201700499

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 201700499 A

(43)公開日： 中華民國 106 (2017) 年 01 月 01 日

(21)申請案號：105129449 (22)申請日： 中華民國 100 (2011) 年 03 月 28 日

(51)Int. Cl.： *C07K16/28 (2006.01)* *C07K16/46 (2006.01)*
A61K39/395 (2006.01)

(30)優先權：2010/03/30 日本 2010-079667
2010/11/09 日本 2010-250830

(71)申請人：中外製藥股份有限公司 (日本) CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA (JP)
日本

(72)發明人：井川智之 IGAWA, TOMOYUKI (JP) ；石井慎也 ISHII, SHINYA (JP) ；前田敦彥 MAEDA, ATSUHIKO (JP) ；中井貴士 NAKAI, TAKASHI (JP)

(74)代理人：洪澄文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：51 項 圖式數：35 共 346 頁

(54)名稱

促進抗原消失之具有經修飾的ＦｃＲｎ親和力之抗體

ANTIBODIES WITH MODIFIED AFFINITY TO FCRN THAT PROMOTE ANTIGEN CLEARANCE

(57)摘要

本發明之目的為提供利用抗原-結合分子促使抗原攝入細胞的方法，促使血漿抗原濃度減少的方法，增加單一抗原-結合分子可結合抗原的數目的方法，改善抗原-結合分子藥物動力特性的方法，促使抗原攝入至細胞中的抗原-結合分子，促使血漿抗原濃度減少的抗原-結合分子，可重覆結合至抗原的抗原-結合分子，藥物動力特性經改善之抗原-結合分子，含有此抗原-結合分子的藥學組成物，以及產生上述抗原-結合分子的方法。

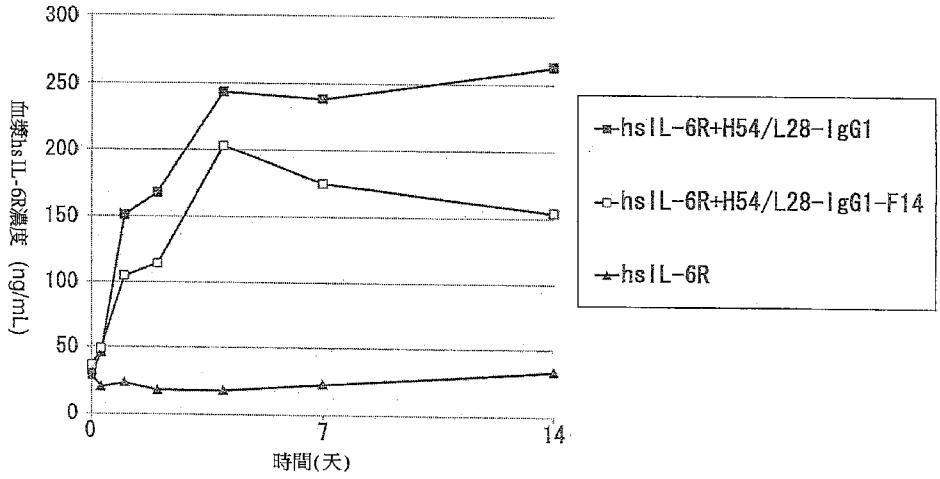
本發明人發現，藉由具有在血漿 pH 有人類 FcRn-結合活性及在早期核內體 pH 的抗原-結合活性低於在血漿 pH 之抗體，可促使抗原攝入細胞中；此抗體可增加單一抗體分子可結合的抗原數目；藉由給予此抗原可促進血漿中抗原濃度的下降；以及利用此抗體可改善抗體藥物動力的特性。

An objective of the present invention is to provide methods for facilitating antigen-binding molecule-mediated antigen uptake into cells, methods for facilitating the reduction of antigen concentration in plasma, methods for increasing the number of antigens to which a single antigen-binding molecule can bind, methods for improving pharmacokinetics of antigen-binding molecules, antigen-binding molecules improved for facilitated antigen uptake into cells, antigen-binding molecules capable of facilitating the reduction of antigen concentration in plasma, antigen-binding molecules capable of repeatedly binding to antigens, antigen-binding molecules with improved pharmacokinetics, pharmaceutical compositions comprising such an antigen-binding molecule, and methods for producing those described above.

The present inventors discovered that antigen uptake into cells is facilitated by an antibody having human FcRn-binding activity at the plasma pH and a lower antigen-binding activity at the early endosomal pH than at the plasma pH; such antibodies can increase the number of antigens to which a single antibody molecule can bind; the reduction of antigen in plasma can be facilitated by administering such an antibody; and antibody pharmacokinetics can be improved by using such antibodies.

TW 201700499 A

指定代表圖：



第1圖

201700499

發明摘要

※ 申請案號：105129449

※ 申請日：100/03/28　　※IPC 分類：C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

【發明名稱】（中文/英文）

促進抗原消失之具有經修飾的 FcRn 親和力之抗體/

ANTIBODIES WITH MODIFIED AFFINITY TO FcRn THAT PROMOTE ANTIGEN CLEARANCE

【中文】

本發明之目的為提供利用抗原-結合分子促使抗原攝入細胞的方法，促使血漿抗原濃度減少的方法，增加單一抗原-結合分子可結合抗原的數目的方法，改善抗原-結合分子藥物動力特性的方法，促使抗原攝入至細胞中的抗原-結合分子，促使血漿抗原濃度減少的抗原-結合分子，可重覆結合至抗原的抗原-結合分子，藥物動力特性經改善之抗原-結合分子，含有此抗原-結合分子的藥學組成物，以及產生上述抗原-結合分子的方法。

本發明人發現，藉由具有在血漿 pH 有人類 FcRn-結合活性及在早期核內體 pH 的抗原-結合活性低於在血漿 pH 之抗體，可促使抗原攝入細胞中；此抗體可增加單一抗體分子可結合的抗原數目；藉由給予此抗原可促進血漿中抗原濃度的下降；以及利用此抗體可改善抗體藥物動力的特性。

【英文】

An objective of the present invention is to provide methods for facilitating antigen-binding molecule-mediated antigen uptake into cells, methods for facilitating the reduction of antigen concentration in plasma, methods for increasing the number of antigens to which a single antigen-binding molecule can bind, methods for improving pharmacokinetics of antigen-binding molecules, antigen-binding molecules improved for facilitated antigen uptake into cells, antigen-binding molecules capable of facilitating the reduction of antigen concentration in plasma, antigen-binding molecules capable of repeatedly binding to antigens, antigen-binding molecules with improved pharmacokinetics, pharmaceutical compositions comprising such an antigen-binding molecule, and methods for producing those described above.

The present inventors discovered that antigen uptake into cells is facilitated by an antibody having human FcRn-binding activity at the plasma pH and a lower antigen-binding activity at the early endosomal pH than at the plasma pH; such antibodies can increase the number of antigens to which a single antibody molecule can bind; the reduction of antigen in plasma can be facilitated by administering such an antibody; and antibody pharmacokinetics can be improved by using such antibodies.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（1）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：無。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無。

發明專利說明書

（本說明書格式、順序，請勿任意更動）

【發明名稱】（中文/英文）

促進抗原消失之具有經修飾的 FcRn 親和力之抗體/ ANTIBODIES WITH MODIFIED AFFINITY TO FcRn THAT PROMOTE ANTIGEN CLEARANCE

【技術領域】

【0001】本發明係關於：

促使以抗原-結合分子媒介的抗原攝入至細胞的方法；

增加單一抗原結合分子可結合的抗原量；

藉由給予抗原結合分子促使血漿抗原濃度減少的方法；

改善抗原結合分子之藥物動力特性的方法；

減少血漿中總抗原濃度或游離抗原濃度的方法；

促使抗原攝入至細胞中的抗原結合分子；

具有抗原結合數增加的抗原結合分子；

藉由給予該分子可促使血漿抗原濃度降低的抗原結合分子；

藥物動力特性經改善之抗原結合分子；

包括該抗原結合分子的醫藥組成物；

製備上述分子的方法；及其類似。

【先前技術】

【0002】抗體在血漿中非常穩定且副作用少，因此被視為藥物。目前，市面上已有一些 IgG 抗體藥物，還有許多正在研發中的抗體藥物(非專利文獻 1 及 2)。同時，已有許多文獻揭

露各種應用於第二代抗體藥物的技術，包括增加作用功能、抗原結合活性、藥物動力、以及穩定性，並且可降低免疫原性的風險(非專利文獻 3)。一般來說，抗體藥物的所需劑量非常高。其導致一些問題的產生，例如，高生產成本以及難以製備皮下注射配方。理論上，可藉由促進抗體動力特性或抗體和抗原之間親和力來減少抗體藥物的劑量。

【0003】已有文獻記載利用人造置換恆定區的胺基酸以增進抗體藥物動力的方法(非專利文獻 4 及 5)。類似地，已有記載可使用親和力成熟技術來促進抗原結合活性或抗原中和能力(非專利文獻 6)。此技術可藉由突變可變區等之 CDR 區的胺基酸以促進抗原結合活性。抗原結合活性的增加可促進體外(in vitro)的生物活性或降低劑量，以及促進在體內(in vivo)的效力(非專利文獻 7)。

【0004】單一抗體分子的抗原中和活性取決於其親和力。藉由增加親和力，抗原可被少量的抗體所中和。有許多方法可用於促進抗體親和力(非專利文獻 6)。再者又若可藉由共價鍵結合抗體及抗原使親和力變大，則單一抗體分子可中和一個抗原分子(二價抗體可中和二個抗原分子)。然而，一個抗體對一個抗原的化學計量中和(stoichiometric neutralization)(二價抗體針對二個抗原)為傳統方法的限制，也因此不可能以較少量的抗體完全中和抗原。換句話說，親和力的增加是有限度的(非專利文獻 9)。為延長中和抗體之中和效果相當期間，在此同時必須給予一劑量高於體內抗原含量的抗體。僅在上述抗體藥物動力特性或親和力成熟技術的改善，因此在減少抗體所需劑量

上有所限制。因此，在一特定期間為了維持抗體在少於抗原含量下的抗原中和活性，單一抗體必須中和複數個抗原。已有文獻記載在 pH 依賴法(pH-dependent manner)中以一抗體結合一個抗原，為一新穎方法(專利文獻 1)。在血漿中，pH-依賴性抗原-結合抗體在中性環境下可穩定地與一抗原結合，且在核內體(endosome)中的酸性環境下會與抗原分離。當一 pH-依賴性抗原-結合抗體與抗原分離後，可經 FcRn 再循環至血漿。因此，一 pH-依賴性抗原-結合抗體可重複與複數個抗原結合。

【0005】而且，與經由 FcRn 結合再循環之抗體相比，抗體的血漿滯留非常短。當具有此血漿滯留時間之抗體與抗原結合時，此抗原-抗體複合物的血漿滯留時間會與此抗體相同。因此，抗原的血漿滯留會因與抗體結合而延長，且因此血漿的抗原濃度增加。

【0006】因 FcRn 結合的結果，IgG 抗體具有較長的血漿滯留時間。IgG 與 FcRn 的結合只發生於酸性環境(pH 6.0)下。相較之下，此結合幾乎不被發現於中性環境下(pH 7.4)。IgG 抗體可以非特定方法攝入細胞中。抗體藉由在酸性環境下與核內體 FcRn 結合而回到細胞表面，接著在血漿的中性環境下與 FcRn 分離。當對 IgG Fc 區域進行突變使 FcRn 結合活性在酸性環境下失活時，抗體失去由核內體至血漿的再循環，因此明顯降低血漿中的抗體滯留。有文獻記載利用增加酸性環境下的 FcRn 結合活性來促進 IgG 抗體的血漿滯留。藉由突變 IgG 抗體 Fc 區的胺基酸以增加酸性環境下的 FcRn 結合活性。此方法增加由核內體至血漿的再循環效率，進而改善血漿滯留。在胺

