



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111138540 B

(45) 授权公告日 2023. 07. 25

(21) 申请号 202010031615.6

(22) 申请日 2015.04.30

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 111138540 A

(43) 申请公布日 2020.05.12

(30) 优先权数据

61/986,742 2014.04.30 US

(62) 分案原申请数据

201580029793.2 2015.04.30

(73) 专利权人 韩诺生物制药株式会社

地址 韩国大田市

(72) 发明人 金圣旭 朴胜国 丁在甲 安惠敬

金旼善 金银善 龙海英 申东玉

宋连情 柳泰亨

(74) 专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司

72003

专利代理师 付文川 吴小瑛

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

A61P 25/08 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

A61P 7/06 (2006.01)

A61P 21/04 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/564 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 102149729 A, 2011.08.10

KR 20130071961 A, 2013.07.01

CA 3089517 A1, 2014.02.06

孙巍等. 治疗性抗体: 炎性免疫性疾病治疗的新选择. 《药学学报》. 2012, 第47卷(第10期), 第1306-1316页.

Susan C Low等. Inhibitors of the FcRn: IgG protein-protein interaction. 《AAPS J》. 2009, 第11卷(第3期), 第432-434页.

审查员 杨莽嘉

权利要求书2页 说明书29页

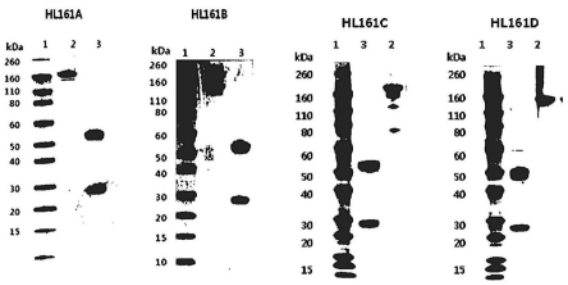
序列表16页 附图9页

(54) 发明名称

治疗自身免疫疾病的结合FCRN的抗体

(57) 摘要

本公开涉及治疗自身免疫疾病的结合FCRN的抗体, 具体而言, 涉及分离的抗FcRn抗体或其片段, 其制备方法、包含该抗体的用于治疗自身免疫疾病的组合物和使用该抗体治疗和诊断自身免疫疾病的方法, 其中所述抗体是与FcRn (代表新生Fc受体, 也称作FcRP、FcRB或Brambell受体) 结合的抗体, 所述FcRn是对IgG具有高亲和力的受体。本公开的FcRn特异性抗体与IgG非竞争性地结合FcRn, 以减少血清致病性自身抗体水平, 并且因此可以用于治疗自身免疫疾病。



1. 一种分离的抗FcRn抗体或其抗原结合片段,其包含:
重链可变区,其包含氨基酸序列如SEQ ID No:21所示的CDR1、氨基酸序列如SEQ ID No:22所示的CDR2和氨基酸序列如SEQ ID No:23所示的CDR3,和轻链可变区,其包含氨基酸序列如SEQ ID No:24所示的CDR1、氨基酸序列如SEQ ID No:25所示的CDR2和氨基酸序列如SEQ ID No:26所示的CDR3。
2. 一种分离的抗FcRn抗体或其抗原结合片段,其包含:
氨基酸序列如SEQ ID No:2所示的重链可变区和氨基酸序列如SEQ ID No:12所示的轻链可变区。
3. 根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是单克隆抗体或嵌合抗体。
4. 根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是鼠抗体或人源化抗体。
5. 根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是人抗体。
6. 根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含全长抗体、Fab、F(ab')₂、Fd、Fv、scFv、结构域抗体、双重特异性抗体、微型抗体、scap、多特异性抗体、胞内抗体、小模块免疫药物(SMIP)或结合结构域免疫球蛋白融合蛋白。
7. 根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体包括IgD抗体、IgE抗体、IgM抗体、IgG1抗体、IgG2抗体、IgG3抗体、IgG4抗体。
8. 一种多核苷酸,其编码根据权利要求1至7中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。
9. 一种编码抗FcRn抗体或其抗原结合片段的多核苷酸,其包含:
SEQ ID No:1的编码重链可变区的序列和SEQ ID No:11的编码轻链可变区的序列。
10. 一种重组表达载体,其包含根据权利要求8或9所述的多核苷酸。
11. 一种宿主细胞,其用权利要求10所述的重组表达载体转染。
12. 一种制备抗FcRn抗体或其抗原结合片段的方法,包括:
培养权利要求11所述的宿主细胞并且从中产生抗体;和
分离和纯化产生的抗体以回收与FcRn特异性结合的抗体。
13. 一种药物组合物,其包含权利要求1至7中任一项所述的抗体或其抗原结合片段和一种或多种可药用载体。
14. 权利要求13所述的药物组合物在制备用于治疗患有自身免疫疾病的患者的药物中的用途。
15. 根据权利要求14所述的用途,其中所述自身免疫疾病是选自以下的一种:免疫中性粒细胞减少症、Guillain-Barre综合征、癫痫、自身免疫脑炎、Isaac综合征、痣综合征、寻常天疱疮、落叶型天疱疮、大疱性类天疱疮、获得性大疱性表皮松解症、妊娠性类天疱疮、粘膜类天疱疮、抗磷脂综合征、自身免疫贫血、自身免疫Grave病、Goodpasture综合征、重症肌无力、多发性硬化、类风湿性关节炎、狼疮、特发性血小板减少性紫癜、狼疮性肾炎和膜性肾病。
16. 一种组合物,其包含用检测标记物标记的权利要求1至7中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。
17. 一种非诊断目的的在体外检测FcRn的方法,所述方法包括使用权利要求1至7中任

一项所述的抗体或其抗原结合片段。

治疗自身免疫疾病的结合FCRN的抗体

[0001] 本申请是申请号为201580029793.2,申请日为2015年4月30日,发明名称为“治疗自身免疫疾病的结合FCRN的抗体”的中国专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本公开涉及分离的抗FcRn抗体或其片段,其制备方法、包含该抗体的用于治疗自身免疫疾病的组合物和使用该抗体治疗和诊断自身免疫疾病的方法,所述抗体是与FcRn(代表新生Fc受体,也称作FcRP、FcRB或Brambell受体)结合的抗体,所述FcRn是对IgG具有高亲和力的受体。本公开的FcRn特异性抗体与IgG非竞争性地结合FcRn,以减少血清致病性自身抗体水平,并且因此可以用于治疗自身免疫疾病。

背景技术

[0003] 抗体是与特定抗原结合的免疫蛋白质。在包括人和小鼠在内的大部分动物中,抗体由配对的重链和轻链多肽构成并且每条链由称作可变区和恒定区的两个不同区域组成。轻链可变区和重链可变区在抗体之间显示显著的序列多样性,并且负责结合靶抗原。恒定区显示较小的序列多样性,并且负责结合众多天然蛋白质以激发重要的生物化学事件。

[0004] 在正常条件下,人类大部分IgG(不包括IgG3同种型)在血清中的半寿期是约22-23天,这个时间相对于其他血浆蛋白的血清半寿期而言较长。对于IgG的这种较长的血清半寿期,通过内吞过程进入细胞的IgG可以在pH 6.0与内体中的新生Fc受体(FcRn,一种Fc γ 受体)强结合以避免降解性溶酶体途径。当IgG-FcRn复合物循环到质膜时,IgG在血流中在略碱性pH(约7.4)从FcRn快速地解离。通过这种受体介导的再生机制,FcRn有效地在溶酶体中拯救IgG免于降解,从而延长IgG的半寿期(Roopenian等人,J.Immunol.170:3528,2003)。

[0005] 在新生大鼠消化道中鉴定到FcRn,它在此发挥作用以介导从母体乳汁吸收IgG抗体并促进其运输至循环系统。FcRn还已经从人胎盘分离得到,它在此介导吸收母源IgG并运输至胎儿循环。在成人中,FcRn在众多组织中表达,包括肺、肠、肾的上皮组织以及鼻、阴道和胆道表面。

[0006] FcRn是非共价异二聚体,通常存在于内皮细胞和上皮细胞的内体中。FcRn是具有三个重链 α 结构域($\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$)和单个可溶性轻链 $\beta 2$ -微球蛋白($\beta 2m$)结构域的膜结合型受体。在结构上,它属于以 $\beta 2m$ 作为共同轻链的主要组织相容性复合体I类分子家族。FcRn链具有约46kD的分子量,并且由含有 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$ 重链结构域和 $\beta 2m$ 轻链结构域且具有单条糖链、单次跨膜和相对短的胞质尾的胞外结构域组成。

[0007] 为了研究FcRn对IgG稳态的贡献,已经对小鼠进行工程化,使编码 $\beta 2m$ 和FcRn重链的基因的至少部分已经“敲除”,从而不表达这些蛋白质。在这些小鼠中,IgG的血清半寿期和浓度大幅度降低,这提示了IgG稳态的FcRn依赖性机制。还已经提出可以在这些FcRn敲除小鼠中生成抗人FcRn抗体并且这些抗体可以阻止IgG与FcRn的结合。对IgG与FcRn结合的抑制因阻止IgG再生而不利地改变IgG血清半寿期,从而可以治疗由自身抗体引起的自身免疫疾病。在自身免疫性皮肤大疱病的小鼠模型中显示了这种可能性(Li等人,

J.Clin.Invest.115:3440,2005)。因此,阻断或拮抗IgG与FcRn结合的药物可以用于治疗或预防IgG介导的自身免疫疾病和炎性疾病的方法。

[0008] “自身免疫疾病”涵盖当身体的免疫系统因不能找到原因的免疫系统异常而攻击其自身正常组织、器官或其他体内组分时发生的疾病。这些自身免疫疾病是可以在身体的几乎全部部位(包括神经系统、胃肠系统、内分泌系统、皮肤、骨骼系统和血管组织)中出现的全身性疾病。已知自身免疫疾病侵袭约5-8%的世界人口,但是报告的自身免疫疾病患病率低于实际水平,原因是对自身免疫疾病的理解及诊断这些疾病方法的局限性。

[0009] 已经在遗传、环境和免疫因素方面对自身免疫疾病的病因进行了长期研究,但是仍未得到明确鉴别。最近的许多研究揭示,多种自身免疫疾病是由IgG型自身抗体引起的。实际上,根据对疾病和自身免疫疾病治疗的研究,已经广泛地鉴定了在疾病特异性自身抗体有无和治疗自身免疫疾病之间的关系。因此,已经鉴定了大量自身免疫疾病中疾病特异性自身抗体的存在及其病理学的作用,并且当目的自身抗体从血液移除时,可以获得迅速治疗疾病的效果。

[0010] 自身免疫疾病和同种异型免疫性疾病由致病性抗体介导,并且其常见例子包括免疫中性粒细胞减少症、Guillain-Barre综合征、癫痫、自身免疫脑炎、Isaac综合征、痣综合征、寻常天疱疮、落叶型天疱疮、大疱性类天疱疮、获得性大疱性表皮松解症、妊娠性类天疱疮、粘膜类天疱疮、抗磷脂综合征、自身免疫贫血、自身免疫Grave病、Goodpasture综合征、重症肌无力、多发性硬化、类风湿性关节炎、狼疮、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、狼疮性肾炎或膜性肾病或其他。

[0011] 例如,已知在重症肌无力(MG)的情况下,位于随意肌的神经肌肉交界处的乙酰胆碱受体(AChR)被针对所述受体的自身抗体摧毁或阻断,从而破坏随意肌的功能。还已知,当这类自身抗体减少时,肌肉的功能得到恢复。

[0012] 对于ITP的情况,ITP是因产生与特定血小板膜糖蛋白结合的自身抗体而破坏外周血小板所引起的疾病。抗血小板抗体调理血小板并且导致血小板被网状细胞(例如,巨噬细胞)迅速破坏。

[0013] 通常,治疗ITP的尝试包括抑制免疫系统,并且因此引起血小板水平上升。相对于男性而言ITP更频繁地侵袭女性,并且相比于成人而言在儿童中更常见。发生率是1/10,000人。慢性ITP是成人和儿童中的重大血液疾病之一。在美国和全世界的血液病专科,慢性ITP产生大量住院与治疗费用。每年美国出现大约20,000个新病例,并且ITP护理和特效疗法的费用极高。大部分ITP儿童具有很低的血小板计数而造成突然出血,伴随的常见症状包括青肿、皮肤上小红点、鼻出血和牙龈出血。尽管儿童可能有时在不治疗的情况下恢复,但是许多医生推荐仔细观察并减轻出血和 γ 球蛋白静脉内输注治疗。

[0014] 已知自身免疫疾病狼疮性肾炎的重要发病机制是,增加的免疫复合物(这可能由于不适宜地过量产生自身抗体如抗核抗体而出现)在系统器官中积累以造成炎症反应。约40-70%的狼疮患者出现肾受累,并且约30%的患者发展成狼疮性肾炎,已知这是狼疮患者的不利预后因素。虽然尚未尝试使用免疫抑制剂治疗狼疮性肾炎的方法,但是据报道在约22%的狼疮性肾炎患者中没有引起缓解,甚至当使用免疫抑制剂时也是如此。另外,据报道当减少免疫抑制剂的使用时,即便是引起缓解的情况下,有10-65%的患者复发狼疮性肾炎。最终,5-10%的严重狼疮性肾炎(WHO III和IV级)患者在10年后死亡,并且5-15%的患

者进入终末期肾阶段。因此,尚未报道有适宜的狼疮性肾炎疗法。

[0015] 因此,使用具有通过清除致病性自身抗体治疗自身免疫疾病的新机理的抗体预计具有对抗致病性IgG介导的自身免疫疾病(如寻常天疱疮、视神经脊髓炎和重症肌无力)以及免疫复合物介导的肾小球疾病(如狼疮性肾炎或膜肾病)的治疗效果。

[0016] 已经广泛使用通过静脉内大量施用IgG (IVIG) 治疗自身免疫疾病的方法 (Arnson Autoimmunity 42:553,2009)。IVIG的效果由多种机制解释,另外还由与内源IgG竞争FcRn而增加致病性抗体清除的机制解释。已经显示,静脉内大量施用人免疫球蛋白 (IVIG) 增加了免疫性ITP患儿中的血小板计数,并且已经显示IVIG作为疗法有益于几种其他自身免疫病症。许多研究已经研究了IVIG在治疗自身免疫疾病方面产生效果的机理。对于ITP,早期研究得出以下结论:IVIG效果主要归因于对负责吞噬抗体调理的血小板的Fc受体的阻断作用。后续研究显示,Fc耗尽的IVIG制剂引起一些ITP患者中血小板计数升高,并且最近报道IVIG效果归因于刺激巨噬细胞细胞上Fc γ RIIb表达,从而导致抑制血小板吞噬过程。

[0017] 然而,这类IVIG治疗具有大量副作用并且对使用者而言非常昂贵。另外,除IVIG之外,用于治疗自身免疫/同种异型免疫病症的其他疗法包括多克隆抗D免疫球蛋白、皮质类固醇类、免疫抑制剂(包括化疗药)、细胞因子、血浆分离、体外抗体吸附(例如,使用Prosorba柱)、手术介入如脾切除术和其他。但是,如同IVIG,这些疗法复杂,疗效不完全且费用高。另外,需要极高剂量的IVIG以引起致病性抗体的清除明显增长,原因在于IVIG抑制致病性抗体结合FcRn(即,竞争性抑制)的推定机制和以下事实:IgG在生理pH(即,pH 7.2-7.4)对FcRn显示很低的亲和力,并且IVIG的常见临床剂量是约2g/kg。

[0018] 使用竞争性抑制IgG与FcRn结合的抑制剂治疗自身免疫疾病是一种有前景的治疗方法。然而,由于内源IgG对FcRn的高亲和力和血液中内源IgG的高浓度,FcRn的竞争性抑制将有可能需要极高剂量,并因此具有类似于现有IVIG治疗的相同局限性。

[0019] 因此,虽然抗FcRn抗体在WO 2006/118772、WO 2007/087289、WO 2009/131702、WO 2012/167039中公开,但迫切需要开发对FcRn具有高亲和力并且因此可以甚至在低剂量移除致病性抗体并降低免疫原性的改进型人抗体。

发明内容

[0020] 技术问题

[0021] 发明人已经做出充分努力以解决上述问题并提供有效且根本上治疗自身免疫疾病(包括ITP)的药物,并且最终提供对FcRn具有高亲和力的抗体或其片段及其制备方法。与FcRn结合的抗体或其片段,以pH非依赖性方式与FcRn链特异性结合并且以非竞争性方式干扰抗体的Fc与FcRn的结合,从而通过减少体内的可能引起自身免疫疾病的自体抗体,治疗自身免疫疾病。

[0022] 本公开的目的是提供一种治疗自身免疫疾病的药物组合物,所述药物组合物包含与FcRn结合的抗体,其中自身免疫疾病是免疫中性粒细胞减少症(immune neutropenia)、Guillain-Barre综合征(Guillain-Barre syndrome)、癫痫(epilepsy)、自身免疫脑炎(autoimmune encephalitis)、Isaac综合征(Isaac's syndrome)、痣综合征(nevus syndrome)、寻常天疱疮(pemphigus vulgaris)、落叶型天疱疮(Pemphigus foliaceus)、大疱性类天疱疮(Bullous pemphigoid)、获得性大疱性表皮松解症(epidermolysis bullosa)

acquisita)、妊娠性类天疱疮 (pemphigoid gestationis)、粘膜类天疱疮 (mucous membrane pemphigoid)、抗磷脂综合征 (antiphospholipid syndrome)、自身免疫贫血 (autoimmune anemia)、自身免疫Grave病 (autoimmune Grave's disease)、Goodpasture综合征 (Goodpasture's syndrome)、重症肌无力 (myasthenia gravis)、多发性硬化 (multiple sclerosis)、类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis)、狼疮 (lupus)、特发性血小板减少性紫癜 (idiopathic thrombocytopenic purpura)、狼疮性肾炎 (lupus nephritis) 和膜性肾病 (membranous nephropathy) 等。

[0023] 技术解决方案

[0024] 为了实现以上目的,本公开提供一种分离的抗FcRn抗体或其片段,所述抗体包含:

[0025] 包含选自SEQ ID No:21、24、27、30、33、36、39和42的一个或多个氨基酸序列的CDR1;

[0026] 包含选自SEQ ID No:22、25、28、31、34、37、40和43的一个或多个氨基酸序列的CDR2;和

[0027] 包含选自SEQ ID No:23、26、29、32、35、38、41和44的一个或多个氨基酸序列的CDR3。

[0028] 另外,本公开提供一种分离的抗FcRn抗体或其片段,所述抗体包含:

[0029] 包含氨基酸序列的CDR1,所述氨基酸序列与选自SEQ ID No:21、24、27、30、33、36、39和42的一个或多个氨基酸序列具有至少90%同源性;

[0030] 包含氨基酸序列的CDR2,所述氨基酸序列与选自SEQ ID No:22、25、28、31、34、37、40和43的一个或多个氨基酸序列具有至少90%同源性;和

[0031] 包含氨基酸序列的CDR3,所述氨基酸序列与选自SEQ ID No:23、26、29、32、35、38、41和44的一个或多个氨基酸序列具有至少90%同源性。

[0032] 另外,本公开提供一种分离的抗FcRn抗体,所述抗体包含一个或多个重链可变区和轻链可变区,所述可变区包含选自SEQ ID No:2、4、6、8、10、12、14、16、18和20的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸序列。

[0033] 另外,本公开提供一种分离的抗FcRn抗体,所述抗体包含一个或多个重链可变区和轻链可变区,所述可变区包含氨基酸序列,所述氨基酸序列与选自SEQ ID No:2、4、6、8、10、12、14、16、18和20的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸序列具有至少90%同源性。

[0034] 另外,本公开提供编码抗FcRn抗体或其片段的多核苷酸。

[0035] 另外,本公开提供编码抗FcRn抗体的多核苷酸,所述多核苷酸包含选自SEQ ID No:1、3、5、7、9、11、13、15、17和19的一个或多个序列。

[0036] 另外,本公开提供编码抗FcRn抗体的多核苷酸,所述多核苷酸包含序列,所述序列与选自SEQ ID No:1、3、5、7、9、11、13、15、17和19的一个或多个序列具有至少90%同源性。

