



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109641045 A

(43)申请公布日 2019.04.16

(21)申请号 201780039549.3

A.R.赫恩

(22)申请日 2017.04.25

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(30)优先权数据

62/326907 2016.04.25 US

代理人 罗文锋 黄希贵

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.12.25

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

C07K 16/00(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/029375 2017.04.25

C07K 16/46(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/189556 EN 2017.11.02

G01N 33/53(2006.01)

(71)申请人 SYNT免疫公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 L.J.布隆伯格 R.S.布隆伯格

S.D.琼斯 D.鲁佩尼安

R.G.E.霍尔加特 T.D.琼斯

权利要求书5页 说明书27页

序列表44页 附图10页

(54)发明名称

人源化亲和力成熟的抗FCRN抗体

(57)摘要

本文提供了可用于结合FcRn并阻断FcRn与人血清白蛋白的结合的重组抗体及其抗原结合部分。所述FcRn结合蛋白可用于治疗多种病症，包括急性和慢性毒性暴露。

Kabat No.	1	2	3	4
SEQ ID NO.	123456789012345678901234567890	12345AB	67890123	
ADM31	EVQLVESGGGLV	KPGGSLKLS	CAASGFTFS	XXXXXX
VH1	EVQLVESGGGLV	KPGGSLKLS	CAASGFTFS	XXXXXX--
VH3	EVQLVESGGGLV	KPGGSLKLS	CAASGFTFS	XXXXXX--
VH4	EVQLVESGGGLV	KPGGSLKLS	CAASGFTFS	XXXXXX--

Kabat No.	5	6	7	8
SEQ ID NO.	456789	012ABC3456789012345	67890123456789012ABC	
ADM31	GLEWVA	XXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	RFTISRDNKNTLFLQMTSL
VH1	GLEWVA	XXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	RFTISRDNKNTLYLQMSL
VH3	GLEWVA	XXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	RFTISRDNKNTLYLQMSL
VH4	GLEWVA	XXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	RFTISRDNKNTLYLQMSL

Kabat No.	9	10	11
SEQ ID NO.	345678901234	567890ABCDEFGHIJK12	34567890123
ADM31	RSED	TAMYCAR	XXXXXXXXXX
VH1	RAED	TAMYCAR	XXXXXXXXXX
VH3	RAED	TAMYCAR	XXXXXXXXXX
VH4	RSED	TAMYCAR	XXXXXXXXXX

1. 一种包含重链可变区的结合FcRn的抗体或其抗原结合片段,所述重链可变区包含CDR1、CDR2和CDR3,其中:

CDR1的序列是SEQ ID NO:2;

CDR2的序列是SEQ ID NO:4;并且

CDR3的序列是SEQ ID NO:48。

2. 如权利要求1所述的抗体或抗原结合片段,其中CDR3的序列是SEQ ID NO:46。

3. 如权利要求1所述的抗体或抗原结合片段,其中CDR3的序列是SEQ ID NO:44。

4. 如权利要求1所述的抗体或抗原结合片段,其中CDR3的序列选自由以下组成的组:SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:39。

5. 如权利要求1所述的抗体或抗原结合片段,其中CDR3的序列是SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:31。

6. 一种包含重链可变区和轻链可变区的结合FcRn的抗体或其抗原结合片段,其中所述重链和所述轻链可变区各自包含CDR1、CDR2和CDR3,并且其中:

所述重链的CDR1的序列是SEQ ID NO:2;

所述重链的CDR2的序列是SEQ ID NO:4;并且

所述重链的CDR3的序列选自由以下组成的组:SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39;并且

所述轻链的CDR1的序列是SEQ ID NO:6;

所述轻链的CDR2的序列是SEQ ID NO:8;并且

所述轻链的CDR3的序列是SEQ ID NO:10。

7. 如权利要求6所述的抗体或抗原结合片段,其中所述重链的CDR3的序列是SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:31。

8. 如权利要求7所述的抗体或抗原结合片段,其中所述重链的CDR3的序列是SEQ ID NO:27。

9. 如权利要求7所述的抗体或抗原结合片段,其中所述重链的CDR3的序列是SEQ ID NO:31。

10. 如权利要求1至9中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段是嵌合抗体或抗原结合片段或人源化抗体或抗原结合片段。

11. 如权利要求1至9中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段是人源化抗体或抗原结合片段。

12. 一种包含重链可变区的结合FcRn的抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区的序列是SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38或SEQ ID NO:40,或者所述重链可变区的序列与SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38或SEQ ID NO:40的重链可变区氨基酸序列至少95%相同。

13. 如权利要求12所述的抗体或抗原结合片段,其还包含轻链可变区,其中所述轻链可变区的序列是SEQ ID NO:22。

14. 如权利要求12所述的抗体或抗原结合片段,其中所述重链可变区的序列是SEQ ID

NO:28或SEQ ID NO:32。

15. 如权利要求14所述的抗体或抗原结合片段,其中所述重链可变区的序列是SEQ ID NO:28,并且还包含轻链可变区,其中所述轻链可变区的序列是SEQ ID NO:22。

16. 如权利要求14所述的抗体或抗原结合片段,其中所述重链可变区的序列是SEQ ID NO:32,并且还包含轻链可变区,其中所述轻链可变区的序列是SEQ ID NO:22。

17. 如权利要求12所述的抗体或其抗原结合片段,其还包含轻链可变区,其中所述轻链可变区的序列是SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:24,或者所述轻链可变区的序列与SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:24的轻链可变区氨基酸序列至少95%相同。

18. 一种包含轻链可变区的结合FcRn的抗体或其抗原结合片段,其中所述轻链可变区的序列是SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:24,或者所述轻链可变区的序列与SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:24的轻链可变区氨基酸序列至少95%相同。

19. 如权利要求18所述的抗体或抗原结合片段,其中所述轻链可变区的序列是SEQ ID NO:22。

20. 如权利要求19所述的抗体或抗原结合片段,其还包含重链可变区,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:12的框架区。

21. 如权利要求20所述的抗体或抗原结合片段,其还包含重链可变区,其中所述重链可变区的序列是SEQ ID NO:28。

22. 如权利要求20所述的抗体或抗原结合片段,其还包含重链可变区,其中所述重链可变区的序列是SEQ ID NO:32。

23. 一种包含重链可变区的结合FcRn的抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:16的重链可变区氨基酸序列的框架区,或与SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:16的框架区至少95%相同的框架区。

24. 如权利要求23所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:12的重链可变区氨基酸序列的框架区,或与SEQ ID NO:12的框架区至少95%相同的框架区。

25. 一种包含轻链可变区的结合FcRn的抗体或其抗原结合片段,其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:24的轻链可变区氨基酸序列的框架区,或与SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:24的框架区至少95%相同的框架区。

26. 如权利要求25所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:22的轻链可变区氨基酸序列的框架区,或与SEQ ID NO:22的框架区至少95%相同的框架区。

27. 如权利要求23所述的抗体或其抗原结合片段,其还包含轻链可变区,其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:24的轻链可变区氨基酸序列的框架区,或与SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:24的框架区至少95%相同的框架区。

28. 如权利要求1至27中任一项所述的抗体,其具有同种型IgG4。

29. 如权利要求28所述的抗体,其在所述重链中含有S241P修饰。
30. 如权利要求28所述的抗体,其在所述重链中缺乏C-末端赖氨酸。
31. 如权利要求28所述的抗体,其在所述重链中含有S241P修饰,并且在所述重链中缺乏C-末端赖氨酸。
32. 如权利要求1至27中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其是scFv、Fv、Fab'、Fab、F(ab')₂或双抗体。
33. 一种抗体,其与如权利要求1至32中任一项所述的抗体或抗原结合片段竞争或交叉阻断所述抗体或抗原结合片段。
34. 一种分离的核酸,其编码如权利要求1至33中任一项所述的FcRn抗体或抗原结合片段。
35. 一种核酸载体,其包含根据权利要求34的分离的核酸。
36. 一种原核或真核宿主细胞,其包含根据权利要求34的分离的核酸。
37. 一种组合物,其包含如权利要求1至33中任一项的FcRn抗体或抗原结合片段和药学上可接受的载体。
38. 一种调节FcRn与白蛋白之间相互作用的方法,其包括使FcRn与如权利要求1至33中任一项的抗体或抗原结合片段接触。
39. 一种降低受试者中白蛋白水平的方法,其包括向所述受试者施用有效降低白蛋白水平的量的如权利要求1至33中任一项的抗体或抗原结合片段。
40. 如权利要求39所述的方法,其中所述受试者是哺乳动物。
41. 如权利要求40所述的方法,其中所述哺乳动物是人。
42. 一种降低受试者中白蛋白结合毒素水平的方法,其包括向所述受试者施用有效降低白蛋白结合毒素水平的量的如权利要求1至33中任一项的抗体或抗原结合片段。
43. 如权利要求42所述的方法,其中所述白蛋白结合毒素是铜、血红素、长链脂肪酸、锌、胆红素、甲状腺素、类二十烷酸、色氨酸、维生素D3、胆汁酸、钙、镁、氯化物、吡啶美辛、溴酚蓝、水杨酸盐、华法林、保泰松、地高辛、咪塞米、苯妥英、氯磺丙脲、苄青霉素、伊文思蓝、地西洋、布洛芬、萘普生、氯贝特、氯丙嗪、丙咪嗪、奎尼丁、蓖麻毒素、胺碘酮或对乙酰氨基酚。
44. 如权利要求43所述的方法,其中所述白蛋白结合毒素是对乙酰氨基酚。
45. 如权利要求44所述的方法,所述方法还包括同时、分开或顺序施用治疗有效量的N-乙酰半胱氨酸。
46. 一种预防、治疗、抑制或降低受试者中毒素暴露的方法,其包括向所述受试者施用有效量的如权利要求1至33中任一项的抗体或抗原结合片段。
47. 如权利要求46所述的方法,其中所述白蛋白结合毒素是铜、血红素、长链脂肪酸、锌、胆红素、甲状腺素、类二十烷酸、色氨酸、维生素D3、胆汁酸、钙、镁、氯化物、吡啶美辛、溴酚蓝、水杨酸盐、华法林、保泰松、地高辛、咪塞米、苯妥英、氯磺丙脲、苄青霉素、伊文思蓝、地西洋、布洛芬、萘普生、氯贝特、氯丙嗪、丙咪嗪、奎尼丁、蓖麻毒素、胺碘酮或对乙酰氨基酚。
48. 如权利要求47所述的方法,其中所述白蛋白结合毒素是对乙酰氨基酚。
49. 如权利要求48所述的方法,所述方法还包括同时、分开或顺序施用治疗有效量的N-

乙酰半胱氨酸。

50. 一种治疗与白蛋白毒性相关的医学病状的方法,其包括向所述受试者施用有效量的如权利要求1至33中任一项的抗体或抗原结合片段。

51. 如权利要求50所述的方法,其中所述医学病状是动脉粥样硬化性冠状和外周血管疾病。

52. 如权利要求50所述的方法,其中所述医学病状是糖尿病性血管病变并发症。

53. 如权利要求50所述的方法,其中所述医学病状是阿尔茨海默病。

54. 如权利要求50所述的方法,其中所述医学病状是外伤性脑损伤。

55. 如权利要求50所述的方法,其中所述医学病状是糖尿病。

56. 如权利要求50所述的方法,其中所述医学病状是终末期肾衰竭。

57. 一种鉴定在酸性pH和生理pH下均结合FcRn并阻断白蛋白结合FcRn的抗体的方法,所述方法包括:

(a) 使候选抗体的集合与FcRn或其一部分在pH 5.8-6.4下接触并且分离结合FcRn或其一部分的所述抗体;

(b) 使步骤(a)的所述分离抗体与FcRn或其一部分在pH 6.8-7.6下接触并且分离结合FcRn或其一部分的所述抗体;

(c) 使步骤(b)的所述分离抗体与FcRn或其一部分在pH 5.8-6.4下接触并且分离结合FcRn或其一部分的所述抗体。

(d) 测定步骤(c)的所述分离抗体阻断白蛋白与FcRn结合的能力。

58. 一种鉴定在酸性pH和生理pH下均结合FcRn并阻断白蛋白结合FcRn的抗体的方法,所述方法包括:

(a) 提供候选FcRn结合抗体的集合;

(b) 使所述候选FcRn结合抗体的集合与FcRn或其一部分在pH6.0下在使得在所述FcRn或其一部分与至少一些所述候选FcRn结合抗体之间形成复合物的条件下接触;

(c) 分离所述复合物;

(d) 从所述分离的复合物分离所述候选FcRn结合抗体;

(e) 使来自步骤(d)的所述分离的候选FcRn结合抗体与FcRn或其一部分在pH 7.4下在使得在所述FcRn或其一部分与至少一些所述候选FcRn结合抗体之间形成复合物的条件下接触;

(f) 分离在步骤(e)中形成的所述复合物;

(g) 从步骤(f)的所述分离的复合物分离所述候选FcRn结合抗体;

(h) 使来自步骤(g)的所述分离的候选FcRn结合抗体与FcRn或其一部分在pH 6.0下在使得在所述FcRn或其一部分与至少一些所述候选FcRn结合抗体之间形成复合物的条件下接触;

(i) 分离在步骤(h)中形成的所述复合物;

(j) 从步骤(i)的所述分离的复合物分离所述候选FcRn结合抗体以获得在酸性pH和生理pH下均结合FcRn的抗体。

(k) 测定所述候选FcRn结合抗体阻断白蛋白与FcRn结合的能力。

59. 一种在施用基于白蛋白的治疗剂之前促进内源性白蛋白降解的方法,其包括在施

用所述基于白蛋白的治疗剂之前,向需要用所述基于白蛋白的治疗剂治疗的受试者施用对FcRn的白蛋白结合位点有特异性的抗FcRn抗体或其片段。

60.如权利要求59所述的方法,其还包括向所述受试者施用所述基于白蛋白的治疗剂的步骤。

61.如权利要求60所述的方法,其中增强了所述基于白蛋白的治疗剂的药代动力学或药效动力学。

62.如权利要求59所述的方法,其中所述抗FcRn抗体或其片段包含SEQ ID NO:28的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:22的轻链可变区序列。

63.如权利要求59所述的方法,其中所述抗FcRn抗体或其片段包含SEQ ID NO:32的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:22的轻链可变区序列。

64.一种促进已向受试者施用的外源性基于白蛋白的治疗剂降解的方法,其包括向所述受试者施用有效量的对FcRn的所述白蛋白结合位点有特异性的抗FcRn抗体或其片段。

65.如权利要求64所述的方法,其中所述抗FcRn抗体或其片段包含SEQ ID NO:28的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:22的轻链可变区序列。

66.如权利要求64所述的方法,其中所述抗FcRn抗体或其片段包含SEQ ID NO:32的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:22的轻链可变区序列。

人源化亲和成熟的抗FCRN抗体

[0001] 本申请要求2016年4月25日提交的美国申请号62/326,907的优先权,所述申请整体并入本文。

技术领域

[0002] 本发明涉及结合FcRn的抗体及其抗原结合部分以及其用于调节或抑制FcRn与白蛋白相互作用的用途。所述抗体可用于作用于最小化结合白蛋白的某些化合物或分子的毒性作用的治疗剂。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有已通过EFS-Web以ASCII格式提交且据此以引用的方式整体并入本文的序列表。2017年4月25日创建的序列表名为162255.46276_Sequence-Listing.txt且大小为58,787字节。

背景技术

[0005] 新生儿Fc受体(FcRn)是IgG的细胞内运输整合膜Fc受体。FcRn最初被鉴定为在新生儿生命中起作用的受体。它最早作为12kDa与40-50kDa蛋白质之间的异二聚体从啮齿动物肠道分离(Rodewald和Kraehenbuhl 1984, *J. Cell. Biol.* 99(1Pt2):159s-154s; Simister和Rees, 1985, *Eur. J. Immunol.* 15:733-738),并且在1989年被克隆(Simister和Mostov, 1989, *Nature* 337:184-187)。对FcRn的克隆和后续结晶揭示它具有与12kDa β 2微球蛋白轻链非共价缔合的大约50kDa I类主要组织相容性复合物(MHC)样重链(Raghavan等, 1993, *Biochemistry* 32:8654-8660; Huber等, 1993, *J. Mol. Biol.* 230:1077-1083)。尽管最早被认定与胎儿和新生儿生命关联,但当今已知FcRn继续在整个成人生命中起作用。FcRn主要驻留在早期酸性内体中,在其中它以pH依赖性方式结合IgG的Fc区,在pH 6.5下具有微摩尔至纳摩尔亲和力,而在生理pH下FcRn与Fc的结合可忽略不计。在大多数细胞中,大部分FcRn存在于内体中,并且FcRn与它的IgG Fc配体之间的相互作用发生在所述酸性环境内。在一些细胞(诸如造血细胞)中,除细胞内表达之外,还可在细胞表面上检测到显著水平的FcRn(Zhu等, 2001, *J. Immunol.* 166:3266-3276)。在这种情况下,当细胞外环境是酸性时,如在赘生性或感染性病状的情况下,可能的是FcRn可在这些细胞类型的细胞表面上结合IgG。FcRn通过以下调控血清IgG浓度:结合内吞的单体IgG并保护所述内吞的单体IgG免于在溶酶体区室中降解,并且将IgG转运至细胞表面以便在中性细胞外pH下释放。通过这种机制,FcRn造成IgG的长血清半衰期,因为未被FcRn结合的IgG进入溶酶体途径并且被降解。

[0006] 由于FcRn与IgG或白蛋白之间在FcRn重链的相对面上的离子相互作用,因此FcRn含有白蛋白的结合位点,其不同于其IgG的Fc结构域的结合位点(Chaudhury等, 2006, *Biochemistry* 45:4983-4990)。像它与IgG的结合一样,FcRn与白蛋白的结合是强烈pH依赖性的,发生在酸性pH下(通常小于pH 6,并且最佳地在pH 5下)但不在中性pH下。白蛋白的FcRn结合保护白蛋白免于降解并导致白蛋白的延长血清半衰期。在小鼠中不存在FcRn表达时,白蛋白从循环损耗到胆汁中。(Kim等, 2006, *AmJ Gastrointest Liver Physiol* 290(2):

G352-60)。此外,越来越多的证据表明白蛋白在多种疾病环境中具有致病性,例如急性和慢性毒性暴露 (Taguchi, J Pharm Sci 2012)、动脉粥样硬化性冠状和外周血管疾病 (Song, Atherosclerosis 2012)、糖尿病性血管病变并发症 (Kim, Diab Metab J 2012; Murea, Am J Nephrol 2012) 和阿尔茨海默病 (Byun, PLoS One 2012)。

发明内容

[0007] 本发明提供了结合FcRn的抗体及其抗原结合部分。所述抗体结合与白蛋白的Fc结构域的结合位点重叠的FcRn的表位并且减少或抑制FcRn与白蛋白的结合。

[0008] 本文提供了一种包含重链可变区的结合FcRn的抗体或其抗原结合片段,所述重链可变区包含CDR1、CDR2和CDR3,其中:

[0009] CDR1的序列是SEQ ID NO:2;

[0010] CDR2的序列是SEQ ID NO:4;并且

[0011] CDR3的序列是SEQ ID NO:48。

[0012] 在一个实施方案中,CDR3的序列是SEQ ID NO:46。在另一个实施方案中,CDR3的序列是SEQ ID NO:44。

[0013] 在其他实施方案中,CDR3的序列选自由以下组成的组:SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:46和SEQ ID NO:48。在一个实施方案中,CDR3的序列是SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:31。

[0014] 本文还提供了一种包含重链可变区和轻链可变区的结合FcRn的抗体或其抗原结合片段,其中所述重链和所述轻链可变区各自包含CDR1、CDR2和CDR3,并且其中:

[0015] 所述重链的CDR1的序列是SEQ ID NO:2;

[0016] 所述重链的CDR2的序列是SEQ ID NO:4;并且

[0017] 所述重链的CDR3的序列选自由以下组成的组:SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39;并且

[0018] 所述轻链的CDR1的序列是SEQ ID NO:6;

[0019] 所述轻链的CDR2的序列是SEQ ID NO:8;并且

[0020] 所述轻链的CDR3的序列是SEQ ID NO:10。

[0021] 在一些实施方案中,所述重链的CDR3的序列是SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:31。

[0022] 在一些实施方案中,本文抗体或抗原结合片段是嵌合或人源化抗体或抗原结合片段。

[0023] 本文还提供了一种包含重链可变区的结合FcRn的抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区的序列是SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38或SEQ ID NO:40,或者所述重链可变区的序列与SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38或SEQ ID NO:40的重链可变区氨基酸序列至少95%相同。