基酸置換中有一重要的需求為，不增加中性環境下的 FcRn 結合活性。若 IgG 抗體在中性環境下與 FcRn 結合，則此抗體在藉由酸性環境下與 FcRn 結合返回細胞表面時，無法在中性環境下與 FcRn 分離。在此情況下，由於 IgG 抗體不會再循環至血漿，因此血漿滯留會稍微降低。例如，如 J Immunol. (2002) 169(9): 5171-80 所示，藉由胺基酸置換修飾 IgG1 抗體，使此抗體可以在中性環境下與小鼠 FcRn 結合，在給予至小鼠後發現此抗體的血漿滯留非常低。再者，如 J Immunol. (2009) 182(12): 7663-71；J Biol Chem. 2007 Jan. 19; 282(3): 1709-17；以及 J Immunol. 2002 Nov. 1; 169(9): 5171-80 所示，IgG1 抗體經胺基酸突變修飾後，此抗體在酸性環境下(pH 6.0)具有較強的人類 FcRn 結合，且同時中性環境(pH 7.4)下可與人類 FcRn 結合。在給予至食蟹猴後，並不會改善或改變此抗體的血漿滯留。因此，改善抗體功能的抗體工程技術僅集中在加強於酸性環境下的人類 FcRn 結合，而非中性環境(pH 7.4)。至今，尚未有文獻揭露利用 IgG 抗體 Fc 區的胺基酸置換來加強於中性環境(pH 7.4)下的人類 FcRn 結合。即使增加抗體的抗原親和力，仍無法促使抗原由血漿中移除。相較於典型的抗體，上述 pH-依賴性抗原結合抗體為更有效之促進抗原由血漿中移除的方法(專利文獻 1)。

【0007】相較於典型的抗體，pH-依賴性抗原結合抗體可與複數個抗原結合，並容易將抗原由血漿中移除。因此，pH-依賴性抗原結合抗體具有典型的抗體所無法達成的功效。然而，目前仍未有抗體工程技術進一步改進 pH-依賴性抗原結合抗體

的特性以重複與抗原結合，並促使抗原由血漿中移除。

【0008】與本發明相關的先前技術文獻如下所示：

先前技術文獻

[專利文獻]

[專利文獻 1] WO 2009/125825, ANTIGEN-BINDING MOLECULE CAPABLE OF BINDING TO TWO OR MORE ANTIGEN MOLECULES REPEATEDLY。

[非專利文獻]

[非專利文獻 1] Monoclonal antibody successes in the clinic, Janice M Reichert, Clark J Rosensweig, Laura B Faden & Matthew C Dewitz, Nature Biotechnology 23, 1073 - 1078 (2005)。

[非專利文獻 2] Pavlou AK, Belsey MJ., The therapeutic antibodies market to 2008., Eur J Pharm Biopharm. 2005 Apr; 59(3): 389-96。

[非專利文獻 3] Kim SJ, Park Y, Hong HJ., Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies., Mol Cells. 2005 Aug 31; 20(1): 17-29. Review。

[非專利文獻 4] Hinton PR, Xiong JM, Johlfs MG, Tang MT, Keller S, Tsurushita N., An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life., J Immunol. 2006 Jan 1; 176(1): 346-56。

[非專利文獻 5] Ghetie V, Popov S, Borvak J, Radu C, Matesoi D, Medesan C, Ober RJ, Ward ES., Increasing the serum

persistence of an IgG fragment by random mutagenesis., Nat Biotechnol. 1997 Jul; 15(7): 637-40。

[非專利文獻 6] Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jun 14; 102(24): 8466-71. Epub 2005 Jun 6. A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries. Rajpal A, Beyaz N, Haber L, Cappuccilli G, Yee H, Bhatt RR, Takeuchi T, Lerner RA, Crea R。

[非專利文獻 7] Wu H, Pfarr DS, Johnson S, Brewah YA, Woods RM, Patel NK, White WI, Young JF, Kiener PA. Development of Motavizumab, an Ultra-potent Antibody for the Prevention of Respiratory Syncytial Virus Infection in the Upper and Lower Respiratory Tract. J Mol Biol. (2007) 368: 652-665。

[非專利文獻 8] Hanson CV, Nishiyama Y, Paul S. Catalytic antibodies and their applications. Curr Opin Biotechnol. 2005 Dec; 16(6): 631-6。

[非專利文獻 9] Rathanaswami P, Roalstad S, Roskos L, Su QJ, Lackie S, Babcook J. Demonstration of an in vivo generated sub-picomolar affinity fully human monoclonal antibody to interleukin-8. Biochem Biophys Res Commun. 2005 Sep 9; 334(4): 1004-13。

【發明內容】

【0009】本發明係依上述內容所完成。本發明之目標為提

供藉由使用抗原-結合分子促使抗原攝入至細胞的方法，增加單一抗原-結合分子可結合的抗原量的方法，藉由給予抗原-結合分子促使血漿中抗原濃度減少的方法，改善抗原-結合分子藥物動力特性的方法，促使抗原攝入至細胞中的抗原-結合分子，具有抗原結合數目增加的抗原-結合分子，藉由給予此分子可促使血漿抗原濃度減少的抗原-結合分子，具有改善的藥物動力特性的抗原-結合分子；包含抗原-結合分子的醫藥組成物；以及製備上述分子的方法。

【0010】本發明人致力研究藉由抗原-結合分子(分子，例如，多胜肽，其具有抗原結合活性)促使抗原攝入至細胞的方法，使抗原-結合分子重複結合抗原的方法，藉由給予抗原-結合分子促使血漿中抗原濃度減少的方法，以及改善抗原-結合分子之血漿滯留的方法。因此，本發明人發現抗原-結合分子在早期核內體 pH 下具有人類 FcRn-結合活性，且在血漿 pH 下具有比完整人類 IgG 免疫球蛋白高的人類 FcRn-結合活性，可促使抗原攝入至細胞中。本發明人亦發現藉由抗原-結合分子可進一步促進抗原被攝入細胞中，以及利用具有在早期核內體 pH 比在血漿 pH 弱的抗原-結合活性的抗原-結合分子可增加單一抗原-結合分子可結合的抗原數；藉由給予此抗原-結合分子可促進血漿抗原濃度的降低；且可改善抗原-結合分子的藥物動力特性。

【0011】本發明特別有關於有關於：

促使以抗原-結合分子媒介的抗原攝入至細胞的方法；

增加單一抗原-結合分子可結合的抗原數的方法；

藉由給予抗原-結合分子促使血漿抗原濃度減少的方法；

改善抗原-結合分子之藥物動力特性的方法；

減少血漿中總抗原濃度或游離抗原濃度的方法；

促使抗原攝入至細胞中的抗原結合分子；

具有抗原結合數量增加的抗原結合分子；

藉由給予此分子可促使血漿抗原濃度減少的抗原結合分子；

具有改善的藥物動力特性的抗原結合分子；

包括抗原結合分子的醫藥組成物；

製備上述分子的方法；及其類似。

本發明更特別提供：

[1]一種抗原-結合分子，包括一抗原-結合區與一人類FcRn-結合區，其在酸性與中性pH範圍下具有人類FcRn-結合活性，其中，中性pH範圍下的人類FcRn-結合活性大於3.2微莫耳；

[2]一種抗原-結合分子，包括一抗原-結合區與一人類FcRn-結合區，其在中性pH範圍下具有人類FcRn-結合活性，其中，在中性pH範圍下的人類FcRn-結合活性為完整人類IgG的28倍；

[3]一種抗原-結合分子，包括一抗原-結合區與一人類FcRn-結合區，其在中性pH範圍下具有一人類FcRn-結合活性，其中，在中性pH範圍下的人類FcRn-結合活性大於2.3微莫耳；

[4]一種抗原-結合分子，包括一抗原-結合區與一人類

FcRn-結合區，其在中性 pH 範圍下具有一人類 FcRn-結合活性，其中，在中性 pH 範圍下的人類 FcRn-結合活性為完整人類 IgG 的 38 倍；

[5]如[1]至[4]任一項之抗原-結合分子，其中該中性 pH 範圍為 pH 7.0 至 8.0；

[6]一種抗原-結合分子，包括一抗原-結合區與一人類 FcRn-結合區，在給予此抗原-結合分子至非人類動物後的血漿總抗原濃度低於給予一參考抗原-結合分子(reference antigen-binding molecule)至非人類動物後的血漿總抗原濃度，此非人類動物包括與此抗原-結合區及完整人類 IgG Fc 區相同的人類 FcRn-結合區；

[7]一種抗原-結合分子，在給予此抗原-結合分子至非人類動物後的血漿抗原濃度低於未給予此抗原-結合分子至非人類動物的血漿總抗原濃度；

[8]一種抗原-結合分子，包括一抗原-結合區與一人類 FcRn-結合區，其中此抗原-結合分子的抗原/抗原-結合分子莫耳比值(C):

C = A/B，

低於一包括與人類 FcRn-結合區相同之抗原-結合區及完整人類 IgG Fc 區的一莫耳抗原/抗原-結合分子比值(C')：

C'=A'/B'，

其中；

A 為在給予該抗原-結合分子至非人類動物後血漿中的總抗原濃度，

B 為在給予該抗原-結合分子至非人類動物後的抗原-結合分子之血漿濃度，

A'為在給予一參考抗原-結合分子(reference antigen-binding molecule)至非人類動物後的血漿中總抗原濃度，

B' 為在給予一參考抗原-結合分子至非人類動物後的抗原-結合分子之血漿濃度；

[9]如[6]至[8]任一項之抗原-結合分子，其中該非人類動物為人類 FcRn 轉殖小鼠；

[10]如[6]至[9]任一項之抗原-結合分子，其中該血漿中的抗原濃度為血漿中長期的總抗原濃度；

[11]如[6]至[9]任一項之抗原-結合分子，其中該血漿中的抗原濃度為血漿中短期的總抗原濃度；

[12]一種抗原-結合分子，包括一抗原-結合區與一人類 FcRn-結合區，該抗原-結合分子在酸性及中性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性，其中該人類 FcRn-結合活性在中性 pH 範圍下大於完整人類 IgG 的人類 FcRn-結合活性；

[13]如[1]至[11]任一項之抗原-結合分子，其中該抗原-結合區在酸性 pH 範圍下的抗原-結合活性小於在中性 pH 範圍下的抗原-結合活性；

[14]如[12]至[13]任一項之抗原-結合分子，其中該抗原-結合活性在酸性 pH 範圍及中性 pH 範圍下的 KD (酸性 pH 範圍下)/KD (中性 pH 範圍下)比值至少為 2；

[15]如[12]至[14]任一項之抗原-結合分子，其包括抗原-結合區之一胺基酸突變，該胺基酸突變包括該抗原-結合區之

至少一個胺基酸以組胺酸置換或插入至少一個組胺酸；

[16]如[12]至[14]任一項之抗原-結合分子，其中此抗原-結合區獲得自抗原-結合區資料庫；

[17]如[1]至[16]任一項之抗原-結合分子，其包括在親代IgG(parent IgG) 之 Fc 區的至少一個胺基酸以不同胺基酸置換所得的 Fc 區作為該人類 FcRn-結合區；

[18]如[1]至[17]任一項之抗原-結合分子，其中此人類FcRn-結合區為包含選自於親代 IgG 之 Fc 區中(EU 編號)第237、238、239、248、250、252、254、255、256、257、258、265、270、286、289、297、298、303、305, 307、308、309、311、312、314、315、317、325、332、334、360、376、380、382、384、385、386、387、389、424、428、433、434 及 436 (EU 編號)位置之至少一個胺基酸以不同的胺基酸置換之人類FcRn-結合區；

[19]如[1]至[18]任一項之抗原-結合分子，包括在親代 IgG 之 Fc 區包含胺基酸置換的人類 FcRn-結合區，該親代 IgG 之 Fc 區包括擇自下列之至少一個胺基酸置換：