[0037] 另外,本公开提供包含多核苷酸的重组表达载体、用重组表达载体转染的宿主细胞。本公开额外地提供一种制备与FcRn特异性结合的抗体或其片段的方法,所述方法包括:培养宿主细胞并从中产生抗体;以及分离和纯化产生的抗体以回收抗FcRn抗体。

[0038] 另外,本公开提供一种药物组合物,所述药物组合物包含抗FcRn抗体或其片段和一种或多种可药用载体。

[0039] 另外,本公开提供一种治疗患有自身免疫疾病的患者的方法,所述方法包括向所

述患者施用所述组合物。

[0040] 另外,本公开提供一种组合物,所述组合物包含用检测标记物标记的抗体。

[0041] 另外,本公开提供一种在体内或在体外检测FcRn的方法,所述方法包含使用抗FcRn抗体或其片段。

[0042] 有利效果

[0043] 对FcRn特异的本发明抗体或其片段具有高亲和力和特异性,所述FcRn是对IgG具有高亲和力的受体,从而造成很少或不造成免疫原性相关的问题,并且以不与IgG竞争的方式与FcRn结合以减少血清自身抗体水平。通过这类特性,所述抗体或其片段可用于治疗和诊断自身免疫疾病。

附图说明

[0044] 图1显示分析CHO-S细胞中抗体表达以及在还原或非还原条件下在SDS-PAGE凝胶上分析通过蛋白A纯化获得的HL161A、HL161B、HL161C和HL161D抗体蛋白的结果。结果显示,在非还原条件下,每种HL161抗体均具有大小约160kDa的完整人IgG1型结构,并且在还原条件下,重链大小约55kDa,并且轻链大小约25kDa,这显示抗体由常规抗体亚基组成。在图1中,泳道1代表分子量(M.W.)标志物,泳道2代表2 μ g非还原(*NEM处理的)抗体,并且通道3代表2 μ g还原的抗体。

[0045] 图2显示为了确定4种与FcRn结合的抗FcRn抗体(HL161A、HL161B、HL161C和HL161D)的动力学解离(KD),使用SPR系统进行分析的结果。通过使用Proteon GLC芯片和Proteon XPR36(Bio-Rad)系统分析人FcRn和HL161A、HL161B、HL161C或HL161D抗体之间在pH 6.0和pH 7.4的相互作用,获得图2的结果:

[0046] 图2a显示pH 6.0时人FcRn和HL161A抗体之间相互作用的分析结果。

[0047] 图2b显示pH 7.4时人FcRn和HL161A抗体之间相互作用的分析结果。

[0048] 图2c显示pH 6.0时人FcRn和HL161B抗体之间相互作用的分析结果。

[0049] 图2d显示pH 7.4时人FcRn和HL161B抗体之间相互作用的分析结果。

[0050] 图2e显示pH 6.0时人FcRn和HL161C抗体之间相互作用的分析结果。

[0051] 图2f显示pH 7.4时人FcRn和HL161C抗体之间相互作用的分析结果。

[0052] 图2g显示pH 6.0时人FcRn和HL161D抗体之间相互作用的分析结果。

[0053] 图2h显示pH 7.4时人FcRn和HL161D抗体之间相互作用的分析结果。

[0054] 图3显示选择的两个抗体与细胞表面结合的能力,并且显示通过用所选择的与HEK293细胞表面上存在的人FcRn结合的HL161A抗体和HL161B抗体处理过量表达人FcRn的HEK293细胞并分析在pH 6.0和pH 7.4时抗体与细胞表面结合所获得的结果。HL161A抗体和HL161B抗体各自与人FcRn的结合表述为通过在不同pH用每种抗体处理细胞后使用Alexa488-标记的抗人山羊抗体进行荧光激活细胞分选(FACS)获得的MFI值。

[0055] 图4显示了分析阻断人IgG在pH 6.0与表达人FcRn的细胞结合的能力的结果,并且显示了两种选定抗体与细胞表面人FcRn的结合是否可以在细胞水平阻断人IgG与人FcRn结合的观察结果。通过从200nM连续4倍稀释经证实与过量表达人FcRn的HEK293细胞结合的HL161A抗体和HL161B抗体每一者,获得了阻断Alexa488标记的人IgG与人FcRn结合的能力的曲线。

[0056] 图5a和图5b显示了选自表达人FcRn的转基因小鼠Tg32 (hFcRn+/+、h β 2m+/+、mFcRn-/-、m β 2m-/-)的HL161A抗体和HL161B抗体对IgG1分解代谢的影响的分析结果。在0小时,将5mg/kg生物素-hIgG和495mg/kg人IgG腹腔内施用至体内以使IgG饱和。关于药物施用,在施用生物素-IgG后24、48、72和96小时,将IgG1、HL161A、HL161B或PBS按剂量5、10和20mg/kg一日一次腹腔内注射。在施用生物素-IgG后24、48、72、96、120和168小时进行样品采集。在24、48、72和96小时,在药物施用前采集血液,并且通过ELISA方法分析剩余量的生物素-IgG。结果表述为在每个时间点的剩余量与在24小时采集的血液样品中100%的剩余量的比率。

[0057] 图6显示分析通过施用两种抗体(HL161A和HL161B)至与人FcRn具有96%序列同源性的食蟹猴所引起的猴IgG血液水平变化的结果。将HL161A抗体和HL161B抗体各自按剂量5和20mg/kg一日一次静脉内施用至食蟹猴,并且结果显示,与0小时相比猴IgG减少多达70%,并且直至第29天减少约30%。

[0058] 图6a显示HL161A抗体和HL161B抗体在不同抗体浓度时的血清IgG减少作用。

[0059] 图6b显示猴个体中HL161A抗体和HL161B抗体(浓度:5mg/kg)的血清IgG减少作用。

[0060] 图6c显示猴个体中HL161A抗体和HL161B抗体(浓度:20mg/kg)的血清IgG减少作用。

[0061] 图7a和图7b显示在使用食蟹猴进行的实验中分析HL161A和HL161B的药代动力学曲线的结果。显示与HL161A相比,HL161B总体具有高的半寿期AUC和C_{max}。

[0062] 图8a至图8c显示在使用食蟹猴进行的实验中,分析通过施用HL161A抗体和HL161B抗体引起的猴IgM、IgA和白蛋白的血液水平变化的结果。猴IgM、IgA和白蛋白的血液水平存在轻微变化,这些变化处于食蟹猴的正常范围内,这表明这类变化因个体之间的差异所致,而非测试物质的影响所致。

[0063] 图8a显示猴的血清IgM水平的变化。

[0064] 图8b显示猴的血清IgA水平的变化。

[0065] 图8显示猴的血清白蛋白水平的变化。

具体实施方案

[0066] 为了实现上述目的,本公开提供一种抗体,所述抗体可以按pH非依赖性方式以高亲和力与FcRn特异性结合并且由人衍生的序列组成,并且因此在体内施用时造成很少或不造成免疫应答。

[0067] 本公开的抗体是对FcRn具有特异性的结合分子。抗体可以包括单克隆抗体(例如,具有免疫球蛋白Fc结构域的全长抗体),具有多表位特异性的抗体组合物,双特异性抗体,双体抗体,和单链分子,以及抗体片段(例如,Fab、F(ab')₂和Fv),但是不限于此。根据本公开的抗体可以例如是针对人FcRn的单克隆抗体。

[0068] 单克隆抗体包括鼠抗体。另外,单克隆抗体包括这样的“嵌合抗体”以及这类抗体的片段,其中重链和/或轻链的部分与源自特定物种(如鼠)或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,同时所述链的其余部分与源自另一个物种或属于另一个抗体类别或亚类(如人类)的抗体的相应序列相同或同源,只要它们显示所需的生物活性。使用“人源化抗体”作为“嵌合抗体”的下游集合。

[0069] 作为人源化的备选,可以产生人抗体。“人抗体”是由人产生的或具有与使用任何人抗体产生技术产生的抗体相对应的氨基酸序列的抗体。人抗体可以使用本领域已知的各种技术(包括噬菌体展示文库)产生。可以通过施用抗原至转基因动物制备人抗体,其中所述转基因动物已经被修饰从而响应于抗原攻击而产生此类抗体,但是其内源基因座已经失能,例如,免疫的xenomice。本公开的抗体可以例如是人抗体的形式。

[0070] 天然四链抗体是由两条相同轻链(L)和两条相同重链(H)组成的异四聚体糖蛋白。每条轻链在一端具有具有可变结构域(V_L)并在另一端具有恒定结构域。在N端,每条重链具有一个可变结构域(V_H),并且对于 α 链和 γ 链具有3个恒定结构域(C_H),对于 μ 和 ϵ 同种型具有4个CH结构域。

[0071] 术语“可变”指抗体之间可变结构域的某些部分在序列方面广泛不同的事实。V结构域介导抗原结合并界定特定抗体针对其特定抗原的特异性。然而,可变性集中在三个区段(称作高变区(HVR))内,即轻链可变结构域和重链可变结构域中的CDR。可变结构域的较高度保守部分称作框架区(FR)。轻链可变结构域和重链可变结构域从N端至C末端包含结构域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。

[0072] 在本公开中,使用人免疫球蛋白转基因动物获得了对人FcRn具有亲和力和特异性的抗体。转基因动物可以通过失活动物的Ig种系基因并植入人Ig种系基因基因座产生。使用转基因动物具有以下优点:抗体由动物免疫系统天然地优化,而不需要亲和力成熟,从而可以短时间内开发具有低免疫原性和高亲和力的抗体药物(US 20090098134, US 20100212035, Menoret等人, Eur J Immunol, 40:2932, 2010)。

[0073] 在本公开中,使用了具有人免疫球蛋白转基因大鼠专利的技术的OmniRatTM(OMT, 美国)。OmniRatTM可以高效地选择对人FcRn具有高亲和力的抗体,因为它具有来自大鼠基因的CH2和CH3结构域以及来自人基因的V区、D区和J区和CH1结构域组成的重链,以及来自人类的 κ 轻链和 λ 轻链,从而有效地选择对人FcRn具有高亲和力的抗体(Menoret等人, Eur J Immunol, 40:2932, 2010)。

[0074] 为了获得对FcRn具有高亲和力的单克隆抗体,通过在其中注射人FcRn免疫转基因大鼠(OmniRatTM),并且随后从细胞提取B细胞并且使其与骨髓瘤细胞融合以产生杂交瘤,此后从生成的杂交瘤纯化产生的抗体。

[0075] 本公开的抗体充当与FcRn结合的非竞争性IgG抑制剂。本公开抗体与FcRn的结合导致了对针对FcRn的致病性抗体的抑制,这促进从受试者的身体清除(即,移除)致病性抗体,从而减少致病性抗体的半寿期。

[0076] 如本文所用,术语“致病性抗体”意指造成病理状况或疾病的抗体。这类抗体的例子包括但不限于抗血小板抗体、抗乙酰胆碱抗体、抗核酸抗体、抗磷脂抗体、抗胶原蛋白抗体、抗神经节苷脂抗体、抗桥粒芯蛋白抗体等。

[0077] 本公开的抗体或其片段的优点在于,它可以在生理pH(即, pH 7.0-7.4)下非竞争性地抑制致病性抗体与FcRn的结合。FcRn与其配体(即, IgG)结合,并且在生理pH而非酸性pH,对IgG基本上不显示亲和力。因此,在生理pH与FcRn特异性结合的抗FcRn抗体充当IgG与FcRn结合的非竞争性抑制剂,并且在这种情况下,抗FcRn抗体与FcRn的结合不受存在的IgG的影响。因此,以pH非依赖性方式与IgG非竞争地结合FcRn的本发明抗体具有胜过常规竞争性抑制剂(即,与IgG竞争性结合FcRn的抗体)的优点:通过FcRn介导的IgG信号传导它甚至

可以在显著低的浓度的情况下治疗疾病。此外,在结合于FcRn的状态下的胞内移行过程中,本公开的抗FcRn抗体以高于血液IgG的亲合力维持其与FcRn的结合,并且因此可以甚至在内体中(IgG可以与FcRn结合的酸性pH环境)抑制IgG与FcRn结合,从而促进IgG的清除。

[0078] 本公开的抗体甚至在IgG不与FcRn结合的生理pH环境(即,pH 7.0-7.4)下,也对FcRn具有亲合力。在pH 6.0,与血清IgG相比,本公开的抗体对FcRn具有更高亲合力,显示它充当非竞争性抑制剂。

[0079] 在本公开的一个实施方案中,本公开涉及与FcRn特异性结合的抗体或其片段,其包含:

[0080] 包含氨基酸序列的CDR1,所述氨基酸序列与选自SEQ ID No:21、24、27、30、33、36、39和42的一个或多个氨基酸序列具有至少90%同源性;

[0081] 包含氨基酸序列的CDR2,所述氨基酸序列与选自SEQ ID No:22、25、28、31、34、37、40和43的一个或多个氨基酸序列具有至少90%同源性;和

[0082] 包含氨基酸序列的CDR3,所述氨基酸序列与选自SEQ ID No:23、26、29、32、35、38、41和44的一个或多个氨基酸序列具有至少90%同源性。

[0083] 本领域技术人员将理解,在以上SEQ ID No中所述的氨基酸序列内缺失、添加或置换一些氨基酸也落在本公开的范围内。

[0084] 此外,与本公开中所述的核苷酸序列和氨基酸序列具有某个范围内的同源性的序列也落于本公开的范围内。“同源性”指与选自SEQ ID No:1至44的至少一个核苷酸序列或氨基酸序列的相似性,并且包括至少90%的同源性。优选地,同源性可能是至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%。同源性对比以目视方式或使用已知的比较程序如BLAST算法以标准设定进行。市售程序可以将两个或更多个序列之间的同源性表述为百分数。可以对毗邻序列计算同源性(%)。

[0085] 另外,与FcRn特异性结合的在pH 6.0和pH 7.4具有KD(解离常数)0.01-2nM的抗体也落于本公开的范围内。如本文所用的“KD”指抗体-抗原结合的平衡解离常数,并且可以使用以下等式计算: $KD = k_d / k_a$,其中 k_a 表示结合速率常数,并且 k_d 表示解离速率常数。 k_d 或 k_a 的测量可以在25℃或37℃进行。

[0086] 在一个例子中,本公开的抗体包含了:包含SEQ ID No:21的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID No:22的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID No:23的氨基酸序列的CDR3,

[0087] 包含SEQ ID No:27的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID No:28的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID No:29的氨基酸序列的CDR3,

[0088] 包含SEQ ID No:33的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID No:34的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID No:35的氨基酸序列的CDR3,或

[0089] 包含SEQ ID No:39的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID No:40的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID No:41的氨基酸序列的CDR3。

[0090] 在以上SEQ ID No中所述的氨基酸序列可以是与重链可变区的CDR1至CDR3相对应的氨基酸序列。

[0091] 在另一个例子中,本公开的抗体或抗原结合片段包含了:

[0092] 包含SEQ ID No:24的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID No:25的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID No:26的氨基酸序列的CDR3,

[0093] 包含SEQ ID No:30的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID No:31的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID No:32的氨基酸序列的CDR3,

[0094] 包含SEQ ID No:36的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID No:37的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID No:38的氨基酸序列的CDR3,或

[0095] 包含SEQ ID No:42的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID No:43的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID No:44的氨基酸序列的CDR3。

[0096] 在以上SEQ ID No中所述的氨基酸序列可以是与轻链可变区的CDR1至CDR3相对应的氨基酸序列。

[0097] 具体而言,本公开的抗体或抗原结合片段包含:选自以下的一个或多个重链可变区和轻链可变区:

[0098] 重链可变区,其包含了包含SEQ ID No:21的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID No:22的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID No:23的氨基酸序列的CDR3,和轻链可变区,其包含了包含SEQ ID No:24的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID No:25的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID No:26的氨基酸序列的CDR3;

[0099] 重链可变区,其包含了包含SEQ ID No:27的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID No:28的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID No:29的氨基酸序列的CDR3,和轻链可变区,其包含了包含SEQ ID No:30的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID No:31的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID No:32的氨基酸序列的CDR3;

[0100] 重链可变区,其包含了包含SEQ ID No:33的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID No:34的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID No:35的氨基酸序列的CDR3,和轻链可变区,其包含了包含SEQ ID No:36的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID No:37的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID No:38的氨基酸序列的CDR3;和

[0101] 重链可变区,其包含了包含SEQ ID No:39的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID No:40的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID No:41的氨基酸序列的CDR3,和轻链可变区,其包含了包含SEQ ID No:42的氨基酸序列的CDR1、包含SEQ ID No:43的氨基酸序列的CDR2和包含SEQ ID No:44的氨基酸序列的CDR3。

[0102] 在一个例子中,本公开的抗体或抗原结合片段包含一个或多个重链可变区和轻链可变区,所述可变区包含选自SEQ ID No:2、4、6、8、10、12、14、16、18和20的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸序列。

[0103] 具体地,本公开的抗体或抗原结合片段包含了包含SEQ ID No:2、4、6、8或10的氨基酸序列的重链可变区,和/或包含SEQ ID No:12、14、16、18或20的氨基酸序列的轻链可变区。

[0104] 详细地,本公开的抗体或抗原结合片段包含选自以下的一个或多个重链可变区和轻链可变区:

[0105] 包含SEQ ID No:2的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID No:12的氨基酸序列的轻链可变区;

[0106] 包含SEQ ID No:4的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID No:14的氨基酸序列的轻链可变区;

[0107] 包含SEQ ID No:6的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID No:16的氨基酸序列

的轻链可变区；

[0108] 包含SEQ ID No:8的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID No:18的氨基酸序列的轻链可变区；和

[0109] 包含SEQ ID No:10的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID No:20的氨基酸序列的轻链可变区。

[0110] 在这些术语在本文中用来提到抗体时，“片段”或“抗体片段”指衍生自抗体多肽分子的多肽（例如，抗体重链或轻链多肽），所述抗体多肽分子不包括全长抗体多肽，但是仍然包含全长抗体多肽的至少一部分。抗体片段经常包含这样的多肽，所述多肽包含全长抗体多肽的切割部分，不过本术语不限于这类切割的片段。由于片段在本文中用来提到抗体时涵盖这样的片段，所述片段包含从抗体多肽（例如重链或轻链抗体多肽）衍生的单条多肽链，因而应当理解抗体片段本身可以不结合抗原。

[0111] 本公开抗体的片段包括但不限于单链抗体、双特异性、三特异性和多特异性抗体如双体抗体、三体抗体和四体抗体、Fab片段、F(ab')₂片段、Fd、scFv、结构域抗体、双重特异性抗体、微型抗体、scap（固醇调节性结合蛋白切割活化蛋白）、螯合性重组抗体、三体或四体、胞内抗体、纳米体、小模块免疫药物（SMIP）、结合结构域免疫球蛋白融合蛋白、骆驼化抗体、含有VHH的抗体、IgD抗体、IgE抗体、IgM抗体、IgG1抗体、IgG2抗体、IgG3抗体、IgG4抗体、抗体恒定区中的衍生物以及具有与FcRn结合的能力的基于蛋白质支架的合成抗体。本领域技术人员将显而易见，本公开抗体的任何片段将显示与本公开抗体相同的特性。

[0112] 此外，本公开的范围包括在可变区中具有突变的抗体。这类抗体的例子包括在可变区中具有氨基酸残基保守性置换的抗体。如本文所用，术语“保守性置换”指置换为具有与原始氨基酸残基相似的特性的另一个氨基酸残基。例如，赖氨酸、精氨酸和组氨酸具有相似的特性，在于它们具有碱性侧链，并且天冬氨酸和谷氨酸具有相似的特性，在于它们具有酸性侧链。此外，甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸和色氨酸具有相似的特性，在于它们具有不带电荷极性侧链，并且丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸和甲硫氨酸具有相似的特性，在于它们具有非极性侧链。另外，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和组氨酸具有相似的特性，在于它们具有芳族侧链。因此，本领域技术人员将显而易见，甚至当置换如上文所述的显示相似特性的组中的氨基酸残基时，它将不显示特性的特定变化。因此，本公开的范围包括在可变区中具有保守性置换引起的突变的抗体。