[0024] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段还包含轻链可变区,其中所述轻链可变区的序列是SEQ ID NO:22。在一些实施方案中,所述重链可变区的序列是SEQ ID NO:

28或SEQ ID NO:32。在一些实施方案中,所述重链可变区的序列是SEQ ID NO:28。在其他实施方案中,所述重链可变区的序列是SEQ ID NO:32。

[0025] 还提供了一种包含轻链可变区的结合FcRn的抗体或其抗原结合片段,其中所述轻链可变区的序列是SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:24,或者所述轻链可变区的序列与SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:24的轻链可变区氨基酸序列至少95%相同。在一些实施方案中,所述轻链可变区的序列是SEQ ID NO:22。在一些实施方案中,所述轻链可变区的序列是SEQ ID NO:22,并且所述抗体或抗原结合片段还包含重链可变区,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:12的框架区。在一些实施方案中,所述轻链可变区的序列是SEQ ID NO:22,并且所述抗体或抗原结合片段还包含重链可变区,其中所述重链可变区的序列是SEQ ID NO:28。在其他实施方案中,所述轻链可变区的序列是SEQ ID NO:22,并且所述抗体或抗原结合片段还包含重链可变区,其中所述重链可变区的序列是SEQ ID NO:32。

[0026] 本文还提供了一种包含重链可变区的结合FcRn的抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:16的重链可变区氨基酸序列的框架区,或与SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:16的框架区至少95%相同的框架区。在一些实施方案中,所述重链可变区包含SEQ ID NO:12的重链可变区氨基酸序列的框架区,或与SEQ ID NO:12的框架区至少95%相同的框架区。

[0027] 还提供了一种包含轻链可变区的结合FcRn的抗体或其抗原结合片段,其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:24的轻链可变区氨基酸序列的框架区,或与SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:24的框架区至少95%相同的框架区。在一些实施方案中,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:22的轻链可变区氨基酸序列的框架区,或与SEQ ID NO:22的框架区至少95%相同的框架区。

[0028] 在本文所述抗体的一些实施方案中,所述抗体具有同种型IgG4。在一些实施方案中,所述抗体在重链中含有S241P修饰。在一些实施方案中,所述抗体在重链中缺乏C-末端赖氨酸。在一些实施方案中,所述抗体在重链中含有S241P修饰,并且在重链中缺乏C-末端赖氨酸。

[0029] 在一些实施方案中,本文描述的抗体或抗原结合片段是scFv、Fv、Fab'、Fab、F(ab')₂或双抗体。

[0030] 本文还提供了一种与本文所述结合FcRn的抗体或其抗原结合片段竞争或交叉阻断所述抗体或其抗原结合片段的抗体。

[0031] 本文还提供了一种编码本文所述FcRn抗体或抗原结合片段的分离的核酸。本文还提供了一种核酸载体,其包含编码本文所述FcRn抗体或抗原结合片段的分离的核酸。本文还提供了一种原核或真核宿主细胞,其包含编码本文所述FcRn抗体或抗原结合片段的分离的核酸。本文还提供了一种组合物,其包含本文所述FcRn抗体或抗原结合片段和药学上可接受的载体。

[0032] 本文还提供了一种调节FcRn与白蛋白之间相互作用的方法,其包括使FcRn与本文所述抗体或抗原结合片段接触。

[0033] 本文还提供了一种降低受试者中白蛋白水平的方法,其包括向受试者施用有效降低白蛋白水平的量的本文所述抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,受试者是哺乳动

物。在一些实施方案中，哺乳动物是人。

[0034] 本文还提供了一种降低受试者中白蛋白结合毒素水平的方法，其包括向受试者施用有效降低白蛋白结合毒素水平的量的本文所述抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中，白蛋白结合毒素可以是外源性或内源性的。在一些实施方案中，白蛋白结合毒素是铜、血红素、长链脂肪酸、锌、胆红素、甲状腺素、类二十烷酸、色氨酸、维生素D3、胆汁酸、钙、镁、氯化物、吲哚美辛、溴酚蓝、水杨酸盐、华法林、保泰松、地高辛、呋塞米、苯妥英、氯磺丙脲、苄青霉素、伊文思蓝、地西洋、布洛芬、萘普生、氯贝特、氯丙嗪、丙咪嗪、奎尼丁、蓖麻毒素、胺碘酮或对乙酰氨基酚。在一些实施方案中，白蛋白结合毒素可以是对乙酰氨基酚。在一些实施方案中，治疗有效量的本文所示抗体或其抗原结合部分可与其他药剂、药物或激素组合（例如同时、顺序或分开）施用。在一些实施方案中，已知疗法可以是护理标准。例如，在其中白蛋白结合毒素可以是对乙酰氨基酚的实施方案中，所述方法还可包括同时、分开或顺序施用N-乙酰半胱氨酸。

[0035] 本文还提供了预防、治疗、抑制或降低受试者中毒素暴露的方法，其包括向受试者施用有效量的本文所述抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中，白蛋白结合毒素可以是外源性或内源性的。在一些实施方案中，所述毒素是铜、血红素、长链脂肪酸、锌、胆红素、甲状腺素、类二十烷酸、色氨酸、维生素D3、胆汁酸、钙、镁、氯化物、吲哚美辛、溴酚蓝、水杨酸盐、华法林、保泰松、地高辛、呋塞米、苯妥英、氯磺丙脲、苄青霉素、伊文思蓝、地西洋、布洛芬、萘普生、氯贝特、氯丙嗪、丙咪嗪、奎尼丁、蓖麻毒素、胺碘酮或对乙酰氨基酚。在一些实施方案中，白蛋白结合毒素可以是对乙酰氨基酚。在一些实施方案中，治疗有效量的本文所示抗体或其抗原结合部分可与其他药剂、药物或激素组合（例如同时、顺序或分开）施用。在一些实施方案中，已知疗法可以是护理标准。例如，在其中白蛋白结合毒素可以是对乙酰氨基酚的实施方案中，所述方法还可包括同时、分开或顺序施用N-乙酰半胱氨酸。

[0036] 本文还提供了预防或治疗与白蛋白毒性相关的医学病状的方法，其包括向受试者施用有效量的本文所述抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中，所述医学病状是动脉粥样硬化性冠状和外周血管疾病。在一些实施方案中，所述医学病状是糖尿病性血管病变并发症。在一些实施方案中，所述医学病状是阿尔茨海默病。在一些实施方案中，所述医学病状是外伤性脑损伤。在一些实施方案中，所述医学病状是糖尿病。在一些实施方案中，所述医学病状是终末期肾衰竭。在一些实施方案中，治疗有效量的本文所示抗体或其抗原结合部分可与其他药剂、药物或激素组合（例如同时、顺序或分开）施用。在一些实施方案中，其他药剂、药物或激素可以是针对相应医学病状的已知疗法。在一些实施方案中，已知疗法可以是护理标准。

[0037] 本文还提供了一种在施用基于白蛋白的治疗剂之前促进内源性白蛋白降解的方法，其包括在施用基于白蛋白的治疗剂之前，向需要用基于白蛋白的治疗剂治疗的受试者施用对FcRn的白蛋白结合位点有特异性的抗FcRn抗体或其片段。

[0038] 本文还提供了一种促进已向受试者施用的外源性基于白蛋白的治疗剂降解的方法，其包括向受试者施用有效量的对FcRn的白蛋白结合位点有特异性的抗FcRn抗体或其片段。

[0039] 在一些实施方案中，所述方法还包括向受试者施用基于白蛋白的治疗剂的步骤。在一些实施方案中，增强了基于白蛋白的治疗剂的药代动力学或药效动力学。

附图说明

[0040] 本专利或申请文件包含至少一幅以彩色绘制出的绘图。在提出请求并支付必要费用后,专利局将提供具有彩色附图的本专利或专利申请公布的副本。

[0041] 图1示出了人源化重链变体(V_{H1}、V_{H1}和V_{H4})的氨基酸序列。所述变体基于人重链可变结构域序列并且进行比对以示出为了最小化潜在免疫原性在某些位置处并入的氨基酸的变化。在人源化框架中变化的氨基酸残基标有下划线。Kabat CDR被加框。

[0042] 图2示出了人源化轻链变体(V_{K1}-V_{K4})的氨基酸序列。所述变体基于人轻链可变结构域序列并且进行比对以示出为了最小化潜在免疫原性在某些位置处并入的氨基酸的变化。在人源化框架中变化的氨基酸残基标有下划线。Kabat CDR被加框。

[0043] 图3示出了在pH 6.0和pH 7.4下竞争ELISA的比较。亲本scFv在中心示出。用于进一步分析的感兴趣的scFv由框突出显示。

[0044] 图4示出了在(a) pH 7.4或(b) pH 6.0下人源化亲和力成熟的抗FcRn抗体的抗FcRn竞争ELISA测试。IgG在HEK细胞中瞬时表达。针对固定浓度的生物素酰化的鼠亲本测试抗FcRn人源化亲和力成熟变体的稀释系列,用于在pH 7.4或pH 6.0下结合重组人FcRn。使用链霉抗生物素蛋白-HRP和TMB底物检测结合的生物素酰化的鼠亲本。

[0045] 图5示出了在pH 6.0下人源化亲和力成熟的抗FcRn抗体的抗FcRn竞争ELISA测试。IgG在NS0细胞中稳定表达。针对固定浓度的生物素酰化的鼠亲本测试抗FcRn人源化亲和力成熟变体的稀释系列,用于在pH 6.0下结合重组人FcRn。使用链霉抗生物素蛋白-HRP和TMB底物检测结合的生物素酰化的鼠亲本。

[0046] 图6示出了在pH 7.4下人源化亲和力成熟的抗FcRn抗体的抗FcRn竞争ELISA测试。IgG在NS0细胞中稳定表达。针对在pH 7.4下结合重组人FcRn的固定浓度的生物素酰化的鼠亲本测试抗FcRn人源化亲和力成熟变体的稀释系列。使用链霉抗生物素蛋白-HRP和TMB底物检测结合的生物素酰化的鼠亲本。

[0047] 图7示出了在pH 7.4和pH 6.0下mAb与人FcRn的结合。代表性的传感图示出在固定的mAb (A) SYNT002h (人源化亲本V_{H1}/V_{K1})、(B) SYNT002-3 (G15_C3/V_{K3})、(C) SYNT002-8 (G47_B10/V_{K3})、(D) SYNT002-16 (G50_C10/V_{K3})、(E) SYNT002-17 (G54_D11/V_{K3})和(F) SYNT002-21 (G49_H9.3/V_{K3})上注射的滴定量hFcRn的结合。

[0048] 图8A示出了SYNT002-8 (G47_B10/V_{K3})和SYNT002-16 (G50_C10/V_{K3})绘制为指定时间点处基于24小时基线(±标准误差)剩余的平均%白蛋白的研究结果。

[0049] 图8B示出了SYNT002-8 (G47_B10/V_{K3})以剂量依赖性方式有效增加白蛋白分解代谢。结果显示为与24小时基线相比,指定时间点处剩余的人白蛋白的平均百分比(±SEM)的log₁₀。

[0050] 图9示出了在APAP施用后2小时接受PCS、NAC (140mg/kg)、SYNT002-8 (G47_B10/V_{K3}) (10mg/kg)或IgG4同种型对照 (10mg/kg)的Fcgrt^{TG}小鼠中分段APAP施用后6小时和8小时的血清ALT水平。

具体实施方式

[0051] 在一个方面,本文提供了结合FcRn的抗体和结合蛋白。更具体地,所述抗体结合与白蛋白的结合位点重叠的FcRn的表位。因此,所述抗体调节FcRn介导的功能,诸如FcRn与白

蛋白的结合、保护白蛋白免于降解,以及白蛋白结合化合物的半衰期延长。在另一方面,提供了一种包含编码FcRn抗体或其抗原结合部分的序列的分离的核酸。在另一方面,提供了一种适于向受试者施用的组合物,其包含FcRn抗体或其抗原结合部分和药学上可接受的载体。

[0052] 在一些实施方案中,本文公开的抗体抑制白蛋白与人FcRn的结合,但不抑制人IgG与人FcRn的结合。在一些实施方案中,本文公开的抗体降低白蛋白的血清半衰期,但不降低人IgG的血清半衰期。

[0053] 在另一方面,提供了调节FcRn与白蛋白之间相互作用的方法。例如,通过降低白蛋白与FcRn的结合,本文所示的抗体或其抗原结合部分可用于降低循环白蛋白的半衰期并且治疗或预防急性和慢性毒性暴露。已知白蛋白结合宽范围的化合物和分子,例如铜、血红素、长链脂肪酸、锌、胆红素、甲状腺素、类二十烷酸、色氨酸、维生素D3、胆汁酸、钙、镁、氯化物、吡啶美辛、溴酚蓝、水杨酸盐、华法林、保泰松、地高辛、呋塞米、苯妥英、氯磺丙脲、苜蓿霉素、伊文思蓝、地西洋、布洛芬、萘普生、氯贝特、氯丙嗪、丙咪嗪和奎尼丁(参见例如,Varshney等,Ligand binding strategies of human serum albumin:How can the cargo be optimized.Chirality.2010(22):77-87)。还已知蓖麻毒素结合白蛋白(Blome和Schengrund.,Toxicol.200851(7):1214-24)。另外,已发现对乙酰氨基酚结合人血清白蛋白(Damsten等,Drug Metab Dispos.200735(8):1408-17)。此类化合物和分子的排泄在各种病状的治疗中将是有利的,所述病状包括但不限于各种药物(例如,白蛋白缀合的药物和融合蛋白)的毒性过量、重金属毒性、细菌过载、细菌性败血症和各种其他病状。

[0054] 类似地,本文所示的抗体或其抗原结合部分可用于降低循环白蛋白的半衰期,用于治疗与白蛋白毒性相关的医学病状,或已证明较低水平是有益的医学病状。例如,白蛋白涉及动脉粥样硬化性冠状和外周血管疾病(Song,Atherosclerosis 2012)、糖尿病性血管病变并发症(Kim,Diab Metab J 2012;Murea,Am J Nephrol 2012)、阿尔茨海默病(Byun,PLoS One 2012)以及外伤性脑损伤(The SAFE Study Investigators,N Engl JMed 2007)。降低循环白蛋白还可用于治疗糖尿病、终末期肾衰竭以及其他病痛、疾病或病症。

[0055] FcRn,也称为新生儿Fc受体,是白蛋白的完整膜Fc受体。FcRn是膜结合的 α 链(GenBank登录号NM004107)和可溶性 β 2微球蛋白(β 2m)(GenBank登录号NM004048)的异二聚体,并且在结构上与I类MHC分子相关。FcRn通过以下调控白蛋白浓度:结合内吞的白蛋白并保护所述内吞的白蛋白免于在溶酶体区室中降解,并且将白蛋白转运至细胞表面以便在中性细胞外pH下释放。通过这种机制,FcRn造成白蛋白的长血清半衰期。因此,FcRn-白蛋白相互作用的特异性阻断可用于促进病原性白蛋白结合毒素的降解。

[0056] 提供了源自鼠抗体的抗体,其特异性结合FcRn并阻断FcRn与白蛋白的结合,但基本上不结合FcRn的IgG-Fc结合位点。所述抗体在pH 7.4和pH 6.0下具有对FcRn的结合亲和力的显著改善,并且因此在生理和酸性条件下阻断白蛋白与FcRn的结合。所述抗体可用于治疗自体免疫和炎性疾病。所述抗体包含一个或多个亲和力成熟的CDR。亲和力成熟程序提供了在临界pH范围6.0至7.4中以高亲和力结合FcRn的抗体。因此,一旦内化到体内的酸性环境中,则所述抗体有效地阻断白蛋白的结合。

[0057] 根据某些实施方案,改善的抗体的特征还在于具有人源化框架以便降低免疫原性。在某些实施方案中,FcRn特异性抗体的CDR位于从人抗体获得的框架中。在其他实施方

案中, FcRn特异性抗体的CDR位于是两个或更多个人抗体的复合物的框架中。在其他实施方案中, FcRn特异性抗体的表面暴露的框架残基被人抗体的框架残基替换。在优选的实施方案中, 选择框架以最小化被预测在广泛群体范围中是T细胞表位的氨基酸序列的存在。CDR还可位于与人恒定区连接的鼠框架中(即嵌合抗体)。

[0058] 如本文进一步所述, 为了亲和力成熟, 将重链可变结构域CDR3区突变并在pH 6.0和pH 7.4下以scFv形式筛选。使用包含序列ARGBNSVVSBNVCNVCNCRSC (SEQ ID NO:41)的寡核苷酸将氨基酸序列变异在氨基酸位置94-100 (CDR3H的a.a.95-100和FW3的a.a.94)处引入重链CDR3H区中, 其如下在每个位置处提供所选的氨基酸:a.a.94:K,R;a.a.95:A,C,D,E,F,G,H,I,L,P,Q,R,S,V,W,Y;a.a.96:A,D,E,G,H,K,N,P,Q,R,S,T;a.a.97:A,C,D,F,G,H,L,P,R,S,T,V,Y;a.a.98:A,D,G,H,I,L,N,P,R,S,T,V;a.a.99:A,C,D,G,H,N,P,R,S,T,Y;a.a.100:A,G,S,T。使用包含序列AGGNNSNNSNNSNRSC (SEQ ID NO:42)的寡核苷酸将氨基酸序列变异在氨基酸位置94-99 (CDR3H的a.a.95-99和FW3的a.a.94)处引入重链CDR3H区中, 其在如下的每个位置处提供所选的氨基酸:a.a.94:R;a.a.95:A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y;a.a.96:A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y;a.a.97:A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y;a.a.98:A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y;a.a.99:A,G,S,T。

[0059] 如以下实施例中所示, 这导致赋予在FcRn结合亲和力方面的实质性改善的若干CDR3H变体。与引入CDR3H文库中的可变性相对获得的变体的检查指示其中氨基酸保持相对无变化的某些位置和其中可引入变化并导致结合改善的其他位置。因此, 提供了一种结合FcRn的抗体或其结合部分, 其中重链包含CDR3H, 所述CDR3H包含可被改变的某些氨基酸。在一个这样的实施方案中, CDR3H包含 X_1ESTTX_2 , 其中 X_1 是A或L; 并且 X_2 是T或R; (SEQ ID NO:43)。在另一个这样的实施方案中, 重链CDR3H是 X_1ESTTX_2VGDY , 其中 X_1 是A或L; 并且 X_2 是T或R (SEQ ID NO:44)。在另一个这样的实施方案中, 重链CDR3H包含 X_1ESTTX_2 , 其中 X_1 是G、A或L; 并且 X_2 是T或R (SEQ ID NO:45)。在另一个这样的实施方案中, 重链CDR3H是 X_1ESTTX_2VGDY , 其中 X_1 是G、A或L; 并且 X_2 是T或R (SEQ ID NO:46)。在另一个这样的实施方案中, 重链CDR3H包含 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$, 其中 X_1 是G、A、F或L; X_2 是E、A或D; X_3 是S、T或A; X_4 是T、L、P或V; X_5 是T、S或A; 并且 X_6 是T或A (SEQ ID NO:47)。在另一个这样的实施方案中, 重链CDR3H是 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6VGDY$, 其中 X_1 是G、A、F或L; X_2 是E、A或D; X_3 是S、T或A; X_4 是T、L、P或V; X_5 是T、S或A; 并且 X_6 是T或A (SEQ ID NO:48)。

[0060] 在某些实施方案中, CDR3H是GESTTTVGDY (SEQ ID NO:25)、AESTTTVGDY (SEQ ID NO:27)、FSSLSTVGDY (SEQ ID NO:29)或LESTTAVGDY (SEQ ID NO:31)。在某些实施方案中, CDR3H是FDTPATVGDY (SEQ ID NO:33)、FDTPSTVGDY (SEQ ID NO:35)、FDSLSTVGDY (SEQ ID NO:37)或LEAVSAVGDY (SEQ ID NO:39)。在这些实施方案中的某些中, 重链可变结构域的位置103处的氨基酸是色氨酸。在这些实施方案中的某些中, 重链可变结构域的位置103处的氨基酸是精氨酸。

[0061] 在其中CDR3H如上所示的某些实施方案中, CDR1H由SEQ ID NO:2示出, 并且CDR2H由SEQ ID NO:4示出。

[0062] 开发了几种重链和轻链框架。人源化框架由人可变结构域序列装配, 着眼于最小化免疫原性T细胞表位。例示了三种这样的人源化重链框架和四种这样的轻链人源化框架:

V_{H1} (SEQ ID NO:12); V_{H3} (SEQ ID NO:14); V_{H4} (SEQ ID NO:16); V_{κ1} (SEQ ID NO:18); V_{κ2} (SEQ ID NO:20); V_{κ3} (SEQ ID NO:22); 和 V_{κ4} (SEQ ID NO:24)。用于这些例示性人源化框架的相应寡核苷酸序列如下示出: SEQ ID NO:11 (V_{H1}); SEQ ID NO:13 (V_{H3}); SEQ ID NO:15 (V_{H4}); SEQ ID NO:17 (V_{κ1}); SEQ ID NO:19 (V_{κ2}); SEQ ID NO:21 (V_{κ3}); 和 SEQ ID NO:23 (V_{κ4})。在 SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16 和 SEQ ID NO:18 中提供的重链可变结构域序列中, CDR1H、CDR2H 和 CDR3H 氨基酸表示为“Xaa.”。CDR1H 和 CDR2H 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:4 所示。CDR1H 的相应寡核苷酸序列由 SEQ ID NO:1 示出, 并且 CDR2H 的相应寡核苷酸序列由 SEQ ID NO:3 示出。在 SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22 和 SEQ ID NO:24 中提供的轻链可变结构域序列中, 在所有位置处指定特定氨基酸。CDR1L 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示, CDR2L 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示, 并且 CDR3L 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:10 所示。相应寡核苷酸序列如以下所示: SEQ ID NO:5 (CDR1L); SEQ ID NO:7 (CDR2L) 和 SEQ ID NO:9 (CDR3L)。重链和轻链中 FW 和 CDR 的位置还将分别从根据图1和图2看出。

[0063] 表1提供了亲和力成熟的人源化 FcRn 结合抗体重链和轻链可变结构域以及 CDR 的非限制性实例。如本文所述, 可变结构域被选择以便在 pH 6.0 和 pH 7.4 下改善结合, 并且相对于亲本鼠抗体展示出实质上改善的结合。

表 1-根据 SEQ ID NO 的抗体氨基酸序列

	CDR1H	CDR2H	CDR3H	VH
G15_C3 V _{H1}	2	4	25	26
G47_B10 V _{H1}	2	4	27	28
G47_H6 V _{H1}	2	4	29	30
G50_C10 V _{H1}	2	4	31	32
G54_D11 V _{H1}	2	4	33	34
G52_G9 V _{H1}	2	4	35	36
G49_H9.3 V _{H1}	2	4	37	38
G49_H9.5 V _{H1}	2	4	39	40

[0065] 可使亲和力成熟的重链 CDR3 与重链 CDR1 (例如具有 SEQ ID NO:2 的 CDR1) 和/或重链 CDR2 (例如具有 SEQ ID NO:4 的 CDR2) 组合。

[0066] 如以下实施例中所公开, 本文例示的各种抗体可变结构域基于鼠抗体, 并且含有亲和力成熟的 CDR, 并且某些实施方案的特征还在于具有人源化 FW。表1中公开的任何重链可变结构域可与任何公开的轻链共表达以产生功能性抗 FcRn 抗体。此外, 亲和力成熟的重链可变结构域可与本文公开的人源化非亲和力成熟的轻链可变结构域配对, 并且亲和力成熟的轻链可变结构域可与人源化非亲和力成熟的重链可变结构域配对。在优选的实施方案中, 亲和力成熟的重链可变结构域可与人源化轻链可变结构域配对。另外, 表1列出了 V_{H1} 中的重链 CDR。重链 CDR 还与例如本文公开的框架 V_{H3} 和 V_{H4} 相容 (参见图1)。如本文所用, 名称 V_{H1}、V_{H3}、V_{H4}、V_{κ1}、V_{κ2}、V_{κ3} 和 V_{κ4} 是指本文公开的示例性人源化框架, 并且未提及人种系基因家族。将显而易见的是本文公开的任何重链或轻链可变结构域均可与互补可变结构域的文库组合并且筛选以鉴定具有改善或改变的结合特征的新抗体。

[0067] 本文提供了与表1中公开的那些类似但不相同的抗体和抗原结合部分。所述抗体

可具有一个或多个氨基酸取代、缺失、插入和/或添加。在某些实施方案中, FcRn抗体包含与表1中示出的重链可变结构域至少85%、至少90%或至少95%相同的重链可变结构域。

[0068] 在一个实施方案中, FcRn抗体含有重链可变结构域, 其包含CDR序列, 即表1中示出的CDR1H、CDR2H和CDR3H, 以及V_{H1}、V_{H3}或V_{H4}的框架(即FW1、FW3和FW4) 或者与V_{H1}、V_{H3}或V_{H4}的框架至少85%、90%或95%相同的框架。在一个实施方案中, FcRn抗体含有重链可变结构域, 其包含表1中示出的CDR序列以及框架使得所述重链可变结构域序列与表1中示出的可变结构域至少85%或至少90%或至少95%相同。

[0069] 在一个实施方案中, FcRn抗体含有重链可变结构域和轻链可变结构域, 所述重链可变结构域包含CDR序列, 即表1中示出的CDR1H、CDR2H和CDR3H, 以及V_{H1}、V_{H3}或V_{H4}的框架(即FW1、FW3和FW4) 或者与V_{H1}、V_{H3}或V_{H4}的框架至少85%、90%或95%相同的框架, 所述轻链可变结构域包含V_{K1}、V_{K2}、V_{K3}或V_{K4}或者与V_{K1}、V_{K2}、V_{K3}或V_{K4}至少85%、90%或95%相同的序列。

[0070] “同一性”是指将出于两个序列最佳比对而需要引入的空位数和各空位长度考虑在内, 由两个氨基酸或核酸序列共享的相同位置的数目或百分比。

[0071] 当氨基酸序列被描述为与另一氨基酸序列至少85%或至少90%或至少95%相同时, 所述氨基酸序列的差异可在于保守取代(包括其中所有取代均是保守取代)。

[0072] 在一些情况下, 氨基酸取代可通过选择在它们对维持(a) 取代的区域中肽骨架的结构、(b) 靶标位点处分子的电荷或疏水性; 或(c) 侧链的主体的作用方面不显著不同的取代来进行。例如, 天然存在的残基可基于侧链特性被分成各组; (1) 疏水性氨基酸(甲硫氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸); (2) 中性亲水性氨基酸(半胱氨酸、丝氨酸和苏氨酸); (3) 酸性氨基酸(天冬氨酸和谷氨酸); (4) 碱性氨基酸(天冬酰胺、谷氨酰胺、组氨酸、赖氨酸和精氨酸); (5) 影响链取向的氨基酸(甘氨酸和脯氨酸); 和(6) 芳族氨基酸(色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸)。在这些组内进行的取代可视为保守取代。取代的实例包括但不限于缬氨酸取代丙氨酸、赖氨酸取代精氨酸、谷氨酰胺取代天冬酰胺、谷氨酸取代天冬氨酸、丝氨酸取代半胱氨酸、天冬酰胺取代谷氨酰胺、天冬氨酸取代谷氨酸、脯氨酸取代甘氨酸、精氨酸取代组氨酸、亮氨酸取代异亮氨酸、异亮氨酸取代亮氨酸、精氨酸取代赖氨酸、亮氨酸取代甲硫氨酸、亮氨酸取代苯丙氨酸、甘氨酸取代脯氨酸、苏氨酸取代丝氨酸、丝氨酸取代苏氨酸、酪氨酸取代色氨酸、苯丙氨酸取代酪氨酸和/或亮氨酸取代缬氨酸。

[0073] 用于确定序列类似性的方法和计算机程序可公开获得, 包括但不限于GCG程序包(Devereux等, *Nucleic Acids Research* 12:387, 1984)、BLASTP、BLASTN、FASTA(Altschul等, *J. Mol. Biol.* 215:403 (1990)) 和ALIGN程序(2.0版)。熟知的SmithWaterman算法也可用于确定类似性。BLAST程序可从NCBI和其他来源公开获得(BLAST Manual, Altschul等, NCBI NLM NIH, Bethesda, Md. 20894; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>的BLAST 2.0)。在比较序列时, 这些方法考虑了各种取代、缺失和其他修饰。

[0074] 如本文所用, 术语“互补决定区”(CDR, 即CDR1、CDR2和CDR3) 是指抗体可变结构域的其存在是抗原结合所必需的氨基酸残基。各可变结构域通常具有3个标识为CDR1、CDR2和CDR3的CDR区。各互补决定区可包含来自如由Kabat定义的“互补决定区”的氨基酸残基(即约是轻链可变结构域中的残基24-34(L1)、50-56(L2) 和89-97(L3) 以及重链可变结构域中的31-35(H1)、50-65(H2) 和95-102(H3))。同样, 将Kabat编号系统考虑在内(Kabat等,

Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987, 1991)), “框架” (FW) 包含轻链可变结构域中的氨基酸1-23 (FW1)、35-49 (FW2)、57-88 (FW3) 和98-107 (FW4) 以及重链可变结构域中的1-30 (FW1)、36-49 (FW2)、66-94 (FW3) 和103-113 (FW4)。

[0075] Kabat残基标号不始终与氨基酸残基的线性编号直接对应。相比于在严格Kabat编号下, 实际线性氨基酸序列可含有对应于基本可变结构域结构的结构组分 (无论是框架还是互补决定区 (CDR)) 的缩短或向所述结构组分中插入的更少或另外氨基酸。可通过将抗体序列中具有同源性的残基与“标准”Kabat编号序列比对来确定给定抗体中残基的正确Kabat编号。

[0076] 如本文所用, “抗体可变结构域”是指抗体分子的轻链和重链包括互补决定区 (CDR; 即CDR1、CDR2和CDR3) 和框架区 (FR) 的氨基酸序列的部分。 V_H 是指重链的可变结构域。 V_L 是指轻链的可变结构域。

[0077] 抗体是识别并结合特定抗原或物质的蛋白质。在优选的实施方案中, 本文所示的抗体或抗原结合部分至少与天然配体 (即白蛋白) 一样强地结合FcRn。亲和力, 由抗原与抗体解离的平衡常数 (K_d) 表示, 度量抗原决定簇与抗体结合位点之间的结合强度。抗体对抗原的亲和力可通过使用合适的表面等离子体能量共振测量来测定。这种测量可以是国际专利申请公布W0 2005/012359中和本文其他地方所述的BIACORE®测定。测定亲和力的其他方法包括酶联免疫吸附测定或竞争测定诸如放射免疫测定。

[0078] 亲合力是抗体与其抗原之间的结合强度的量度。亲合力与抗原决定簇与抗体上的抗原结合位点之间的亲和力和每个抗体的结合位点数目 (效价) 两者相关。例如, 单价抗体 (例如Fab或scFv) 具有一个针对特定表位的结合位点。IgG抗体具有两个抗原结合位点。典型的K (解离常数 K_d 的倒数) 值是 10^5 至 10^{11} 升/摩尔。弱于 10^4 升/摩尔的任何K均被视为指示非特异性结合。

[0079] 在某些实施方案中, 本文所述的抗体或其抗原结合部分以 10^5 至 10^{12} 升/摩尔、 10^6 至 10^{12} 升/摩尔、 10^7 至 10^{12} 升/摩尔、 10^8 至 10^{12} 升/摩尔、 10^9 至 10^{12} 升/摩尔、 10^{10} 至 10^{12} 升/摩尔或 10^{11} 至 10^{12} 升/摩尔的 K_d 结合人FcRn的白蛋白结合部分。在其他实施方案中, 本文所述的抗体或其抗原结合部分以 10^5 至 10^{11} 升/摩尔、 10^6 至 10^{11} 升/摩尔、 10^7 至 10^{11} 升/摩尔、 10^8 至 10^{11} 升/摩尔、 10^9 至 10^{11} 升/摩尔或 10^{10} 至 10^{11} 升/摩尔的 K_d 结合人FcRn的白蛋白结合部分。在其他实施方案中, 本文所述的抗体或其抗原结合部分以 10^5 至 10^{10} 升/摩尔、 10^6 至 10^{10} 升/摩尔、 10^7 至 10^{10} 升/摩尔、 10^8 至 10^{10} 升/摩尔或 10^9 至 10^{10} 升/摩尔的 K_d 结合人FcRn的白蛋白结合部分。在其他实施方案中, 本文所述的抗体或其抗原结合部分以 10^5 至 10^8 升/摩尔、 10^6 至 10^8 升/摩尔或 10^7 至 10^8 升/摩尔的 K_d 结合人FcRn的白蛋白结合部分。

[0080] 为了使在向人施用时的免疫原性最小化, 本文所示的抗体或其抗原结合部分优选地包括人恒定结构域。因此, 所述抗体可以是任何同种型或亚型, 包括但不限于IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG₃、IgG₄、IgM、IgA、IgD或IgE。可选择抗体类别以使效应物功能最优化 (例如, 以增加或降低补体依赖性细胞毒性 (CDC) 或抗体依赖性细胞毒性 (ADCC))。在某些实施方案中, 修饰恒定区 (即C_H1、C_H2、C_H3和/或铰链区), 例如以增加或降低与Fc受体的结合。在某些实施方案中, 修饰恒定结构域以促进或稳定化重链-重链结合。在某些实施方案中, 所述抗体是IgG₄抗体, 并且重链的铰链区通过使位置241处的丝氨酸变为脯氨酸来修饰, 从而导致血清

半衰期延长 (Angal等, 1993, Mol. Immunol. 30:105-108)。在某些实施方案中, 所述抗体是 IgG₄ 抗体, 并且重链的位置478处的C-末端赖氨酸被缺失。在一些实施方案中, IgG₄ 抗体具有 S241P 修饰并且缺乏C-末端赖氨酸。

[0081] 在某些实施方案中, 提供了FcRn结合抗体片段。Fv是含有完全重链和轻链可变结构域的最小片段, 其包括全部6个高变环 (CDR)。在缺乏恒定结构域时, 可变结构域以非共价方式缔合。重链和轻链可使用允许V_H结构域和V_L结构域缔合以形成抗原结合位点的接头连接成单一多肽链 (“单链Fv” 或 “scFv”)。参见例如, Bird等, 1988, Science 242:423和Huston等, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879。在一个实施方案中, 所述接头是 (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃。因为scFv片段缺乏完整抗体的恒定结构域, 所以它们显著小于完整抗体。scFv片段还没有正常重链恒定结构域与可能在某些实施方案中所需的其他生物分子的相互作用。

[0082] 如本文所用, “抗体” 是指单体以及多聚体和结合片段。可使用完整抗体 (包括多聚体) 或携带抗体的抗原结合区的抗体片段。抗原结合区包括但不限于Fv、scFv、Fab、Fab' 和F(ab')₂ 片段。用于制备抗体片段的方法在本领域中是熟知的。例如, 缺乏重链铰链区的单价Fab片段可通过用木瓜蛋白酶进行蛋白水解消化由完整免疫球蛋白制备。保留重链铰链区的二价F(ab')₂ 片段可通过用胃蛋白酶进行蛋白水解消化来制备。

[0083] 还可使用抗体的含有V_H、V_L以及任选C_L、C_{H1}或其他恒定结构域的片段。此类片段还可重组产生。许多其他可用抗原结合抗体片段在本领域中是已知的, 并且包括但不限于双抗体、三抗体、单结构域抗体以及其他单价和多价形式。

[0084] 进一步提供了多价抗原结合蛋白, 其可呈 (不限于) 抗体、其抗原结合片段、以及包含抗体的抗原结合部分的全部或一部分的蛋白质形式。多价抗原结合蛋白可以是单特异性、双特异性或多特异性的。术语特异性是指特定分子可与其结合的不同类型抗原决定簇的数目。如果免疫球蛋白分子仅结合一种类型的抗原决定簇, 则所述免疫球蛋白分子是单特异性的。如果免疫球蛋白分子结合不同类型的抗原决定簇, 则所述免疫球蛋白分子是多特异性的。

[0085] 在一个实施方案中, 多价单链抗体包括与可变重链片段连接的可变轻链片段 (类似于scFv), 其通过另一肽接头与至少一个其他抗原结合结构域进一步连接。通常, 肽接头由约15个氨基酸残基构成。在优选的实施方案中, V_L结构域和V_H结构域的数目相等。例如, 二价单链抗体可如下表示: V_L-L₁-V_H-L₂-V_L-L₃-V_H或V_L-L₁-V_H-L₂-V_H-L₃-V_L或V_H-L₁-V_L-L₂-V_H-L₃-V_L或V_H-L₁-V_L-L₂-V_L-L₃-V_H。三价或价数更大的多价单链抗体具有一个或多个通过另外的肽接头接合到二价单链抗体的抗体片段。三价单链抗体的一个实例是: V_L-L₁-V_H-L₂-V_L-L₁-V_H-L₂-V_L-L₁-V_H。

[0086] 可使两个单链抗体组合以形成双抗体, 也称为二价二聚体。参见例如, 欧洲专利申请0404097或Hollinger等, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444。双抗体具有两条链。双抗体的每个链包括通过具有约5-10个氨基酸残基的短接头例如 (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)、(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₂ 连接到V_L结构域的V_H结构域。此类接头足够短以防止在相同链上的结构域之间的链内配对, 由此驱动不同链上互补结构域之间的链间配对, 并且重新产生两个抗原结合位点。双抗体结构是紧凑的, 其中抗原结合位点在分子的相对端处。

[0087] 可使V_H和V_L框架序列变体和亲和力成熟的抗体经受临床前离体测定以评估潜在免

疫原性。一种这样的测定是EPISCREEN™,其提供用于通过量化响应于蛋白质治疗剂的T细胞来预测T细胞免疫原性的有效技术。所述测定使用基于II类MHC单倍型仔细选择的一组血液供体以最佳表示在世界人口中表达的HLA-DR同种异型的数目和频率。所述测定提供了一种可通过其在T细胞响应的幅度和频率两方面评估完整蛋白质的免疫原性的方法(Jones等,J Interferon Cytokine Res.200424(9):560-72;Jones等,J Thromb Haemost.20053(5):991-1000)。

[0088] 与本文公开抗体竞争与FcRn的结合或交叉阻断本文公开抗体与FcRn的结合,或其自身被本文公开抗体交叉阻断而免于结合FcRn的抗体可用于本文公开的阻断FcRn活性的方法中。在一些情况下,这些竞争抗体、交叉阻断抗体或交叉阻断的抗体结合与由本文所述抗体结合的表位交界和/或重叠的FcRn的表位。在一些情况下,这些竞争抗体、交叉阻断抗体或交叉阻断的抗体是嵌合、完全人源化抗体,其结合与由本文所述抗体结合的表位相同的FcRn的表位。

[0089] 竞争抗体、交叉阻断抗体和交叉阻断的抗体可使用本领域中已知的任何合适的方法来鉴定,包括竞争ELISA或BIAcore®测定,其中竞争抗体或交叉阻断抗体与人FcRn的结合阻止本文公开抗体的结合或反之亦然。

[0090] 在某些实施方案中,竞争抗体或交叉阻断抗体是阻断白蛋白与人FcRn结合并且与具有重链序列和轻链序列的抗体竞争或交叉阻断其结合的抗体,所述重链序列选自自由以下组成的组:SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:40,并且所述轻链选自自由以下组成的组:SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:24。在一些实施方案中,所述竞争或交叉阻断大于80%、大于85%、大于90%或大于95%。

[0091] 在某些实施方案中,竞争抗体或交叉阻断抗体是阻断白蛋白与人FcRn结合并且与具有SEQ ID NO:28的重链序列和SEQ ID NO:22的轻链序列的抗体竞争或交叉阻断其结合的抗体。在一些实施方案中,所述竞争或交叉阻断大于80%、大于85%、大于90%或大于95%。

[0092] 在某些实施方案中,竞争抗体或交叉阻断抗体是阻断白蛋白与人FcRn结合并且与具有SEQ ID NO:32的重链序列和SEQ ID NO:22的轻链序列的抗体竞争或交叉阻断其结合的抗体。在一些实施方案中,所述竞争或交叉阻断大于80%、大于85%、大于90%或大于95%。

[0093] 在某些实施方案中,竞争抗体或交叉阻断的抗体是阻断白蛋白与人FcRn结合并且其与FcRn的结合被具有重链序列和轻链序列的抗体竞争或交叉阻断的抗体,所述重链序列选自自由以下组成的组:SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:40,并且所述轻链选自自由以下组成的组:SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:24。在一些实施方案中,竞争抗体或交叉阻断的抗体被竞争或交叉阻断至大于80%、大于85%、大于90%或大于95%。