第 237 位置的胺基酸由 Gly 置換為 Met；

第 238 位置的胺基酸由 Pro 置換為 Ala；

第 239 位置的胺基酸由 Ser 置換為 Lys；

第 248 位置的胺基酸由 Lys 置換為 Ile；

第 250 位置的胺基酸由 Thr 置換為 Ala、Phe、Ile、Met、Gln、Ser、Val、Trp、或 Tyr；

第 252 位置的胺基酸由 Met 置換為 Phe、Trp、或 Tyr；

第 254 位置的胺基酸由 Ser 置換為 Thr；

第 255 位置的胺基酸由 Arg 置換為 Glu；

第 256 位置的胺基酸由 Thr 置換為 Asp、Glu、或 Gln；

第 257 位置的胺基酸由 Pro 置換為 Ala、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr 或 Val；

第 258 位置的胺基酸由 Glu 置換為 His；

第 265 位置的胺基酸由 Asp 置換為 Ala；

第 270 位置的胺基酸由 Asp 置換為 Phe；

第 286 位置的胺基酸由 Asn 置換為 Ala 或 Glu；

第 289 位置的胺基酸由 Thr 置換為 His；

第 297 位置的胺基酸由 Asn 置換為 Ala；

第 298 位置的胺基酸由 Ser 置換為 Gly；

第 303 位置的胺基酸由 Val 置換為 Ala；

第 305 位置的胺基酸由 Val 置換為 Ala；

第 307 位置的胺基酸由 Thr 置換為 Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、Trp、或 Tyr；

第 308 位置的胺基酸由 Val 置換為 Ala、Phe、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、或 Thr；

第 309 位置的胺基酸由 Leu 或 Val 置換為 Ala、Asp、Glu、Pro、或 Arg；

第 311 位置的胺基酸由 Gln 置換為 Ala、His 或 Ile；

第 312 位置的胺基酸由 Asp 置換為 Ala 或 His；

第 314 位置的胺基酸由 Leu 置換為 Lys 或 Arg；

第 315 位置的胺基酸由 Asn 置換為 Ala 或 His；

第 317 位置的胺基酸由 Lys 置換為 Ala；

第 325 位置的胺基酸由 Asn 置換為 Gly；

第 332 位置的胺基酸由 Ile 置換為 Val；

第 334 位置的胺基酸由 Lys 置換為 Leu；

第 360 位置的胺基酸由 Lys 置換為 His；

第 376 位置的胺基酸由 Asp 置換為 Ala；

第 380 位置的胺基酸由 Glu 置換為 Ala；

第 382 位置的胺基酸由 Glu 置換為 Ala；

第 384 位置的胺基酸由 Asn 或 Ser 置換為 Ala；

第 385 位置的胺基酸由 Gly 置換為 Asp 或 His；

第 386 位置的胺基酸由 Gln 置換為 Pro；

第 387 位置的胺基酸由 Pro 置換為 Glu；

第 389 位置的胺基酸由 Asn 置換為 Ala 或 Ser；

第 424 位置的胺基酸由 Ser 置換為 Ala；

第 428 位置的胺基酸由 Met 置換為 Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、Trp、或 Tyr；

第 433 位置的胺基酸由 His 置換為 Lys；

第 434 位置的胺基酸由 Asn 置換為 Ala、Phe、His、Ser、Trp、或 Tyr；

以及第 436 位置的胺基酸由 Tyr 置換為 His 或 Phe(EU 編號)；

[20]如[1]至[18]任一項之抗原-結合分子，該人類 FcRn-結

合區包括選自下列至少一個胺基酸：

於親代 IgG 的 Fc 區(EU 編號)的

第 237 位置的胺基酸為 Met；

第 238 位置的胺基酸為 Ala；

第 239 位置的胺基酸為 Lys；

第 248 位置的胺基酸為 Ile；

第 250 位置的胺基酸為 Ala、Phe、Ile、Met、Gln、Ser、Val、Trp、或 Tyr；

第 252 位置的胺基酸為 Phe、Trp、或 Tyr；

第 254 位置的胺基酸為 Thr；

第 255 位置的胺基酸為 Glu；

第 256 位置的胺基酸為 Asp、Glu、或 Gln；

第 257 位置的胺基酸為 Ala、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr、或 Val；

第 258 位置的胺基酸為 His；

第 265 位置的胺基酸為 Ala；

第 270 位置的胺基酸為 Phe；

第 286 位置的胺基酸為 Ala 或 Glu；

第 289 位置的胺基酸為 His；

第 297 位置的胺基酸為 Ala；

第 298 位置的胺基酸為 Gly；

第 303 位置的胺基酸為 Ala；

第 305 位置的胺基酸為 Ala；

第 307 位置的胺基酸為 Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、

Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、Trp、或 Tyr；

第 308 位置的胺基酸為 Ala、Phe、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、或 Thr；

第 309 位置的胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Pro、或 Arg；

第 311 位置的胺基酸為 Ala、His、或 Ile；

第 312 位置的胺基酸為 Ala 或 His；

第 314 位置的胺基酸為 Lys 或 Arg；

第 315 位置的胺基酸為 Ala 或 His；

第 317 位置的胺基酸為 Ala；

第 325 位置的胺基酸為 Gly；

第 332 位置的胺基酸為 Val；

第 334 位置的胺基酸為 Leu；

第 360 位置的胺基酸為 His；

第 376 位置的胺基酸為 Ala；

第 380 位置的胺基酸為 Ala；

第 382 位置的胺基酸為 Ala；

第 384 位置的胺基酸為 Ala；

第 385 位置的胺基酸為 Asp 或 His；

第 386 位置的胺基酸為 Pro；

第 387 位置的胺基酸為 Glu；

第 389 位置的胺基酸為 Ala 或 Ser；

第 424 位置的胺基酸為 Ala；

第 428 位置的胺基酸為 Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、

Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、Trp、或 Tyr；

第 433 位置的胺基酸為 Lys；

第 434 位置的胺基酸為 Ala、Phe、His、Ser、Trp、或 Tyr；

以及第 436 位置的胺基酸為 His 或 Phe；

[21]如[18]至[20]任一項之抗原-結合分子，其中該親代 IgG 擇自於一非人類動物之 IgG；

[22]如[18]至[20]任一項之抗原-結合分子，其中該親代 IgG 為一人類 IgG；

[23]如[1]至[22]任一項之抗原-結合分子，其具有一拮抗能力；

[24]如[1]至[23]任一項之抗原-結合分子，其結合至一膜抗原或可溶性抗原；

[25]如[1]至[24]任一項之抗原-結合分子，其中此抗原-結合區包括一結合至受體的人造配體；

[26]如[1]至[24]任一項之抗原-結合分子，其中此抗原-結合區包括一結合至配體的人造受體；

[27]如[1]至[24]任一項之抗原-結合分子，其為一抗體；

[28]如[27]之抗原-結合分子，其中此抗體擇自於嵌合抗體、人源化抗體、或人類抗體；

[29]一種醫藥組成物，包括[1]至[28]任一項之抗原-結合分子；

[30]一種促使以抗原-結合分子媒介的抗原攝入至細胞的方法，係藉由增加在中性 pH 範圍下該抗原-結合分子之人類 FcRn-結合活性，其中該抗原-結合分子包括一抗原-結合區與一

人類 FcRn-結合區，且在酸性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性；

[31]一種促使抗原-結合分子媒介的抗原攝入至細胞的方法，係藉由增加在中性 pH 範圍下該抗原-結合分子之人類 FcRn-結合活性，及降低該抗原-結合分子在酸性 pH 範圍下之抗原-結合活性至小於在中性 pH 範圍下之抗原-結合活性，其中該抗原-結合分子包括一抗原-結合區與一人類 FcRn-結合區，且在酸性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性；

[32]一種增加單一抗原-結合分子結合的抗原量之方法，係藉由增加在中性 pH 範圍下該抗原-結合分子之人類 FcRn-結合活性，其中該抗原-結合分子包括一抗原-結合區與一人類 FcRn-結合區，且在酸性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性；

[33]一種增加單一抗原-結合分子結合的抗原量之方法，係藉由增加在中性 pH 範圍下該抗原-結合分子之人類 FcRn-結合活性，且降低在酸性 pH 範圍下之該抗原-結合活性至小於在中性 pH 範圍下之抗原-結合活性，其中該抗原-結合分子包括一抗原-結合區與一人類 FcRn-結合區，且在酸性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性；

[34]一種增進抗原-結合分子移除血漿中抗原能力的方法，係藉由增加在中性 pH 範圍下該抗原-結合分子之人類 FcRn-結合活性，其中該抗原-結合分子包括一抗原-結合區與一人類 FcRn-結合區，且在酸性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性；

[35]一種增進抗原-結合分子移除血漿中抗原能力的方

法，係藉由增加在中性 pH 範圍下該抗原-結合分子之人類 FcRn-結合活性，且降低在酸性 pH 範圍下該抗原-結合活性至小於在中性 pH 範圍下之抗原-結合活性，其中該抗原-結合分子包括一抗原-結合區與一人類 FcRn-結合區，且在酸性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性；

[36]一種改善抗原-結合分子之藥物動力特性的方法，係藉由增加在中性 pH 範圍下該抗原-結合分子之人類-結合活性，其中該抗原-結合分子包括一抗原-結合區與一人類 FcRn-結合區，且在酸性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性；

[37]一種改善抗原-結合分子之藥物動力特性的方法，係藉由增加在中性 pH 範圍下該抗原-結合分子之人類 FcRn-結合活性，且降低在酸性 pH 範圍下之該抗原-結合活性至小於在中性 pH 範圍下之抗原-結合活性，其中該抗原-結合分子包括一抗原-結合區與一人類 FcRn-結合區，且在酸性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性；

[38]一種促使結合於細胞外抗原-結合分子之抗原的細胞內游離的方法，係藉由增加在中性 pH 範圍下該抗原-結合分子之人類 FcRn-結合活性，及降低在酸性 pH 範圍下該抗原-結合活性至小於在中性 pH 範圍下之抗原-結合活性，其中該抗原-結合分子包括一抗原-結合區與一人類 FcRn-結合區，且在酸性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性；

[39]一種促使以抗原結合型式攝入細胞內的抗原-結合分子以無抗原型式胞外釋放的方法，係藉由增加在中性 pH 範圍下該抗原-結合分子之人類 FcRn-結合活性，及降低在酸性 pH

範圍下該抗原-結合活性至小於在中性 pH 範圍下之抗原-結合活性，其中該抗原-結合分子包括一抗原-結合區與一人類 FcRn-結合區，且其在酸性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性；

[40]一種減少血漿中總血漿抗原濃度或游離血漿抗原濃度的方法，係藉由增加在中性 pH 範圍下該抗原-結合分子之人類 FcRn-結合活性，其中該抗原-結合分子包括一抗原-結合區與一人類 FcRn-結合區，且在酸性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性；

[41]一種減少血漿中總血漿抗原濃度或游離血漿抗原濃度的方法，係藉由增加在中性 pH 範圍下該抗原-結合分子之人類 FcRn-結合活性，及降低在酸性 pH 範圍下該抗原-結合活性至小於在中性 pH 範圍下之抗原-結合活性，其中該抗原-結合分子包括一抗原-結合區與一人類 FcRn-結合區，且在酸性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性；

[42]如[30]至[41]任一項之方法，其中該酸性 pH 範圍為 pH 5.5 至 pH 6.5，且該中性 pH 範圍為 pH 7.0 至 pH 8.0；

[43]如[30]至[41]任一項之方法，其中該人類 FcRn-結合活性在中性 pH 範圍下的增加為藉由將人類 FcRn-結合區之親代 IgG Fc 區之至少一個胺基酸置換為不同的胺基酸；