[0113] 此外，本公开的抗体或其片段可以作为与另一种物质的缀合物使用。可以作为与本公开抗体或其片段的缀合物使用的物质包括通常用于治疗自身免疫疾病的治疗药、能够抑制FcRn活性的物质，和与抗体物理结合以改善其在循环中（例如在血清、淋巴液或其他组织中）的稳定作用和/或停留的部分。例如，结合FcRn的抗体可以与聚合物（例如，非抗原性聚合物如聚亚烷基氧化物或聚环氧乙烷）结合。合适的聚合物的重量存在大幅度变动。可以使用具有约200至约35,000（或约1,000至约15,000和2,000至约12,500）数均分子量的聚合物。例如，结合FcRn的抗体可以缀合于水溶性聚合物，例如，亲水性聚乙烯聚合物，例如聚乙烯醇和聚乙烯吡咯烷酮。这类聚合物的非限制性列表包括，但不限于聚亚烷基氧化物均聚物如聚乙二醇（PEG）或聚丙二醇、聚氧乙烯化多元醇，其共聚物及其嵌段共聚物，条件是维持了嵌段共聚物的水溶解度。

[0114] 在另一个实施方案中,本公开涉及一种治疗自身免疫疾病的药物组合物,所述药物组合物包含抗FcRn抗体和一种或多种可药用载体。另外,本公开还涉及一种治疗自身免疫疾病的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的与FcRn特异性结合的抗体。

[0115] 药物组合物可以包含本领域熟知的可药用载体、赋形剂等。可药用载体应当与有效成分如本公开的抗体或其片段相容并且可以是生理盐水、无菌水、林格氏溶液、缓冲盐水、右旋糖溶液、麦芽糊精溶液、甘油、乙醇或其两者或更多种者的混合物。此外,如果需要,本公开的药物组合物可以包含其他常规添加物,包括抗氧化剂、缓冲剂和抑菌剂。另外,本公开的药物组合物可以借助稀释剂、分散剂、表面活性剂、粘合剂和润滑剂而配制为可注射形式,如水溶液剂、混悬剂或乳剂。此外,本公开的药物组合物可以通过配制成各种形式如散剂、片剂、胶囊剂、液体剂、注射剂、油膏剂、糖浆剂等以及单剂量或多剂量容器如密封安瓿或小瓶来提供。

[0116] 本公开的药物组合物可以应用于IgG和FcRn介导的全部自身免疫疾病,并且这类自身免疫疾病的常见例子包括但不限于免疫中性粒细胞减少症、Guillain-Barré综合征、癫痫、自身免疫脑炎、Isaac综合征、痣综合征、寻常天疱疮、落叶型天疱疮、大疱性类天疱疮、获得性大疱性表皮松解症、妊娠性类天疱疮、粘膜类天疱疮、抗磷脂综合征、自身免疫贫血、自身免疫Grave病、Goodpasture综合征、重症肌无力、多发性硬化、类风湿性关节炎、狼疮、特发性血小板减少性紫癜、狼疮性肾炎和膜性肾病。

[0117] 在本公开的治疗方法中,可以通过考虑该患者的严重程度、状况、年龄、病史等适当地确定抗体的剂量。例如,抗体可以按1mg/kg至2g/kg的剂量施用。抗体可以是施用一次或几次。

[0118] 本公开还提供一种用于缓解自身免疫病症或同种异型免疫病症的方法,包括向需要治疗的受试者施用本公开的抗体或抗体的片段。本公开还提供特效抗FcRn疗法。

[0119] 可以通过向受试者施用本公开的药物组合物,实现用于缓解自身免疫或同种异型免疫病症的本发明方法或本发明的抗FcRn疗法。本公开的药物组合物可以口服或肠胃外施用。本公开的药物组合物可以通过各种途径施用,包括但不限于口服、静脉内、肌内、动脉内、髓内、硬膜内、心内、透皮、皮下、腹膜内、胃肠道、舌下和局部途径。本公开组合物的剂量可以根据多种因素变动,如患者体重,年龄、性别、健康状况和膳食,施用的时间和方法、排泄速率和疾病严重程度,并且可以由所属领域的技术人员容易地确定。通常,可以将1-200mg/kg且优选1-40mg/kg组合物施用至罹患自身免疫或同种异型免疫病症的患者,并且这些方案优选地设计成减少血清内源IgG浓度至小于治疗前值的75%。间歇和/或长期(持续)给药策略可以根据患者的状况使用。

[0120] 在另一个实施方案中,本公开还提供一种包含本公开抗体或其片段的诊断组合物和使用该诊断组合物的诊断方法。换言之,与FcRn结合的本公开抗体或其片段具有体外和体内诊断用途。

[0121] 在另一个实施方案中,本公开涉及一种检测FcRn的组合物,所述组合物包含抗FcRn抗体或其片段。本公开还提供用于体内或体外检测FcRn的方法、系统或装置,其包括处理抗FcRn抗体。

[0122] 体外检测方法、系统或装置可能例如包括(1)使样品与结合FcRn的抗体接触;(2)检测在结合FcRn的抗体和样品之间形成的复合物;和/或(3)使参比样品(例如,对照样品)

与抗体接触；和(4)通过与参比样品比较，确定抗体和样品之间复合物形成的程度。如与对照样品或受试者中相比，样品或受试者中复合物形成的变化(例如，统计学上的显著变化)表示样品中存在FcRn。

[0123] 体内检测方法、系统或装置可以包括：(1)向受试者施用结合FcRn的抗体；和(2)检测在结合FcRn的抗体和受试者之间复合物的形成。检测可以包括确定形成复合物的位置或时间。结合FcRn的抗体可以直接或间接地用可检测物质标记以促进所结合的或未结合的抗体的检测。合适的可检测物质包括多种酶、辅基、荧光物质、发光物质和放射性物质。可以通过测量与FcRn结合或不结合的抗体或使其可视化，检测在结合FcRn的抗体和FcRn之间的复合物形成。可以使用常规检测测定法，例如，酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)或组织免疫组织化学。除了标记结合FcRn的抗体，还可以通过竞争免疫测定法分析样品中FcRn的存在，所述竞争免疫测定法使用以可检测物质标记的标准物和未标记的结合FcRn的抗体。在这种测定法的一个例子中，将生物样品、标记的标准物和结合FcRn的抗体合并，并且确定未与FcRn结合的标记的标准物的量。生物样品中FcRn的量反比于未结合至FcRn的标记的标准物的量。

[0124] 出于检测目的，本公开的抗体或其片段可以用荧光团和发色团标记。因为抗体和其他蛋白质吸收光具有多达约310nm的波长，所以应当选择在高于310nm和优选地高于400nm的波长具有大量吸收的荧光部分。本公开的抗体或其片段可以用多种合适的荧光剂和发色团标记。一组荧光剂是氧杂蒽染料，其包括荧光素和罗丹明。另一组荧光化合物是萘基胺。一旦用荧光团或发色团标记，则抗体可以用来检测样品中FcRn的存在或其定位，例如，使用荧光显微术(如共聚焦或反卷积显微术)。

[0125] 可以通过各种方法如组织学分析、蛋白质阵列和FACS(荧光激活的细胞分选法)，使用本公开的抗体或其片段检测FcRn的存在或其定位。

[0126] 在本公开中，可以通过一种体内成像方法显示FcRn或表达FcRn的组织在体内的存在。该方法包括(i)向受试者(例如，具有自身免疫疾病的患者)施用与可检测标记物缀合的抗FcRn抗体；和(ii)使受试者暴露于检测所述可检测标记物的手段以显示表达FcRn的组织或细胞。例如，通过NMR或其他断层摄影手段将受试者成像。可用于诊断性成像的标记物的例子包括放射标记物、荧光标记物、正电子发射同位素、化学发光剂和酶促标志物。放射标记的抗体也可以用于体外诊断试验。同位素标记的抗体的比活性取决于放射性标记物的半衰期、同位素纯度以及如何将标记物并入抗体中。

[0127] 本公开还提供一种试剂盒，所述试剂盒包含与FcRn结合的抗体或其片段和诊断使用说明，例如，结合FcRn的抗体或其片段在体外(例如，在样品中，例如，来自具有自身免疫疾病的患者的活组织检查样品或细胞中)或在体内(例如，通过对受试者成像)检测FcRn的用途。试剂盒还可以含有至少一种额外的试剂，如标记物或额外的诊断剂。对于体内使用，抗体可以配制为药物组合物。

[0128] 在另一个实施方案中，本公开涉及编码本公开抗体或其片段的多核苷酸序列。

[0129] 在一个例子中，编码本公开抗体或其片段的多核苷酸序列是这样的序列，其与选自SEQ ID No:1、3、5、7、9、11、13、15、17和19的一个或多个序列具有至少90%同源性，或与上文提到的序列相比时具有超过90%同源性的序列。

[0130] 具体而言，本公开抗体或其片段的多核苷酸序列是这样的序列，所述序列编码本

公开抗体的重链的是SEQ ID No:1、3、5、7或9的序列,和/或是这样的序列,所述序列编码本公开抗体的轻链的是SEQ ID No:11、13、15、17或19的序列。

[0131] 在另一个实施方案中,本公开涉及了包含该多核苷酸的重组表达载体、用该重组表达载体转染的宿主细胞和通过使用重组表达载体和宿主细胞制备与FcRn特异性结合的抗体或其片段的方法。

[0132] 在一个实施方案中,本公开的抗体或其片段优选地使用基因重组方法通过表达和纯化产生。具体而言,通过在独立宿主细胞中表达或在单个宿主细胞中同时表达,产生了编码与FcRn特异性结合的本发明抗体的可变区。

[0133] 如本文所用,术语“重组载体”指能够在合适的宿主细胞中表达目的蛋白的表达载体并且意指包含有效连接的必需调节元件以表达核酸插入物的DNA构建体。如本文所用,术语“有效连接”意指核酸表达控制序列与编码目的蛋白的核酸序列功能性连接,从而执行通用功能。可以使用本领域熟知的基因重组技术,进行与重组载体的有效连接,并且位点特异性DNA切割和连接可以使用本领域公知的酶容易地进行。

[0134] 可以在本公开中使用的合适表达载体可以包括表达调节元件如启动子、操纵基因、起始密码子、终止密码子、多聚腺苷化信号和增强子,以及膜靶向或分泌的信号序列。起始密码子和终止密码子通常视为编码免疫原性靶蛋白的核苷酸序列的部分,并且是在已经施用基因构建体的个体中发挥功能必需的,并且必须符合编码性序列的可读框。启动子可以通常是组成型或诱导型的。原核启动子包括但不限于lac、tac、T3和T7启动子。真核启动子包括但不限于猴病毒40 (SV40) 启动子、小鼠乳腺瘤病毒(MMTV) 启动子、人类免疫缺陷病毒(HIV) 启动子如HIV长末端重复序列(LTR) 启动子、莫洛尼病毒启动子、巨细胞病毒(CMV) 启动子、Epstein Barr病毒(EBV) 启动子、劳斯肉瘤病毒(RSV) 启动子以及来自人类基因如人 β -肌动蛋白、人血红蛋白、人肌肉肌酸和人金属硫蛋白的启动子。表达载体可以包括允许选择含有载体的宿主细胞的选择标记。使用编码下述产物的基因作为通用选择标记,所述产物赋予可选表型,如药物耐药性、养分要求、细胞毒药物耐药性或表面蛋白的表达。由于仅表达选择标记的细胞幸存于选择剂处理的环境中,可以选择转化的细胞。另外,复制型表达载体可以包括复制起点(一种启动复制的特定核酸序列)。可以在本公开中使用的重组表达载体包括多种载体如质粒、病毒和粘粒。不具体限制重组载体的种类并且重组载体可以在各种宿主细胞如原核细胞和真核细胞中发挥作用以表达目的基因并产生所需的蛋白质。然而,优选使用这样的载体,所述载体可以产生大量的与天然蛋白质相似,同时利用显示强力活性的启动子具有强烈的表达能力的外来蛋白。

[0135] 在本公开中,多种表达宿主/载体组合可以用来表达本公开的抗体或其片段。例如,适于真核宿主的表达载体包括但不限于SV40、牛乳头瘤病毒、腺病毒、腺联病毒、巨细胞病毒和逆转录病毒。可以用于细菌宿主的表达载体包括细菌质粒如pET、pRSET、pBluescript、pGEX2T、pUC、colE1、pCR1、pBR322、pMB9及其衍生物,具有较宽宿主范围的质粒如RP4,由多种噬菌体 λ 衍生物代表的噬菌体DNA如gt10、gt11和NM989,和其他DNA噬菌体如M13和丝状单链DNA噬菌体。可用于酵母细胞中的表达载体包括2 μ m质粒及其衍生物。可用于昆虫细胞中的表达载体是pVL941。

[0136] 将重组载体引入宿主细胞以形成转化体。适用于本公开中的宿主细胞包括原核细胞如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、链霉菌属物种(*Streptomyces* sp.)、

假单胞菌属物种(*Pseudomonas* sp.)、奇异变形菌(*Proteus mirabilis*)和葡萄球菌属物种(*Staphylococcus* sp.)、真菌如曲霉属物种(*Aspergillus* sp.)、酵母如巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、裂殖酵母属物种(*Schizosaccharomyces* sp.)和粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)以及真核细胞如低等真核细胞和其他高等真核细胞如昆虫细胞。

[0137] 可以使用在本公开中的宿主细胞优选地衍生自植物和哺乳动物,并且其例子包括但不限于猴肾细胞(COS7)、NS0细胞、SP2/0、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、W138、幼仓鼠肾(BHK)细胞、MDCK、骨髓瘤细胞、HuT78细胞和HEK293细胞。优选地,使用CHO细胞。

[0138] 在本公开中,向宿主细胞中的转染或转化包括可以藉此将核酸引入生物、细胞、组织或器官中的任何方法,并且如本领域已知,可以使用根据宿主细胞种类选择的合适标准技术进行。这些方法包括但不限于电穿孔、原生质体融合、磷酸钙(CaPO_4)沉淀、氯化钙(CaCl_2)沉淀、与碳化硅纤维搅拌、和农杆菌介导、PEG介导、硫酸葡聚糖介导、脂质转染胺(lipofectamine)介导和脱水/抑制介导的转化。

[0139] 本公开的FcRn特异性抗体或其片段可以通过在营养培养基中培养包含重组载体的转化体大量产生,并且在本公开中使用的培养基和培养条件可以根据宿主细胞的种类合适地选择。在培养过程中,可以控制条件,包括温度、培养基pH和培养时间,从而适于细胞生长和大量生产蛋白质。通过如所述的重组方法产生的抗体或抗体片段可以从培养基或细胞裂解物收集并且可以通过常规生物化学分离技术分离并纯化(Sambrook等人,Molecular Cloning:A laboratory Manual,第2版,Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989); Deutscher,M.,Guide to Protein Purification Methods Enzymology,第182卷.Academic Press,Inc.,San Diego,CA(1990))。这些技术包括但不限于电泳、离心、凝胶过滤、沉淀、透析、色谱(离子交换色谱、亲和色谱、免疫吸附色谱、大小排阻色谱等)、等电聚焦和各种改进型及其组合。优选地,使用蛋白A分离和纯化抗体或抗体片段。

[0140] 本公开的抗体在pH 7.4显示约300pM或更小至约2nM或更小(KD值)的抗原结合能力,并且在pH 6.0还显示2nM或更小至900pM或更小的KD值。本公开的抗体具有0.01-2nM的强烈hFcRn结合亲和力并且因此认为与细胞外部结合的抗体甚至维持它们与内体的结合作用,这提示这些抗体具有阻断自身抗体与hFcRn结合的优异效果。此外,还在使用表达人FcRn的细胞进行的阻断测定法和FACS中证实了这种阻断自身抗体与hFcRn结合的效果。

[0141] 实施例

[0142] 下文,将参考实施例进一步详细描述本公开。本领域普通技术人员将显而易见的是,这些实施例仅起说明目的并且不得解释为限制本公开的范围。

[0143] 实施例1:使用转基因大鼠构建表达抗FcRn的文库

[0144] 使用总计六只转基因大鼠(OmniRat[®], OMT)进行免疫。使用人FcRn作为免疫原。大鼠的两个足垫按3天间距用0.0075mg人FcRn(每次)连同佐剂免疫8次,持续24天。在第28天,将大鼠用5-10μg稀释于PBS缓冲液中的免疫原免疫。在第28天,收集大鼠血清并用来测量抗体滴度。在第31天,令大鼠安乐死,并且回收腭淋巴结和腹股沟淋巴结以便与P3X63/AG8.653骨髓瘤细胞融合。

[0145] 进行ELISA分析以测量大鼠血清中的抗体滴度。具体而言,将人FcRn稀释于PBS(pH 6.0或pH 7.4)缓冲液中,以形成2μg/mL溶液,并且将100μl该溶液包被在96孔板的每个孔

上,并且随后在4℃温育至少18小时。每个孔用300μl洗涤缓冲液(含0.05%Tween-20的PBS)洗涤3次,以移除未结合的人FcRn,并且随后添加200μL封闭缓冲液至每个孔并在室温温育2小时。将测试血清样品按1/100稀释,并且随后将溶液连续2倍稀释以制得总计10份具有稀释倍数1/100至1/256,000的测试样品。在封闭后,每个孔用300μl洗涤缓冲液洗涤,并且随后添加测试样品至每个孔并在室温温育2小时。在洗涤3次后,将100μL第二检测抗体在PBS缓冲液中的1:50,000稀释物添加至每个孔并在室温温育2小时。再洗涤3次后,将100μL TMB溶液添加至每个孔并允许在室温反应10分钟,并且随后将50μL含有1M硫酸的终止溶液添加至每个孔以终止反应,此后用微量平板读数仪测量在450nm的OD值。因免疫产生的抗hFcRn IgG滴度高于未免疫大鼠(在1/100稀释条件下在450nm的OD值为1.0或更高)的免疫前血清中的IgG滴度,这显示大鼠是充分免疫的。

[0146] 使用聚乙二醇,产生了总计三个融合的杂交瘤文库A、B和C。具体而言,转基因大鼠1和5用来产生杂交瘤文库A,大鼠2和6用来产生杂交瘤文库B,并且大鼠3和4用来产生杂交瘤文库C。用于构建每个杂交瘤文库的杂交瘤文库融合混合物在含有HAT的培养基中培养7天,从而仅选择融合至HAT的细胞。收集在HAT培养基中存活的杂交瘤细胞并且在HT培养基中培养约6天,并且随后收集上清液,并且使用大鼠IgG ELISA试剂盒(RD-biotech)测量上清液中大鼠IgG的量。具体而言,将每份样品按1:100稀释,并且将100μL稀释物添加至ELISA平板的每个孔并且与过氧化物酶缀合的抗大鼠IgG混合,随后在室温反应15分钟。将100μL TMB溶液添加至每个孔并允许在室温反应10分钟,并且随后将50μL含有1M硫酸的终止溶液添加至每个孔以终止反应。接着,用微量平板读数仪测量在450nm的OD值。

[0147] 实施例2:评价杂交瘤文库的抗hFcRn抗体的抗原结合亲和力和IgG结合作用阻断能力

[0148] 为了分析抗体对人FcRn的结合,进行如上文提到的相同ELISA分析(pH6.0和pH7.4)。三个杂交瘤文库A、B和C的hFcRn结合作用的评价结果表明,hFcRn结合亲和力在pH6.0和pH7.4均按A>C>B顺序增高。

[0149] 使用三个杂交瘤文库的培养上清液,在pH6.0和pH7.4通过FACS评价在5ng/mL和25ng/mL时的hFcRn结合亲和力。使稳定表达人FcRn的HEK293细胞从培养瓶脱离,并且随后悬浮于反应缓冲液(PBS中的0.05%BSA,pH6.0或pH7.4)。将悬液稀释至细胞密度 2×10^6 个细胞/mL,并且将50μL稀释物添加至96孔板的每个孔。随后,将各自稀释至10ng/mL和50ng/mL的50μL杂交瘤文库培养物上清液添加至每个孔并且悬浮以允许抗体结合。将A488兔抗IgG山羊抗体按1:200在反应缓冲液中稀释,并且将100μL稀释物添加至每个孔并与细胞沉淀物混合以进行结合反应,并且随后将150μL反应缓冲液添加至每个孔。在FACS(BD)中进行测量。如同ELISA结果,可以见到,杂交瘤文库A显示最高的结合亲和力。