[0094] 在某些实施方案中,竞争抗体或交叉阻断的抗体是阻断白蛋白与人FcRn结合并且其与FcRn的结合被具有SEQ ID NO:28的重链序列和SEQ ID NO:22的轻链序列的抗体竞争或交叉阻断的抗体。在一些实施方案中,竞争抗体或交叉阻断的抗体被竞争或交叉阻断至大于80%、大于85%、大于90%或大于95%。

[0095] 在某些实施方案中,竞争抗体或交叉阻断的抗体是阻断白蛋白与人FcRn结合并且其与FcRn的结合被具有SEQ ID NO:32的重链序列和SEQ ID NO:22的轻链序列的抗体竞争或交叉阻断的抗体。在一些实施方案中,竞争抗体或交叉阻断的抗体被竞争或交叉阻断至大于80%、大于85%、大于90%或大于95%。

[0096] 在一些实施方案中,竞争抗体、交叉阻断抗体或交叉阻断的抗体是嵌合、完全人或人源化的。在一些实施方案中,竞争抗体、交叉阻断抗体或交叉阻断的抗体以 10^5 至 10^{11} 升/摩尔、 10^6 至 10^{11} 升/摩尔、 10^7 至 10^{11} 升/摩尔、 10^8 至 10^{11} 升/摩尔、 10^9 至 10^{11} 升/摩尔或 10^{10} 至 10^{11} 升/摩尔的亲和力结合人FcRn的白蛋白结合位点。

[0097] 本文还提供了编码抗FcRn抗体及其功能性片段的核酸、载体、宿主细胞和表达系统。编码抗FcRn抗体及其功能性片段的核酸可以是例如包含那些多核苷酸中的任一种(单独或组合)的DNA、cDNA、RNA或合成产生的DNA或RNA或重组产生的嵌合核酸分子。例如,提供了一种表达载体,其含有编码本文所述的抗FcRn抗体的多核苷酸序列,所述多核苷酸序列可操作地连接至适于在真核和/或原核宿主细胞中表达的表达控制序列。已开发了多种表达载体以便在原核细胞(诸如细菌)和真核系统(包括但不限于酵母)中有效合成抗体和片段,并且已开发了哺乳动物细胞培养系统。所述载体可包含染色体、非染色体和合成DNA序列的区段。在一些实施方案中,所述核酸可包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:41或SEQ ID NO:42。

[0098] 可使用任何合适的表达载体。例如,原核克隆载体包括来自大肠杆菌的质粒,诸如colE1、pCR1、pBR322、pMB9、pUC、pKSM和RP4。原核载体还包括噬菌体DNA的衍生物(诸如M13)和其他丝状单链DNA噬菌体。可用于酵母中的载体的实例是2 μ 质粒。适于在哺乳动物细胞中表达的载体包括SV40、腺病毒、逆转录病毒衍生的DNA序列的熟知衍生物以及源自功能性哺乳动物载体(诸如上述那些)和功能性质粒(例如pLenti6.3/V5-DEST[®]、pT-RexTM-DEST31[®]、pGene/V5-HispGene/V5-His[®] (Life Technologies, Norwalk, CT))的组合的穿梭载体。

[0099] 另外的真核表达载体在本领域中是已知的(例如P. J. Southern和P. Berg, J. Mol. Appl. Genet., 1, 327-341 (1982); Subramani等, Mol. Cell. Biol., 1:854-864 (1981); Kaufmann和Sharp, "Amplification And Expression of Sequences Cotransfected with a Modular Dihydrofolate Reductase Complementary DNA Gene," J. Mol. Biol. 159, 601-621 (1982); Kaufmann和Sharp, Mol. Cell. Biol. 159, 601-664 (1982); Scahill等, "Expression And Characterization Of The Product Of A Human Immune Interferon DNA Gene In Chinese Hamster Ovary Cells," Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 80, 4654-4659 (1983); Urlaub和Chasin, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77, 4216-4220, (1980)。

[0100] 表达载体可含有至少一个操作性地连接至待表达的DNA序列或片段的表达控制序列。控制序列被插入载体中以便控制和调控克隆的DNA序列的表达。可用的表达控制序列的实例是lac系统、trp系统、tac系统、trc系统、噬菌体 λ 的主要操纵子和启动子区、fd外壳蛋白的控制区、酵母的糖酵解启动子(例如3-磷酸甘油酸激酶的启动子)、酵母酸性磷酸酶的启动子(例如Pho5)、酵母 α 交配因子的启动子,和源自巨细胞病毒、多瘤病毒、腺病毒、逆转录病毒和猿猴病毒的启动子(例如早期和晚期启动子或SV40),以及已知控制原核或真核细

胞及其病毒的基因表达的其他序列或其组合。可使用的其他表达控制序列包括来自中国仓鼠延伸因子-1 α (CHEF1) 基因的DNA调控序列 (Running Deer和Allison, 2004, *Biotechnol. Prog.* 20:880-889; 美国专利号5,888,809)。

[0101] 还提供了含有先前所述的表达载体的重组宿主细胞。本文所示的抗体或其抗原结合部分可在除杂交瘤以外的细胞系中表达。包含编码如本文所述多肽的序列的核酸可用于转化合适的哺乳动物宿主细胞。

[0102] 基于高水平表达、感兴趣的蛋白质的组成型表达和宿主蛋白的最小污染来选择特别优选的细胞系。可用作表达宿主的哺乳动物细胞系在本领域中是熟知的,并且包括许多永生化细胞系,诸如但不限于NS0细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、幼仓鼠肾 (BHK) 细胞和许多其他细胞系。在一些实施方案中,所述细胞是骨髓瘤细胞,例如SP2/0,其可在小鼠腹膜腔的培养物中转染和生长,其中可从腹水中回收高浓度的IgG。合适的另外的真核细胞包括酵母和其他真菌。可用的原核宿主包括例如大肠杆菌,诸如大肠杆菌SG-936、大肠杆菌HB 101、大肠杆菌W3110、大肠杆菌X1776、大肠杆菌X2282、大肠杆菌DHI和大肠杆菌MRC1、假单胞菌属、芽孢杆菌属诸如枯草芽孢杆菌和链霉菌属。

[0103] 通过在允许表达抗体或其片段的条件下培养细胞,并且从宿主细胞或包围宿主细胞的培养基纯化抗体或其片段,这些本发明重组宿主细胞可用于产生抗体或其抗原结合部分。因此,在一个实施方案中,提供了一种产生能够结合FcRn的白蛋白结合区的抗体的方法,所述方法包括:(a) 如上所述培养宿主细胞;和(b) 从宿主细胞或宿主细胞的培养基中分离所述抗体。

[0104] 可使转化的宿主在发酵罐中生长,并且根据本领域中已知的技术进行培养。一旦达到抗体的所需表达水平,则可根据本领域的标准程序纯化抗体,所述标准程序包括硫酸铵沉淀、在亲和柱上纯化、柱色谱法、凝胶电泳等。对于在本文所述的治疗方法中使用,优选的是所述抗体被纯化到至少90%、95%、98%或99%纯度。

[0105] 通过在感兴趣的抗体编码基因的5'端部处插入信号或分泌前导肽编码序列(参见Shokri等,*Appl Microbiol Biotechnol.* 60(6):654-64(2003),Nielsen等,*Prot. Eng.* 10:1-6(1997)和von Heinje等,*Nucl. Acids Res.* 14:4683-4690(1986)),可促进靶向用于在重组宿主细胞中分泌的表达的抗体或片段。这些分泌前导肽元件可源自原核或真核序列。因此合适地,使用分泌前导肽,其是接合到多肽的N-末端以引导所述多肽从宿主细胞胞质液移出并分泌到培养基中的氨基酸。

[0106] 抗体或其抗原结合部分可与另外的氨基酸残基融合。此类氨基酸残基可以是肽标签,可能有助于分离。还考虑用于使抗体向特定器官或组织归巢的其他氨基酸残基。

[0107] 在一些实施方案中,使抗体或其抗原结合部分缀合至一个或多个对抗体或其抗原结合部分提供一些所需特性(例如增加的血清半衰期)的效应分子。在特定的实施方案中,使抗体或其抗原结合部分缀合至聚乙二醇(PEG)。可使PEG附接到任何氨基酸侧链或末端氨基酸官能团,例如游离氨基、亚氨基、硫醇基团、羟基或羧基。使PEG附接到抗体的方法在本领域中是已知的,并且可采用。参见例如,欧洲专利申请EP 0948544;欧洲专利申请EP1090037;“Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications,”1992, J. Milton Harris (编), Plenum Press, New York; “Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications,”1997, J. Milton Harris和

S.Zalipsky(编),American Chemical Society,Washington DC;“Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences,”1998,M.Aslam和A.Dent,Grove Publishers,New York;或Chapman,A.2002,Advanced Drug Delivery Reviews 2002,54:531-545。

[0108] 在另一个实施方案中,通过在转基因动物中表达编码抗体的核酸,使得抗体被表达并可被回收来制备如本文所示的抗体或其抗原结合部分。例如,可以有助于回收和纯化的组织特异性方式表达所述抗体。在一个这样的实施方案中,抗体在乳腺中表达以便在泌乳期间分泌。转基因动物包括但不限于小鼠、山羊和兔。

[0109] 本文提供了鉴定在酸性pH和生理pH下均结合FcRn并且还在与结合FcRn的白蛋白竞争的表位处结合的抗体的方法。所述方法包括两个或更多个在酸性pH(例如pH 5.0-6.6、pH 5.8-6.4、pH 6.0-6.2或pH 6.0)下进行的筛选步骤。所述两个或更多个酸性筛选步骤与在生理pH(例如pH 6.8-8.2、pH 6.8-7.6、pH 7,2-7.4或pH 7.4)下进行的筛选步骤交替。

[0110] 例如,此类方法的一个实施方案包括:

[0111] (a) 使候选抗体的集合与FcRn或其一部分在pH 5.8-6.4下接触并且分离结合FcRn或其一部分的抗体;

[0112] (b) 使步骤(a)的分离抗体与FcRn或其一部分在pH 6.8-7.6下接触并且分离结合FcRn或其一部分的抗体;

[0113] (c) 使步骤(b)的分离抗体与FcRn或其一部分在pH 5.8-6.4下接触并且分离结合FcRn或其一部分的抗体。

[0114] (d) 测定步骤(c)的分离抗体阻断白蛋白与FcRn结合的能力。

[0115] 另一个实施方案包括:

[0116] (a) 提供候选FcRn结合抗体的集合:

[0117] (b) 使所述候选FcRn结合抗体的集合与FcRn或其一部分在pH6.0下在使得在所述FcRn或其一部分与至少一些所述候选FcRn结合抗体之间形成复合物的条件下接触;

[0118] (c) 分离所述复合物;

[0119] (d) 从分离的复合物分离所述候选FcRn结合抗体;

[0120] (e) 使来自步骤(d)的分离的候选FcRn结合抗体与FcRn或其一部分在pH 7.4下在使得在所述FcRn或其一部分与至少一些所述候选FcRn结合抗体之间形成复合物的条件下接触;

[0121] (f) 分离在步骤(e)中形成的复合物;

[0122] (g) 从步骤(f)的分离的复合物分离所述候选FcRn结合抗体;

[0123] (h) 使来自步骤(g)的分离的候选FcRn结合抗体与FcRn或其一部分在pH 6.0下在使得在所述FcRn或其一部分与至少一些所述候选FcRn结合抗体之间形成复合物的条件下接触;

[0124] (i) 分离在步骤(h)中形成的复合物;

[0125] (j) 从步骤(i)的分离的复合物分离所述候选FcRn结合抗体以获得在酸性pH和生理pH下均结合FcRn的抗体。

[0126] (k) 测定所述候选FcRn结合抗体阻断白蛋白与FcRn结合的能力。

[0127] 在一些实施方案中,所述候选FcRn结合抗体的集合可以是抗体或其部分的文库

(例如展示在噬菌体上的scFv的文库)。

[0128] 在一些实施方案中,在各接触步骤中降低FcRn或其一部分的浓度。例如,步骤(b)可在25nM的浓度下进行,步骤(e)可在2.5nM的浓度下进行,并且步骤(h)可在0.25nM的浓度下进行。

[0129] 在一些实施方案中,可使FcRn或其一部分附接到固体支持体,例如磁珠。在此类实施方案中,例如当固体支持体是色谱柱时,分离步骤可简单地是抗体与附接到固体支持体的FcRn或其一部分的结合。在一些实施方案中,可使FcRn或其一部分附接到有助于分离FcRn或其一部分与抗体之间的复合物的部分。例如,可使FcRn或其一部分附接到生物素。

[0130] 如本文所示的抗体或其抗原结合部分的物理和功能特性可通过常规程序来测定。例如,可通过许多方法评估抗体阻断FcRn-白蛋白相互作用的能力。此类方法可包括检查通过所述抗体结合FcRn阻断的白蛋白的量的体外测定、针对与白蛋白竞争结合的已知FcRn抗体的竞争测定,或检查由施用所述抗体引起的白蛋白分泌量的体内测定。

[0131] 可使用检测破坏FcRn与白蛋白之间结合的多种方法中的任一种,诸如US 8,232,067中描述的那些,其通过引用整体并入本文。例如,可使用荧光共振能量转移("FRET")或色谱方法。在一些情况下,蛋白质-蛋白质相互作用可通过重构酶(例如 β -半乳糖苷酶)的结构域来检测(参见Rossi等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,94:8405-8410(1997))。在一些实施方案中,测试破坏FcRn与白蛋白之间相互作用的抗体或抗原结合片段或缺乏结合FcRn的变体白蛋白多肽可在动物模型中进行。例如,通过抗体或抗原结合片段测量FcRn多肽与白蛋白多肽之间的破坏的方法包括用抗体或抗原结合片段向表达FcRn多肽和白蛋白多肽的受试者(例如实验动物(例如哺乳动物))施用所述抗体或抗原结合片段,并确定受试者体液中白蛋白多肽的水平,其中存在所述抗体或抗原结合片段时受试者体液中的白蛋白多肽水平相比于不存在所述抗体或抗原结合片段时动物体液中存在的白蛋白多肽水平的差异表明测试化合物破坏了FcRn多肽与白蛋白多肽之间的相互作用。在一些实施方案中,根据本文公开的一种或多种方法使用的动物可以是转基因动物。例如,根据本文公开的一种或多种方法使用的动物可以是转基因的,使得其表达FcRn、白蛋白或两者。在一些实施方案中,动物可以是转基因的,使得其表达人FcRn、白蛋白或两者。

[0132] 人FcRn被本文公开抗体结合的特定区域或表位可通过本领域中已知的任何合适的表位作图方法来鉴定。此类方法包括筛选来自FcRn的具有不同长度的肽与所述抗体的结合以便确定所述抗体结合FcRn的哪些氨基酸。所述肽可通过熟知的方法(诸如蛋白水解消化FcRn或化学合成)来产生。诸如质谱的技术可用于鉴定结合所述抗体的肽。可替代地,可使用NMR波谱法或X射线晶体学。一旦鉴定,则结合肽可用作免疫原以获得结合FcRn的相同表位的另外抗体。

[0133] 应了解当出于预防或治疗的目的用于哺乳动物时,本文所示的抗FcRn抗体或其抗原结合部分将以另外包含药学上可接受的载体的组合物形式施用。合适的药学上可接受的载体包括例如以下中的一种或多种:水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、右旋糖、组氨酸、谷氨酸、柠檬酸盐、甘露糖醇、海藻糖、蔗糖、精氨酸、乙酸盐、聚山梨醇酯80、泊洛沙姆188等以及其组合。药学上可接受的载剂还可包含少量增强抗体的存放期或有效性的辅助物质,诸如湿润剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂。

[0134] 在一些实施方案中,使包含抗体和药学上可接受的载体的组合物冻干。

[0135] 包含抗体和药学上可接受的载体的组合物可以各种浓度包含本文所示的抗FcRn抗体或其抗原结合部分。例如,所述组合物可包含10mg/ml至200mg/ml、25mg/ml至130mg/ml、50mg/ml至125mg/ml、75mg/ml至110mg/ml或80mg/ml至100mg/ml的抗体。所述组合物还可包含约10mg/ml、20mg/ml、30mg/ml、40mg/ml、50mg/ml、60mg/ml、70mg/ml、80mg/ml、90mg/ml、100mg/ml、110mg/ml、120mg/ml、130mg/ml、140mg/ml或150mg/ml的抗体。

[0136] “白蛋白结合毒素”是指结合白蛋白的化合物、药物或分子。尽管在一些情况下可能需要降低受试者中白蛋白结合毒素的浓度,但所述术语不限于标记或通常被理解为“毒素”的化合物、药物或分子。所述术语还可包括外源性或内源性毒素两者。白蛋白结合毒素可包括例如铜、血红素、长链脂肪酸、锌、胆红素、甲状腺素、类二十烷酸、色氨酸、维生素D3、胆汁酸、钙、镁、氯化物、吡哆美辛、溴酚蓝、水杨酸盐、华法林、保泰松、地高辛、呋塞米、苯妥英、氯磺丙脲、苄青霉素、伊文思蓝、地西洋、布洛芬、萘普生、氯贝特、氯丙嗪、丙咪嗪、奎尼丁、蓖麻毒素、胺碘酮和对乙酰氨基酚。

[0137] 在一个实施方案中,提供了一种降低受试者中白蛋白结合毒素水平的方法,其包括向受试者施用有效降低白蛋白结合毒素水平的量的本文所述抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,白蛋白结合毒素可以是外源性或内源性的。在一个实施方案中,白蛋白结合毒素是铜、血红素、长链脂肪酸、锌、胆红素、甲状腺素、类二十烷酸、色氨酸、维生素D3、胆汁酸、钙、镁、氯化物、吡哆美辛、溴酚蓝、水杨酸盐、华法林、保泰松、地高辛、呋塞米、苯妥英、氯磺丙脲、苄青霉素、伊文思蓝、地西洋、布洛芬、萘普生、氯贝特、氯丙嗪、丙咪嗪、奎尼丁、蓖麻毒素、胺碘酮或对乙酰氨基酚。在一些实施方案中,白蛋白结合毒素可以是对乙酰氨基酚。在其中白蛋白结合毒素可以是对乙酰氨基酚的其他实施方案中,所述方法还可包括同时、分开或顺序施用N-乙酰半胱氨酸。

[0138] 在另一个实施方案中,提供了预防、治疗、抑制或降低受试者中毒素暴露严重性的方法,其包括向受试者施用有效量的本文所述抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,白蛋白结合毒素可以是外源性或内源性的。在一个实施方案中,所述毒素是铜、血红素、长链脂肪酸、锌、胆红素、甲状腺素、类二十烷酸、色氨酸、维生素D3、胆汁酸、钙、镁、氯化物、吡哆美辛、溴酚蓝、水杨酸盐、华法林、保泰松、地高辛、呋塞米、苯妥英、氯磺丙脲、苄青霉素、伊文思蓝、地西洋、布洛芬、萘普生、氯贝特、氯丙嗪、丙咪嗪、奎尼丁、蓖麻毒素、胺碘酮或对乙酰氨基酚。在一些实施方案中,白蛋白结合毒素可以是对乙酰氨基酚。在其中白蛋白结合毒素可以是对乙酰氨基酚的其他实施方案中,所述方法还可包括同时、分开或顺序施用N-乙酰半胱氨酸。

[0139] 本文所述的方法包括用于治疗与白蛋白结合毒素相关(例如,与毒性水平的此类毒素相关)的病症的方法,所述白蛋白结合毒素例如,来自过量用药(例如,来自意外或故意暴露或摄入高于被认为对人或动物健康安全的水平的毒素量)或来自受试者的内源性高水平的白蛋白结合毒素(例如,来自产生比被认为对人或动物健康正常和安全的水平更高的毒素的受试者)。

[0140] 这里提供了预防或治疗与白蛋白毒性相关的医学病状的方法,其包括向受试者施用有效量的本文所述抗体或抗原结合片段。如本文所用,“白蛋白毒性”是指其中白蛋白被认为是有毒的或有害的并且可能导致例如死亡、器官损伤或神经损伤的状态。在一些实施方案中,所述医学病状是动脉粥样硬化性冠状和外周血管疾病。在一些实施方案中,所述医

学病状是糖尿病性血管病变并发症。在一些实施方案中,所述医学病状是阿尔茨海默病。在一些实施方案中,所述医学病状是外伤性脑损伤。在一些实施方案中,所述医学病状是糖尿病。在一些实施方案中,所述医学病状是终末期肾衰竭。