[44]如[30]至[41]任一項之方法，其中該人類 FcRn-結合活性在中性 pH 範圍下的增加為藉由將人類 FcRn-結合區之親代 IgG Fc 區之擇自(EU 編號)第 237、238、239、248、250、252、254、255、256、257、258、265、270、286、289、297、298、303、305、307、308、309、311、312、314、315、317、325、

332、334、360、376、380、382、384、385、386、387、389、424、428、433、434、以及436位置之至少一個胺基酸置換為不同的胺基酸；

[45]如[31]、[33]、[35]、[37]至[39]、及[41]任一項之方法，其中藉由將該抗原-結合分子至少一個胺基酸置換為組胺酸或插入至少一個組胺酸，以降低該抗原-結合分子在酸性pH範圍下的抗原-結合活性至小於在中性pH範圍下的抗原-結合活性；

[46]如[31]、[33]、[35]、[37]至[39]、及[41]任一項之方法，其中此抗原-結合區獲得自抗原-結合區資料庫；

[47]如[31]、[33]、[35]、[37]至[39]、及[41]任一項之方法，其中該抗原-結合活性的下降，相對於組胺酸的置換或插入前，以抗原-結合活性在酸性pH範圍與在中性pH範圍下的比值，即KD(在酸性pH範圍)/KD(在中性pH範圍)值的增加來表示；

[48]一種抗原-結合分子的製造方法，其包括下列步驟：

(a)、篩選一抗原-結合分子，該抗原-結合分子在中性pH範圍下的人類FcRn-結合活性大於KD 3.2微莫耳，該抗原-結合分子獲得自改變該抗原-結合分子之人類FcRn-結合區的至少一個胺基酸；

(b) 獲得一編碼步驟(a)的抗原-結合分子的基因，該抗原-結合分子的人類FcRn-結合區與抗原-結合區連結；以及

(c) 利用步驟(b)所獲得的基因製備抗原-結合分子；

[49]一種抗原-結合分子的製造方法，其包括下列步驟：

(a) 篩選一抗原-結合分子，該抗原-結合分子在中性pH

範圍下的人類 FcRn-結合活性大於該抗原-結合分子的人類 FcRn-結合區至少一個胺基酸改變前在酸性 pH 範圍下的人類 FcRn-結合活性；

(b) 改變一抗原-結合分子之抗原-結合區的至少一個胺基酸，並篩選在中性 pH 範圍下的抗原-結合活性大於在酸性 pH 範圍下的抗原-結合活性之抗原-結合分子；

(c) 獲得一編碼步驟(a)及(b)所製備的抗原-結合分子的基因，該抗原-結合分子的人類 FcRn-結合區與抗原-結合區連結；以及

(d) 利用步驟(c)所獲得的基因製備抗原-結合分子；以及

[50]一種抗原-結合分子的製造方法，其包括下列步驟：

(a) 篩選一抗原-結合分子，該抗原-結合分子在中性 pH 範圍下的人類 FcRn-結合活性大於該抗原-結合分子的人類 FcRn-結合區至少一個胺基酸在改變前在酸性 pH 範圍下的人類 FcRn-結合活性；

(b) 篩選一抗原-結合分子，該抗原-結合分子在中性 pH 範圍下的抗原-結合活性在大於在酸性 pH 範圍下；

(c) 獲得一編碼步驟(a)及(b)中所製備的抗原-結合分子的基因，該抗原-結合分子的人類 FcRn-結合區與抗原-結合區連結；以及

(d) 利用步驟(c)所獲得的基因製備抗原-結合分子；

[51]一種抗原-結合分子，由[48]至[50]任一項所述之製造方法所製造；

[52]一種抗原-結合分子的篩選方法，包括下列步驟：

(a) 篩選一抗原-結合分子，該抗原-結合分子在中性 pH 範圍下的人類 FcRn-結合活性大於 KD 3.2 微莫耳，該抗原-結合分子獲得自改變該抗原-結合分子之人類 FcRn-結合區的至少一個胺基酸；

(b) 獲得一編碼步驟(a)的抗原-結合分子的基因，該抗原-結合分子的人類 FcRn-結合區與抗原-結合區連結；以及

(c) 利用步驟(b)所獲得的基因製備抗原-結合分子；

【0012】[53]一種抗原-結合分子的篩選方法，包括下列步驟：

(a) 篩選一抗原-結合分子，該抗原-結合分子在中性 pH 範圍下的人類 FcRn-結合活性大於該抗原-結合分子的人類 FcRn-結合區至少一個胺基酸改變前在酸性 pH 範圍下的人類 FcRn-結合活性；

(b) 改變一抗原-結合分子之抗原-結合區的至少一個胺基酸，並篩選在中性 pH 範圍下的抗原-結合活性大於在酸性 pH 範圍下的抗原-結合活性之抗原-結合分子；

(c) 獲得一編碼步驟(a)及(b)所製備的抗原-結合分子的基因，該抗原-結合分子的人類 FcRn-結合區與抗原-結合區連結；以及

(d) 利用步驟(c)所獲得的基因製備抗原-結合分子；

[54]一種抗原-結合分子的篩選方法，包括下列步驟：

(a) 篩選一抗原-結合分子，該抗原-結合分子在中性 pH 範圍下的人類 FcRn-結合活性大於該抗原-結合分子的人類 FcRn-結合區至少一個胺基酸在改變前在酸性 pH 範圍下的人

類 FcRn-結合活性；

(b) 篩選一抗原-結合分子，該抗原-結合分子在中性 pH 範圍下的抗原-結合活性在大於在酸性 pH 範圍下；

(c) 獲得一編碼步驟(a)及(b)中所製備的抗原-結合分子的基因，該抗原-結合分子的人類 FcRn-結合區與抗原-結合區連結；以及

(d) 利用步驟(c)所獲得的基因製備一原-結合分子；

[55]如[30]至[54]之任一項方法，其中此抗原-結合區包括一與受體結合的人造配體；

[56]如[30]至[54]之任一項方法，其中此抗原-結合區包括一與配體結合的人造受體；以及

[57]如[30]至[54]之任一項方法，其中此抗原-結合分子為抗體。

【圖式簡單說明】

【0013】

第 1 圖顯示在給予抗-人類 IL-6 受體抗體至人類 FcRn 轉殖小鼠(276 小鼠株)後，各時間點可溶性人類 IL-6 受體的血漿濃度，其中可溶性人類 IL-6 受體的血漿濃度維持恆定(穩定狀態輸注模式(steady-state infusion model))。

第 2 圖為 IgG 抗體分子與核內體中可溶性抗原分離之示意圖，其促進抗原的移除並產生與新一輪其他抗原的結合。

第 3 圖顯示人類 FcRn 轉殖小鼠中各時間點的血漿抗體濃度。

第 4 圖顯示人類 FcRn 轉殖小鼠中各時間點可溶性人類

IL-6 受體的血漿濃度。

第 5 圖顯示正常小鼠中各時間點的血漿抗體濃度。

第 6 圖顯示正常小鼠中各時間點可溶性人類 IL-6 受體的血漿濃度。

第 7 圖顯示正常小鼠中各時間點未結合之可溶性人類 IL-6 受體的血漿濃度。

第 8 圖顯示人類 FcRn 轉殖小鼠中各時間點可溶性人類 IL-6 受體的血漿濃度。

第 9 圖顯示在給予低劑量(0.01 mg/kg)或 1 mg/kg 的 Fv4-IgG1-F14 後，各時間點可溶性人類 IL-6 受體的血漿濃度。

第 10 圖顯示在給予低劑量(0.01 mg/kg)或 1 mg/kg 的 Fv4-IgG1-F14 後，各時間點的血漿抗體濃度。

第 11 圖顯示在給予抗-人類 IL-6 受體至正常小鼠後，各時間點可溶性人類 IL-6 受體的血漿濃度，其中可溶性人類 IL-6 受體的血漿濃度維持恆定。

第 12 圖顯示在共注射 hsIL-6R 與抗-人類 IL-6 受體抗體至人類轉殖小鼠(276 小鼠株)後，各時間點的血漿抗體濃度。

第 13 圖顯示在共注射 hsIL-6R 與抗-人類 IL-6 受體抗體至人類 FcRn 轉殖小鼠(276 小鼠株)後，各時間點可溶性人類 IL-6 受體的血漿濃度。

第 14 圖顯示在共注射 hsIL-6R 與抗-人類 IL-6 受體抗體至人類 FcRn 轉殖小鼠(276 小鼠株)後 1 天，Fc 變異體在 pH 7.0 下對人類 FcRn 的結合親和力與血漿 hsIL-6R 濃度之間的關係。

第 15 圖顯示在共注射 hsIL-6R 與抗-人類 IL-6 受體抗體至

人類 FcRn 轉殖小鼠(276 小鼠株)後 1 天，Fc 變異體在 pH 7.0 下對人類 FcRn 的結合親和力與血漿抗體濃度之間的關係。

第 16 圖顯示在共注射 hsIL-6R 與抗-人類 IL-6 受體抗體至人類 FcRn 轉殖小鼠(276 小鼠株)後，各時間點的抗原/抗體莫耳比(C 值)。

第 17 圖顯示在共注射 hsIL-6R 與抗-人類 IL-6 受體抗體至人類 FcRn 轉殖小鼠(276 小鼠株)後 1 天，Fc 變異體在 pH 7.0 下對人類 FcRn 的結合親和力與抗原/抗體莫耳比(C 值)之間的關係。

第 18 圖顯示在給予低劑量(0.01 or 0.2 mg/kg) 或 1 mg/kg 之 Fv4-IgG1-F14 至人類 FcRn 轉殖小鼠(276 小鼠株)後，各時間點的 hsIL-6R 血漿濃度，其中 hsIL-6R 的血漿濃度維持恆定(穩定狀態輸注模式)。

第 19 圖顯示在共注射 hsIL-6R 與抗-人類 IL-6 受體抗體至人類 FcRn 轉殖小鼠(276 與 32 小鼠株)後，人類 FcRn 轉殖小鼠株 276 與 32 中各時間點的血漿 hsIL-6R 濃度。

第 20 圖顯示在共注射 hsIL-6R 與抗-人類 IL-6 受體抗體至人類 FcRn 轉殖小鼠(276 與 32 小鼠株)後，人類 FcRn 轉殖小鼠株 276 與 32 中各時間點的血漿抗體濃度。

第 21 圖顯示在給予抗-人類 IL-6 受體抗體至人類 FcRn 轉殖小鼠(32 小鼠株)後，各時間點的 hsIL-6R 血漿濃度，其中 hsIL-6R 的血漿濃度維持恆定(穩定狀態輸注模式)。

第 22 圖顯示在給予抗-人類 IL-6 受體抗體至人類 FcRn 轉殖小鼠(32 小鼠株)後，各時間點的血漿抗體濃度，其中 hsIL-6R

的血漿濃度維持恆定(穩定狀態輸注模式)。

第 23 圖顯示在給予抗-人類 IL-6 受體抗體至人類 FcRn 轉殖小鼠(32 小鼠株)後，各時間點的抗原/抗體莫耳比(C 值)，其中 hsIL-6R 的血漿濃度維持恆定(穩定狀態輸注模式)。

第 24 圖顯示在給予抗-人類 IL-6 受體抗體至人類 FcRn 轉殖小鼠(32 小鼠株)後 1 天，Fc 變異體在 pH 7.0 下對人類 FcRn 的結合親和力與抗原/抗體莫耳比(C 值)之間的關係，其中 hsIL-6R 的血漿濃度維持恆定(穩定狀態輸注模式)。

第 25 圖顯示在給予具有 F11、F39、F48 與 F264 Fc 變異體之抗-人類 IL-6 受體抗體至人類 FcRn 轉殖小鼠(32 小鼠株)後，各時間點的血漿抗體濃度，其中 hsIL-6R 的血漿濃度維持恆定(穩定狀態輸注模式)。