[0150] 通过FACS在pH6.0评价杂交瘤文库的人FcRn阻断能力。具体而言,全新的HEK293细胞和过量表达人FcRn的HEK293细胞浮于反应缓冲液(PBS中的0.05%BSA,pH6.0)中。将 1×10^5 个细胞添加至96孔板,并分别用4nM的每种杂交瘤文库培养物上清液和0.4nM上清液10倍稀释物处理。为了证实hIgG阻断能力,将100nM A488-hIgG1添加至每个孔,并且随后在冰上温育90分钟。在反应结束后,将细胞沉淀物用100μL反应缓冲液洗涤,并转移至U形圆底管中,随后在FACS中测量。测量在过量表达人FcRn的稳定细胞中剩余的100nM A488-hIgG1的量,并且随后计算阻断作用(%)。使用hIgG1作为同种型对照,并且作为阳性对照,先前形成

的HL161-1Ag抗体用来对比评价抗体的阻断作用。在1 μ M和2 μ M的浓度分析每个对照,并且在两个浓度0.4nM和4nM测量杂交瘤文库样品。结果发现,杂交瘤文库A显示最高阻断作用。

[0151] 实施例3:通过FACS分离杂交瘤克隆和选择人抗体

[0152] 使用显示最高人FcRn结合亲和力和阻断作用的杂交瘤文库A,通过FACS(流式细胞术)分离各克隆,从而获得总计442个单一克隆。在HT培养基中培养分离的单克隆,并且收集上清液。通过FACS选择在上清液中与hFcRn结合的表达抗体的杂交瘤克隆。作为结果,可以见到,100个克隆(M1-M100)强烈地与表达hFcRn的HEK293细胞结合。

[0153] 从借助FACS分析选择的100个单克隆分离RNA并将分离的RNA测序。在一步法测序中,对100个单克隆中的88个克隆测序,并且将这些克隆根据氨基酸序列划分成总计35个组(G1至G38)。将33组代表性克隆(不包括不可获得其培养基的两个克隆(G33和G35))的培养上清液按100ng/mL的浓度稀释,并且通过ELISA评价对hFcRn的结合亲和力。

[0154] 按照与上文所述相同的方式,在pH 6.0和7.4通过FACS评价hFcRn结合亲和力。各克隆的结合亲和力的顺序在各pH之间相似,并且结合强度以各种水平出现。

[0155] 此外,在pH 6.0通过FACS评价33个克隆的hFcRn阻断作用。基于测量的MFI值计算阻断作用(%)。基于在浓度1667pM分析阻断作用(%)的结果,将各克隆分成总计以下四个组:组A:70-100%;组B:30-70%;组C:10-30%;和组D:10%或更小。

[0156] 为了通过SPR对杂交瘤克隆进行动力学分析,将人FcRn固定化,并且随后使用杂交瘤培养物作为分析物进行分析。除几个克隆外,大部分克隆显示 10^6 M或更高的 k_{on} 和 10^{-3} M或更低的 k_{off} 值。综上所述,显示全部克隆均具有 10^{-9} 至 10^{-11} M的KD值。

[0157] 在5个杂交瘤克隆当中,将根据hFcRn阻断作用的分析结果划分的组A和组B的CDR序列中没有N-糖基化位点或游离半胱氨酸的18个克隆的基因转化成完整的人IgG序列。

[0158] 具体而言,使用NCBI网页的Ig BLAST程序检验在18个选择的抗体和人生殖系抗体组的VH和VL之间的氨基酸序列相似性。

[0159] 为了克隆18个人抗体基因,将限制性酶识别位点按以下方式插入基因的两个末端。将EcoRI/ApaI插入重链可变结构域(VH);将EcoRI/XhoI插入轻链 λ 可变结构域(VL(λ));将EcoRI/NheI限制性酶识别位点插入轻链 κ 可变结构域(VL(κ))。在轻链可变结构域的情况下,轻链 λ 可变(VL(λ))基因序列在基因克隆期间与人轻链恒定(LC(λ))区域基因连接,并且轻链 κ 可变(VL(κ))基因序列与人轻链恒定(LC(κ))区域基因连接。

[0160] 在克隆入pCH01.0表达载体以在动物细胞中表达抗体时,将轻链和重链基因在用EcoRV、PacI、AvrII和BstZ17I限制性酶切割后插入。为了检查含有18个选定的人抗体基因的pCH01.0表达载体是否与合成的基因序列一致,进行DNA测序。

[0161] 使用含有全部抗体轻链和重链基因作为动物细胞表达系统的pCH01.0表达载体,表达完整的人IgG。通过将每种抗体的质粒DNA瞬时转染入CHO-S细胞中并且通过蛋白A柱纯化分泌入培养基的抗体,获得人抗体。

[0162] 将人IgG注射至表达hFcRn的Tg32(hFcRn+/+、h β 2m+/+、mFcRn-/-、m β 2m-/-)小鼠(Jackson实验室),并且随后,将18种转化成人IgG序列的人抗体施用至小鼠,目的在于检查抗体是否影响人IgG的分解代谢。

[0163] 基于对抗原的结合亲和力(KD)的体外分析结果和通过FACS对人FcRn结合亲和力和阻断作用的分析以及对体内人IgG的分解代谢的分析,选择4种最有效发挥作用的人抗

FcRn抗体蛋白 (HL161A、HL161B、HL161C和HL161D) (图1)。此外,通过将HL161B抗体的重链可变构架位置83处的天冬酰胺(N) 置换为赖氨酸(K),制备了没有N-糖基化位点的HL161BK抗体。表1、2和3中显示每种抗体的轻链可变区和重链可变区的核苷酸序列、氨基酸序列和CDR序列。

[0164] 表1:选择的人FcRn抗体重链可变结构域和轻链可变结构域的多核苷酸序列

[0165]

抗体名称	重链可变结构域序列		轻链可变结构域序列	
	SEQ ID NO.	多核苷酸序列	SEQ ID NO.	多核苷酸序列
HL161A	1	GAAGTGCAGC TGCTGGAATC CGGCGGAGGC CTGGTGCAGC CTGGCGGCTC TCTGAGACTG TCCTGCGCCG CCTCCGAGTT CACCTTCGGC AGCTGCGTGA TGACCTGGGT CCGACAGGCT CCCGGCAAGG GCCTGGAATG GGTGTCCGTG ATCTCCGGCT CCGGCGGCTC CACCTACTAC GCCGACTCTG TGAAGGGCCG GTTACCATC TCCCGGGACA ACTCCAAGAA CACCCTGTAC CTGCAGATGA ACTCCCTGCG GGCCGAGGAC ACCGCCGTGT ACTACTGCGC CAAGACCCCC TGGTGGCTGC GGTCCCCCTT	11	TCTTACGTGC TGACCCAGCC CCCCTCCGTG TCTGTGGCTC CTGGCCAGAC CGCCAGAATC ACCTGTGGCG GCAACAACAT CGGCTCCACC TCCGTGCACT GGTATCAGCA GAAGCCCGGC CAGGCCCCCG TGCTGGTGGT GCACGACGAC TCCGACCGGC CTTCTGGCAT CCCTGAGCGG TTCTCCGGCT CCAACTCCGG CAACACCGCC ACCCTGACCA TCTCCAGAGT GGAAGCCGGC GACGAGGCCG ACTACTACTG CCAAGTGC GA GACTCCTCT CCGACCACGT GATCTTCGGC GGAGGCACCA AGCTGACCGT

[0166]

		CTTCGATTAC TGGGGCCAGG GCACCCTGGT GACAGTGTCC TCC		GCTGGGCCAG CCTAAGGCCG CTCCCTCCGT GACCCTG
HL161B	3	CAACTGTTGC TCCAGGAATC CGGTCCTGGT CTTGTAAAGC CATCTGAGAC TCTCTCCCTT ACCTGTACCG TTAGCGGAGG AAGTCTTTCC TCAAGCTTCT CCTACTGGGT GTGGATCAGA CAGCCTCCCG GAAAAGGGTT GGAGTGGATT GGCACAATAT ACTACTCCGG CAACACTTAC TATAACCCCA GCCTGAAGAG CAGGCTGACT ATCTCTGTCG ACACCAGTAA AAATCACTTT TCTCTGAATC TGTCTTCAGT GACCGCAGCC GACACCGCCG TGTATTATTG CGCTCGGCGC GCCGGGATTC TGACAGGCTA TCTGGATTCA TGGGGCCAGG GGACATTGGT TACAGTGTCT AGT	13	TCTTACGTGC TGACCCAGTC CCCCTCCGTG TCCGTGGCTC CTGGCCAGAC CGCCAGAATC ACCTGTGGCG GCAACAACAT CGGCTCCAAG TCCGTGCACT GGTATCAGCA GAAGCCCGGC CAGGCCCCCG TGCTGGTGGT GTACGACGAC TCCGACCGGC CCTCTGGCAT CCCTGAGCGG TTCTCCGCCT CCAACTCCGG CAACACCGCC ACCCTGACCA TCTCCAGAGT GGAAGCCGGC GACGAGGCCG ACTACTACTG CCAAGTGTGG GACTCCTCCT CCGACCACGT GGTGTTCCGGC GGAGGCACCA AGCTGACCGT GCTGGGCCAG CCTAAGGCCG CTCCCTCCGT GACCCTG
HL161BK	5	CAGCTGCTGC TGCAAGAATC CGGCCCTGGC CTGGTGAAAC CCTCCGAGAC ACTGTCCCTG ACCTGCACCG TGTCGGCGCG CTCCCTGTCC TCCAGCTTCT CCTACTGGGT CTGGATCCGG CAGCCCCCTG GCAAGGGCCT GGAATGGATC GGCACCATCT	15	TCTTACGTGC TGACCCAGTC CCCCTCCGTG TCCGTGGCTC CTGGCCAGAC CGCCAGAATC ACCTGTGGCG GCAACAACAT CGGCTCCAAG TCCGTGCACT GGTATCAGCA GAAGCCCGGC CAGGCCCCCG TGCTGGTGGT GTACGACGAC TCCGACCGGC

[0167]

		ACTACTCCGG CAACACCTAC TACAACCCCA GCCTGAAGTC CCGGCTGACC ATCTCCGTGG ACACCTCCAA GAACCACTTC AGCCTGAAGC TGTCTCCGT GACCGCCGCT GACACCGCCG TGTACTACTG TGCCAGAAGG GCCGGCATCC TGACCGGCTA CCTGGACTCT TGGGGCCAGG GCACCCTGGT GACAGTGTCC TCC		CCTCTGGCAT CCCTGAGCGG TTCTCCGCCT CCAACTCCGG CAACACCGCC ACCCTGACCA TCTCCAGAGT GGAAGCCGGC GACGAGGCCG ACTACTACTG CCAAGTGTGG GACTCCTCCT CCGACCACGT GGTGTTCCGGC GGAGGCACCA AGCTGACCGT GCTGGGCCAG CCTAAGGCCG CTCCCTCCGT GACCCTG
HL161C	7	CAGGTGCAGC TCGTGCAGTC CGGCGCAGAG GTCAAAAAGC CTGGTGCATC TGTGAAAGTG AGTTGCAAGG CTAGCGGCTA CACCTTTACC GGATGTTATA TGCATTGGGT ACGCCAAGCC CCCGGACAAG GCTTGGAATG GATGGGGCGT ATCAACCCAA ACTCTGGCGG GACTAATTAC GCCCAGAAGT TTCAGGGAAG GGTGACTATG ACAAGGGACA CATCCATATC CACCGCTTAT ATGGACCTGT CTCGACTGCG GTCTGATGAT ACAGCCGTTT ATTACTGCGC CAGAGACTAC AGCGGATGGA GCTTCGATTA TTGGGGGCAG GGTACTTTGG TCACAGTTTC AAGT	17	GACATCCAGA TGACCCAGTC ACCATCATCC CTTTCCGCAT CTGTCGGAGA TAGAGTGACT ATCACCTGCA GGGCTTCTCA AGGTATTTC AACTACCTCG CCTGGTTCCA GCAAAAGCCA GGTAAAGCCC CAAAGAGCTT GATCTACGCC GCTTCTAGTC TGCAGAGTGG AGTTCCTAGT AAGTTCTCCG GCTCTGGCAG TGGCACAGAT TTTACCTTGA CCATTTCCAG CCTGCAGTCT GAGGATTTTC CTACCTACTA TTGTCAGCAG TATGACAGCT ATCCCCCAC ATTTGGGGGG GGGACTAAGG TGGAGATAAA ACGGACAGTG GCTGCCCCCTT CTGTCTTTAT T
HL161D	9	CAGCTGCAGT TGCAGGAGTC	19	AGCTATGAGC TGACCCAGCC

[0168]

AGGCCCCGGT TTGGTTAAGC	TCTGAGCGTA TCTGTCGCTC
CTTCTGAAAC CCTTTCTCTC	TCGGCCAGAC AGCCAGAATT
ACATGCACAG TATCCGGTGG	ACCTGTGGCG GCAATAACAT
CTCCATCTCC AGTCAAGTT	AGGATCCAAA AATGTTCACT
ACTACTGGGG ATGGATCCGG	GGTATCAGCA AAAACCTGGC
CAACCCCCAG GAAAAGGGCT	CAAGCTCCCC TGCTCGTGAT
GGAGTGGATT GGCAATATAT	CTACCGGGAC TCTAACCGAC
ATTACTCTGG GTCCACCTAT	CCAGTGGAAT CCCCGAACGC
TACAACCCTT CCCTGATGAG	TTTAGCGGTT CCAACTCTGG
TAGAGTGACC ATCAGCGTGG	AAATACAGCT ACTCTGACTA
ACACAAGCAA AAACCAATTC	TCTCCAGGGC TCAGGCCGGG
AGCCTGAAGC TTTCTAGCGT	GATGAGGCCG ATTACTACTG
GACCGCTGCC GACACAGCTG	CCAGGTGTGG GACTCAAGCA
TCTATTACTG TGCCCGCCAG	CAGTGGTCTT CGGCGGAGGT
CTTAGTTATA ACTGGAATGA	ACCAAGTTGA CTGTTCTTGG
TAGGCTGTTT GATTACTGGG	GCAGCCAAAG GCCGCACCTT
GCCAGGGGAC TCTCGTTACA	CAGTGACCCT G
GTCAGCAGC	

[0169] 表2. 选择的人FcRn抗体重链可变结构域和轻链可变结构域的氨基酸序列

[0170]

抗体名称	重链可变结构域序列		轻链可变结构域序列	
	SEQ ID NO.	氨基酸序列	SEQ ID NO.	氨基酸序列
HL161A	2	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASEFTFG SCVMTWVRQA PGKGLEWVSV ISGSGGSTYY ADSVKGRFTI	12	SYVLTQPPSV SVAPGQTARI TCGGNNIGST SVHWYQQKPG QAPVLVVHDD SDRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISRVEAG

[0171]

		SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKTP WWLRSPFFDY WGQGTLVTVSS		DEADYYCQVR DSSSDHVIFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTL
HL161B	4	QLLLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSLS SSFSYWVWIR QPPGKGLEWI GTIYYSGNTY YNPSLKSRLT ISVDTSKNHF SLNLSSVTAA DTAVYYCARR AGILTYLDS WGQGTLVTVSS	14	SYVLTQSPSV SVAPGQTARI TCGGNNIGSK SVHWYQQKPG QAPVLVVYDD SDRPSGIPER FSASNSGNTA TLTISRVEAG DEADYYCQVW DSSSDHVVFVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTL
HL161BK	6	QLLLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSLS SSFSYWVWIR QPPGKGLEWI GTIYYSGNTY YNPSLKSRLT ISVDTSKNHF SLKLSSVTAA DTAVYYCARR AGILTYLDS WGQGTLVTVSS	16	SYVLTQSPSV SVAPGQTARI TCGGNNIGSK SVHWYQQKPG QAPVLVVYDD SDRPSGIPER FSASNSGNTA TLTISRVEAG DEADYYCQVW DSSSDHVVFVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTL
HL161C	8	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT GCMHWVRQA PGQGLEWMGR INPNSGGTNY AQKFQGRVTM TRDTSISTAY MDLSRLRSDD TAVYYCARDY SGWSFDYWGQ GTLTVTVSS	18	DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASQGIS NYLAWFQQKP GKAPKSLIYA ASSLQSGVPS KFSGSGSGTD FTLTISSLQS EDFATYYCQQ YDSYPPTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFI
HL161D	10	QLQLQESGPG LVKPSETLSL	20	SYELTQPLSV SVALGQTARI

[0172]

TCTVSGGSIS SSSYYWGWIR	TCGNNIGSK
QPPGKGLEWI GNIYYSGSTY	NVHWYQQKPG
YNPSLMSRVT ISVDTSKNQF	QAPVLVIYRD SNRPSGIPER
SLKLSSVTAA	FSGSNSGNTA TLTISRAQAG
DTAVYYCARQ	DEADYYCQVW
LSYNWNDRLF	DSSTVVFSGG TKLTVLGQPK
DYWGQGTLVT VSS	AAPSVTL

[0173] 表3. 选择的人FcRn抗体重链可变结构域和轻链可变结构域的CDR序列

[0174]

抗体	重链可变结构域CDR			轻链可变结构域CDR		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
SEQ ID NO.	21	22	23	24	25	26
HL161A	SCVMT	VISGSGGS TYYADSV KG	TPWWLR SPFFDY	GGNNIGS TSVH	DDSDRPS	VRDSSSD HVI
SEQ ID NO.	27	28	29	30	31	32
HL161B (HL161BK)	FSYWV	TIYYSGN TYYNPSL KS	RAGILTG YLDS	GGNNIGS KSVH	DDSDRPS	QVWDSSS DHVV
SEQ ID NO.	33	34	35	36	37	38
HL161C	GCYMH	RINPNSG GTNYAQK FQG	DYSGWSF DY	RASQGIS NYLA	AASSLQS	QQYDSYP PTF
SEQ ID NO.	39	40	41	42	43	44
HL161D	SYWVG	NIYYSGS TYYNPSL MS	QLSYNW NDRLFDY	GGNNIGS KNVH	RDSNRPS	QVWDSS TVV

[0176] 实施例4:通过SPR测量HL161A/HL161B/HL161C/HL161D抗体的抗原结合亲和力

[0177] 通过将水溶性hFcRn作为配体固定到Proteon GLC芯片(Bio-Rad)上并测量亲和力,测量HL161A、HL161B、HL161C和HL161D抗体依据SPR的结合亲和力。使用Proteon XPR36

系统进行动力学分析。将shFcRn固定在GLC芯片上,并且允许抗体样品以浓度5反应,并且获得传感图(sensogram)结果。在动力学分析中,使用1:1朗格缪尔结合模型,将分析在pH 6.0和pH 7.4各自重复6次,并且计算平均KD值。在固定步骤后,将芯片在EDAC/NHS 0.5X、30μL/min和300秒的条件下活化。为了固定,将shFcRn在乙酸盐缓冲液(pH5.5)稀释至浓度2μg/mL和250μL,并且允许稀释物在芯片上以30μL/分钟的速率流动。当达到200-300RU的固定化水平时,终止反应。随后,以30μL/分钟的速率使用乙醇胺进行失活300秒。将每种HL161抗体从浓度10nM至5nM、2.5nM、1.25nM、0.625nM、0.312nM等连续2倍稀释,从而制备样品。使用1X PBST(pH 7.4)或1X PBST(pH 6.0)在每种pH进行样品稀释。为了分析样品,结合按50μL/分钟进行200秒,并且解离步骤按50μL/分钟进行600秒,此后按100μL/分钟使用甘氨酸缓冲液(pH2.5)进行再生18秒。每份样品的动力学分析重复6次,并且随后测量平均抗原结合亲和力(KD)。下表4中显示从SPR分析得到的抗体动力学参数(图2a至2h)。