[0141] 在本文所述的方法中,治疗有效量的本文所示抗体或其抗原结合部分可与其他药剂、药物或激素组合(例如同时、顺序或分开)施用。在一些实施方案中,其他药剂、药物或激素可以是针对相应医学病状的已知疗法。在一些实施方案中,已知疗法可以是护理标准。例如,在降低受试者中白蛋白结合毒素水平的方法或者预防、治疗、抑制或降低受试者中毒素暴露严重性的方法的一些实施方案中(其中白蛋白结合毒素是对乙酰氨基酚),所述方法还可包括同时、分开或顺序施用N-乙酰半胱氨酸。

[0142] 在一些实施方案中,用白蛋白降低剂阻断FcRn将有益于降低内源性白蛋白水平,从而允许基于白蛋白的治疗剂的药代动力学和药效动力学增强。在这种情况下,在施用这种治疗剂之前用对白蛋白结合位点有特异性的抗FcRn抗体进行预处理将降低源自内源性白蛋白的竞争并且允许增加对施用的基于白蛋白的治疗剂的保护。在其他实施方案中,用对白蛋白结合位点有特异性的抗FcRn抗体进行治疗可用于在施用后从血清中清除基于白蛋白的治疗剂。当不再需要这种基于白蛋白的治疗方法或减少治疗性过量用药的副作用时,这可能是可用的。

[0143] 已研究了白蛋白作为半衰期延长的候选物,并且由于其与FcRn的相互作用而靶向细胞内递送药物。如本文所用的术语“基于白蛋白的治疗剂”是指与白蛋白缔合的治疗剂。基于白蛋白的治疗剂可通过例如共价缀合、遗传融合或非共价缔合与白蛋白缔合(参见Larsen等,Molecular and Cellular Therapies (2016) 4:3,其通过引用整体并入本文)。与白蛋白的缔合可在施用之前发生,即,基于白蛋白的治疗剂与一个或多个外源性白蛋白分子缔合。例如,由GlaxoSmithKline制造并以Eperzan/Tanzeum出售用于治疗II型糖尿病的阿必鲁泰是通过将两种人GLP-1重复序列融合至重组人白蛋白而开发的GLP-1受体激动剂。与白蛋白的缔合可在治疗剂的施用之后发生,即,基于白蛋白的治疗剂与一个或多个内源性白蛋白分子缔合。例如,由Novo Nordisk制造并以Levemir出售用于治疗I型糖尿病的地特胰岛素是肉豆蔻酸修饰的胰岛素类似物。在注射时,脂肪酸部分结合白蛋白并随时间解离,从而增强生物利用度和分布。基于白蛋白的治疗剂的其他实例包括利拉鲁肽(liraglutide)、奥佐利珠单抗(ozoralizumab)、MTX-HSA、adloxorubicin、CJC-1134、Albuferon、Abraxane、ABI-008、ABI-009、ABI-010、^{99m}Tc-Albures、^{99m}Tc-Nanocoll和如Larsen等所述的其他治疗剂。

[0144] 在本文所述的方法中,向有需要的哺乳动物施用治疗有效量的本文所示的抗体或其抗原结合部分。如本文所用的术语“施用”意指通过可实现所寻求结果的任何方法将本文所示抗体或其抗原结合部分递送至哺乳动物。它们可例如皮下、静脉内或肌肉内施用。尽管本文所示的抗体或其抗原结合部分特别可用于向人施用,但它们也可向其他哺乳动物施用。如本文所用的术语“哺乳动物”旨在包括但不限于人、实验室动物、家养宠物和农场动物。“治疗有效量”意指本文所示抗体或其抗原结合部分在向哺乳动物施用时有有效产生所需治疗作用的量。例如,取决于疾病,对于抗体,这可能需要0.1、1.0、3.0、6.0或10.0mg/Kg。对于具有150,000g/摩尔分子质量的IgG(两个结合位点),这些剂量对应于5L血液体积的结合位点大约18nM、180nM、540nM、1.08μM和1.8μM。

[0145] 在某些实施方案中,通过静脉内输注(即在一定时间段内将抗体或其抗原结合部分引入哺乳动物的静脉中)向哺乳动物施用抗体或其抗原结合部分。在某些实施方案中,所述时间段是约5分钟、约10分钟、约30分钟、约1小时、约2小时、约4小时或约8小时。

[0146] 在某些实施方案中,通过皮下递送(即在哺乳动物的皮肤下,通常通过捏起并提起皮肤离开下层组织,并且将抗体或其抗原结合部分注射到由此在皮肤下形成的空间中)向哺乳动物施用抗体或其抗原结合部分。

[0147] 在某些实施方案中,每天、每隔一天、每两天、每三天、一周一次、一周两次、一周三次或每两周一次向受试者施用一个剂量的化合物或组合物。在其他实施方案中,每天、每两天、每三天、一周一次或每两周一次向受试者施用两个、三个或四个剂量的化合物或组合物。在一些实施方案中,持续2天、3天、5天、7天、14天或21天施用一个或多个剂量的化合物或组合物。在某些实施方案中,持续1个月、1.5个月、2个月、2.5个月、3个月、4个月、5个月、6个月或更久施用一个剂量的化合物或组合物。在一些实施方案中,所述化合物或组合物可在暴露于毒素之前、同时或之后施用。

[0148] 施用方法包括但不限于胃肠外、真皮内、玻璃体内、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外、口服、舌下、鼻内、脑内、阴道内、经皮、经粘膜、经直肠、通过吸入、或局部,特别是向耳、鼻、眼或皮肤。施用模式由从业者决定。在大多数情况下,施用将导致化合物释放到血流中。

[0149] 在具体的实施方案中,所需的是局部施用化合物。这可通过以下实现,例如但不限于通过局部输注、局部涂敷、通过注射、借助于导管或借助于植入物,所述植入物是多孔、非多孔或凝胶状材料,包括膜(诸如硅橡胶膜)或纤维。在此类情况下,施用可选择性靶向局部组织,而不将化合物大量释放到血流中。

[0150] 还可采用肺部施用,例如通过使用吸入器或喷雾器以及具有雾化剂的制剂或通过氟碳化合物或合成肺表面活性剂中进行灌注。在某些实施方案中,将化合物与传统粘合剂和媒介物(诸如甘油三酯)一起配制成栓剂。

[0151] 在另一个实施方案中,将化合物在囊泡特别是脂质体中递送(参见Langer,1990,Science 249:1527-1533;Treat等,in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Bacterial infection,Lopez-Berestein and Fidler(编),Liss,New York,第353-365页(1989);Lopez Berestein,同上,第317-327页;通常参见同上)。

[0152] 在另一个实施方案中,将化合物在控制释放系统中递送(参见例如,Goodson,in Medical Applications of Controlled Release,见上文,第2卷,第115-138页(1984))。可使用在Langer,1990,Science249:1527-1533的综述中讨论的控制释放系统的实例。在一个实施方案中,可使用泵(参见Langer,上文;Sefton,1987,CRC Crit.Ref.Biomed.Eng.14:201;Buchwald等,1980,Surgery 88:507;Saudek等,1989,N.Engl.J.Med.321:574)。在另一个实施方案中,可使用聚合材料(参见Medical Applications of Controlled Release,Langer和Wise(编),CRC Pres.,Boca Raton,Florida(1974);Controlled Drug Bioavailability,Drug Product Design and Performance,Smolen和Ball(编),Wiley,NewYork(1984);Ranger和Peppas,1983,J.Macromol.Sci.Rev.Macromol.Chem.23:61;还参见Levy等,1985,Science 228:190;During等,1989,Ann.Neurol.25:351;Howard等,1989,J.Neurosurg.71:105)。

[0153] 毒性和治疗功效可在细胞培养物或实验动物中通过标准药理学程序来测量,以确定例如LD50(对所述群体的50%致命的剂量)和ED50(在所述群体的50%中治疗有效的剂量)。剂量比,表示为LD50/ED50之间的比率,称为治疗指数。优选表现出高治疗指数的抗体或抗原结合片段。

[0154] 用于人的剂量范围的制剂可从细胞培养测定和/或动物研究的数据获得,并且优选地在包括ED50的循环浓度范围内,具有很小毒性或没有毒性。剂量可取决于所采用的剂型和所利用的施用途径而在这个范围内变化。本领域技术人员应理解,某些因素影响有效治疗患者所需的剂量和时程,这些因素包括但不限于待治疗的患者类型、疾病或病症的严重性、先前的治疗、患者的一般健康状况和/或年龄,以及存在的其他病症。此外,用治疗有效量的抗体或抗原结合片段治疗患者可包括单次治疗,或可包括一系列治疗。

[0155] 上述施用时程仅出于说明目的提供,并且不应被视为具有限制性。本领域普通技术人员将易于了解所有剂量均在本发明的范围内。

[0156] 应了解和预期可由本领域技术人员作出符合本文公开的本发明原理的变化,并且旨在此类修改将被包括在本发明的范围内。

[0157] 在整个本申请中,引用了各种出版物。这些出版物据此通过引用整体并入本申请以更充分描述本发明所涉及的技术现状。以下实施例进一步说明本发明,而不应解释为以任何方式限制本发明的范围。

[0158] 实施例

[0159] 实施例1

[0160] 可变结构域的人源化

[0161] 基于对于小鼠单克隆抗体结合FcRn并阻断FcRn和白蛋白结合的能力选择的小鼠单克隆抗体设计适于人施用的重链和轻链可变区。所述小鼠抗体基本上不阻断FcRn和IgG Fc的结合。使用基于现有抗体结构的单克隆抗体的模型,从人V区的区段设计人抗体的可变区框架。为了最小化潜在免疫原性,设计若干变体,其在某些框架位置处具有被设计以移除人T细胞表位的所选氨基酸。

[0162] 重链和轻链V区基因由重叠寡核苷酸构建,所述重叠寡核苷酸使用连接酶链式反应(LCR)装配成全长基因,随后扩增和添加适于克隆的限制位点。

[0163] 用含有S241P突变的人IgG4恒定区构建三种重链变体。所述变体命名为V_{H1}、V_{H3}和V_{H4}。重链变体的可变结构域的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:12、14和16表示。重链变体的可变结构域的寡核苷酸序列分别由SEQ ID NO:11、13和15表示。图1示出了三种变体的比对。构建四种轻链变体,并且表达为人κ链。所述变体命名为V_{κ1}、V_{κ2}、V_{κ3}和V_{κ4}。轻链变体的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:18、20、22和24表示。轻链变体的可变结构域的寡核苷酸序列分别由SEQ ID NO:17、19、21和23表示。图2示出了四种变体的比对。

[0164] 通过将V区基因克隆到具有上游巨细胞病毒立即/早期启动子/增强子、免疫球蛋白信号序列和免疫球蛋白恒定区的哺乳动物表达载体中来将抗体表达为完整IgG。将载体转染到HEK EBNA细胞中,对表达进行定量,并且在蛋白A柱上纯化抗体。

[0165] 通过瞬时转染到HEK EBNA细胞中表达三种重链和四种轻链变体的所有12种重链-轻链组合。在蛋白A琼脂糖柱上纯化抗体,并且进行定量。如上所指出,FcRn主要驻留在早期酸性内体中,在那里其在低pH下捕获内吞的白蛋白。为了阻断FcRn与白蛋白的结合,还希望

FcRn抗体将在生理pH(例如,pH 7.4)下结合暴露于细胞间环境的FcRn。因此,在竞争ELISA测定中在pH 6.0和pH 7.4下评估纯化的抗体与FcRn的结合。

[0166] 对于ELISA,将Nunc Immuno MaxiSorp 96孔平底微量滴定板在pH 7.4下用对不同于白蛋白结合区的IgG结合表位有特异性的FcRn抗体预涂覆过夜。第二天,将在PBS(pH 7.4)中稀释的1 μ g/ml重组人FcRn(Sino Biological Inc.目录号CT009-H08H)加入到孔中,并在37 $^{\circ}$ C下孵育1小时。将30 μ g/ml至0.0018 μ g/ml的四倍稀释系列的测试或对照IgG4抗体与恒定浓度的生物素酰化的亲本鼠抗体预混合,加入到板中并在37 $^{\circ}$ C下孵育1小时。用链霉抗生物素蛋白-HRP和TMB底物检测生物素酰化的mAb的结合。在450nm下读取吸光度,并且绘制结合曲线。如表2所示,在pH 7.4和pH 6.0下测试12种组合的结合,并通过与亲本抗体比较进行定量。

[0167]

变体	平均效价	平均相对 IC ₅₀	
	(μ g/ml)	(相对于嵌合亲本 IgG ₄)	
		pH 7.4	pH 6
嵌合亲本	10.30	1	1
V _H 1/V _K 1	27.92	0.51	0.64
V _H 1/V _K 2	25.61	0.29	0.45
V _H 1/V _K 3	27.93	0.37	0.56
V _H 1/V _K 4	28.00	0.45	0.75
[0168] V _H 3/V _K 1	33.05	1.39	1.09
V _H 3/V _K 2	24.27	1.24	0.90
V _H 3/V _K 3	24.76	0.50	0.52
V _H 3/V _K 4	21.56	0.58	0.61
V _H 4/V _K 1	37.18	1.06	1.06
V _H 4/V _K 2	38.71	1.06	1.06
V _H 4/V _K 3	33.95	1.24	0.86
V _H 4/V _K 4	34.95	1.37	0.99

[0169] 实施例2

[0170] 亲和力成熟

[0171] 为了改善在酸性pH和生理pH下的结合亲和力,将重链和轻链可变结构域CDR3区突变并在pH 6.0和pH 7.4下以scFv形式筛选。为了制备scFv,使用重叠PCR,用15个氨基酸的(G₄S)₃接头装配编码V_H和V_K的基因。将scFv序列作为基因3融合蛋白克隆到噬菌粒载体中,并且将所述载体转化到大肠杆菌(TG1)中。使用V_H1和V_K1变体进行亲和力成熟过程。对于筛选,使V_H1中重链CDR3的文库与人源化亲本V_K1轻链组合,并且使V_K1中轻链CDR3的文库与人源化亲本V_H1重链组合。

[0172] 使用包含序列ARGBNSVVSBNVCNVCNCRSC (SEQ ID NO:41)的寡核苷酸将氨基酸序列变异在氨基酸位置94-100(CDR3H的a.a.95-100和FW3的a.a.94)处引入重链CDR3H区中,其如下在每个位置处提供所选的氨基酸:a.a.94:K,R;a.a.95:A,C,D,E,F,G,H,I,L,P,Q,R,S,V,W,Y;a.a.96:A,D,E,G,H,K,N,P,Q,R,S,T;a.a.97:A,C,D,F,G,H,L,P,R,S,T,V,Y;a.a.98:

A、D、G、H、I、L、N、P、R、S、T、V；a.a.99:A、C、D、G、H、N、P、R、S、T、Y；a.a.100:A、G、S、T。使用包含序列AGGNSNNSNNSRSC (SEQ ID NO:42) 的寡核苷酸将氨基酸序列变异在氨基酸位置94-99 (CDR3H的a.a.95-99和FW3的a.a.94) 处引入重链CDR3H区中,其在如下的每个位置处提供所选的氨基酸:a.a.94:R;a.a.95:A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、Y;a.a.96:A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、Y;a.a.97:A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、Y;a.a.98:A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、Y;a.a.99:A、G、S、T。

[0173] 对于各CDR,针对与可溶性抗原的结合来筛选含有大约 $3-6 \times 10^6$ 个DNA序列的约 $5-10 \times 10^7$ 个噬菌体的文库(即表示各DNA序列的约10-20个拷贝)。具体地,使噬菌体文库与可溶性生物素酰化的FcRn混合,随后在链霉抗生物素蛋白涂覆的珠上捕获FcRn-抗体噬菌体复合物。为了获得在酸性内体中以及在生理pH下结合FcRn的抗体,在交替pH下进行连续多轮文库筛选。另外,为了增加每轮连续筛选的严格性,使FcRn抗原的浓度降低。在pH 6.0下以25nM的FcRn浓度进行初始选择轮。在pH 7.4下以2.5nM进行第二轮。在pH 6.0下以0.25nM进行第三轮。在第三轮期间,在pH 6.0下以0.25nM进行“解离速率”选择。在pH 7.4下以0.1nM进行第四轮。

[0174] 由细菌周质提取物制备scFv抗体,并且通过竞争ELISA在pH 6.0和pH 7.4下进行测试。在pH 6.0下分析的大于4100个周质制品中,选择99个用于在pH 7.4下进一步分析。在竞争ELISA中,scFv抗体片段与生物素酰化的亲本鼠抗体竞争,其先前显示阻断FcRn-白蛋白相互作用以便结合固定的FcRn。如在用于测试人源化变体的ELISA中,将96孔平底微量滴定板用 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 对不同于白蛋白结合区的IgG结合表位有特异性的FcRn抗体预涂覆。在pH 7.4和pH 6.0下测定结合。图3示出了在pH 6.0和pH 7.4下与亲本scFv(即,由V_{H1}/V_{K1}组成)相关的竞争ELISA的比较。

[0175] 测量到在V_{H1}框架中含有亲和力成熟的重链CDR3的scFv在结合方面的显著改善。因此,进行这些重链与改善的轻链组合的测试。对于在V_{K3}框架中含有亲和力成熟的轻链CDR3的scFv,未鉴定出改善的变体。

[0176] 实施例3

[0177] IgG抗体的开发

[0178] 选择二十一个亲和力成熟的重链(G03_B2、G15_C10、G15_C3、G15_B7、G02_F4、G24_C11、G19_F8、G47_B10、G47_H11、G47_H6、G48_G10、G48_E3、G49_F11、G50_B10、G50_G5、G50_C10、G54_D11、G52_G9、G51_H6、G49_H9.3或G49_H9.5)并与人源化轻链(V_{K3})一起表达。通过瞬时转染HEK细胞,将所述二十一种组合表达为含有S241P突变的二价IgG4抗体,随后纯化IgG4抗体。

[0179] 实施例4

[0180] 如通过ELISA所测定的IgG4抗体的抗原结合特征

[0181] 在pH 6.0和pH 7.4下在竞争ELISA中测试IgG4抗体的抗原结合。将Nunc Immuno MaxiSorp 96孔平底微量滴定板(Fisher,目录号DIS-971-030J)在pH 7.4下用 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 对不同于白蛋白结合区的IgG结合表位有特异性的FcRn抗体预涂覆过夜。第二天,将在PBS(pH 7.4)中稀释的 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 重组人FcRn(Sino Biological Inc.目录号CT009-H08H)加入到孔中,并在37°C下孵育1小时。在用PBST(pH 7.4)将板洗涤3次之后,在37°C下用PBSM(pH 7.4)将板封闭1小时。从这点开始,所有洗涤和孵育步骤均在所选测定pH(pH 6.0或7.4)下进行。在

用PBST洗涤3次之后,使25 μ g/ml至0.006 μ g/ml最终浓度的四倍稀释系列的测试抗体与恒定浓度的生物素酰化的亲本鼠抗体(0.4 μ g/ml,最终浓度)预混合,加入到FcRn涂覆的板中,并在37 $^{\circ}$ C下孵育1小时。在3次PBST洗涤后,用链霉抗生物素蛋白-HRP(Sigma,目录号S5512)和TMB底物(Invitrogen,目录号00-2023)检测生物素酰化的mAb的结合。用3M HCl终止反应,在Dynex Technologies MRXTC II读板仪上在450nm下读取吸光度,并且绘制结合曲线。四种抗体(G02_F4V_{H1}_V_{K3}、G24_C11V_{H1}_V_{K3}、G19_F8V_{H1}_V_{K3}、G47_B10V_{H1}_V_{K3})的数据的实例示出在图4(a)中的pH 7.4和图4(b)中的pH 6.0下。获得的完整结果总结在表3中,其示出了在pH 7.4和pH 6.0下进行的实验的平均相对IC₅₀值和实验数(n)。将所述组合的IC₅₀值标准化为在相同板上测试的人源化亲本抗体。

表3 - 相对亲和力

变体	平均相对 IC ₅₀ (相对于人源化亲本)	
	pH 7.4	pH 6
V _{H1} /V _{K1}	1	1
G03_B2/V _{K3}	4.3	9.1
G15_C10/V _{K3}	0.6	0.7
G15_C3/V _{K3}	0.8	0.9
G15_B7/V _{K3}	2.0	8.2
G02_F4/V _{K3}	0.8	0.6
G24_C11/V _{K3}	2.6	1.5
G19_F8/V _{K3}	0.9	0.7
G47_B10/V _{K3}	0.6	0.6
G47_H11/V _{K3}	1.5	1.0
G47_H6/V _{K3}	0.7	0.8
G48_G10/V _{K3}	2.4	1.0
G48_E3/V _{K3}	3.6	2.3
G49_F11/V _{K3}	1.5	1.0
G50_B10/V _{K3}	1.1	1.0
G50_G5/V _{K3}	1.2	0.9
G50_C10/V _{K3}	0.7	0.9
G54_D11/V _{K3}	0.8	0.6
G52_G9/V _{K3}	0.8	0.8
G51_H6/V _{K3}	2.9	2.3
G49_H9.3/V _{K3}	0.7	0.8
G49_H9.5/V _{K3}	1.0	0.8