第 26 圖顯示在給予具有 F11、F39、F48 與 F264 Fc 變異體之抗-人類 IL-6 受體抗體至人類 FcRn 轉殖小鼠(32 小鼠株)後，各時間點的 hsIL-6R 血漿濃度，其中 hsIL-6R 的血漿濃度維持恆定(穩定狀態輸注模式)。

第 27 圖顯示在給予具有 F157、F196 與 F262 Fc 變異體之抗-人類 IL-6 受體抗體至人類 FcRn 轉殖小鼠(32 小鼠株)後，各時間點的血漿抗體濃度，其中 hsIL-6R 的血漿濃度維持恆定(穩定狀態輸注模式)。

第 28 圖顯示在給予具有 F157、F196 與 F262 Fc 變異體之抗-人類 IL-6 受體抗體至人類 FcRn 轉殖小鼠(32 小鼠株)後，各時間點的 hsIL-6R 血漿濃度，其中 hsIL-6R 的血漿濃度維持恆定(穩定狀態輸注模式)。

第 29 圖顯示用於傳統抗體與抗原移除抗體之矽試驗的藥物動力模式。

第 30 圖顯示在共注射人類 IL-6 及抗-人類 IL-6 抗體至正常小鼠後，各時間點的人類 IL-6 血漿濃度。

第 31 圖顯示在共注射人類 IL-6 及抗-人類 IL-6 抗體至正常小鼠後，各時間點的抗體血漿濃度。

第 32 圖顯示在 pH 7.4 與 pH 6.0 下以 Biacore 獲得之結合至 CD89-Fc 融合蛋白之人類 IgA 的感應譜(sensorgram)。

第 33 圖顯示在共注射人類 IgA 與 CD89-Fc 融合蛋白至正常小鼠後，各時間點的人類 IgA 血漿濃度。

第 34 圖顯示在共注射人類 IgA 與 CD89-Fc 融合蛋白至正常小鼠後，各時間點的抗體血漿濃度。

第 35 圖顯示在共注射可溶性人類 plexin A1 與抗-人類 plexi A1 抗體至正常小鼠後 7 小時，可溶性人類 plexin A1 的血漿濃度。

【實施方式】

【0014】本發明提供促使以抗原-結合分子媒介的抗原攝入至細胞的方法。更特別是，本發明提供，基於增加在中性 pH 範圍下抗原-結合分子的人類 FcRn-結合活性，藉由在酸性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性的抗原-結合分子而促使抗原攝入至細胞的方法。本發明亦提供，基於改變抗原-結合分子之人類 FcRn-結合區中的至少一個胺基酸，藉由在酸性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性之抗原-結合分子而促使抗原攝入至細胞的方法。

【0015】本發明亦提供藉由在酸性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性之抗原-結合分子以促使抗原攝入至細胞的方法，基於利用一人類 FcRn-結合區，該人類 FcRn-結合區包含選自於親代 IgG 之 Fc 區中(EU 編號)第 237、238、239、248、250、252、254、255、256、257、258、265、270、286、289、297、298、303、305、307、308、309、311、312、314、315、317、325、332、334、360、376、380、382、384、385、386、387、389、424、428、433、434、以及 436 位置之至少一個胺基酸以不同的胺基酸置換之人類 FcRn-結合區。

【0016】本發明亦提供促使以抗原-結合分子媒介的抗原攝入至細胞的方法，藉由降低在酸性 pH 範圍下上述抗原-結合分子之抗原-結合活性(結合能力)小於其在中性 pH 範圍下之抗原-結合活性；此加速抗原被攝入至細胞中。本發明亦提供促使以抗原-結合分子媒介的抗原攝入至細胞的方法，基於改變上述促使抗原攝入細胞中之抗原-結合分子的抗原-結合區之至少一個胺基酸。本發明亦提供促使抗原-結合分子媒介的抗原攝入至細胞的方法，基於將上述促使抗原攝入細胞中之抗原-結合分子的抗原-結合區之至少一個胺基酸置換為組胺酸或插入一組胺酸。

【0017】本發明中所述之藉由抗原-結合分子“攝入至細胞中”係指抗原藉由胞吞作用(endocytosis)被攝入至細胞中。再者，本發明中所述之“促使攝入至細胞中”係指結合血漿中抗原之抗原-結合分子攝入細胞內的速率增加，及/或攝入抗原再循環至血漿的數量減少。其係指在增加抗原-結合分子之人類

FcRn-結合活性前，或在增加人類 FcRn-結合活性及降低在酸性 pH 範圍下抗原-結合分子之抗原-結合活性(結合活性)至低於在中性 pH 範圍下之抗原-結合活性前，與抗原-結合分子相比，攝入細胞的速率增加。與完整人類 IgG 相比，此速率較佳被促進。因此，在本發明中，藉由抗原-結合分子促使抗原攝入至細胞可評斷為基於抗原攝入細胞的速率增加。抗原攝入細胞的速率可被計算，例如，在將抗原及抗原-結合分子加至含人類 FcRn-表現細胞的培養基後，隨著時間觀察此培養基中抗原濃度減少的量，或隨著時間觀察攝入至人類 FcRn-表現細胞中的抗原量。使用本發明促使抗原攝入至細胞的方法，例如，可藉由給予抗原-結合分子促使抗原由血漿中移除。因此，可評估是否可藉由抗原-結合分子促使抗原攝入至細胞，例如，分析抗原由血漿中移除的速率是否增加，或血漿中的總抗原濃度是否可藉由給予抗原-結合分子而減少。

【0018】本發明中所述之“血漿中總抗原濃度”係指與抗原-結合分子結合的抗原以及未結合之抗原濃度或“血漿中自由抗原濃度”的總合。各種用於測量“血漿中總抗原濃度”或“血漿中自由抗原濃度”的方法已為公眾所習知並描述於下文。

【0019】本發明中所述之“完整的人類 IgG”係指一未經修飾的人類 IgG 且不限於特定類型之 IgG。人類 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 皆可作為“完整的人類 IgG”，只要其可在酸性 pH 範圍下與人類 FcRn 結合。“完整的人類 IgG”較佳可為人類 IgG1。

【0020】本發明亦提供增加抗原-結合分子可結合抗原量的方法。特別是，本發明提供藉由增加於中性 pH 範圍下人類抗

原-結合分子的人類 FcRn-結合活性，以增加於酸性 pH 範圍下具 FcRn-結合活性之單一抗原-結合分子可結合抗原量的方法。本發明亦提供藉由改變抗原-結合分子之人類 FcRn-結合區的至少一個胺基酸，以增加於酸性 pH 範圍下具 FcRn-結合活性之單一抗原-結合分子可結合抗原量的方法。

【0021】本發明亦提供藉由改變抗原-結合分子之人類 FcRn-結合區，以增加於酸性 pH 範圍下具 FcRn-結合活性之單一抗原-結合分子可結合抗原量的方法，人類 FcRn-結合區包含選自於親代 IgG 之 Fc 區中(EU 編號)第 237、238、239、248、250、252、254、255、256、257、258、265、270、286、289、297、298、303、305、307、308、309、311、312、314、315、317、325、332、334、360、376、380、382、384、385、386、387、389、424、428、433、434 及 436 位置之至少一個胺基酸以不同的胺基酸置換之人類 FcRn-結合區。

【0022】本發明中所述之“親代 IgG”係指未經修飾的 IgG，其後續被修飾成在酸性 pH 範圍下可與人類 FcRn 結合的親代 IgG 變異體(因此，在酸性 pH 範圍下親代 IgG 不需具有與人類 FcRn 結合的能力)。親代 IgG 可為自然存在的 IgG，或自然存在 IgG 的變異體或改造體。親代 IgG 可為其多胜肽，含親代 IgG 的組合物，或編碼其之胺基酸序列。應注意的是，“親代 IgG”包括已知市售的重組 IgG 產品，如下文所述。“親代 IgG”的來源可來自，但並不限於，非人類動物或人類的任何組織。組織較佳可擇自於小鼠、大鼠、天竺鼠、倉鼠、沙鼠、貓、兔、狗、山羊、綿羊、牛、馬、駱駝、和非人類靈長目動物。在另一實

施例中，“親代 IgG”也可來自於長尾獼猴、狨猴、獼猴、黑猩猩或人類。“親代 IgG”較佳來自於人類 IgG1，但不限於等定種類之 IgG。其表示人類 IgG1、IgG2、IgG3、或 IgG4 皆適合作為“親代 IgG”。在類似的方法中，來自於任何上述組織之任何種類或次種類的 IgGs 較佳可作為“親代 IgG”。自然存在 IgG 的變異體或改造體之例子可參照 Curr Opin Biotechnol. 2009 Dec; 20(6): 685-91, Curr Opin Immunol. 2008 Aug; 20(4): 460-70, Protein Eng Des Sel. 2010 Apr; 23(4): 195-202, WO 2009/086320, WO 2008/092117, WO 2007/041635 and WO 2006/105338，但不限於此。

【0023】本發明亦提供藉由減少上述抗原結合分子於酸性 pH 範圍下的結合活性(結合能力)，以增加單一抗原結合分子可結合的抗原量的方法，此抗原結合分子具有抗原結合事件的增加以降低其在中性 pH 範圍下的結合活性。本發明亦提供藉由改變上述抗原結合分子之抗原-結合區至少一個胺基酸，以增加單一抗原結合分子可結合的抗原量的方法，此抗原結合分子具有抗原結合事件的增加。本發明亦提供藉由將上述抗原結合分子之抗原-結合區至少一個胺基酸置換為組胺酸，以增加單一抗原結合分子可結合的抗原量的方法，此抗原結合分子具有抗原結合事件的增加。

【0024】本發明中所述之“單一抗原-結合分子可結合的抗原量”係指單一抗原分子可結合的抗原量，直到此分子因分解而被移除。本發明中所述之“增加單一抗原-結合分子可結合的抗原量”係指增加循環次數直到此抗原-結合分子因分解而被

移除，每次循環包括：於血漿中抗原與抗原-結合分子結合，與抗原結合的抗原-結合分子攝入至細胞中，以及於核內體內與抗原分離，接著抗原-結合分子返回到血漿中。其係指相較於在增加於中性 pH 範圍下抗原-結合分子之 FcRn-結合活性前，或在增加 FcRn-結合活性及於酸性 pH 範圍下降低抗原-結合分子之抗原-結合活性(結合活性)至少於在中性 pH 範圍下的抗原-結合活性前，此循環次數增加。因此，此循環次數的增加可藉由分析“細胞內攝取是否被促進”或“藥物動力特性是否被改善”來判斷，如下所述。

【0025】本發明亦提供促使結合於細胞外抗原-結合分子之抗原的細胞內游離的方法。特別是，本發明提供促使結合於細胞外抗原-結合分子之抗原的細胞內游離的方法，增加在中性 pH 範圍下該抗原-結合分子之人類 FcRn-結合活性，及降低在酸性 pH 範圍下該抗原-結合活性至小於在中性 pH 範圍下之抗原-結合活性。本發明亦提供促使結合於細胞外抗原-結合分子之抗原的細胞內游離的方法，基於改變抗原-結合分子之抗原-結合區的至少一個胺基酸，及同時改變在酸性 pH 範圍下具 FcRn-結合活性之抗原-結合分子之人類 FcRn-結合區的至少一個胺基酸。本發明亦提供促使結合於細胞外抗原-結合分子之抗原的細胞內游離的方法，藉由將人類 FcRn-結合區為包含選自於親代 IgG 之 Fc 區中(EU 編號)第 237、238、239、248、250、252、254、255、256、257、258、265、270、286、289、297、298、303、305、307、308、309、311、312、314、315、317、325、332、334、360、376、380、382、384、385、386、387、