[0178] 表4. 借助人FcRn固定化SPR的抗体动力学分析结果

抗体	pH 6.0			pH 7.4		
	$k_{on} (M^{-1}s^{-1})$	$k_{off}(s^{-1})$	$K_D (M)$	$k_{on} (M^{-1}s^{-1})$	$k_{off}(s^{-1})$	$K_D (M)$
[0179] HL161A	1.81×10^6	3.26×10^{-4}	1.80×10^{-10}	1.32×10^6	3.27×10^{-4}	2.47×10^{-10}
HL161B	9.12×10^5	7.35×10^{-4}	8.07×10^{-10}	7.10×10^5	1.25×10^{-3}	1.76×10^{-9}
HL161C	1.74×10^6	3.32×10^{-4}	1.91×10^{-10}	1.36×10^6	3.16×10^{-4}	2.32×10^{-10}
[0180] HL161D	9.70×10^5	1.38×10^{-3}	1.43×10^{-9}	6.99×10^5	1.24×10^{-3}	1.78×10^{-9}
hIgG1	3.2×10^5	4.6×10^{-4}	1.4×10^{-9}	不结合	不结合	不结合

[0181] 实施例5:通过FACS分析HL161A/HL161B抗体与人FcRn的结合

[0182] 使用表达人FcRn的稳定HEK293细胞,通过FACS系统分析在每种pH与FcRn的结合作用。在pH 6.0和pH的7.4反应缓冲液中使用FACS进行FcRn结合作用测定。具体而言,将100,000个表达人FcRn的稳定HEK293细胞用PBS缓冲液洗涤并且在台式微量离心机中按4500转/分钟离心5分钟以获得细胞沉淀物。将抗体添加至100μl pH 6.0或pH 7.4的PBS/10mM EDTA。将剩余的细胞沉淀物悬浮于反应缓冲液中,并且进行细胞计数。将10μL细胞悬液添加至载玻片,并且在TC10系统中计数细胞悬液中细胞的数目,此后细胞悬液用反应缓冲液稀释至细胞浓度 2×10^6 个细胞/mL。每份抗体样品稀释至500nM。为了在pH 6.0分析,将稀释物在96孔V形底平板中稀释至20nM,并且将50μL稀释物添加至每个孔。为了在pH 7.4分析,将500nM抗体样品作3倍系列稀释,并在范围从250nM至0.11nM的浓度进行分析。将50μL稀释至 2×10^6 个细胞/mL的细胞添加至每个孔并悬浮。将平板在4℃在摇床中封装并以转动角度15°和10转/分钟转动90分钟。在完成反应后,从摇床取出平板并以2000转/分钟离心10分钟,并且移除上清液。将A488抗hIgG山羊抗体按1:200在反应缓冲液中稀释,并且将100μL抗体稀释物添加至每个孔并悬浮。接下来,将平板再次在4℃在摇床中封装并以转动角度15°和10转/分钟转动90分钟。在完成反应后,从摇床取出平板并以2000转/分钟离心10分钟,并且移除上清液。在洗涤程序再进行一次后,将100μL反应缓冲液添加至每个孔以溶解细胞沉

淀物,并且将平板转移入蓝色试管中。接着,添加200 μ L反应缓冲液至每个孔,并且随后在FACS中进行测量。在以下条件下进行FACS测量:FS 108伏、SS 426伏、FL1 324伏、FL2 300伏。使用BD FACSDivaTMv6.1.3软件(BD Bioscience)通过FACS分析这些细胞。结果表述为平均荧光强度(MFI)(图3)。HL161A抗体和HL161B抗体在10nM浓度和pH6.0分别显示MFI值为10.59和8.34。在pH 7.4和0.11-250nM的浓度,根据通过使用MFI值的4参数对数回归所分析,抗体分别显示EC₅₀(50%有效浓度)值为2.46nM和1.20nM。

[0183] 实施例6:通过FACS分析HL161A/HL161B抗体的阻断作用

[0184] 将细胞表面上表达hFcRn的HEK293细胞用分析其对细胞表面人FcRn的结合亲和力的两种抗体处理,并且基于Alexa-Fluo-488-标记的hIgG1的结合作用下降,检验抗体的阻断作用。分析程序按以下方式进行。

[0185] 将2mL 1x TE添加至每种类型的全新HEK293细胞和过量表达人FcRn的稳定HEK293细胞,所述细胞在37℃、5%CO₂培养箱中温育1分钟。从培养瓶回收细胞,并且向其添加8mL反应缓冲液(pH 6.0),此后,将细胞转移入50mL锥形管。将细胞悬液以2000转/分钟离心5分钟以移除上清液,并且将1mL反应缓冲液(pH 6.0)添加至每种细胞沉淀物。随后,将细胞悬液转移入新的1.5mL微量离心管。接着,将细胞悬液以4000转/分钟离心5分钟,并且移除上清液。随后,将反应缓冲液(pH 6.0)添加至保留的细胞沉淀物,并且计数细胞悬液的细胞数。最后,将细胞悬液用反应缓冲液稀释至细胞浓度2.5x10⁶个细胞/mL。

[0186] 将每份抗体样品稀释至400nM,并且随后在96孔V形底平板中按4倍连续稀释度稀释。将50 μ L稀释至终浓度200nM至0.01nM的样品添加至每个孔。随后,每孔添加10 μ L用1 μ M反应缓冲液(pH 6.0)稀释的Alex488-hIgG1。最后,将40 μ L细胞浓度稀释为2.5x 10⁶个细胞/mL的细胞添加至每个孔并悬浮。将平板在4℃在摇床中封装并以转动角度15°和10转/分钟转动90分钟。在完成反应后,从摇床取出平板并以2000转/分钟离心10分钟以移除上清液。将100 μ L反应缓冲液添加至每个孔以溶解细胞沉淀物,并且将平板转移入蓝色试管中。随后,添加200 μ L反应缓冲液至每个孔,并且在FACS中进行测量。在以下条件下进行FACS测量:FS 108伏、SS 426伏、FL1 324伏、FL2 300伏。使用BD FACSDivaTMv6.1.3软件(BD Bioscience)通过FACS分析这些细胞。结果表述为平均荧光强度(MFI)。在扣减仅测量的细胞的MFI值(背景信号)后处理试验组的MFI。相对于对照管(仅Alexa Fluor 488,并且无竞争物)的100%,计算含有竞争物的管的MFI百分数。

[0187]
$$\text{阻断}(\%) = \left(\frac{\text{hFcRn稳定的MFI (竞争物+A488-hIgG1)} - \text{HEK293的MFI (A488-hIgG1)}}{\text{hFcRn稳定的MFI (A488-hIgG1)} - \text{HEK293的MFI (A488-hIgG1)}} \right) \times 100$$

[0188] 当MFI低于含有人IgG1竞争物的管的MFI时,确定竞争抗体具有高竞争率。基于pH 6.0和浓度0.01-200nM的条件下测量的HL161A抗体和HL161B抗体阻断作用(%),进行4-参数对数回归。作为结果,证实HL161A抗体和HL161B抗体分别显示0.92nM和2.24nM的IC₅₀(50%抑制性浓度)值(图4)。

[0189] 实施例7:在mFcRn-/-hFCRN转基因32(Tg32)小鼠中检验HL161A/HL161B的作用

[0190] 将人IgG注射至表达人FcRn的Tg32(hFcRn+/+、h β 2m+/+、mFcRn-/-、m β 2m-/-)小鼠(Jackson实验室),并且随后,将HL161A和HL161B连同人IgG一起施用至小鼠,目的在于检查抗体是否影响人IgG的分解代谢。

[0191] 将HL161A抗体和HL161B抗体和人IgG(Greencross, IVglobulinS)按剂量5、10和

20mg/kg分配4天施用量并存储,并且使用PBS(磷酸盐缓冲盐水)缓冲液(pH 7.4)作为溶媒以及20mg/kg IgG1对照。人FcRn Tg32小鼠适应约7天并且随意饮水和摄食。自动控制温度($23\pm 2^{\circ}\text{C}$)、湿度($55\pm 5\%$)和12小时光照/12小时黑暗循环。每个动物组由4只小鼠组成。为了使用人IgG作为示踪剂,使用试剂盒(Pierce,目录号21327)制备生物素缀合的hIgG。在0小时,将5mg/kg生物素-hIgG和495mg/kg人IgG腹腔内施用至体内以饱和IgG。在施用生物素-IgG后24、48、72和96小时,将每种药物按剂量5、10和20mg/kg一日一次腹腔内注射。为了采集血液,将小鼠用异氟烷(JW Pharmaceutical)轻微麻醉,并且随后在施用生物素-IgG后24、48、72、96、120和168小时,使用肝素化微量血细胞比容毛细管(Fisher)从眶后静脉丛采集血液。在24、48、72和96小时,在血液采集后施用药物。在微量离心管中收到0.1mL全血后立即通过离心分离血浆并且将其贮存在 -70°C 的深冷器(Thermo)直至分析。

[0192] 通过ELISA按以下方式分析采集的血液中生物素-hIgG1的水平。将100 μL 中性抗生物素蛋白(Pierce,31000)添加至96孔板(Costar,目录号2592)至浓度1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$,并且随后在 4°C 包被16小时。将平板用缓冲液A(0.05%Tween-20,10mM PBS,pH 7.4)洗涤3次,并且随后在室温在含有1%BSA的PBS(pH 7.4)缓冲液中温育2小时。接下来,将平板用缓冲液A洗涤3次,并且随后用含有0.5%BSA的PBS(pH 7.4)缓冲液制备中性抗生物素蛋白平板,从而对应于1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。将血液样品在缓冲液B(100mM MES,150mM NaCl,0.5%无IgG的BSA,0.05%Tween-20,pH 6.0)中连续稀释500-1000倍,并且将150 μL 稀释物添加至平板的每个孔。添加的样品在室温反应1小时。接下来,将平板用缓冲液A洗涤3次,并且随后将200 μL 1nM HRP缀合的抗人IgG山羊抗体添加至每个孔并且在 37°C 温育2小时。接下来,将平板用冰冷的缓冲液B洗涤3次,并且随后将100 μL 底物溶液四甲基联苯胺(RnD,目录号:DY999)添加至每个孔并且允许在室温反应15分钟。将50 μL 1.0M硫酸溶液(Samchun,目录号:S2129)添加至每个孔以终止反应,此后测量在450nm的吸光度。

[0193] 将24小时后(在小鼠中生物素-IgG的大约 T_{max} ;在出现生物素-IgG分解代谢前)的生物素-IgG浓度设定在100%,并且图10中显示在其他时间点的浓度相对于24小时浓度而言的百分数。分析的结果显示,溶媒和20mg/kg IgG1对照的半寿期分别是103小时和118小时。然而,在不同剂量时HL161A抗体的血液IgG半寿期是30、23和18小时,所述HL161A抗体在体外分析中显示优异的人FcRn结合亲和力和阻断作用以及在人FcRn转基因Tg32小鼠中显示最快的IgG分解代谢。此外,HL161B抗体显示41、22和21小时的IgG半寿期。这表明针对hFcRn的pH非依赖性和Fc非竞争性抗体具有增加内源抗体分解代谢的作用(图5a和图5b)。

[0194] 实施例8:在猴中检验HL161A/HL161B的作用

[0195] 使用与人FcRn具有96%同源性的食蟹猴,分析施用HL161A抗体和HL161B抗体的猴IgG、IgA、IgM和白蛋白水平,并且分析抗体的药代动力学(PK)曲线。

[0196] 1)分析猴血液中免疫球蛋白G表达的变化

[0197] 首先,通过ELISA测量分析猴IgG的变化。将100 μL 抗人IgG/Fc抗体(BethylLab, A80-104A)装入96孔板(Costar,目录号2592)的每个孔至浓度4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$,并且随后在 4°C 包被16小时。将平板用洗涤缓冲液(0.05%Tween-20,10mM PBS,pH 7.4)洗涤3次,并且随后在室温与含有1%BSA的PBS(pH 7.4)缓冲液温育2小时。标准猴IgG以浓度3.9-500ng/mL使用,并且将血液样品在含有1%BSA的PBS(pH 7.4)缓冲液中稀释80,000倍,并且将稀释物装入平板并在室温温育2小时。接下来,将平板用洗涤缓冲液洗涤3次,并且随后将100 μL 抗hIgG

抗体(Biorad,201005)的20,000倍稀释物装入平板并允许其在室温反应1小时。在洗涤每块平板后,将100 μ L底物溶液3,3',5,5'-四甲基联苯胺(RnD,目录号:DY999)装入平板并且允许其在室温反应7分钟,此后将50 μ L 1.0M硫酸溶液(Samchun,目录号S2129)添加至每个孔以终止反应。对于分析,使用450nm和540nm吸光度读数仪(MD,型号:VersaMax)测量吸光度(OD)。结果显示,当HL161A抗体和HL161B抗体各自按剂量5和20mg/kg一周一次静脉内施用于食蟹猴时,猴IgG水平以剂量依赖性方式降低,并且HL161抗体有效阻断IgG-FcRn相互作用。5mg/kg HL161A在第9天时猴IgG水平降低至47.1%,并且20mg/kg HL161A在第10天时猴IgG水平降低至29.6%。5mg/kg HL161B在第10天降低猴IgG水平至53.6%,并且20mg/kg HL161B在第9天降低猴IgG水平至31%,这提示两种抗体显示类似的结果(表5和图6a和图6c)。此外,在个体之间比较静脉内施用HL161A和HL161B所致的猴IgG水平变化,并且结果显示,个体之间的猴IgG水平以非常相似的方式降低。

[0198] 表5. 施用HL161A和HL161B所致的猴IgG水平的变化(%)

[0199]

天	溶媒	HL161A		HL161B	
		5 mg/kg	20 mg/kg	5 mg/kg	20 mg/kg
0日	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0
0.5天	99.0 \pm 4.8	81.5 \pm 1.8	101.5 \pm 9.0	94.3 \pm 5.4	96.2 \pm 3.0
1天	97.6 \pm 15.9	67.2 \pm 2.0	86.2 \pm 11.9	83.9 \pm 24.7	94.1 \pm 7.0
2天	97.8 \pm 6.2	63.0 \pm 3.3	74.2 \pm 14	73.7 \pm 11.3	71.7 \pm 5.4
3天	104.5 \pm 13.1	61.8 \pm 8.0	59.2 \pm 11.0	68.3 \pm 9.3	61.3 \pm 6.0
4天	100.9 \pm 16.7	55.3 \pm 4.1	45.1 \pm 4.6	65.5 \pm 12.2	44.3 \pm 5.6
5天	103.4 \pm 12.5	60.8 \pm 8.3	38.8 \pm 4.9	65.0 \pm 11.9	38.4 \pm 3.7
6天	113.3 \pm 8.5	64.9 \pm 11.7	39.7 \pm 6.4	66.4 \pm 11.3	39.0 \pm 5.4
7天	116.9 \pm 23.3	58.7 \pm 4.7	39.6 \pm 5.4	61.4 \pm 8.0	37.5 \pm 3.2
7.5天	92.4 \pm 10.4	51.2 \pm 7.2	38.7 \pm 7.8	62.8 \pm 8.3	39.3 \pm 0.4
8天	94.6 \pm 8.7	48.0 \pm 9.3	36.1 \pm 5.3	60.7 \pm 7.5	39.6 \pm 5.9
9天	117.6 \pm 14.3	47.1 \pm 4.4	33.8 \pm 5.0	54.3 \pm 6.9	31.0 \pm 3.1
10天	115.1 \pm 16.7	49.7 \pm 8.9	29.6 \pm 5.8	53.6 \pm 4.9	32.8 \pm 4.3
11天	114.6 \pm 18.9	47.7 \pm 4.2	30.4 \pm 6.5	54.7 \pm 4.2	39.9 \pm 9.1
12天	109.5 \pm 13.1	51.7 \pm 3.1	32.9 \pm 5.7	56.5 \pm 4.7	46.7 \pm 9.1

[0200]

13天	111.1±21.2	52.9±6.4	35.7±9.2	58.7±3.8	45.4±7.6
14天	128.9±17.7	54.7±4.2	37.8±9.6	60.6±4.2	53.8±11.3
17天	95.6±6.6	59.5±10.3	40.2±7.4	56.7±4.4	48.4±10.0
20天	92.5±8.4	62.4±6.7	47.6±8.9	61.8±6.0	54.0±9.5
23天	107.1±15.2	71.9±6.5	61.8±13.3	64.9±4.4	56.8±6.0
26天	104.0±5.6	77.7±6.8	72.2±22.4	70.8±7.4	62.4±5.8
29天	102.4±8.3	81.4±6.7	77.9±20.5	74.8±5.1	65.4±10.8

[0201] 2) 分析猴血液中HL161A/HL161B的药代动力学曲线

[0202] 通过竞争性ELISA分析在静脉内施用后HL161A和HL161B的时间依赖性药代动力学曲线(PK)。具体而言,制备2μg/mL的中性抗生物素蛋白溶液,并且将100μL该溶液包被在96孔板的每个孔上,并且随后在4℃温育18小时。将平板用300μL洗涤缓冲液(含有0.05% Tween-20的10mM PBS, pH 7.4)洗涤3次,并且随后将每个孔在25℃用含有1% BSA的PBS (pH 7.4) 缓冲液温育2小时。将生物素酰化的hFcRn用PBS稀释至1μg/mL,并且随后将100μL稀释物添加至96孔板的每个孔并且在25℃温育1小时。接下来,将平板用300μL洗涤缓冲液洗涤3次以移除未结合的hFcRn,并且随后添加标准样品(0.156-20ng/mL)至每个孔并在25℃温育2小时。接下来,将平板用洗涤缓冲液洗涤3次,并且随后添加100μL在PBS中1:10,000稀释度的检测抗体至每个孔并在25℃温育1.5小时。最后将平板洗涤3次,并且将100μL TMB溶液添加至每中缓冲液并在室温温育5分钟,之后将50μL 1M硫酸作为反应终止溶液添加至每个孔以终止反应。接着,用微量平板读数仪测量在450nm的吸光度。下表6中显示HL161A和HL161B的分析结果,并且如其中可以见到,抗体的药代动力学曲线以剂量依赖性方式增加。抗体的半寿期(T_{1/2})是约6-12天,其短于通常已知的抗体。此外,证实HL161B的半寿期(总体观察时)、AUC和C_{max}高于HL161A(图7a和图7b)。

[0203] 表6. 在不同剂量时HL161A和HL161B的药代动力学曲线的分析结果

[0204]

Ab(剂量)	天	C _{max} (mg/ml)	AUC (mg/ml.hr)	T _{1/2} (hr)
--------	---	-----------------------------	-------------------	--------------------------

[0205]	HL161A (5 mg/kg)	0-7	157 ± 31	1,601 ± 501	6.9 ± 0.9
		7-14	157 ± 25	1,388 ± 334	10.3 ± 2.8
	HL161A (20 mg/kg)	0-7	692 ± 138	13,947 ± 2,459	9.0 ± 0.6
		7-14	724 ± 125	12,699 ± 2,114	7.6 ± 1.6
	HL161B (5 mg/kg)	0-7	178 ± 56	2,551 ± 1,356	7.9 ± 1.3
		7-14	187 ± 9	2,772 ± 466	9.4 ± 0.5
	HL161B (20 mg/kg)	0-7	823 ± 38	21,867 ± 1,088	11.7 ± 1.0
		7-14	868 ± 66	16,116 ± 1,501	6.8 ± 0.9

[0206] 3) 分析猴血液中IgM及IgA抗体水平的变化

[0207] 在按照类似于测量IgG水平的ELISA方法的方式进行用于测量猴血液中IgM及IgA水平的ELISA分析。具体而言,将100μL抗猴IgM抗体(Alpha Diagnostic,70033)或IgA抗体(Alpha Diagnostic,70043)添加至96孔板的每个孔到浓度2.0μg/mL,并且随后在4℃包被16小时。将平板用洗涤缓冲液(含有0.05%Tween-20的10mM PBS,pH 7.4)洗涤3次,并且随后在室温与含有1%BSA的PBS(pH 7.4)缓冲液温育2小时。以7.8-1,000ng/mL浓度分析标准猴IgM,并且以15.6-2,000ng/mL浓度分析IgA。将血液样品在含有1%BSA的PBS(pH 7.4)缓冲液中稀释10,000倍或20,000倍,并且将稀释物添加至每个孔并在室温温育2小时。接下来,将平板用洗涤缓冲液洗涤3次,并且随后将抗猴IgM第二抗体(Alpha Diagnostic,70031)和抗猴IgA第二抗体(KPL,074-11-011)各自的5000倍稀释物100μL添加至每个孔并且允许其在室温反应1小时。将平板最后洗涤3次,并且随后将100μL底物溶液3,3',5,5'-四甲基联苯胺(RnD,目录号:DY999)添加至每个孔并且允许在室温反应7分钟。接下来,将50μL 1.0M硫酸溶液(Samchun,目录号:S2129)添加至每个孔以终止反应。用450nm和540nm吸光度读数仪(MD,型号:VersaMax)测量每个孔的吸光度。