[0182]

[0183] 鉴定了在pH 6.0或pH 7.4下具有与人源化亲本相同或比人源化亲本更好活性的十四种组合,并将其进一步用于稳定转染到NS0小鼠骨髓瘤细胞中。

[0184] 实施例5

[0185] 抗体的稳定表达和纯化

[0186] 通过电穿孔将编码具有与人源化亲本(即,由V_{H1}/V_{K1}组成)相同或比人源化亲本更

好活性的14种IgG组合 (G15_C10/V_κ3、G15_C3/V_κ3、G02_F4/V_κ3、G19_F8/V_κ3、G47_B10/V_κ3、G47_H6/V_κ3、G49_F11/V_κ3、G50_B10/V_κ3、G50_G5/V_κ3、G50_C10/V_κ3、G54_D11/V_κ3、G52_G9/V_κ3、G49_H9.3/V_κ3或G49_H9.5/V_κ3) 的pAnt载体DNA稳定转染到NS0小鼠骨髓瘤细胞中。此外, 优选的人源化抗体, V_H1/V_κ3被包括在内。最初使用200nM甲氨蝶呤(其在扩增期间增加至500nM)选择稳定的转染。使用IgG4ELISA测试每种构建体的甲氨蝶呤抗性菌落的IgG表达水平, 并且选择最佳表达系、将其扩增并在液氮下冷冻。对于所有14种人源化变体以及V_H1/V_κ3, 实现了成功的转染和稳定的克隆选择。

[0187] 从蛋白A琼脂糖柱上的细胞培养物上清液纯化抗体, 将缓冲液交换到PBS pH 7.2中, 并基于预测的氨基酸序列使用消光系数通过OD_{280nm}进行定量。

[0188] 通过如上所述的竞争ELISA在pH 7.4和pH 6.0下测试人源化亲和力成熟抗体与FcRn的结合, 并与嵌合亲本进行比较。将NS0产生的人源化亲和力成熟的IgG用于除G50_C10/V_κ3之外的所有测定中, 其从瞬时表达的HEK细胞中纯化。pH 6.0下的实施例数据在图5中示出, 并且pH 7.4下的实施例数据在图6中示出。所述数据总结在下表4中。

表 4 - 相对亲和力		
变体	平均相对 IC ₅₀ (相对于人源化亲本)	
	pH 7.4	pH 6
V _H 1/V _κ 3	1	1
G15_C10/V _κ 3	0.98	0.78
G15_C3/V _κ 3	0.80	0.68
G02_F4/V _κ 3	1.10	0.95
G19_F8/V _κ 3	1.19	0.76
G47_B10/V _κ 3	0.74	0.58
G47_H6/V _κ 3	0.89	0.84
G49_F11/V _κ 3	1.35	0.98
G50_B10/V _κ 3	1.29	1.23
G50_G5/V _κ 3	1.63	0.84
G50_C10/V _κ 3	0.54	0.89
G54_D11/V _κ 3	1.93	0.62
G52_G9/V _κ 3	0.92	0.56
G49_H9.3/V _κ 3	0.73	0.58
G49_H9.5/V _κ 3	0.87	0.80

[0191] 与优选的人源化变体相比, 变体中的八种 (G15_C3/V_κ3、G47_B10/V_κ3、G47_H6/V_κ3、G50_C10/V_κ3、G54_D11/V_κ3、G52_G9/V_κ3、G49_H9.3/V_κ3和G49_H9.5/V_κ3) 在pH 6.0和pH 7.4下得以改善。一种抗体在pH 6.0下改善, 但在pH 7.4下未改善。将这八种抗体进一步用于Biacore分析。

[0192] 实施例6

[0193] 使用表面等离子体共振测定mAb结合动力学

[0194] 使用T200仪器通过BIACORE®将所选变体的结合动力学与鼠亲本和人源化亲

本 (V_{H1}/V_{K1}) 进行比较。使用标准胺偶联化学和在表面上流动的分析物 (FcRn) 将抗体固定在 Series S CM5 传感器芯片表面上。2 倍稀释范围选自 50–0.01 nM FcRn。监测 FcRn 分析物的缔合相 450 秒, 并且最初以 40 $\mu\text{l}/\text{min}$ 测量解离 250 或 2500 秒。Fc1 是参考通道, 并从其他流动细胞中减去以校正非特异性结合。通过将人源化亲本的 K_D 除以相同芯片上的测试抗体的 K_D 来计算 K_D 的倍数差异。动力学值基于 1:1 结合模型 (表 5)。

[0195] 亲和力成熟的人源化抗体 G15_C3/ V_{K3} 、G47_B10/ V_{K3} 和 G50_C10/ V_{K3} 与人源化亲本相比时显示出亲和力的显著改善 (平均在约 7.1 至约 50 倍之间范围内)。对于 G50_C10/ V_{K3} 观察到的缓慢解离速率接近 Biacore 仪器的检测极限。再次测定三种最佳变体以提供直接分级比较, 其中解离时间增加至 4500 秒, 以便更准确地测定 G50_C10/ V_{K3} 的解离常数。

表 5-抗人 FcRn mAb 的结合动力学

mAb	F _c	K _a (1/Ms)	K _d (1/s)	K _D (nM)	χ^2	K _D 的 倍数 差异
鼠亲本	2	4.75E+05	1.29E-03	2.7	0.02	0.9
V _{H1} /V _{K1}	3	4.77E+05	1.16E-03	2.43	0.08	1.0
G47_B10/ V_{K3}	4	4.15E+05	1.34E-04	0.33	0.07	7.4
V _{H1} /V _{K1}	2	5.37E+05	1.10E-03	2.05	0.02	1.0
G15_C3/ V_{K3}	3	6.68E+05	1.96E-04	0.29	0.06	7.1
G50_C10/ V_{K3} (HEK)	4	3.99E+05	1.00E-05	0.025	0.07	82
V _{H1} /V _{K1}	2	5.17E+05	1.02E-03	1.97	0.08	1.0
G52_G9/ V_{K3}	3	4.55E+05	9.04E-04	1.99	0.06	1.0
G49_H9.3/ V_{K3}	4	5.47E+05	6.08E-04	1.11	0.09	1.8
V _{H1} /V _{K1}	2	4.47E+05	1.17E-03	2.61	0.08	1.0
G47_H6/ V_{K3}	3	3.89E+05	8.14E-04	2.09	0.05	1.2
G49_H9.5/ V_{K3}	4	1.5E+05	1.81E-04	1.21	0.07	2.2
V _{H1} /V _{K1}	2	4.72E+05	1.10E-03	2.34	0.04	1.0
G54_D11/ V_{K3}	3	5.67E+05	2.10E-03	3.71	0.03	0.6
G50_C10/ V_{K3}	4	2.98E+05	2.34E-05	0.078	0.09	30
G15_C3/ V_{K3}	2	3.20E+05	1.25E-04	0.39	0.06	-
G47_B10/ V_{K3}	3	3.74E+05	9.12E-04	0.24	0.1	-
G50_C10/ V_{K3}	4	2.83E+05	1.54E-05	0.054	0.12	-

[0197] 在进一步的研究中, 如制造商所述使用具有 CM5 传感器芯片的 Biacore 3000 仪器 (GE Healthcare) 进行表面等离子体共振 (SPR), 所述 CM5 传感器芯片使用胺偶联化学与 mAb 偶联 (约 500–700 个共振单元)。使用胺偶联试剂盒 (GE Healthcare), 通过将 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的各蛋白质注射到 10 mM 乙酸钠 (pH 4.5) (GE Healthcare) 中进行偶联。将 HBS-P 缓冲液 (pH 7.4) (0.01 M HEPES、0.15 M NaCl、0.005% 表面活性剂 P20) 或磷酸盐缓冲液 (pH 6.0) (67 mM 磷酸盐缓冲液、0.15 M NaCl、0.005% 吐温 20) 用作运行缓冲液和稀释缓冲液。通过在 pH 7.4 或 pH 6.0 下, 在固定化 Ab 上注射滴定量单体 His 标记的 hFcRn (400.0–12.5 nM) 来测定结合动力

学。所有SPR实验均在25℃下以40μl/min的流速进行。将结合数据调零，并减去参考单元值。将由BIAevaluation软件(4.1版)提供的Langmuir 1:1配体结合模型用于测定结合动力学。由统计值 χ^2 描述拟合的接近度。

[0198] 图7示出了通过表面等离子共振确定的(A) SYNT002h(人源化亲本 V_H1/V_K1)、(B) SYNT002-3($G15_C3/V_K3$)、(C) SYNT002-8($G47_B10/V_K3$)、(D) SYNT002-16($G50_C10/V_K3$)、(E) SYNT002-17($G54_D11/V_K3$)和(F) SYNT002-21($G49_H9.3/V_K3$)的结合缔合和解离的图。动力学速率常数在下表6中提供。使用简单一级(1:1)Langmuir双分子相互作用模型获得动力学速率常数。动力学值表示一式两份的平均值。 χ^2 (卡方)值表示与所使用的结合模型的拟合。

mAb	K_a (1/Ms)	K_d (1/s)	K_D (nM)	χ^2
pH 7.4				
V_H1/V_K1	$1.7 \pm 0.1E + 05$	$5.1 \pm 0.1E -03$	30.0	5.0
$G15_C3/V_K3$	$0.9 \pm 0.2E + 05$	$0.7 \pm 0.0E -03$	7.8	4.0
$G47_B10/V_K3$	$1.5 \pm 0.1E + 05$	$0.6 \pm 0.0E -03$	4.0	0.9
$G50_C10/V_K3$	$1.2 \pm 0.1E + 05$	$0.00008 \pm 0.0E -03$	0.00066	0.6
$G54_D11/V_K3$	$2.2 \pm 0.1E + 05$	$7.5 \pm 0.0E -03$	34.0	5.0
$G49_H9.3/V_K3$	$1.8 \pm 0.1E + 05$	$1.8 \pm 0.1E -03$	10.0	3.9
pH 6.0				
V_H1/V_K1	$4.5 \pm 0.5E + 05$	$1.3 \pm 0.1E -03$	2.8	11.7
$G15_C3/V_K3$	$2.7 \pm 0.1E + 05$	$0.2 \pm 0.0E -03$	0.7	27.0
$G47_B10/V_K3$	$3.5 \pm 0.2E + 05$	$0.2 \pm 0.1E -03$	0.6	5.5
$G50_C10/V_K3$	$1.1 \pm 1.0E + 05$	$0.047 \pm 0.2E -03$	0.4	2.1
$G54_D11/V_K3$	$5.9 \pm 0.3E + 05$	$0.8 \pm 0.1E -03$	1.6	36.0
$G49_H9.3/V_K3$	$5.3 \pm 0.3E + 05$	$0.9 \pm 0.0E -03$	1.7	20.0

[0200] 结果显示所有抗体在两种pH条件下以不同的动力学结合人FcRn。与人源化亲本相比，亲和力成熟的变体在两种pH条件下以改善的亲和力结合人FcRn，除了 $G54_D11/V_K3$ ，其仅在pH 6.0下得到改善。

[0201] 实施例7

[0202] 白蛋白清除研究

[0203] 使用转基因小鼠进行体内研究以检查抗FcRn抗体对白蛋白清除的影响。在第0天，通过IV注射500mg/kg人白蛋白预负载所有小鼠。在第1天，以20mg/kg对每组小鼠(n=6)给药PBS或 $G47_B10/V_K3$ (SYNT002-8)或 $G50_C10/V_K3$ (SYNT002-16)。在IV注射后24、32、48、56、72、96、120和144小时从每只小鼠收集血液样品并加工成血浆。通过ELISA定量血浆的白蛋白浓度。

[0204] 图8A示出了SYNT002-8($G47_B10/V_K3$)和SYNT002-16($G50_C10/V_K3$)绘制为指定时间点处基于24小时基线(\pm 标准误差)剩余的平均%白蛋白的研究结果。

[0205] 图8B示出了第二个实验的结果，其证明了SYNT002-8($G47_B10/V_K3$)以剂量依赖性方式有效增加白蛋白分解代谢。施用PBS、IgG4同种型对照(20mg/kg)和三种不同浓度的SYNT002-8($G47_B10/V_K3$)(5mg/kg、10mg/kg和20mg/kg)，并且结果表示为与24小时基线相

比,指定时间点处剩余的人白蛋白的平均百分比(\pm SEM)的 \log_{10} 。曲线表示具有90%置信区间的非线性回归分析。通过单向ANOVA分析这些曲线 \pm SD的斜率($n=5-11$; * $P=0.031$; ** $P=0.0069$; *** $P=0.0003$; **** $P<0.0001$)。

[0206] 实施例8

[0207] 对乙酰氨基酚 (APAP) 保护研究

[0208] 使用转基因小鼠进行体内研究以检查抗FcRn抗体对于对乙酰氨基酚 (APAP) 肝毒性的保护作用。为此,向Fcgrt^{TG}小鼠施用亚致死剂量的APAP (400mg/kg)。在APAP施用后2小时施用PBS、标准临床解毒剂N-乙酰半胱氨酸 (NAC) (140mg/kg)、SYNT002-8 (G47_B10/V_k3) (10mg/kg) 或IgG4同种型对照 (10mg/kg)。在APAP施用后6小时和8小时测量血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 水平。

[0209] 图9示出了与对照治疗相比时,剂量为10mg/kg的SYNT002-8 (G47_B10/V_k3) 对Fcgrt^{TG}小鼠提供保护,其等于在亚致死APAP攻击后2小时由施用的NAC提供的保护 ($n=3-5$; * $P<0.05$; ** $P<0.0038$; *** $P<0.001$)。因此,在治疗环境中,SYNT002-8赋予保护免于毒性APAP暴露,其程度与当前标准解毒剂NAC相同。

序列表

<110> Syntimmune, Inc.
 Blumberg, Laurence J.
 Blumberg, Richard S.
 Jones, Susan Dana
 Roopenian, Derry
 Holgate, Robert
 Jones, Timoth
 Hearn, Arron

<120> 人源化亲和力成熟的抗 FcRn 抗体

<130> 162255.46276

<150> U. S. 60/326,907
 <151> 2016-04-25

<160> 48

<170> PatentIn 版本 3.5

[0001] <210> 1
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(15)

<400> 1
 gac tat gga atg cac
 Asp Tyr Gly Met His
 1 5 15

<210> 2
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 2
 Asp Tyr Gly Met His
 1 5

<210> 3

<211> 51
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (51)

<400> 3
 tac att agt agt ggc agt agt acc atc tac tat gca gac aca gtg aag 48
 Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15

 ggc 51
 Gly

<210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

[0002]

<400> 4

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

 Gly

<210> 5
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (33)

<400> 5
 aag gcc agt cag agt gtg agt aat gat gta gct 33
 Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Val Ala
 1 5 10

<210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 6

Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Val Ala
 1 5 10

<210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(21)

<400> 7

tat gca tcc aat cgc tac act
 Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
 1 5

21

[0003]

<210> 8
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 8

Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
 1 5

<210> 9
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(24)

<400> 9

cag cag gat tat agc tct ctc acg

24

Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Leu Thr
1 5

<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 10

Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Leu Thr
1 5

<210> 11
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化

[0004]

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(357)

<220>
<221> misc_feature
<222> (91)..(105)
<223> CDR; 位置 91 至 105 处的' n' 代表 a、g、c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (148)..(198)
<223> CDR; 位置 148 至 198 处的' n' 代表 a、g、c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (295)..(324)
<223> CDR; 位置 295 至 324 处的' n' 代表 a、g、c 或 t

<400> 11

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc tta gtg aag cct gga ggg 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt nnn nnn 96
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Xaa

	20	25	30	
	nnn nnn nnn tgg gtt cgt cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtt			144
	Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45	
	gca nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn			192
	Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa			
	50	55	60	
	nnn nnn cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac acc ctg tat			240
	Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr			
	65	70	75	80
	ctg caa atg aac agt ctg agg gcc gag gac acg gcc atg tat tac tgt			288
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys			
	85	90	95	
	gca agg nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn tgg ggt caa gga			336
	Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly			
	100	105	110	
	acc tca gtc acc gtc tcc tca			357
	Thr Ser Val Thr Val Ser Ser			
	115			
[0005]				
<210>	12			
<211>	119			
<212>	PRT			
<213>	人工序列			
<220>				
<221>	misc_feature			
<222>	(31)..(31)			
<223>	位置 31 处的'Xaa' 代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、 Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys 或 Phe。			
<220>				
<221>	misc_feature			
<222>	(32)..(32)			
<223>	位置 32 处的'Xaa' 代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、 Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys 或 Phe。			
<220>				
<221>	misc_feature			
<222>	(33)..(33)			
<223>	位置 33 处的'Xaa' 代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、			

- Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys 或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (34).. (34)
<223> 位置 34 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys 或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (35).. (35)
<223> 位置 35 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (50).. (50)
<223> 位置 50 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。
- [0006] <220>
<221> misc_feature
<222> (51).. (51)
<223> 位置 51 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (52).. (52)
<223> 位置 52 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (53).. (53)
<223> 位置 53 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (54).. (54)
<223> 位置 54 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、

或 Phe。

<220>

<221> misc_feature

<222> (55).. (55)

<223> 位置 55 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、
Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、
或 Phe。

<220>

<221> misc_feature

<222> (56).. (56)

<223> 位置 56 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、
Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、
或 Phe。

<220>

<221> misc_feature

<222> (57).. (57)

<223> 位置 57 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、
Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、
或 Phe。

[0007]

<220>

<221> misc_feature

<222> (58).. (58)

<223> 位置 58 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、
Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、
或 Phe。

<220>

<221> misc_feature

<222> (59).. (59)

<223> 位置 59 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、
Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、
或 Phe。

<220>

<221> misc_feature

<222> (60).. (60)

<223> 位置 60 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、
Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、
或 Phe。

<220>

<221> misc_feature

<222> (61).. (61)

<223> 位置 61 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、
Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、
或 Phe。

- <220>
<221> misc_feature
<222> (62).. (62)
<223> 位置 62 处的' Xaa' 代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (63).. (63)
<223> 位置 63 处的' Xaa' 代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (64).. (64)
<223> 位置 64 处的' Xaa' 代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。
- [0008] <220>
<221> misc_feature
<222> (65).. (65)
<223> 位置 65 处的' Xaa' 代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (66).. (66)
<223> 位置 66 处的' Xaa' 代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (99).. (99)
<223> 位置 99 处的' Xaa' 代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (100).. (100)
<223> 位置 100 处的' Xaa' 代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys 或 Phe。

- <220>
<221> misc_feature
<222> (101).. (101)
<223> 位置 101 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、
Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、
Cys 或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (102).. (102)
<223> 位置 102 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、
Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、
Cys 或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (103).. (103)
<223> 位置 103 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、
Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、
Cys 或 Phe。
- [0009] <220>
<221> misc_feature
<222> (104).. (104)
<223> 位置 104 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、
Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、
Cys 或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (105).. (105)
<223> 位置 105 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、
Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、
Cys 或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (106).. (106)
<223> 位置 106 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、
Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、
Cys 或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (107).. (107)
<223> 位置 107 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、
Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、
Cys 或 Phe。
- <220>

acc acg gtc acc gtc tcc tca
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

357

<210> 14
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (31).. (31)
 <223> 位置 31 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、
 Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、
 或 Phe。

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (32).. (32)
 <223> 位置 32 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、
 Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、
 或 Phe。

[0012]

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (33).. (33)
 <223> 位置 33 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、
 Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、
 或 Phe。

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (34).. (34)
 <223> 位置 34 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、
 Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、
 或 Phe。

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (35).. (35)
 <223> 位置 35 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、
 Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、
 或 Phe。

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (50).. (50)
 <223> 位置 50 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、
 Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、

或 Phe。

<220>

<221> misc_feature

<222> (51).. (51)

<223> 位置 51 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。

<220>

<221> misc_feature

<222> (52).. (52)

<223> 位置 52 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。

<220>

<221> misc_feature

<222> (53).. (53)

<223> 位置 53 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。

[0013]

<220>

<221> misc_feature

<222> (54).. (54)

<223> 位置 54 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。

<220>

<221> misc_feature

<222> (55).. (55)

<223> 位置 55 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。

<220>

<221> misc_feature

<222> (56).. (56)