389、424、428、433、434及436位置之至少一個胺基酸以不同的胺基酸置換之人類FcRn-結合區。

【0026】在本發明中，抗原可在細胞內的任何位區與抗原-結合分子分離；然而，較佳的分離位置為早期核內體(early endosome)。本發明中所述之“結合於細胞外抗原-結合分子之抗原從該抗原-結合分子的細胞內游離”，不一定指透過與抗原-結合分子結合而攝入細胞內的所有抗原在此細胞內從此抗原-結合分子分離。因此，可接受的是，在降低抗原-結合分子於酸性pH範圍下之抗原-結合活性至小於在中性pH範圍下之活性，並同時增加於中性pH範圍下之人類FcRn-結合活性之前相比，細胞內從抗原-結合分子分離的抗原的比例提高。此促進結合於細胞外抗原-結合分子之抗原在細胞內從該抗原-結合分子游離的方法，與藉由促進與抗原結合之抗原-結合分子之攝入以促使抗原從抗原-結合分子分離之能力的方法同義。

【0027】本發明亦提供促使以抗原結合型式攝入細胞內的抗原-結合分子以無抗原型式胞外釋放的方法。特別是，本發明提供促使以抗原結合型式攝入細胞內的抗原-結合分子以無抗原型式胞外釋放的方法，藉由增加在中性pH範圍下該抗原-結合分子之人類FcRn-結合活性，及降低在酸性pH範圍下該抗原-結合活性至小於在中性pH範圍下之抗原-結合活性。本發明亦提供促使以抗原結合型式攝入細胞內的抗原-結合分子以無抗原型式胞外釋放的方法，藉由改變抗原-結合分子之至少一個胺基酸並同時改變人類FcRn-結合區之至少一個胺基酸。本發明亦提供藉由將至少一個胺基酸置換為組胺酸或插入

至少一個組胺酸至抗原-結合分子中，同時將該人類 FcRn-結合區為包含選自於親代 IgG 之 Fc 區中(EU 編號)第 237、238、239、248、250、252、254、255、256、257、258、265、270、286、289、297、298、303、305、307、308、309、311、312、314、315、317、325、332、334、360、376、380、382、384、385、386、387、389、424、428、433、434、及 436 位置之至少一個胺基酸以不同的胺基酸置換之人類 FcRn-結合區。

【0028】本發明中所述之“以抗原結合型式攝入細胞內的抗原-結合分子以無抗原型式胞外釋放”不一定指所有攝入細胞內與抗原結合之抗原-結合分子以無抗原型式釋放於細胞外。可被接受的是，在降低抗原-結合分子於酸性 pH 範圍下之抗原-結合活性至小於在中性 pH 範圍下之活性、並增加於中性 pH 範圍下之人類 FcRn-結合活性之前相比，以無抗原型式之抗原-結合分子釋放至細胞外的比例增加。釋放至細胞外之抗原-結合分子較佳保有抗原-結合活性。促進以與抗原結合型式攝入至細胞的抗原-結合分子以無抗原型式釋放至細胞外的方法，與給予一抗原-結合分子藉由促進與抗原結合之抗原-結合分子攝入細胞中而促進以抗原結合型式攝入至細胞的抗原-結合分子以無抗原型式釋放至細胞外的方法同義。

【0029】本發明亦提供給予抗原-結合分子以增加移除血漿抗原的能力。在本發明中所述之“增加移除血漿抗原能力的方法”係指“提升抗原-結合分子將抗原由血漿中移除之能力的方法”。特別是，本發明提供藉由增加於中性 pH 範圍下人類 FcRn-結合活性，促進於酸性 pH 範圍下以具有人類 FcRn-結

合活性之抗原-結合分子移除血漿中抗原能力的方法。本發明亦提供藉由改變抗原-結合分子之人類 FcRn-結合區至少一個胺基酸，增加於酸性 pH 範圍下以具人類 FcRn-結合活性之抗原-結合分子移除血漿中抗原能力的方法。

【0030】本發明亦提供以在酸性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性之抗原-結合分子移除血漿中抗原的能力增加的方法，藉由使用包含選自於含有親代 IgG 之 Fc 區的人類 FcRn-結合區之親代 IgG Fc 區(EU 編號)第 237、238、239、248、250、252、254、255、256、257、258、265、270、286、289、297、298、303、305、307、308、309、311、312、314、315、317、325、332、334、360、376、380、382、384、385、386、387、389、424、428、433、434 及 436 位置之至少一個胺基酸置換為不同的胺基酸。

【0031】本發明亦提供相較於中性 pH 範圍下的抗原-結合活性，藉由降低在酸性 pH 範圍下上述具促進移除血漿中抗原能力之抗原-結合分子之抗原-結合活性，以增加抗原-結合分子移除血漿中抗原之能力的方法。本發明亦提供藉由改變上述具促進移除血漿中抗原能力之抗原-結合分子的抗原-結合區至少一個胺基酸，以增加藉由給予抗原-結合分子來移除血漿中抗原能力的方法。

【0032】本發明中所述之“移除血漿中抗原的能力”係指當抗原-結合分子被給予或分泌於體內(in vivo)時，將抗原由血漿中移除的能力。因此，本發明中所述之“增加抗原-結合分子移除血漿中抗原的能力”係指與增加於中性 pH 範圍下抗原-結合

分子之人類 FcRn-結合活性，或增加人類 FcRn-結合活性並同時降低其於酸性 pH 範圍下之抗原-結合活性至小於在中性 pH 範圍下之活性之前相比，藉由給予抗原-結合分子移除血漿中抗原的速率增加。抗原-結合分子移除血漿中抗原能力的增加可被評估，例如，藉由於體內給予可溶性抗原及抗原-結合分子，並分析給予後血漿中可溶性抗原的濃度。當在給予可溶性抗原及抗原-結合分子後，藉由增加於中性 pH 範圍下抗原-結合分子之人類 FcRn-結合活性，或增加其人類 FcRn-結合活性並同時降低其於酸性 pH 範圍下之抗原-結合活性至小於在中性 pH 範圍下之活性，使血漿中可溶性抗原的濃度降低，則抗原-結合分子移除血漿中抗原的能力可判斷為增加。可溶性抗原的形式可為與抗原-結合分子結合之抗原或未與抗原-結合分子結合之抗原，其濃度可分別以“血漿中與抗原-結合分子結合之抗原的濃度”及“血漿中未與抗原-結合分子結合之抗原的濃度”來判定(後者與“血漿中自由抗原濃度”同義)。由於“血漿中總抗原濃度”係指與抗原-結合分子結合之抗原濃度及未與抗原-結合分子結合之抗原濃度的總合，或“血漿中自由抗原濃度”為未與抗原-結合分子結合之抗原濃度，因此可溶性抗原的濃度可判定為“血漿中總抗原的濃度”。有許多已知的方法可用於測定“血漿中總抗原濃度”或“血漿中自由抗原濃度”，如後文所述。

【0033】本發明亦提供改善抗原結合分子之藥物動力特性的方法。特別是，本發明提供藉由增加於中性 pH 範圍下抗原-結合分子的人類 FcRn-結合活性，以改善在酸性 pH 範圍下具

人類 FcRn-結合活性之抗原結合分子之藥物動力特性的方法。而且，本發明提供藉由改變抗原-結合分子之人類 FcRn-結合區之至少一個胺基酸，以改善在酸性 pH 範圍下具人類 FcRn-結合活性之抗原結合分子之藥物動力特性的方法。

【0034】本發明亦提供藉由使用一於人類 FcRn-結合區之親代 IgG Fc 區中擇自於第 237、238、239、248、250、252、254、255、256、257、258、265、270、286、289、297、298、303、305、307、308、309、311、312、314、315、317、325、332、334、360、376、380、382、384、385、386、387、389、424、428、433、434 及 436 位置(EU 編號)之至少一個胺基酸置換為不同胺基酸的人類 FcRn-結合區，以改善在酸性 pH 範圍下具人類 FcRn-結合活性之抗原結合分子之藥物動力特性的方法。

【0035】再者，本發明提供藉由降低上述藥物動力特性被加強之抗原-結合分子於酸性 pH 範圍下的抗原-結合活性至低於在中性 pH 範圍下的抗原-結合活性，以改善抗原-結合分子之藥物動力特性的方法。本發明亦提供藉由改變上述藥物動力特性被加強之抗原-結合分子之抗原-結合區至少一個胺基酸，以改善在酸性 pH 範圍下具人類 FcRn-結合活性之抗原結合分子之藥物動力特性的方法。本發明亦提供藉由將上述藥物動力特性被加強之抗原-結合分子之抗原-結合區至少一個胺基酸置換為組胺酸或插入至少一個組胺酸，以改善藥物動力特性的方法。

【0036】本發明中所述之“藥物動力特性的改善”、“藥物動

力特性的增進”、及“較佳之藥物動力特性”可被視為“血漿(血液)血漿滯留的增強”、“血漿(血液)滯留的增進”、“ 較佳之血漿(血液)滯留”、及“血漿(血液)滯留的延長”。這些皆為用義的用語。

【0037】本發明中所述之“藥物動力特性的改善”不僅指在給予抗原-結合分子至人類或非人類，如小鼠、大鼠、猴子、兔和狗後，由血漿中移除時間的延長(例如，直到抗原-結合分子於細胞內分解等且無法返回至血漿中)，還包括在給予至分解移除的期間，在抗原-結合分子於可與抗原結合的形式下(例如，抗原-結合分子的抗原自由形式)，其血漿滯留的延長。完整的人類 IgG 可結合至非人類動物的 FcRn。例如，由於完整的人類 IgG 與小鼠 FcRn 的結合強於與人類 FcRn 的結合，因此較佳可給予至小鼠以證明本發明抗原-結合分子的特性(Int Immunol. 2001 Dec; 13(12): 1551-9)。在其他例子中，移除小鼠原本的 FcRn 基因，並轉入並表現人類 FcRn 基因(Methods Mol Biol. 2010; 602: 93-104)，則此較佳也可給予至此小鼠以證明本發明抗原-結合分子的特性，如後文所述。特別是，由於抗原-結合分子分解就不會結合至抗原(抗原-結合分子的抗原自由形式)，“藥物動力特性的改善”亦包括移除時間的延長。在血漿中，若抗原-結合分子已與一抗原結合，則此抗原-結合分子無法與一新的抗原結合。因此，長時間抗原-結合分子未與抗原結合，則長時間其可與一新的抗原結合(有較高的機會與另一抗原結合)。其可減少體內抗原不具抗原-結合分子的時間，並增加抗原與抗原-結合分子結合的時間。藉由給予抗原-結合分子以加速移除血漿中抗原，使抗原自由形式之抗

原-結合分子的濃度增加，且抗原與抗原-結合分子結合的時間可被延長。特別是，本發明中所述之“抗原-結合分子之藥物動力特性的增強”包括抗原自由形式之抗原-結合分子藥物動力特性參數的改善(血漿中半衰期的延長，平均滯留時間的延長，以及血漿清除率的降低)，在給予抗原-結合分子後，抗原與抗原-結合分子結合期間的延長，以及加速藉由抗原-結合分子移除血漿中抗原。抗原-結合分子之藥物動力特性的改善可藉由分析抗原-結合分子及其抗原自由形式的參數、血漿半衰期、平均滯留時間、及血漿清除率任一種來評估(“Pharmacokinetics: Enshu-niyoru Rikai (Understanding through practice)” Nanzando)。例如，在給予抗原-結合分子至小鼠，大鼠，猴，兔，狗，或人類後，分析抗原-結合分子或其抗原自由形式的血漿濃度。接著，測定各個參數。當血漿半衰期或平均滯留時間延長時，抗原-結合分子的藥物動力特性可被改善。參數可藉由習知的方法測定。例如，參數可以非模室數據分析法(noncompartmental analysis)以藥物動力學分析軟體WinNonlin (Pharsight)並參考其使用說明書進行適當的分析。抗原自由形式之抗原-結合抗體的血漿濃度可利用習知方法進行測定，例如可參照 Clin Pharmacol. 2008 Apr; 48(4): 406-17 所述之分析方法。