[0208] 4) 分析猴血液中白蛋白水平的变化

[0209] 使用商业ELISA试剂盒(Assaypro,目录号:EKA2201-1)进行猴血液中白蛋白水平变化的分析。简而言之,将猴血清作为测试样品稀释4000倍,并且将25μL稀释物添加至96孔板的每个孔,所述96孔板用能够与猴白蛋白结合的抗体包被。将25μL生物素酰化的猴白蛋白溶液添加至每个孔并且在25℃温育2小时。将平板用200μL洗涤缓冲液洗涤3次,并且随后添加50μL 1:100稀释度的链霉亲和素-过氧化物酶缀合的抗体至每个孔,并在25℃温育30分钟。将平板最后洗涤3次,并且随后将50μL底物添加至每个孔并且在室温温育10分钟。接下来,将50μL反应终止溶液添加至每个孔,并且测量在450nm的吸光度。作为结果,在整个测试期间未观察到因施用HL161A抗体和HL161B抗体所致的猴IgM、IgA和白蛋白水平的清晰变化(图8a至图8c)。因此,得出结论,HL161抗体仅涉及IgG水平并且不影响IgM和IgA的水平,这提示它将不会显著影响免疫球蛋白水平下降所致的免疫力下降。此外,在整个测试期间未观察到猴白蛋白水平的显著变化,这提示HL161A抗体和HL161B抗体仅特异性阻断IgG-FcRn相互作用。

[0210] 5) 血液生物化学水平和尿组分的分析

[0211] 最后,使用在测试第14天的样品,施用抗体进行血液生物化学分析和尿分析。此外,使用Hitachi 7180系统分析了血液生物化学标志物,包括天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、碱性磷酸酶(CPK)、肌酸磷酸激酶(肌酸磷酸激酶)、总胆红素(TBIL)、葡萄糖(GLU)、总胆固醇(TCHO)、甘油三酯(TG)、总蛋白(TP)、白蛋白(A1b)、白蛋白/球蛋白(A/G)、血尿素氮(血尿素氮)、肌酐(CRE)、无机磷(IP)、钙(Ca)、钠(Na)、钾(K)和氯化物(Cl)。此外,使用Mission U120系统分析了尿分析标志物,包括白细胞(LEU)、硝酸盐(NIT)、尿胆原(URO)、蛋白质(PRO)、pH,潜血(BLO)、比重(SG)、酮体(KET)、胆红素(BIL)、葡萄糖(GLU)和抗坏血酸(ASC)。虽然存在轻微的水平变化,但是测量的水平在食蟹猴的正常水平范围内。

[0212] 虽然已经参考具体特征详述本公开,但是本领域技术人员将显而易见的是,这种描述仅目的在于说明并且不限制本公开的范围。因此,本公开的实质范围将由所附权利要求书及其等同物限定。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 韩诺生物制药株式会社 (HANALL BIOPHARMA CO., LTD.)
- [0003] <120> 治疗自身免疫疾病的结合FCRN的抗体
- [0004] <130> PF-B1783
- [0005] <140> PCT/KR2015/004424
- [0006] <141> 2015-04-30
- [0007] <150> 61/986,742
- [0008] <151> 2014-04-30
- [0009] <160> 44
- [0010] <170> PatentIn 3.2版
- [0011] <210> 1
- [0012] <211> 363
- [0013] <212> DNA
- [0014] <213> 人工序列(Artificial)
- [0015] <220>
- [0016] <223> HL161A的Hv
- [0017] <400> 1
- [0018] gaagtgcagc tgctggaatc cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggctc tctgagactg 60
- [0019] tcctgcgccg cctccgagtt caccttcggc agctgcgtga tgacctgggt ccgacaggct 120
- [0020] cccggcaagg gcctggaatg ggtgtccgtg atctccggct ccggcggctc cacctactac 180
- [0021] gccgactctg tgaagggccg gttcaccatc tcccgggaca actccaagaa caccctgtac 240
- [0022] ctgcagatga actccctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc caagaccccc 300
- [0023] tggtggctgc ggtccccctt cttecgattac tggggccagg gcaccctggt gacagtgtcc 360
- [0024] tcc 363
- [0025] <210> 2
- [0026] <211> 121
- [0027] <212> PRT
- [0028] <213> 人工序列(Artificial)
- [0029] <220>
- [0030] <223> HL161A的Hv
- [0031] <400> 2
- [0032] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
- [0033] 1 5 10 15
- [0034] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Phe Thr Phe Gly Ser Cys
- [0035] 20 25 30
- [0036] Val Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
- [0037] 35 40 45
- [0038] Ser Val Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

[0039]	50	55	60
[0040]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[0041]	65	70	75
[0042]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		80
[0043]	85	90	95
[0044]	Ala Lys Thr Pro Trp Trp Leu Arg Ser Pro Phe Phe Asp Tyr Trp Gly		
[0045]	100	105	110
[0046]	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0047]	115	120	
[0048]	<210> 3		
[0049]	<211> 363		
[0050]	<212> DNA		
[0051]	<213> 人工序列(Artificial)		
[0052]	<220>		
[0053]	<223> HL161B的Hv		
[0054]	<400> 3		
[0055]	caactgttgc tccaggaatc cggtcctggt cttgtaaagc catctgagac tctctccctt	60	
[0056]	acctgtaccg ttagcggagg aagtctttcc tcaagcttct cctactgggt gtggatcaga	120	
[0057]	cagcctcccg gaaaagggtt ggagtggatt ggcacaatat actactccgg caacacttac	180	
[0058]	tataacccca gcctgaagag caggctgact atctctgtcg acaccagtaa aaatcacttt	240	
[0059]	tctctgaatc tgtcttcagt gaccgcagcc gacaccgccg tgtattattg cgctcggcgc	300	
[0060]	gccgggattc tgacaggcta tctggattca tggggccagg ggacattggt tacagtgtct	360	
[0061]	agt 363		
[0062]	<210> 4		
[0063]	<211> 121		
[0064]	<212> PRT		
[0065]	<213> 人工序列(Artificial)		
[0066]	<220>		
[0067]	<223> HL161B的Hv		
[0068]	<400> 4		
[0069]	Gln Leu Leu Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu		
[0070]	1	5	10
[0071]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Leu Ser Ser Ser		15
[0072]	20	25	30
[0073]	Phe Ser Tyr Trp Val Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu		
[0074]	35	40	45
[0075]	Trp Ile Gly Thr Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser		
[0076]	50	55	60
[0077]	Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn His Phe		

[0078]	65	70	75	80
[0079]	Ser Leu Asn Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr			
[0080]	85	90	95	
[0081]	Cys Ala Arg Arg Ala Gly Ile Leu Thr Gly Tyr Leu Asp Ser Trp Gly			
[0082]	100	105	110	
[0083]	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
[0084]	115	120		
[0085]	<210> 5			
[0086]	<211> 363			
[0087]	<212> DNA			
[0088]	<213> 人工序列(Artificial)			
[0089]	<220>			
[0090]	<223> HL161B的HvK			
[0091]	<400> 5			
[0092]	cagctgctgc tgcaagaatc cggccctggc ctggtgaaac cctccgagac actgtccctg	60		
[0093]	acctgcaccg tgtccggcgg ctccctgtcc tccagcttct cctactgggt ctggatccgg	120		
[0094]	cagccccctg gcaaggcct ggaatggatc ggcaccatct actactccgg caacacctac	180		
[0095]	tacaacccca gcctgaagtc ccggtgacc atctccgtgg acacctcaa gaaccacttc	240		
[0096]	agcctgaagc tgctctcgt gaccgccgt gacaccgccg tgtactactg tgccagaagg	300		
[0097]	gccggcatcc tgaccggcta cctggactct tggggccagg gcaccctggt gacagtgtcc	360		
[0098]	tcc	363		
[0099]	<210> 6			
[0100]	<211> 121			
[0101]	<212> PRT			
[0102]	<213> 人工序列(Artificial)			
[0103]	<220>			
[0104]	<223> HL161B的HvK			
[0105]	<400> 6			
[0106]	Gln Leu Leu Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu			
[0107]	1	5	10	15
[0108]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Leu Ser Ser Ser			
[0109]	20	25	30	
[0110]	Phe Ser Tyr Trp Val Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu			
[0111]	35	40	45	
[0112]	Trp Ile Gly Thr Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser			
[0113]	50	55	60	
[0114]	Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn His Phe			
[0115]	65	70	75	80
[0116]	Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr			

[0117]		85		90		95	
[0118]	Cys Ala Arg Arg Ala Gly Ile Leu Thr Gly Tyr Leu Asp Ser Trp Gly						
[0119]		100		105		110	
[0120]	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser						
[0121]		115		120			
[0122]	<210> 7						
[0123]	<211> 354						
[0124]	<212> DNA						
[0125]	<213> 人工序列(Artificial)						
[0126]	<220>						
[0127]	<223> HL161C的Hv						
[0128]	<400> 7						
[0129]	caggtgcagc tegtgcagtc cggcgcagag gtcaaaaagc ctggtgcatc tgtgaaagtg 60						
[0130]	agttgcaagg ctagecgcta cacctttacc ggatgttata tgcattgggt acgccaagcc 120						
[0131]	cccgacaag gcttgaatg gatggggcgt atcaacccaa actctggcgg gactaattac 180						
[0132]	gcccagaagt ttcagggaag ggtgactatg acaagggaca catccatata caccgcttat 240						
[0133]	atggacctgt ctgactgcg gtctgatgat acagccgttt attactgcgc cagagactac 300						
[0134]	agcggatgga gcttcgatta ttgggggcag ggtactttgg tcacagtttc aagt 354						
[0135]	<210> 8						
[0136]	<211> 118						
[0137]	<212> PRT						
[0138]	<213> 人工序列(Artificial)						
[0139]	<220>						
[0140]	<223> HL161C的Hv						
[0141]	<400> 8						
[0142]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala						
[0143]	1 5 10 15						
[0144]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Cys						
[0145]	20 25 30						
[0146]	Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met						
[0147]	35 40 45						
[0148]	Gly Arg Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe						
[0149]	50 55 60						
[0150]	Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr						
[0151]	65 70 75 80						
[0152]	Met Asp Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys						
[0153]	85 90 95						
[0154]	Ala Arg Asp Tyr Ser Gly Trp Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr						
[0155]	100 105 110						

[0156]	Leu Val Thr Val Ser Ser
[0157]	115
[0158]	<210> 9
[0159]	<211> 369
[0160]	<212> DNA
[0161]	<213> 人工序列(Artificial)
[0162]	<220>
[0163]	<223> HL161D的Hv
[0164]	<400> 9
[0165]	cagctgcagt tgcaggagtc aggcccccgt ttggttaagc cttctgaaac cttttctctc 60
[0166]	acatgcacag tatccggtgg ctccatctcc agttcaagtt actactgggg atggatccgg 120
[0167]	caacccccag gaaaagggt ggagtggatt ggcaatatat attactctgg gtccacctat 180
[0168]	tacaaccctt cctgatgag tagagtgacc atcagcgtgg acacaagcaa aaaccaattc 240
[0169]	agcctgaagc tttctagcgt gaccgctgcc gacacagctg tctattactg tgcccgccag 300
[0170]	cttagttata actggaatga taggctgttt gattactggg gccaggggac tctcgttaca 360
[0171]	gtcagcagc 369
[0172]	<210> 10
[0173]	<211> 123
[0174]	<212> PRT
[0175]	<213> 人工序列(Artificial)
[0176]	<220>
[0177]	<223> HL161D的Hv
[0178]	<400> 10
[0179]	Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
[0180]	1 5 10 15
[0181]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
[0182]	20 25 30
[0183]	Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
[0184]	35 40 45
[0185]	Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
[0186]	50 55 60
[0187]	Leu Met Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
[0188]	65 70 75 80
[0189]	Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
[0190]	85 90 95
[0191]	Cys Ala Arg Gln Leu Ser Tyr Asn Trp Asn Asp Arg Leu Phe Asp Tyr
[0192]	100 105 110
[0193]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0194]	115 120

[0195]	<210> 11
[0196]	<211> 357
[0197]	<212> DNA
[0198]	<213> 人工序列(Artificial)
[0199]	<220>
[0200]	<223> HL161A的Lv
[0201]	<400> 11
[0202]	tcttacgtgc tgaccagcc cccctccgtg tctgtggctc ctggccagac cgccagaatc 60
[0203]	acctgtggcg gcaacaacat cggctccacc tccgtgcact ggtatcagca gaagcccggc 120
[0204]	caggcccccg tgctggtggt gcacgacgac tccgaccggc cttctggcat ccctgagcgg 180
[0205]	ttctccggct ccaactccgg caacaccgcc accctgacca tctccagagt ggaagccggc 240
[0206]	gacgaggccg actactactg ccaagtgcga gactcctcct ccgaccacgt gatcttcggc 300
[0207]	ggaggcacca agctgaccgt gctggggccag cctaaggccg ctccctccgt gaccctg 357
[0208]	<210> 12
[0209]	<211> 119
[0210]	<212> PRT
[0211]	<213> 人工序列(Artificial)
[0212]	<220>
[0213]	<223> HL161A的Lv
[0214]	<400> 12
[0215]	Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
[0216]	1 5 10 15
[0217]	Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Thr Ser Val
[0218]	20 25 30
[0219]	His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val His
[0220]	35 40 45
[0221]	Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
[0222]	50 55 60
[0223]	Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
[0224]	65 70 75 80
[0225]	Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Arg Asp Ser Ser Ser Asp His
[0226]	85 90 95
[0227]	Val Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
[0228]	100 105 110
[0229]	Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu
[0230]	115
[0231]	<210> 13
[0232]	<211> 357
[0233]	<212> DNA

[0234]	<213> 人工序列(Artificial)
[0235]	<220>
[0236]	<223> HL161B的Lv
[0237]	<400> 13
[0238]	tcttacgtgc tgaccagtc cccctccgtg tccgtggctc ctggccagac cgccagaatc 60
[0239]	acctgtggcg gcaacaacat cggctccaag tccgtgcact ggtatcagca gaagcccggc 120
[0240]	caggcccccg tgctggtggt gtacgacgac tccgaccggc cctctggcat ccctgagcgg 180
[0241]	ttctccgcct ccaactccgg caacaccgcc accctgacca tctccagagt ggaagccggc 240
[0242]	gacgaggccg actactactg ccaagtgtgg gactcctcct ccgaccacgt ggtgttcggc 300
[0243]	ggaggcacca agctgaccgt gctgggccag cctaaggccg ctccctccgt gaccctg 357
[0244]	<210> 14
[0245]	<211> 119
[0246]	<212> PRT
[0247]	<213> 人工序列(Artificial)
[0248]	<220>
[0249]	<223> HL161B的Lv
[0250]	<400> 14
[0251]	Ser Tyr Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
[0252]	1 5 10 15
[0253]	Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
[0254]	20 25 30
[0255]	His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
[0256]	35 40 45
[0257]	Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser
[0258]	50 55 60
[0259]	Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
[0260]	65 70 75 80
[0261]	Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
[0262]	85 90 95
[0263]	Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
[0264]	100 105 110
[0265]	Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu
[0266]	115
[0267]	<210> 15
[0268]	<211> 357
[0269]	<212> DNA
[0270]	<213> 人工序列(Artificial)
[0271]	<220>
[0272]	<223> HL161B的LvK

[0273] <400> 15
 [0274] tcttacgtgc tgaccagtc cccctccgtg tccgtggctc ctggccagac cgccagaatc 60
 [0275] acctgtggcg gcaacaacat cggctccaag tccgtgcact ggtatcagca gaagcccggc 120
 [0276] caggcccccg tgctggtggt gtacgacgac tccgaccggc cctctggcat ccctgagcgg 180
 [0277] ttctccgcct ccaactccgg caacaccgcc accctgacca tctccagagt ggaagccggc 240
 [0278] gacgaggccg actactactg ccaagtgtgg gactcctcct ccgaccacgt ggtgttcggc 300
 [0279] ggaggcacca agctgaccgt gctggggccag cctaaggccg ctccctccgt gaccctg 357
 [0280] <210> 16
 [0281] <211> 119
 [0282] <212> PRT
 [0283] <213> 人工序列(Artificial)
 [0284] <220>
 [0285] <223> HL161B的LvK
 [0286] <400> 16
 [0287] Ser Tyr Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 [0288] 1 5 10 15
 [0289] Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
 [0290] 20 25 30
 [0291] His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
 [0292] 35 40 45
 [0293] Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Ala Ser
 [0294] 50 55 60
 [0295] Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
 [0296] 65 70 75 80
 [0297] Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
 [0298] 85 90 95
 [0299] Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
 [0300] 100 105 110
 [0301] Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu
 [0302] 115
 [0303] <210> 17
 [0304] <211> 351
 [0305] <212> DNA
 [0306] <213> 人工序列(Artificial)
 [0307] <220>
 [0308] <223> HL161C的Lv
 [0309] <400> 17
 [0310] gacatccaga tgaccagtc accatcatcc ctttccgcat ctgtcggaga tagagtgact 60
 [0311] atcacctgca gggctttctca aggtatttcc aactacctcg cctggttcca gcaaaagcca 120

[0312] ggtaaagccc caaagagctt gatctacgcc gcttctagtc tgcagagtgg agttcctagt 180
 [0313] aagttctccg gctctggcag tggcacagat ttaccttga ccatttccag cctgcagtct 240
 [0314] gaggatttcg ctacctacta ttgtcagcag tatgacagct atccccccac atttgggggg 300
 [0315] ggcactaagg tggagataaa acggacagtg gctgccccctt ctgtctttat t 351
 [0316] <210> 18
 [0317] <211> 117
 [0318] <212> PRT
 [0319] <213> 人工序列(Artificial)
 [0320] <220>
 [0321] <223> HL161C的Lv
 [0322] <400> 18
 [0323] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 [0324] 1 5 10 15
 [0325] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
 [0326] 20 25 30
 [0327] Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 [0328] 35 40 45
 [0329] Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly
 [0330] 50 55 60
 [0331] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 [0332] 65 70 75 80
 [0333] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Ser Tyr Pro Pro
 [0334] 85 90 95
 [0335] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 [0336] 100 105 110
 [0337] Pro Ser Val Phe Ile
 [0338] 115
 [0339] <210> 19
 [0340] <211> 351
 [0341] <212> DNA
 [0342] <213> 人工序列(Artificial)
 [0343] <220>
 [0344] <223> HL161D的Lv
 [0345] <400> 19
 [0346] agctatgagc tgaccacgcc tctgagcgta tctgtcgtc tcggccagac agccagaatt 60
 [0347] acctgtggcg gcaataacat aggatccaaa aatgttcaact ggtatcagca aaaacctggc 120
 [0348] caagctcccg tgctcgtgat ctaccgggac tctaaccgac ccagtggaat ccccgaaacgc 180
 [0349] tttagcgggtt ccaactctgg aaatacagct actctgacta tctccagggc tcaggccggg 240
 [0350] gatgaggccg attactactg ccaggtgtgg gactcaagca cagtgggtctt cggcggaggt 300