<223> 位置 56 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。

<220>

<221> misc_feature

<222> (57).. (57)

<223> 位置 57 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。

- <220>
<221> misc_feature
<222> (58).. (58)
<223> 位置 58 处的' Xaa' 代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (59).. (59)
<223> 位置 59 处的' Xaa' 代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (60).. (60)
<223> 位置 60 处的' Xaa' 代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。
- [0014] <220>
<221> misc_feature
<222> (61).. (61)
<223> 位置 61 处的' Xaa' 代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (62).. (62)
<223> 位置 62 处的' Xaa' 代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (63).. (63)
<223> 位置 63 处的' Xaa' 代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (64).. (64)
<223> 位置 64 处的' Xaa' 代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。

- <220>
<221> misc_feature
<222> (65).. (65)
<223> 位置 65 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (66).. (66)
<223> 位置 66 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (99).. (99)
<223> 位置 99 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。
- [0015] <220>
<221> misc_feature
<222> (100).. (100)
<223> 位置 100 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys 或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (101).. (101)
<223> 位置 101 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys 或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (102).. (102)
<223> 位置 102 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys 或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (103).. (103)
<223> 位置 103 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys 或 Phe。
- <220>

Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
50 55 60

Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala 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 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 15
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

[0017]

<220>
<223> 人源化

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(357)

<220>
<221> misc_feature
<222> (91)..(105)
<223> CDR; 位置 91 至 105 处的'n'代表 a、g、c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (148)..(198)
<223> CDR; 位置 148 至 198 处的'n'代表 a、g、c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (295)..(324)
<223> CDR; 位置 295 至 324 处的'n'代表 a、g、c 或 t

<400> 15

或 Phe。

<220>

<221> misc_feature

<222> (33).. (33)

<223> 位置 33 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。

<220>

<221> misc_feature

<222> (34).. (34)

<223> 位置 34 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。

<220>

<221> misc_feature

<222> (35).. (35)

<223> 位置 35 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。

[0019]

<220>

<221> misc_feature

<222> (50).. (50)

<223> 位置 50 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。

<220>

<221> misc_feature

<222> (51).. (51)

<223> 位置 51 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。

<220>

<221> misc_feature

<222> (52).. (52)

<223> 位置 52 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。

<220>

<221> misc_feature

<222> (53).. (53)

<223> 位置 53 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。

- <220>
<221> misc_feature
<222> (54).. (54)
<223> 位置 54 处的' Xaa' 代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (55).. (55)
<223> 位置 55 处的' Xaa' 代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (56).. (56)
<223> 位置 56 处的' Xaa' 代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。
- [0020] <220>
<221> misc_feature
<222> (57).. (57)
<223> 位置 57 处的' Xaa' 代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (58).. (58)
<223> 位置 58 处的' Xaa' 代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (59).. (59)
<223> 位置 59 处的' Xaa' 代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (60).. (60)
<223> 位置 60 处的' Xaa' 代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。

- <220>
<221> misc_feature
<222> (61).. (61)
<223> 位置 61 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (62).. (62)
<223> 位置 62 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (63).. (63)
<223> 位置 63 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (64).. (64)
<223> 位置 64 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。
- [0021] <220>
<221> misc_feature
<222> (65).. (65)
<223> 位置 65 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (66).. (66)
<223> 位置 66 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (99).. (99)
<223> 位置 99 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、Cys、或 Phe。
- <220>

- <221> misc_feature
<222> (100).. (100)
<223> 位置 100 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、
Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、
Cys 或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (101).. (101)
<223> 位置 101 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、
Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、
Cys 或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (102).. (102)
<223> 位置 102 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、
Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、
Cys 或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (103).. (103)
<223> 位置 103 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、
Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、
Cys 或 Phe。
- [0022]
<220>
<221> misc_feature
<222> (104).. (104)
<223> 位置 104 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、
Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、
Cys 或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (105).. (105)
<223> 位置 105 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、
Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、
Cys 或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature
<222> (106).. (106)
<223> 位置 106 处的'Xaa'代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、
Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、
Cys 或 Phe。
- <220>
<221> misc_feature

<222> (107)..(107)
 <223> 位置 107 处的'Xaa' 代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、
 Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、
 Cys 或 Phe。

<220>

<221> misc_feature

<222> (108)..(108)

<223> 位置 108 处的'Xaa' 代表 Lys、Asn、Arg、Ser、Thr、
 Ile、Met、Glu、Asp、Gly、Ala、Val、Gln、His、Pro、Leu、Tyr、Trp、
 Cys 或 Phe。

<220>

<223> 合成构建体

<400> 16

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Xaa
 20 25 30

[0023]

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

Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60

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

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

Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 17

<400> 18

Ser Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Phe Leu Leu Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Leu Thr
 85 90 95

[0025]

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 19

<211> 318

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(318)

<400> 19

agt att gtg atg acc cag tct ccc gac tcc ctg tct gca tca gtg gga 48
 Ser Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

gac agg gtt acc ata acc tgc aag gcc agt cag agt gtg agt aat gat 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp

65	70	75	80
Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Leu Thr			
	85	90	95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
	100	105	
<210> 21			
<211> 318			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人源化			
<220>			
<221> CDS			
<222> (1).. (318)			
<400> 21			
[0027] gac att gtg atg acc cag tct ccc gac tcc ctg tct gca tca gtg gga			48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
gac agg gtt acc ata acc tgc aag gcc agt cag agt gtg agt aat gat			96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp			
	20	25	30
gta gct tgg tac caa cag aag cca ggg cag cct cct aaa ctg ctg ata			144
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile			
	35	40	45
tac tat gca tcc aat cgc tac act gga gtc cct gat cgc ttc agt ggc			192
Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly			
	50	55	60
agt gga tat ggg acg gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag gct			240
Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala			
65	70	75	80
gaa gac gtg gca gtt tat ttc tgt cag cag gat tat agc tct ctc acg			288
Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Leu Thr			
	85	90	95
ttc ggt cag ggg acc aag ctg gag atc aaa			318

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 22
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 22

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

[0028]

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Leu Thr
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 23
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人源化

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

[0030]

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

<220>
 <223> 亲和力成熟的

<400> 25

Gly Glu Ser Thr Thr Thr Val Gly Asp Tyr	1	5	10
---	---	---	----

<210> 26
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 亲和力成熟的

<400> 26

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Glu Ser Thr Thr Thr Val Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

[0031] Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 亲和力成熟的

<400> 27

Ala Glu Ser Thr Thr Thr Val Gly Asp Tyr
 1 5 10

<210> 28

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 亲和力成熟的

<400> 28

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

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

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

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

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

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

[0032]

Ala Arg Ala Glu Ser Thr Thr Thr Val Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 亲和力成熟的

<400> 29

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

<210> 30

<211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 亲和力成熟的

<400> 30

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

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

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

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

[0033]

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

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

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

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 31
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 亲和力成熟的

<400> 31

Leu Glu Ser Thr Thr Ala Val Gly Asp Tyr
1 5 10

<210> 32

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 亲和力成熟的

<400> 32

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

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

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

[0034]

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

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

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

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

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 亲和力成熟的

<400> 33

Phe Asp Thr Pro Ala Thr Val Gly Asp Tyr
1 5 10

<210> 34

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 亲和力成熟的

<400> 34

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

[0035]

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

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

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

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

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

Ala Arg Phe Asp Thr Pro Ala Thr Val Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 35
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 亲和力成熟的

<400> 35

Phe Asp Thr Pro Ser Thr Val Gly Asp Tyr
 1 5 10

<210> 36
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 亲和力成熟的

[0036]

<400> 36

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Phe Asp Thr Pro Ser Thr Val Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 37

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 亲和力成熟的

<400> 37

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

<210> 38

<211> 119

[0037] <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 亲和力成熟的

<400> 38

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

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

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

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

Ala Arg Leu Glu Ala Val Ser Ala Val Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

[0039]

<210> 41
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> n 是 a、c、g 或 t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> n 是 a、c、g 或 t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> n 是 a、c、g 或 t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> n 是 a、c、g 或 t

	<400> 41 argbnsvvsb ncvcnvers c	21
	<210> 42 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成序列	
	<220> <221> misc_feature <222> (4)..(5) <223> n 是 a、c、g 或 t	
	<220> <221> misc_feature <222> (7)..(8) <223> n 是 a、c、g 或 t	
[0040]	<220> <221> misc_feature <222> (10)..(11) <223> n 是 a、c、g 或 t	
	<220> <221> misc_feature <222> (13)..(14) <223> n 是 a、c、g 或 t	
	<400> 42 aggnsnnsn nsnsrsc	18
	<210> 43 <211> 6 <212> PRT <213> 人工序列	
	<220> <223> 共有	
	<220> <221> VARIANT <222> (1)..(1) <223> 残基是 A 或 L	

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (6).. (6)
 <223> 残基是 T 或 R

<400> 45

Xaa Glu Ser Thr Thr Xaa
 1 5

<210> 46
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 共有

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1).. (1)
 <223> 残基是 G、A 或 L

[0042]

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (6).. (6)
 <223> 残基是 T 或 R

<400> 46

Xaa Glu Ser Thr Thr Xaa Val Gly Asp Tyr
 1 5 10

<210> 47
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 共有

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1).. (1)
 <223> 残基是 G、A、F 或 L

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (3).. (3)
 <223> 残基是 S、T 或 A

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (4).. (4)
 <223> 残基是 T、L、P 或 V

[0044] <220>
 <221> VARIANT
 <222> (5).. (5)
 <223> 残基是 T、S 或 A

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (6).. (6)
 <223> 残基是 T 或 A

<400> 48

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Gly Asp Tyr
 1 5 10

Kabat No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7						
SEQ ID NO:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7						
ADM31	S	I	V	M	T	Q	T	P	K	F	L	L	V	S	A	G	D	R	V	T	I	T	C
VK1	S	I	V	M	T	Q	S	P	D	F	L	L	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
VK2	S	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
VK3	D	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
VK4	D	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C

Kabat No.	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0		
SEQ ID NO:	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0		
ADM31	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	Y	A	S	N	R	Y	T
VK1	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	Y	A	S	N	R	Y	T
VK2	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	Y	A	S	N	R	Y	T
VK3	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	Y	A	S	N	R	Y	T
VK4	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	Y	A	S	N	R	Y	T

Kabat No.	1	0	1	2	3	4	5	6	7	8						
SEQ ID NO:	1	0	1	2	3	4	5	6	7	8						
ADM31	E	D	L	A	V	Y	F	C	Q	Q	D	Y	S	S	L	T
VK1	E	D	V	A	V	Y	F	C	Q	Q	D	Y	S	S	L	T
VK2	E	D	V	A	V	Y	F	C	Q	Q	D	Y	S	S	L	T
VK3	E	D	V	A	V	Y	F	C	Q	Q	D	Y	S	S	L	T
VK4	E	D	V	A	V	Y	F	C	Q	Q	D	Y	S	S	L	T