【0038】本發明中所述之“藥物動力學的改善” 也包括在給予抗原-結合分子後，抗原與抗原-結合因子結合時間的延長。在給予抗原-結合分子後，抗原與抗原-結合因子結合時間是否延長可藉由測定自由抗原的血漿濃度來評估。此時間的延

長可基於測定自由抗原的血漿濃度或自由抗體濃度對總抗體濃度比例增加所需的時間來判斷。

【0039】未與抗原-結合分子結合之抗原的血漿濃度或自由抗原濃度對總濃度的比例可利用習知技術來測定，例如可參照 Pharm Res. 2006 Jan; 23 (1): 95-103 所述之方法。再者，當抗原在體內具有一特定功能時，抗原是否結合至抗原-結合分子(抗原-結合分子中和抗原活性(拮抗分子))可藉由分析抗原功能是否被中和來判斷。抗原功能是否被中和，可藉由分析呈現抗原功能的體內標誌來判斷。抗原是否結合至抗原-結合分子(抗原-結合分子中和抗原活性(拮抗分子))可藉由分析呈現抗原功能的體內標誌來判斷。

【0040】在給予抗原-結合分子後，自由抗原的血漿濃度及血漿中自由抗原含量對總抗原含量比例的體內標誌偵測及其測量並無特別限制；然而，較佳在給予抗原-結合分子後一段時間進行此分析。本發明中，給予抗原-結合分子後的時間並無特別限制，此技藝人士可根據給予之抗原-結合分子的特性等來決定適當的時間。此時間包括，例如，在給予抗原-結合分子後 1 天，在給予抗原-結合分子後 3 天，在給予抗原-結合分子後 7 天，在給予抗原-結合分子後 14 天，以及在給予抗原-結合分子後 28 天。本發明中所述之 “血漿抗原濃度”係指“血漿中總抗原濃度”，其為與抗原-結合分子結合及未結合之抗原的總合，或“血漿中自由抗體濃度” 其為未與抗原-結合分子結合之抗原的濃度。

【0041】藉由給予本發明之抗原結合分子可使血漿中的抗

原濃度小於給予包含完整人類 IgG Fc 區(即人類 FcRn-結合區)之對照抗原-結合分子，或未給予本發明抗原-結合分子的 2 倍、5 倍、10 倍、20 倍、50 倍、100 倍、200 倍、500 倍、1000 倍，或更高。

【0042】抗原/抗原-結合分子的莫耳比可以下列方法計算；

數值 A：每個時間點的抗原莫耳濃度

數值 B：每個時間點的抗原-結合分子莫耳濃度

數值 C:每個時間點之每單位抗原-結合分子莫耳濃度的抗原莫耳濃度(抗原/抗原-結合分子莫耳數比)

C=A/B.

數值 C 較小表示具有較高的每單位抗原-結合分子效力，而數值 C 較大表示具有較低的每單位抗原-結合分子效力。

【0043】抗原/抗原-結合分子莫耳比可以上述方法計算。

藉由給予本發明之抗原結合分子可使抗原/抗原-結合分子莫耳比小於給予包含完整人類 IgG Fc 區(即人類 FcRn-結合區)之對照抗原-結合分子的 2 倍、5 倍、10 倍、20 倍、50 倍、100 倍、200 倍、500 倍、1000 倍，或更高。

【0044】在此，完整的人類 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 較佳可作為完整的人類 IgG，其目的為用作對照之完整人類 IgG (reference intact human IgG)，以比較抗原-結合分子之人類 FcRn-結合活性或體內活性。對照之抗原-結合分子較佳包括與所欲抗原-結合分子相同之抗原-結合區，以及較佳可使用與人類 FcRn-結合區相同之完整人類 IgG Fc 區。相對於抗原-結合分子之人類 FcRn 結合活性或體內活性，較佳可使用完整之人

類 IgG1 作為對照之完整人類 IgG。

【0045】血漿中總抗原濃度或抗原/抗體莫耳比的減少可被評估，如實施例 6、8 及 13 所述之內容。特別是，可使用人類 FcRn 轉殖小鼠株 32 或 276(Jackson Laboratories, Methods Mol Biol. 2010; 602: 93-104)，當抗原-結合分子不與小鼠對應抗原反應時，可藉由抗原-抗體共注射模式(antigen-antibody co-injection model)或穩定抗原注射模式(steady-state antigen infusion model)來評估。當抗原-結合分子與小鼠對應抗原反應時，其可單純將抗原-結合分子注射至人類 FcRn 轉殖小鼠株 32 或 276 (Jackson Laboratories)來進行評估。在共注射模式中，抗原-結合分子與抗原之混合物被給予至小鼠中。在穩定抗原注射模式中，將含有抗原溶液之注入幫浦植入小鼠中以維持一定的血漿抗原濃度，接著將抗原-結合分子注射至小鼠中。注射相同劑量測試用之抗原-結合分子。在適當的時間點以習知的方法偵測血漿中總抗原濃度、血漿中自由抗原濃度及血漿抗原-結合分子濃度。

【0046】血漿中總抗原濃度或游離抗原濃度及抗原/抗原結合分子莫耳比可在給予後的第 2、4、7、14、28、56 或 84 天進行偵測以評估本發明的長期效果。換句話說，為了評估本發明抗原-結合分子的效力，在給予抗原-結合分子後的第 2、4、7、14、28、56 或 84 天藉由偵測血漿中總抗原濃度或游離抗原濃度及抗原/抗原-結合分子莫耳比來判斷長期的血漿抗原濃度。 血漿抗原濃度或抗原/抗體結合分子莫耳比的降低是否可利用本發明之抗原-結合分子來完成，可藉由評估上述任何一

或多個時間點的降低來判斷。

【0047】血漿中總抗原濃度或游離抗原濃度及抗原/抗原-結合莫耳比可在給予後的第 15 分鐘、1、2、4、8、12 或 24 小時進行偵測以判斷本發明的短期效果。換句話說，為了評估本發明抗原-結合分子的效力，在給予抗原-結合分子後的第 15 分鐘、1、2、4、8、12 或 24 小時藉由偵測血漿中總抗原濃度或游離抗原濃度及抗原/抗原-結合分子莫耳比來判斷短期的血漿抗原濃度。

【0048】本發明抗原-結合分子的給予方式可擇自於皮內、靜脈、玻璃體、皮下、腹腔、靜脈及肌肉注射。

【0049】在本發明中，藥物動力特性較佳於人體內被改善。當難以偵測人體血漿滯留時間時，可基於小鼠(例如，正常小鼠、人類抗原-表現轉殖鼠、人類 FcRn-表現轉殖鼠)或猴子(例如，食蟹猴(cynomolgus monkeys))的血漿滯留時間來預測。

【0050】在本發明之中，酸性 pH 範圍一般介於 pH 4.0 至 pH 6.5。酸性 pH 範圍較佳介於 pH 5.5 至 pH 6.5 中的任一 pH 值，較佳擇自於 pH5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4 及 6.5，更佳為 pH 5.8 至 pH 6.0，其與體內早期核內體的 pH 值相近。再者，本發明中之中性 pH 範圍一般介於 pH 6.7 至 pH 10.0。中性 pH 範圍較佳介於 pH 7.0 至 pH 8.0 中的任一 pH 值，較佳擇自於 pH 7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9 及 8.0，更佳為 pH 7.4，其與體內血漿(血液)的 pH 值相近。當因 pH 7.4 的結合親和力低而難以評估人類 FcRn-

結合區與人類 FcRn 之間的結合親和力時，可改變 pH 7.4 而使用 pH 7.0。關於分析條件的溫度，人類 FcRn-結合區與人類 FcRn 之間的結合親和力可在 10℃-50℃下的任何溫度被分析。為了偵測人類 FcRn-結合區與人類 FcRn 之間的結合親和力，較佳在 15℃-40℃下的溫度被分析。更佳也可在介於 20℃-35℃下的任何溫度，例如 20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34 及 35℃之任一溫度下偵測人類 FcRn-結合區與人類 FcRn 之間的結合親和力。實施例 5 所揭示之 25℃為本發明之一實施例。

【0051】因此，本發明中所述之“降低抗原-結合分子於酸性 pH 值範圍下之抗原-結合活性至低於中性值範圍下”係指相較於抗原-結合分子在 pH 6.7 至 pH 10.0 之抗原-結合活性，其抗原-結合活性在 pH 4.0 至 pH 6.5 下被減弱。上述用語較佳指相較於在 pH 6.7 至 pH 8.0 下，抗原-結合分子的抗原-結合活性在 pH 5.5 至 pH 6.5 下被減弱，更佳係指相較於在體內血漿 pH 下的抗原-結合活性，其抗原-結合活性在早期核內體的 pH 下被減弱。特別是，相較於在 pH 7.4 下之抗原-結合分子的抗原-結合活性，其抗原-結合分子的抗原-結合活性在 pH 5.8 至 pH 6.0 下被減弱。

【0052】再者，本發明中所述之“降低於酸性 pH 範圍下之抗原-結合分子的抗原-結合活性至小於在中性 pH 範圍下之抗原-結合活性”也可稱作“增加於中性 pH 範圍下之抗原-結合分子之抗原-結合活性至大於在酸性 pH 範圍下之抗原-結合活性”。特別是，在本發明中，抗原-結合分子之抗原-結合活性於

酸性及中性 pH 範圍下的比值可被增加。例如，在後文之實施例中，KD (pH 5.8)/KD (pH 7.4)之比值可被增加。抗原-結合分子之抗原-結合活性於酸性及中性 pH 範圍下的比值可被增加，例如，藉由降低其於酸性 pH 範圍下的抗原-結合活性，增加其於中性 pH 範圍下的抗原-結合活性，或兩者。

【0053】本發明中所述之“相較於中性 pH 範圍下的抗原-結合活性，減弱於酸性 pH 範圍下的抗原-結合活性”有時可被置換為“降低於酸性 pH 範圍下之抗原-結合分子的抗原-結合活性至小於在中性 pH 範圍下之抗原-結合活性”。

【0054】在本發明之中，於酸性 pH 範圍下的人類 FcRn-結合活性係指於 pH 4.0 至 pH 6.5 下的人類 FcRn-結合活性，較佳為於 pH 5.5 至 pH 6.5 下的人類 FcRn-結合活性，以及更佳為於 pH 5.8 至 pH 6.0 下的人類 FcRn-結合活性，其與體內早期核內體的 pH 值相當。再者，本發明中所述之於中性 pH 範圍下的人類 FcRn-結合活性係指於 pH 6.7 至 pH 10.0 下的人類 FcRn-結合活性，較佳為於 pH 7.0 至 pH 8.0 下的人類 FcRn-結合活性，且更佳為 pH 7.4 下的人類 FcRn-結合活性，其與體內血漿的 pH 值相當。

【0055】本發明之抗原-結合分子具有一人類 FcRn-結合區。人類 FcRn-結合區並無特別限制，只要在酸性及中性 pH 範圍下此抗原-結合分子呈現人類 FcRn-結合活性。再者，此區域可具有直接或間接的人類 FcRn-結合活性。此區域包括，例如，IgG 免疫球蛋白之 Fc 區、白蛋白、白蛋白區 3，抗-人類的 FcRn 抗體、抗-人類 FcRn 胜肽及抗-人類 FcRn 支架分子，

其皆具有直接與人類 FcRn 結合的活性；以及與 IgG 或白蛋白結合的分子，其具有間接與人類 FcRn 結合的活性。本發明之區域較佳在酸性及中性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性。只要使用之區域在酸性及中性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性即不需改變。當區域在酸性及/或中性 pH 範圍下僅具有微弱或不具有人類 FcRn-結合活性，可藉由改變抗原-結合分的胺基酸以提供人類 FcRn-結合活性。然而，藉由改變抗原-結合分子胺基酸以提供於酸性及在中性 pH 範圍下的人類 FcRn-結合活性。再者，於酸性及中性 pH 範圍下已具有人類 FcRn-結合活性之區域的胺基酸也可被改變以增加人類 FcRn-結合活性。所欲的胺基酸改變可利用胺基酸改變前後於酸性及中性 pH 範圍下之人類 FcRn-結合活性來選擇。