[0351] accaagttga ctgttcttgg gcagccaaag gccgcacctt cagtgcacct g 351
 [0352] <210> 20
 [0353] <211> 117
 [0354] <212> PRT
 [0355] <213> 人工序列(Artificial)
 [0356] <220>
 [0357] <223> HL161D的Lv
 [0358] <400> 20
 [0359] Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Leu Ser Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
 [0360] 1 5 10 15
 [0361] Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Asn Val
 [0362] 20 25 30
 [0363] His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 [0364] 35 40 45
 [0365] Arg Asp Ser Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 [0366] 50 55 60
 [0367] Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Ala Gln Ala Gly
 [0368] 65 70 75 80
 [0369] Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Thr Val Val
 [0370] 85 90 95
 [0371] Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala
 [0372] 100 105 110
 [0373] Pro Ser Val Thr Leu
 [0374] 115
 [0375] <210> 21
 [0376] <211> 5
 [0377] <212> PRT
 [0378] <213> 人工序列(Artificial)
 [0379] <220>
 [0380] <223> HL161A的Hv CDR1
 [0381] <400> 21
 [0382] Ser Cys Val Met Thr
 [0383] 1 5
 [0384] <210> 22
 [0385] <211> 17
 [0386] <212> PRT
 [0387] <213> 人工序列(Artificial)
 [0388] <220>
 [0389] <223> HL161A的Hv CDR2

[0390]	<400> 22
[0391]	Val Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
[0392]	1 5 10 15
[0393]	Gly
[0394]	<210> 23
[0395]	<211> 12
[0396]	<212> PRT
[0397]	<213> 人工序列(Artificial)
[0398]	<220>
[0399]	<223> HL161A的Hv CDR3
[0400]	<400> 23
[0401]	Thr Pro Trp Trp Leu Arg Ser Pro Phe Phe Asp Tyr
[0402]	1 5 10
[0403]	<210> 24
[0404]	<211> 11
[0405]	<212> PRT
[0406]	<213> 人工序列(Artificial)
[0407]	<220>
[0408]	<223> HL161A的Lv CDR1
[0409]	<400> 24
[0410]	Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Thr Ser Val His
[0411]	1 5 10
[0412]	<210> 25
[0413]	<211> 7
[0414]	<212> PRT
[0415]	<213> 人工序列(Artificial)
[0416]	<220>
[0417]	<223> HL161A的Lv CDR2
[0418]	<400> 25
[0419]	Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
[0420]	1 5
[0421]	<210> 26
[0422]	<211> 10
[0423]	<212> PRT
[0424]	<213> 人工序列(Artificial)
[0425]	<220>
[0426]	<223> HL161A的Lv CDR3
[0427]	<400> 26
[0428]	Val Arg Asp Ser Ser Ser Asp His Val Ile

[0429]	1	5	10
[0430]	<210> 27		
[0431]	<211> 5		
[0432]	<212> PRT		
[0433]	<213> 人工序列(Artificial)		
[0434]	<220>		
[0435]	<223> HL161B或HL161BK的Hv CDR1		
[0436]	<400> 27		
[0437]	Phe Ser Tyr Trp Val		
[0438]	1	5	
[0439]	<210> 28		
[0440]	<211> 16		
[0441]	<212> PRT		
[0442]	<213> 人工序列(Artificial)		
[0443]	<220>		
[0444]	<223> HL161B或HL161BK的Hv CDR2		
[0445]	<400> 28		
[0446]	Thr Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser		
[0447]	1	5	10 15
[0448]	<210> 29		
[0449]	<211> 11		
[0450]	<212> PRT		
[0451]	<213> 人工序列(Artificial)		
[0452]	<220>		
[0453]	<223> HL161B或HL161BK的Hv CDR3		
[0454]	<400> 29		
[0455]	Arg Ala Gly Ile Leu Thr Gly Tyr Leu Asp Ser		
[0456]	1	5	10
[0457]	<210> 30		
[0458]	<211> 11		
[0459]	<212> PRT		
[0460]	<213> 人工序列(Artificial)		
[0461]	<220>		
[0462]	<223> HL161B或HL161BK的Lv CDR1		
[0463]	<400> 30		
[0464]	Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His		
[0465]	1	5	10
[0466]	<210> 31		
[0467]	<211> 7		

[0468] <212> PRT
[0469] <213> 人工序列(Artificial)
[0470] <220>
[0471] <223> HL161B或HL161BK的Lv CDR2
[0472] <400> 31
[0473] Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
[0474] 1 5
[0475] <210> 32
[0476] <211> 11
[0477] <212> PRT
[0478] <213> 人工序列(Artificial)
[0479] <220>
[0480] <223> HL161B或HL161BK的Lv CDR3
[0481] <400> 32
[0482] Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Val Val
[0483] 1 5 10
[0484] <210> 33
[0485] <211> 5
[0486] <212> PRT
[0487] <213> 人工序列(Artificial)
[0488] <220>
[0489] <223> HL161C的Hv CDR1
[0490] <400> 33
[0491] Gly Cys Tyr Met His
[0492] 1 5
[0493] <210> 34
[0494] <211> 17
[0495] <212> PRT
[0496] <213> 人工序列(Artificial)
[0497] <220>
[0498] <223> HL161C的Hv CDR2
[0499] <400> 34
[0500] Arg Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
[0501] 1 5 10 15
[0502] Gly
[0503] <210> 35
[0504] <211> 9
[0505] <212> PRT
[0506] <213> 人工序列(Artificial)

[0507] <220>
[0508] <223> HL161C的Hv CDR3
[0509] <400> 35
[0510] Asp Tyr Ser Gly Trp Ser Phe Asp Tyr
[0511] 1 5
[0512] <210> 36
[0513] <211> 11
[0514] <212> PRT
[0515] <213> 人工序列(Artificial)
[0516] <220>
[0517] <223> HL161C的Lv CDR1
[0518] <400> 36
[0519] Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Ala
[0520] 1 5 10
[0521] <210> 37
[0522] <211> 7
[0523] <212> PRT
[0524] <213> 人工序列(Artificial)
[0525] <220>
[0526] <223> HL161C的Lv CDR2
[0527] <400> 37
[0528] Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
[0529] 1 5
[0530] <210> 38
[0531] <211> 10
[0532] <212> PRT
[0533] <213> 人工序列(Artificial)
[0534] <220>
[0535] <223> HL161C的Lv CDR3
[0536] <400> 38
[0537] Gln Gln Tyr Asp Ser Tyr Pro Pro Thr Phe
[0538] 1 5 10
[0539] <210> 39
[0540] <211> 5
[0541] <212> PRT
[0542] <213> 人工序列(Artificial)
[0543] <220>
[0544] <223> HL161D的Hv CDR1
[0545] <400> 39

[0546] Ser Tyr Tyr Trp Gly
 [0547] 1 5
 [0548] <210> 40
 [0549] <211> 16
 [0550] <212> PRT
 [0551] <213> 人工序列(Artificial)
 [0552] <220>
 [0553] <223> HL161D的Hv CDR2
 [0554] <400> 40
 [0555] Asn Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Met Ser
 [0556] 1 5 10 15
 [0557] <210> 41
 [0558] <211> 13
 [0559] <212> PRT
 [0560] <213> 人工序列(Artificial)
 [0561] <220>
 [0562] <223> HL161D的Hv CDR3
 [0563] <400> 41
 [0564] Gln Leu Ser Tyr Asn Trp Asn Asp Arg Leu Phe Asp Tyr
 [0565] 1 5 10
 [0566] <210> 42
 [0567] <211> 11
 [0568] <212> PRT
 [0569] <213> 人工序列(Artificial)
 [0570] <220>
 [0571] <223> HL161D的Lv CDR1
 [0572] <400> 42
 [0573] Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Asn Val His
 [0574] 1 5 10
 [0575] <210> 43
 [0576] <211> 7
 [0577] <212> PRT
 [0578] <213> 人工序列(Artificial)
 [0579] <220>
 [0580] <223> HL161D的Lv CDR2
 [0581] <400> 43
 [0582] Arg Asp Ser Asn Arg Pro Ser
 [0583] 1 5
 [0584] <210> 44

[0585] <211> 9
[0586] <212> PRT
[0587] <213> 人工序列(Artificial)
[0588] <220>
[0589] <223> HL161D的Lv CDR3
[0590] <400> 44
[0591] Gln Val Trp Asp Ser Ser Thr Val Val
[0592] 1 5