图2

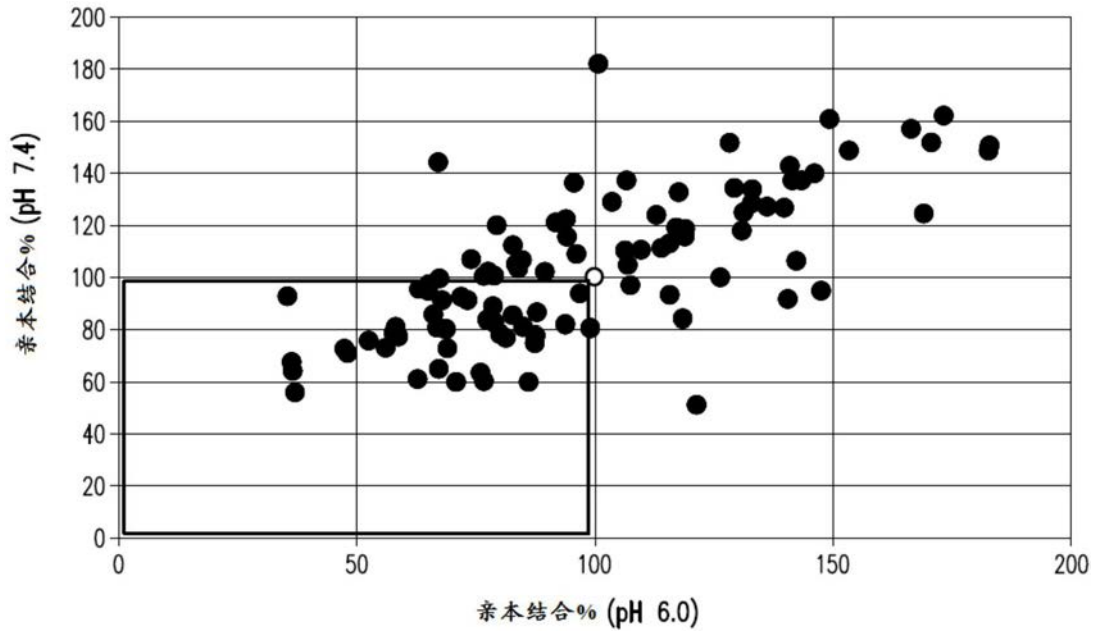


图3

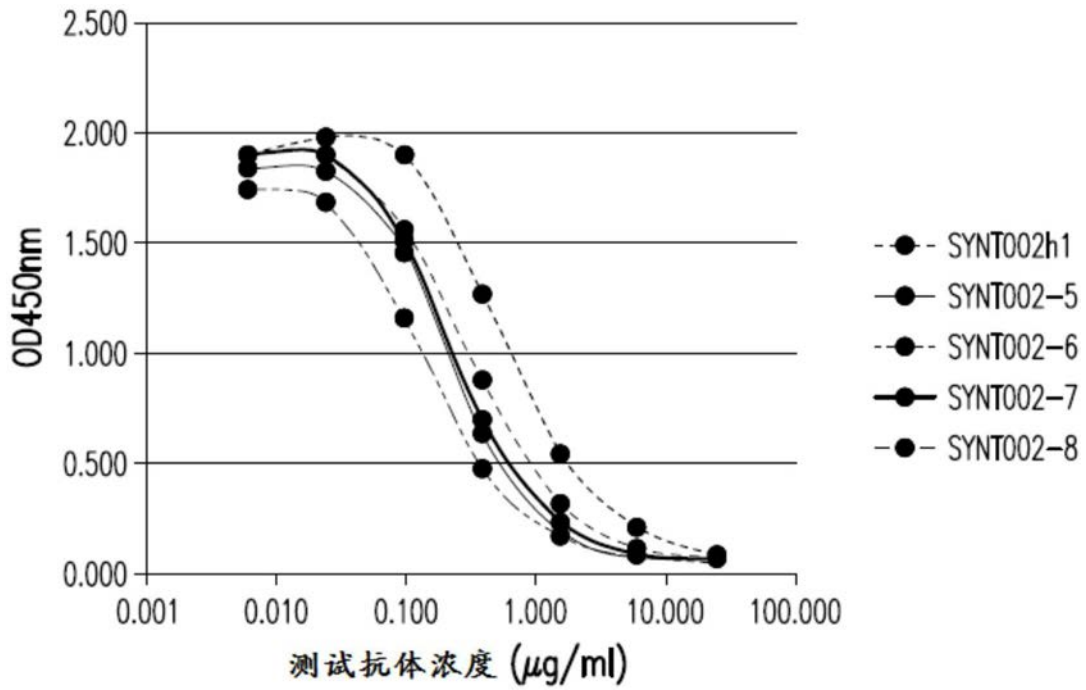


图4A

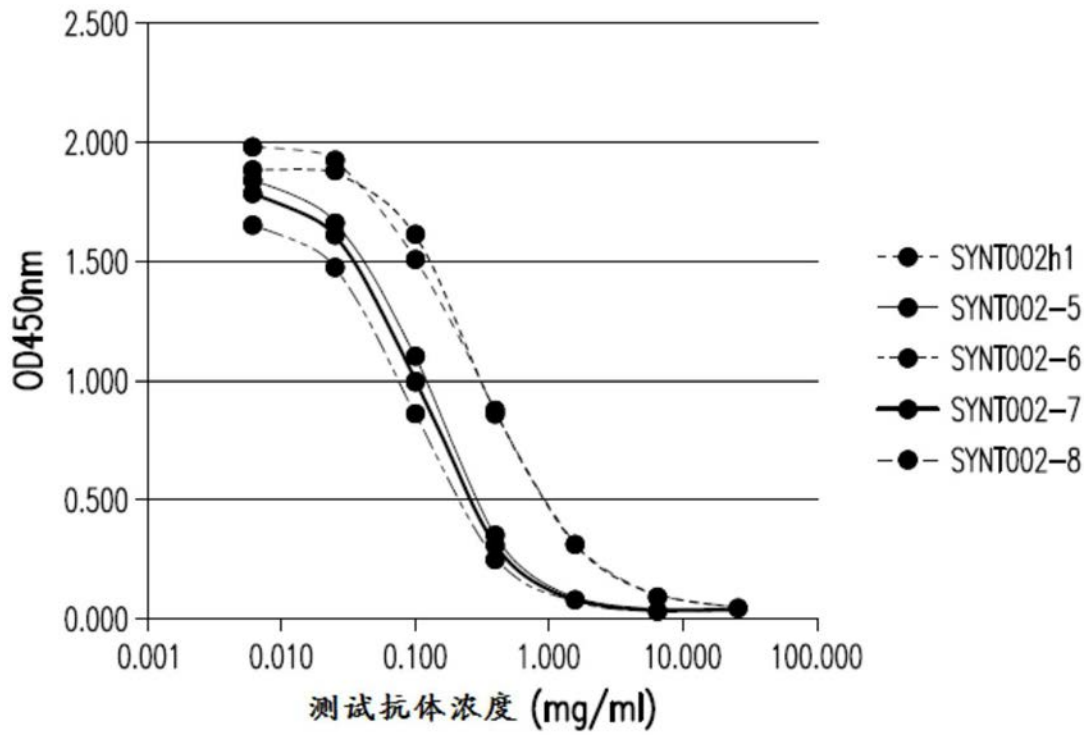


图4B

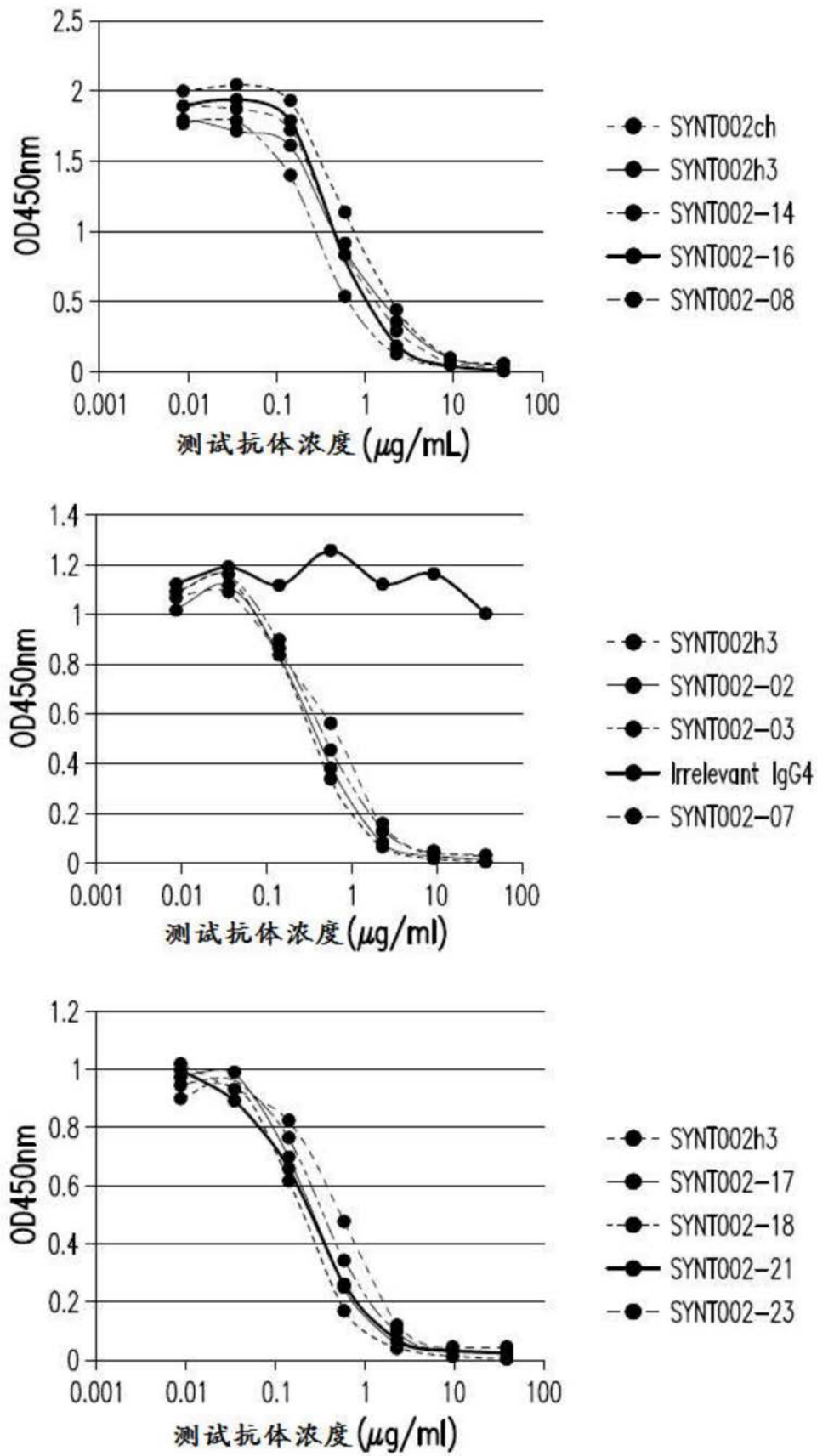


图5

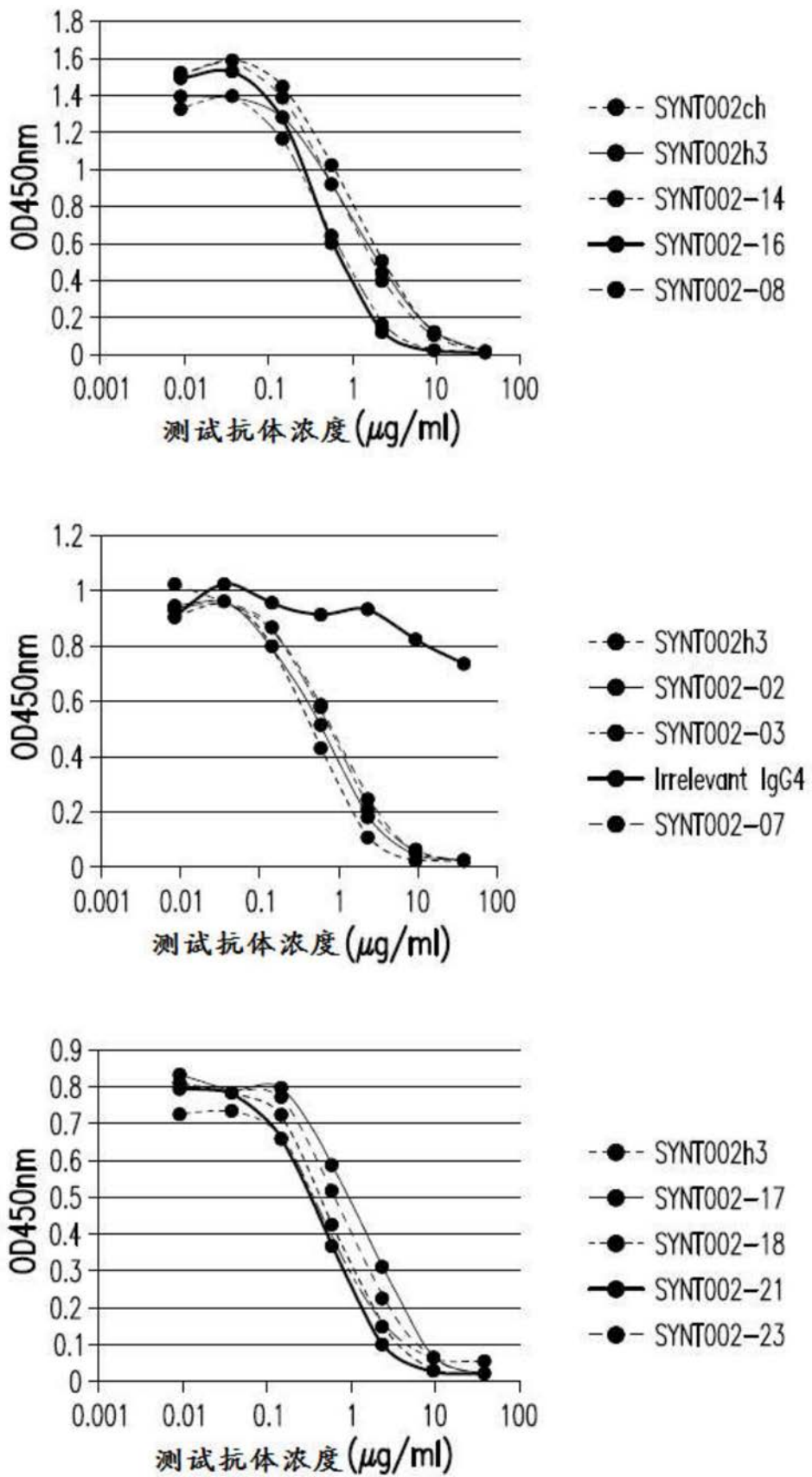


图6

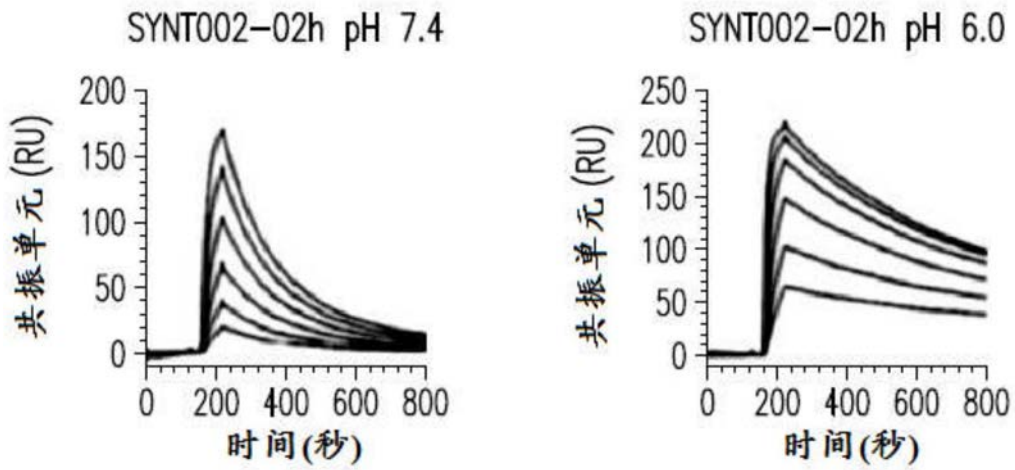


图7A

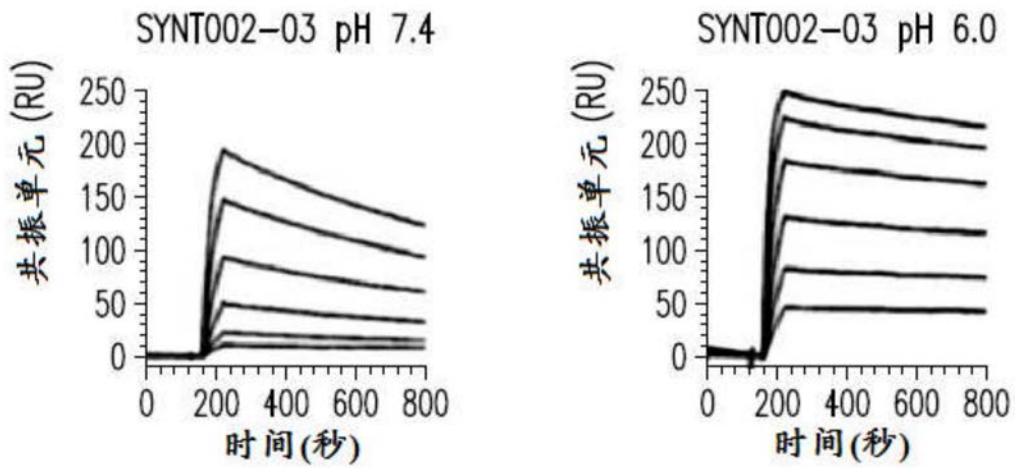


图7B

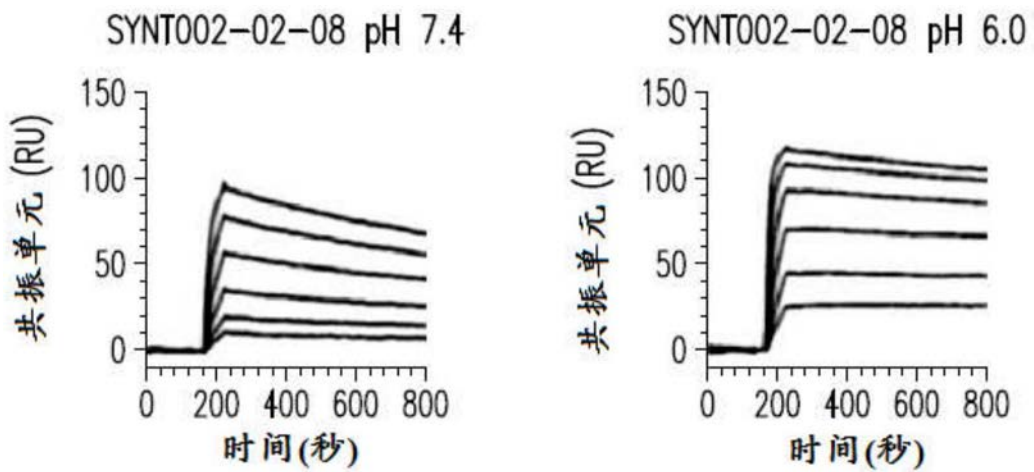


图7C

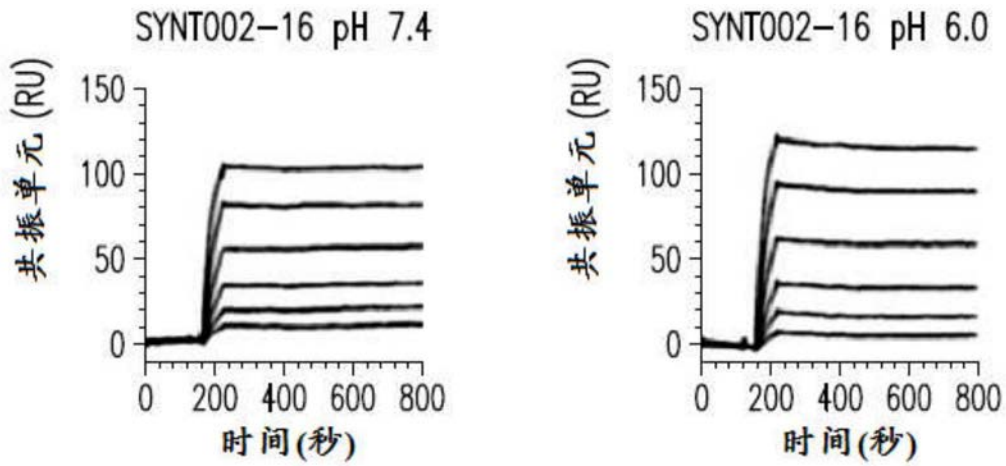


图7D

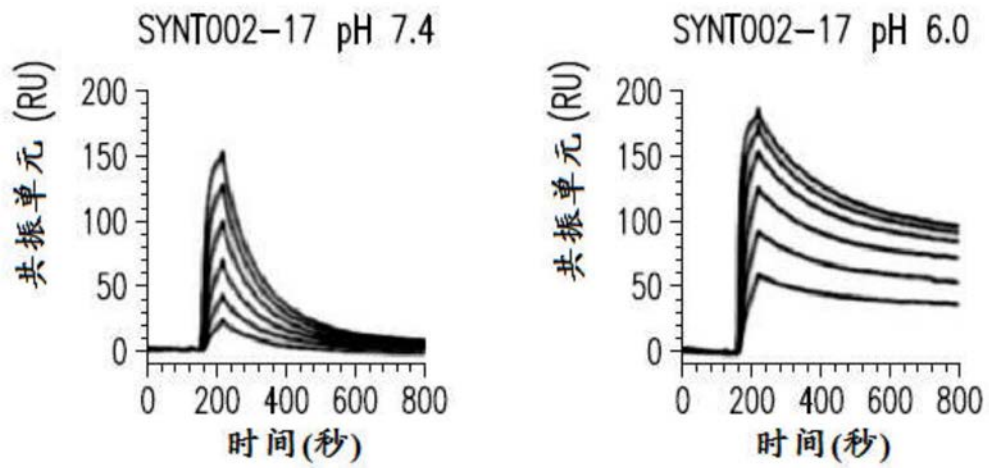


图7E

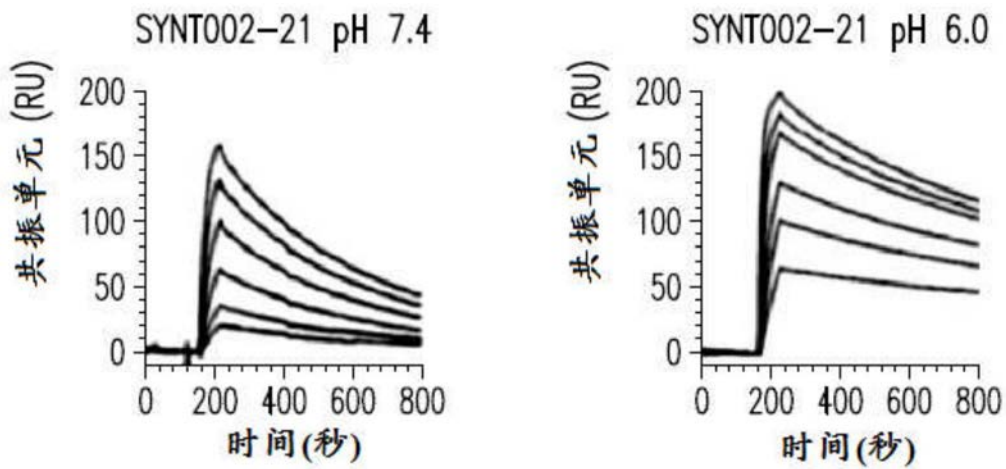


图7F

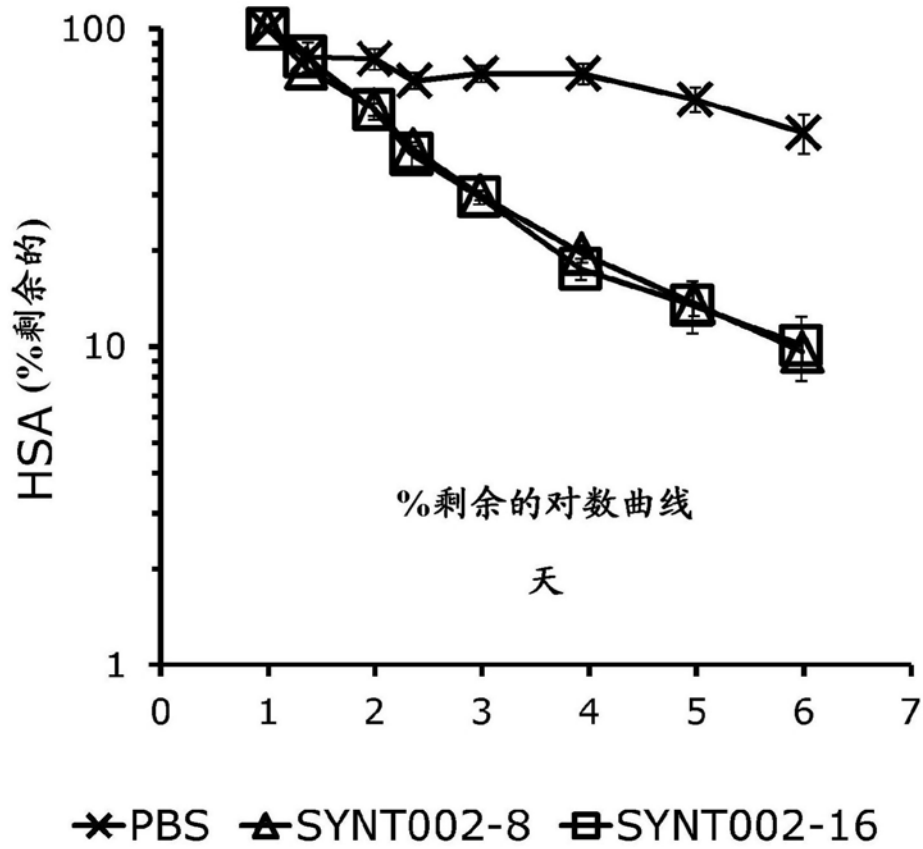


图8A

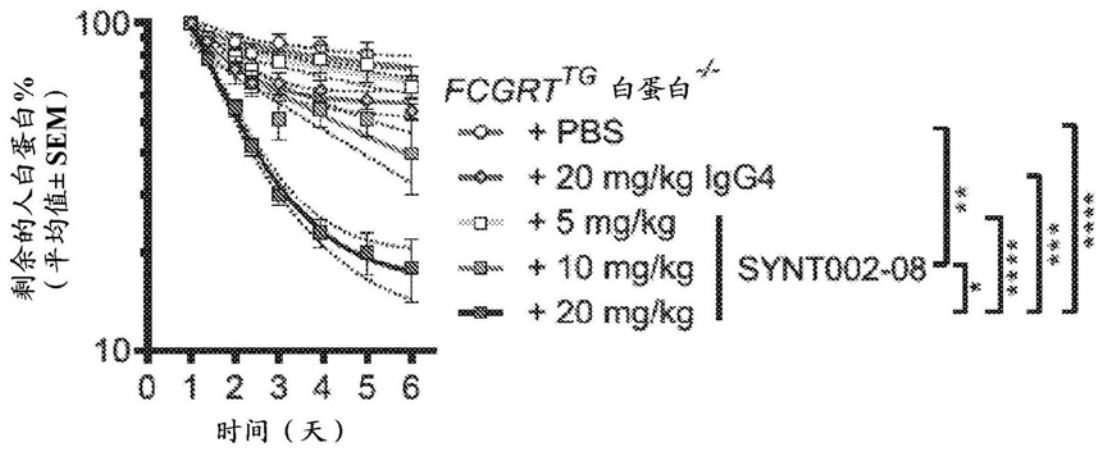


图8B

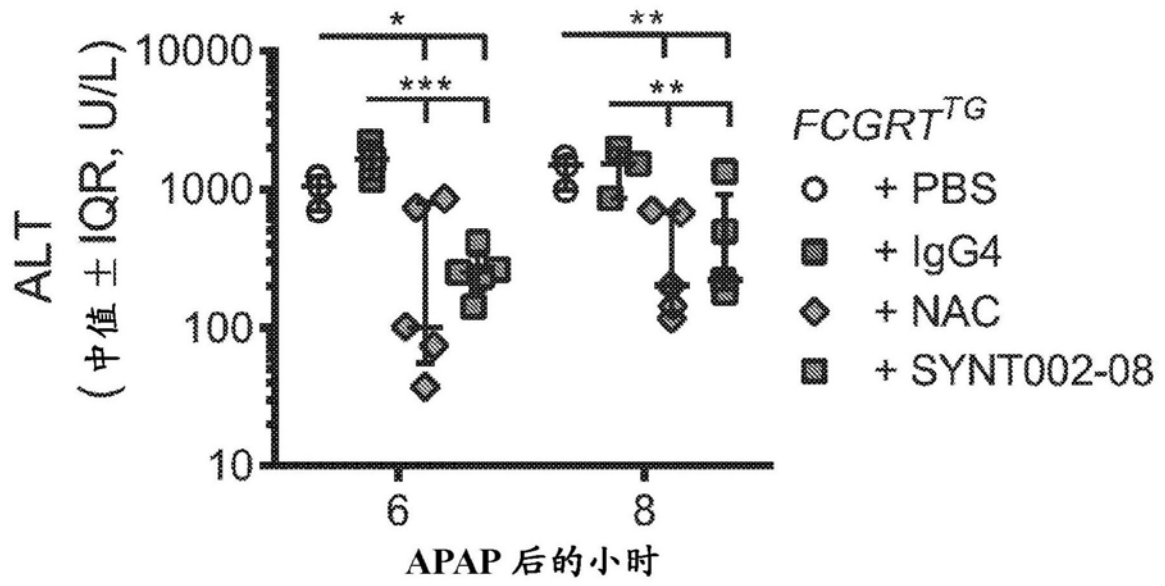


图9