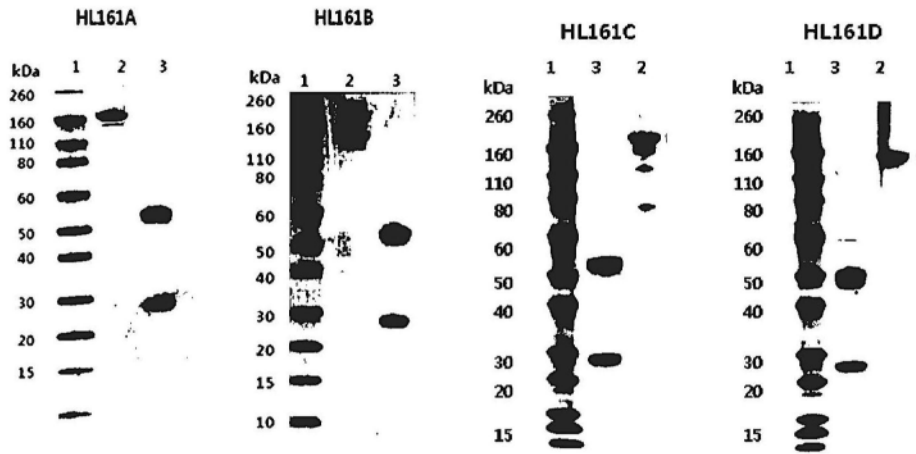


图1

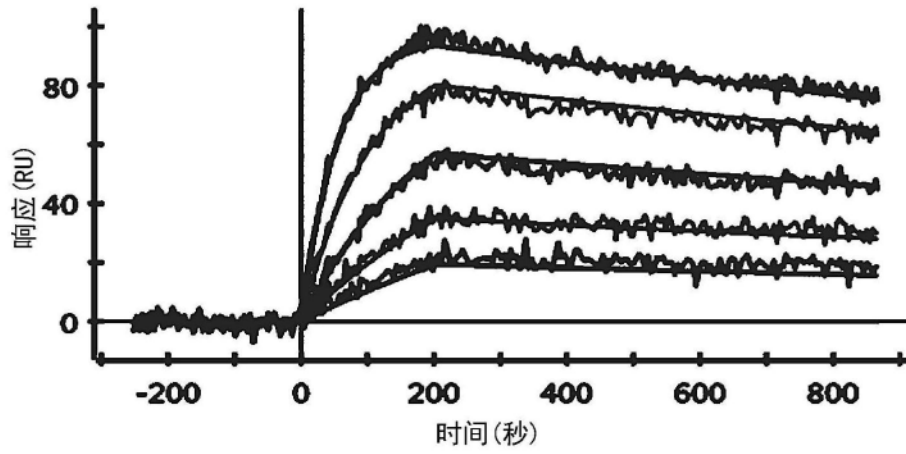


图2a

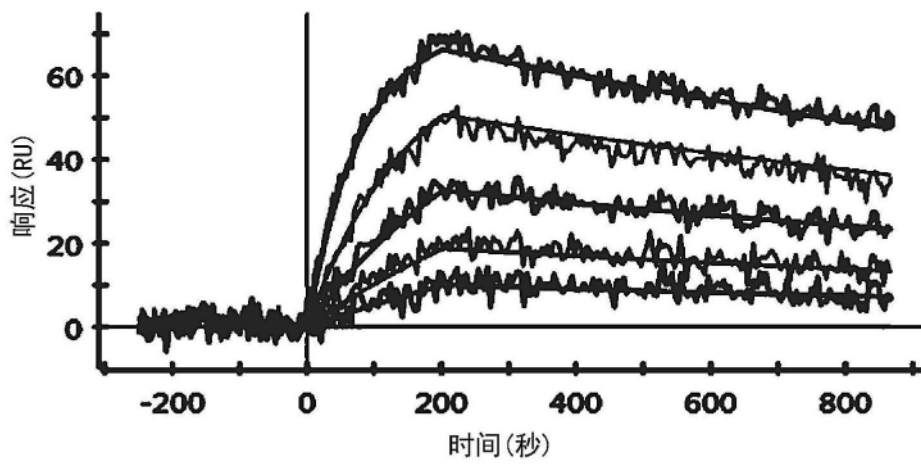


图2b

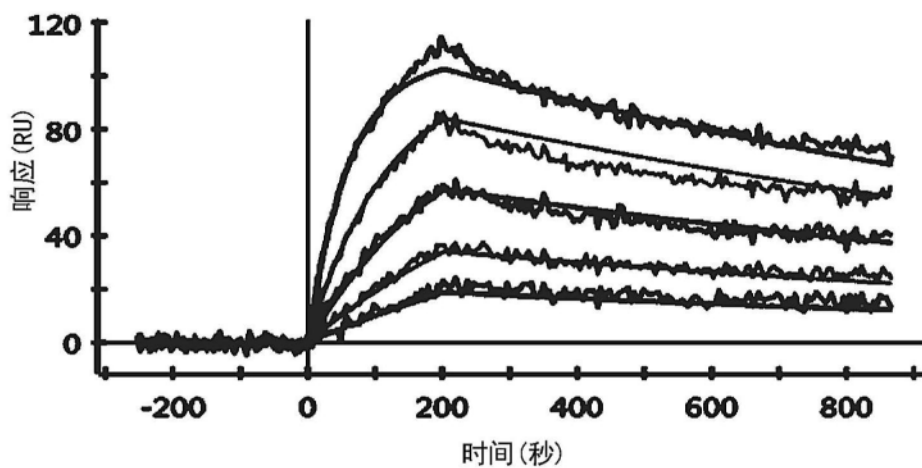


图2c

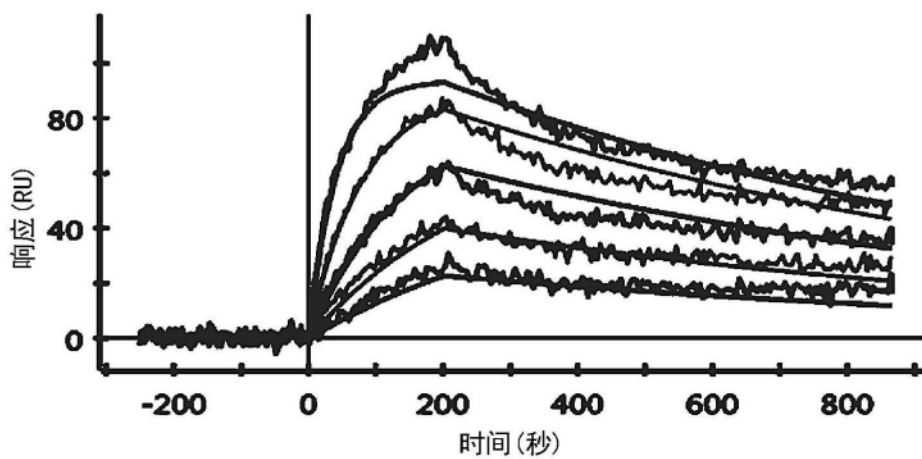


图2d

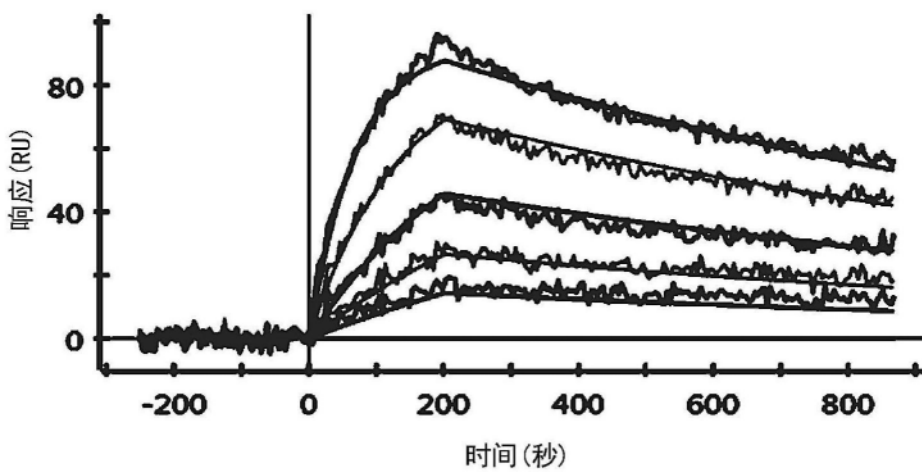


图2e

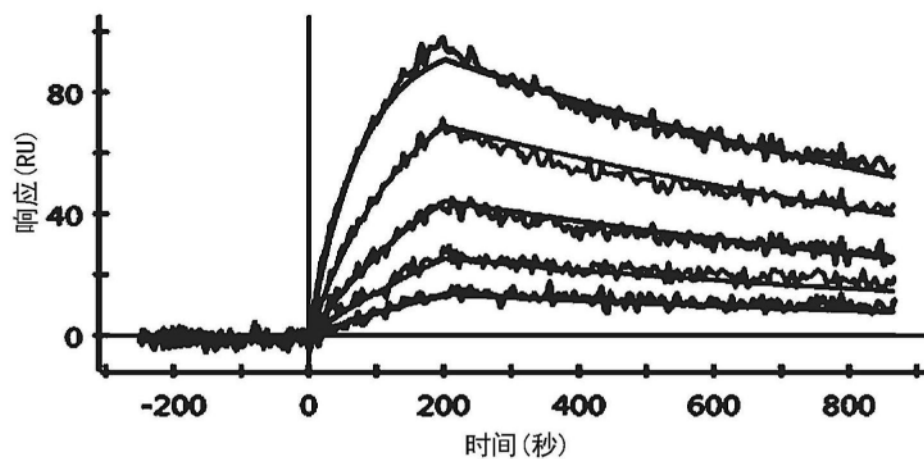


图2f

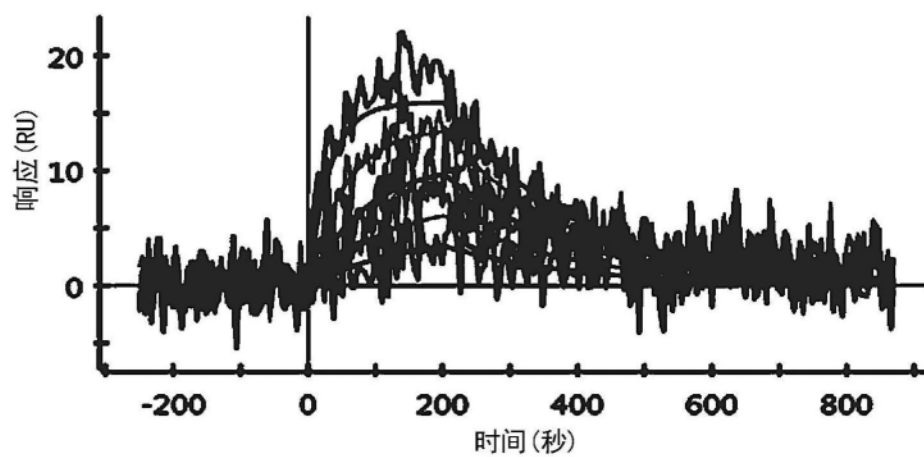


图2g

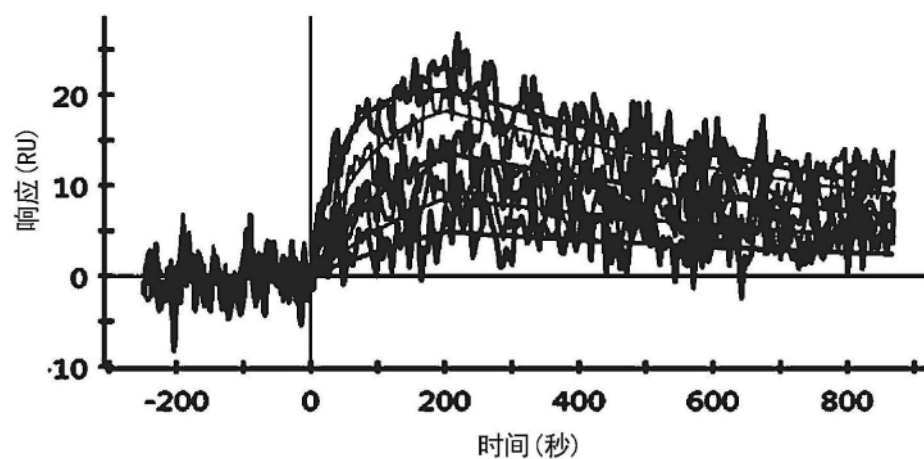


图2h

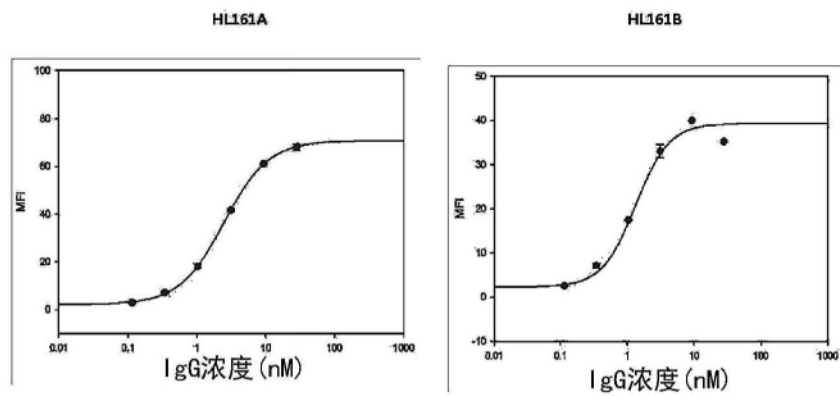


图3

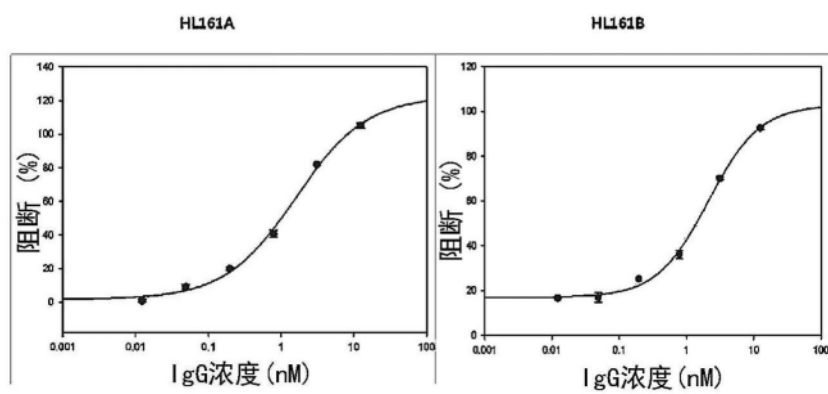


图4

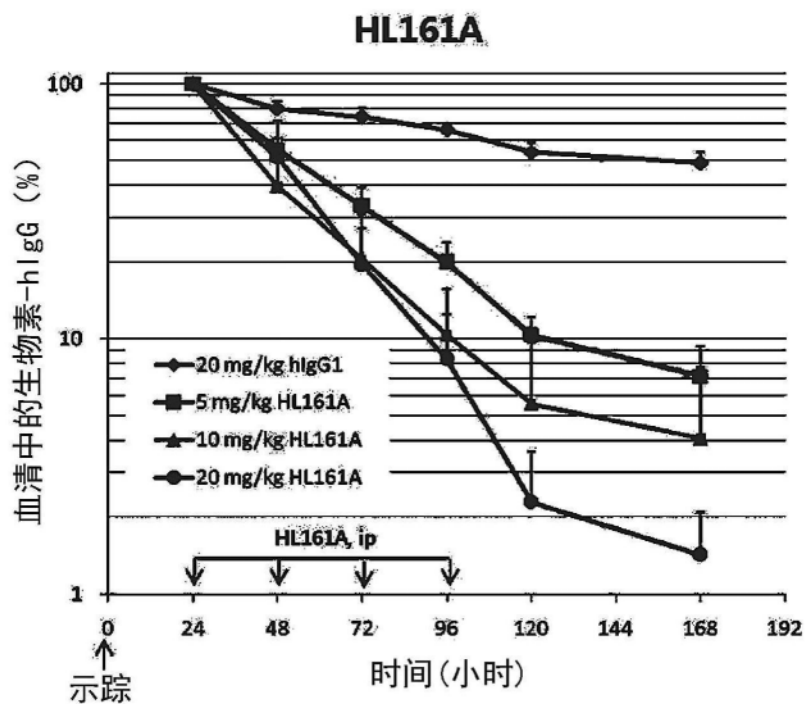


图5a

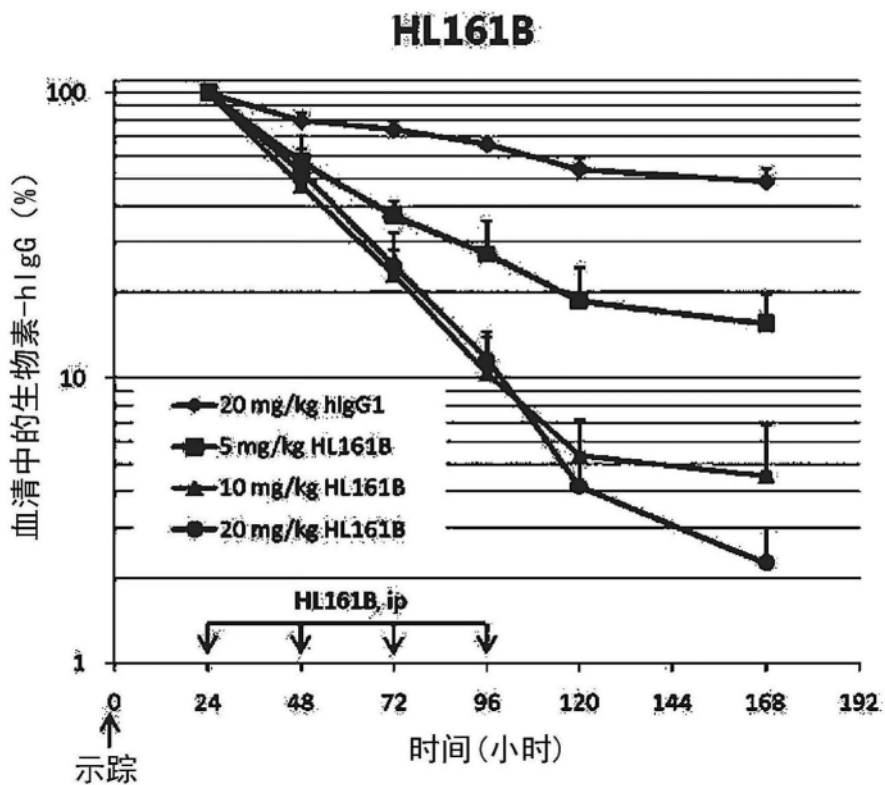


图5b

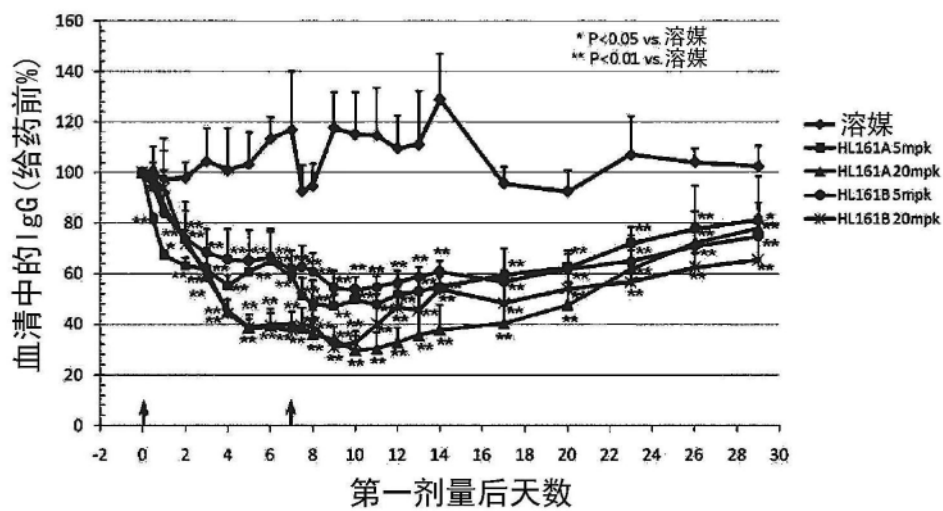


图6a

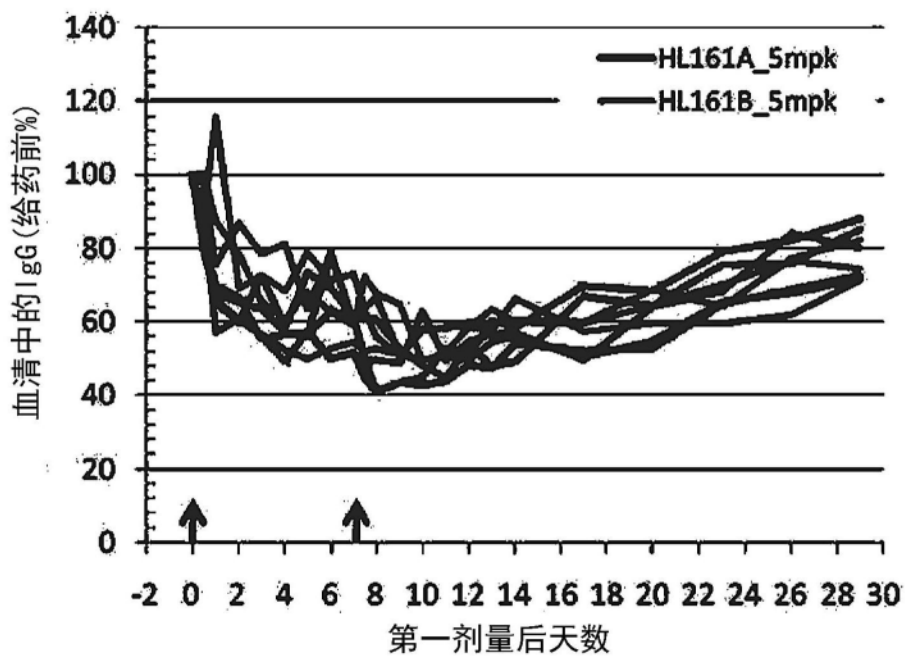


图6b

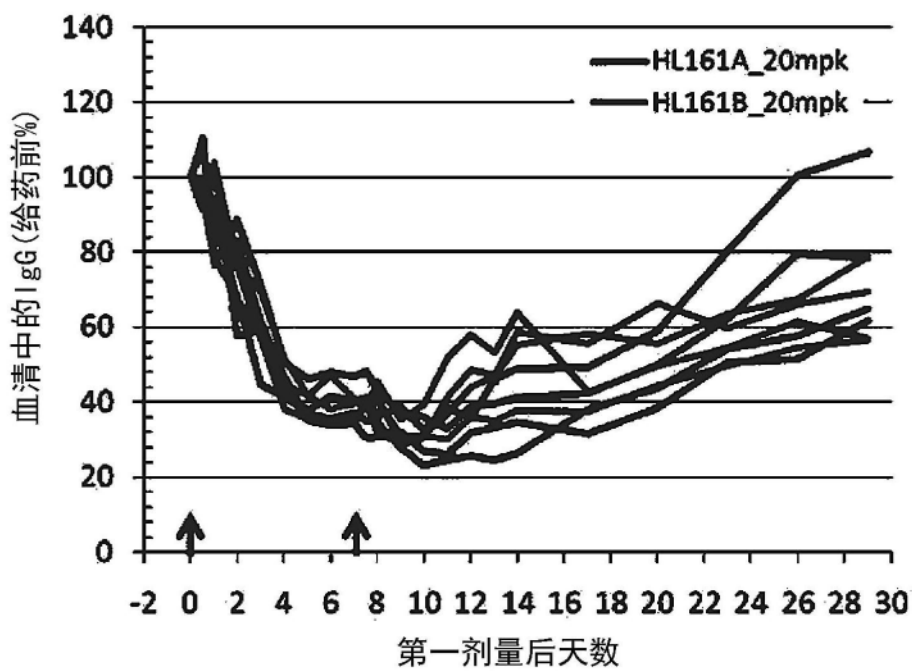


图6c

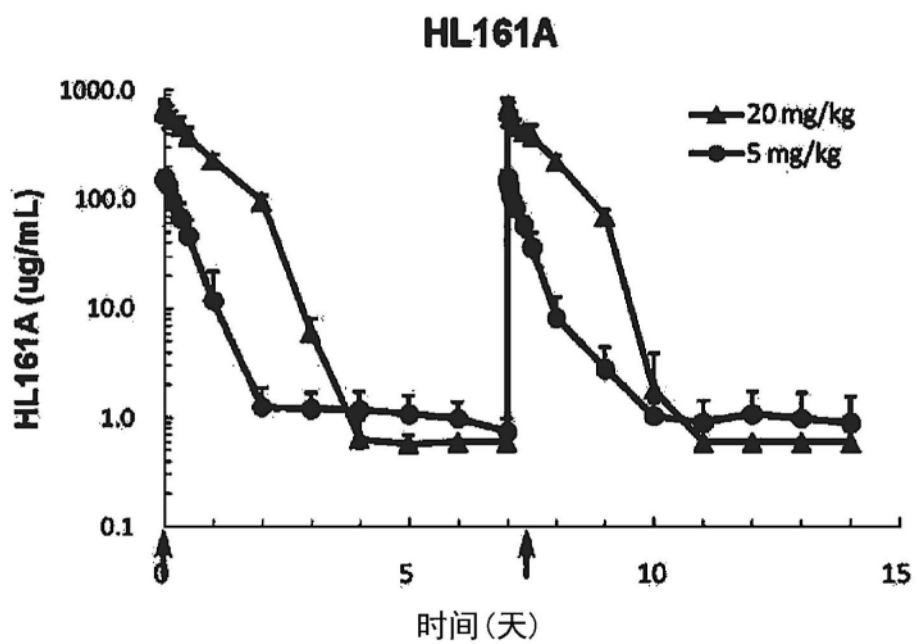


图7a

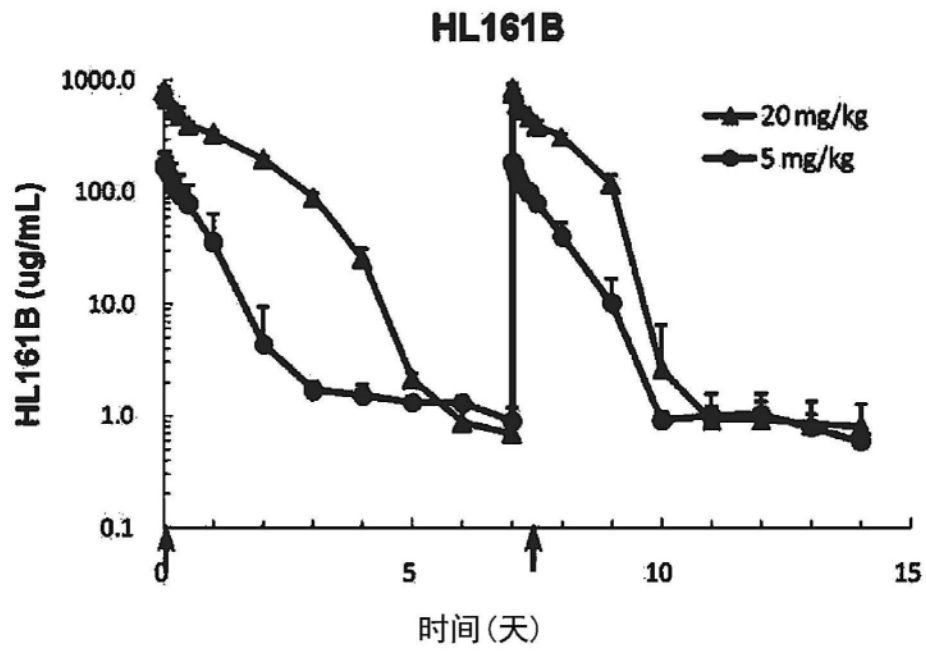


图7b

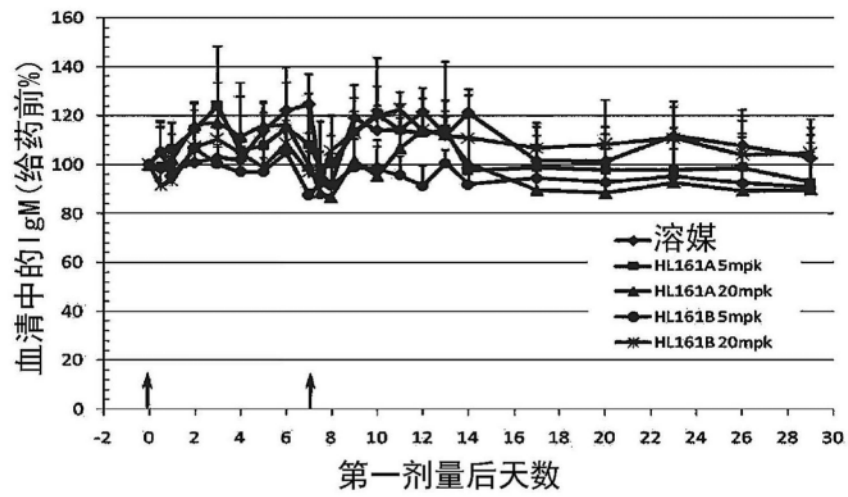


图8a

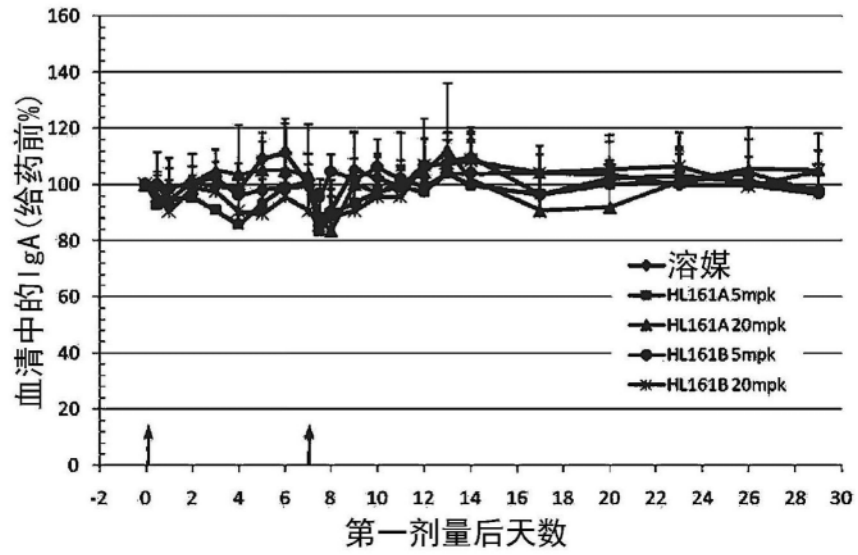


图8b

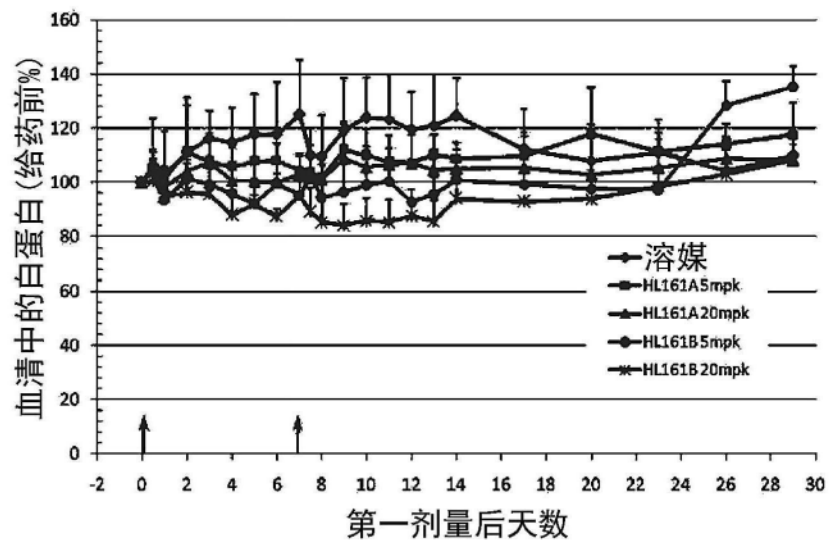


图8c