【0056】較佳之人類 FcRn-結合區可直接與人類 FcRn 結合。此較佳之人類 FcRn-結合區包括，例如，抗體 Fc 區，也就是可與一胜肽結合的區域，如具有人類 FcRn-結合活性之白蛋白或 IgG，可間接藉由白蛋白、IgG 或類似物與人類 FcRn 結合。因此，本發明之人類 FcRn-結合區可為一與具人類 FcRn-結合活性之胜肽結合的區域。

【0057】本發明之抗原結合分子並無特別限制，其包括具有專一性結合至目標抗原之結合活性的抗原-結合區。此較佳抗原-結合區包括，例如 具有抗體之抗原-結合區的區域。抗體之抗原-結合區包括，例如，CDRs 及可變區。當抗體的抗原-結合區為 CDR 時，其可包含完整抗體的 6 個 CDRs，或 1、2 或多個 CDRs。當 CDRs 包含抗體之結合區時，其可包括胺基

酸的缺失、置換、增加及/或插入，或可為一 CDR 蛋白。

【0058】另一方面，可用於本發明方法中的抗原結合分子包括具拮抗活性的抗原結合分子(拮抗性抗原結合分子)、具有致效活性之原結合分子(致效性之原結合分子)以及具有細胞毒性之分子。在一較佳實施例中，抗原結合分子包括拮抗性抗原結合分子，特別是，可辨識抗原，如受體或細胞激素之拮抗性抗原結合分子。

【0059】在本發明中，所欲之抗原-結合分子並無特別限制，可為任何抗原結合分子。本發明之抗原-結合分子較佳同時包括 抗原-結合活性(抗原-結合區)及人類 FcRn-結合區。特別是，本發明較佳之抗原-結合分子包括一可與人類 FcRn 結合之區域。抗原-結合分子包括同時具有抗原-結合區及人類 FcRn-結合區之分子，例如，抗體。本發明中所述之抗體較佳包括，例如，IgG 抗體。當所用之抗體為 IgG 抗體時，此 IgG 的種類並無限制，可使用任何同型(子群)的 IgG，如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。再者，本發明之抗原-結合分子可包括抗體恆定區，且可於此恆定區中導入胺基酸突變。可導入的胺基酸突變包括，例如，其可能或減弱與 Fc γ 受體的結合(Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Mar 14; 103(11): 4005-10)，但不限於這些例子。再者，可藉由選擇適當的恆定，例如 IgG2，以改變 pH-依賴性的結合。

【0060】當本發明所欲之抗原-結合分子為一抗體時，其可為源自於任何動物的抗體，如小鼠抗體，人類抗體，大鼠抗體，兔抗體，山羊抗體，或駱駝抗體。再者，此抗體可為一經改變

的抗體，例如，嵌合抗體，特別是在人源化抗體序列中包含胺基酸置換的改變抗體等。此抗體也包括雙特異性抗體，與各種分子連結的抗體修飾產品，以及包括抗體片段的多肽。

【0061】“嵌合抗體”為結合源自不同動物序列所製備的抗體。特別是，此嵌合抗體包括，例如，具有源自小鼠抗體之重鏈及輕鏈可變區(V)，以及源自於人類抗體之重鏈及輕鏈恆定區(C)的抗體。

【0062】“人源化抗體”又稱為重塑之人類抗體(reshaped human antibodies)，其為將源自於非人類如小鼠之抗體的互補決定區(CDRs)移植至人類抗體的 CDRs。識別 CDRs 的方法已為習知(Kabat et al., Sequence of Proteins of Immunological Interest (1987), National Institute of Health, Bethesda, Md.; Chothia et al., Nature (1989) 342: 877).一般適用之基因重組技術也為已知(see European Patent Application EP 125023; and WO 96/02576)。

【0063】雙特異性抗體係指一抗體，在此相同抗體中具有可辨識不同抗原決定位的可變區。雙特異性抗體為一可辨識二個或以上不同抗原的抗體，或為一可辨識同一抗原上二個或以上不同抗原決定位的抗體。

【0064】再者，含有抗體片斷的聚胜肽包括，例如，Fab 片斷、F(ab')2 片斷、scFvs (Nat Biotechnol. 2005 Sep; 23(9):1126-36)、域抗體(dAbs) (WO 2004/058821，WO 2003/002609)，scFv-Fc (WO 2005/037989)、dAb-Fc 及 Fc 融合蛋白。當一分子包括一 Fc 區時，Fc 區被作為一人類 FcRn-結

合區。再者，FcRn-結合區被融合至這些分子中。

【0065】再者，用於本發明之抗原-結合分子可為類抗體分子。類抗體分子(支架分子(scaffold molecule)，胜肽分子)為一可藉由與目標分子結合而呈現功能性的分子(Current Opinion in Biotechnology (2006) 17: 653-658; Current Opinion in Biotechnology (2007) 18: 1-10; Current Opinion in Structural Biology (1997) 7: 463-469; Protein Science (2006) 15: 14-27)，且包括，例如，DARPins (WO 2002/020565), Affibody (WO 1995/001937)、Avimer (WO 2004/044011; WO 2005/040229)、及 Adnectin (WO 2002/032925)。若這些類抗體分子可在 pH-依賴方式中與目標分子結合及/或在中性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性，則可藉由抗原-結合分子促使抗原被攝入細胞中，藉由給予抗原-結合分子以促使血漿抗原濃度的降低，以及改善抗原-結合分子的藥物動力特性，以及增加單一抗原-結合分子可結合的抗原數目。

【0066】再者，抗原-結合分子可為一蛋白質，其為人類 FcRn-結合區以及可與一包含配體之目標結合之受體蛋白的融合，且包括，例如，TNFR-Fc 融合蛋白、IL1R-Fc 融合蛋白、VEGFR-Fc 融合蛋白以及 CTLA4-Fc 融合蛋白(Nat Med. 2003, Jan; 9(1): 47-52; BioDrugs. (2006) 20(3): 151-60)。若這些受體-人類 FcRn-結合區融合蛋白可在 pH-依賴方式中與包含配體之目標分子結合及/或在中性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性，則可藉由抗原-結合分子促使抗原被攝入細胞中，藉由給予抗原-結合分子以促使血漿抗原濃度的降低，以及改善抗原-

結合分子的藥物動力特性，以及增加單一抗原-結合分子可結合的抗原數目。受體蛋白被適當地被設計及修飾包括一針對包含配體目標的受體蛋白結合區。本發明較佳使用如上述所述的例子，包括 TNFR-Fc 融合蛋白、IL1R-Fc 融合蛋白、VEGFR-Fc 融合蛋白及 CTLA4-Fc 融合蛋白、可溶性受體分子，包括在與包含配體之目標結合時所需要之受體蛋白的細胞外區。這些經設計及修飾之受體分子在本發明中較佳被稱為人造受體分子。用於設計及修飾受體分子以構築人造體分子的方法已為習知。

【0067】再者，抗原-結合分子可為一融合蛋白，其中人造配體蛋白可與一目標結合且具有中和活性，與一人類 FcRn-結合區融合，且人配體蛋白包括，例如突變的 IL-6 (EMBO J. 1994 Dec 15; 13(24): 5863-70)。若此人造配體融合蛋白可在 pH-依賴方式中與目標分子結合及/或在中性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性，其可藉由抗原-結合分子促使抗原被攝入細胞中，藉由給予抗原-結合分子以促使血漿抗原濃度的降低，以及改善抗原-結合分子的藥物動力特性，以及增加單一抗原-結合分子可結合的抗原數目。

【0068】再者，本發明之抗體可包括經修飾的醣鏈。具有經修飾醣鏈的抗體包括，例如，具有經修飾醣基化的抗體(WO 99/54342)、將岩藻醣(fucose)添加至缺乏岩藻醣抗體的醣鏈上(WO 00/61739; WO 02/31140; WO 2006/067847; WO2 006/067913)、以及具平分型乙醯胺基葡萄糖醣鏈(bisecting GlcNAc)的抗體(WO 02/79255)。

【0069】除了 pH 值外，此技藝人士自可適合地選擇抗原-結合或人類 FcRn-結合活性的分析條件，且此條件並無特別限制。例如，WO 2009/125825 中所述之 MES 緩衝液，37°C 的條件可用於測定活性。在另一實施例中，實施例 4 或 5 中所述之 Na-磷酸鹽緩衝液，25°C 的條件可用於測定活性。同時，抗原-結合分子的抗原-結合活性及人類 FcRn-結合活性可利用習知的方法來測定，例如，利用 Biacore (GE Healthcare)或其類似。當此抗原為一可溶性抗原時，可以抗原作為分析物，滴入一固定有抗原-結合分子的晶片上，以偵測抗原-結合分子結合至可溶性抗原的活性。再者，當此抗原為一膜型抗原時，可藉由以抗原-結合分子作為分析物，滴入一固定有抗原的晶片上，以偵測抗原-結合分子結合至膜型抗原的活性。抗原-結合分子的人類 FcRn-結合活性可藉由以人類 FcRn 或抗原-結合分子作為分析物，將其分別滴入一固定有抗原-結合分子或人類 FcRn 的晶片上來進行測定。

【0070】在本發明中，抗原-結合活性在酸性 pH 值範圍及中性 pH 值範圍下的比值並無特別限制，只要抗原-結合活性在酸性 pH 值範圍下低於在中性 pH 值範圍下。然而，KD (pH 5.8)/KD (pH 7.4)值為抗原在 pH 5.8 及 pH 7.4 下的解離常數比值，較佳為 2 或以上，更佳為 10 或以上，且更佳為 40 或以上。KD (pH 5.8)/KD (pH 7.4)的上限並無特別限制，可為任何數值，例如，400、1,000 或 10,000，只要可以利用習知技術產生。

【0071】當此抗原為可溶性抗原時，可利用解離常數(KD)來表示抗原-結合活性。另一方面，當抗原為膜型抗原時，此

活性可以視解離常數(apparent KD)來表示。解離常數(KD)及視解離常數(apparent KD)可利用習知方法來測定，例如，利用Biacore (GE Healthcare)、史考特法(Scatchard plot)、流式細胞儀或其類似。

【0072】在本發明中，其他可表示在酸性及中性 pH 範圍下之抗原-結合活性比值的參數包括，例如，解離速率常數 k_d。當使用解離速率常數(k_d)代替解離常數(KD)作為結合活性比例的代表參數時，則 k_d (在酸性 pH 範圍)/k_d (在中性 pH 範圍)值，其為抗原在酸性 pH 範圍及 pH 範圍下的 k_d (解離速率常數)比值，較佳為 2 或以上，更佳為 5 或以上，更佳為 10 或以上，且更佳為 30 或以上。k_d (在酸性 pH 範圍)/k_d (在中性 pH 範圍)值的上限並無特別限制，且可為任何數值，例如，50、100 或 200，只要可以利用習知技術產生。

【0073】當抗原為可溶性抗原時，可利用解離速率常數(k_d)來表示抗原-結合活性。再者，當抗原為膜型抗原時，可利用視解離速率常數(apparent k_d)來表示此活性。解離速率常數(k_d)及視解離速率常數(apparent k_d)可以習知方法來測定，例如，使用 Biacore (GE Healthcare)、流式細胞儀、或其類似。

【0074】在本發明中，當在不同 pH 值下測定抗原-結合分子之抗原-結合活性時，較佳除了 pH 外，其餘測量條件維持不變。

【0075】降低(減少)在酸性 pH 值範圍下抗原-結合分子的抗原-結合活性至低於在中性 pH 值範圍下(給予 pH-依賴性結合活性的方法)的方法，並無特別限制，且可以任何方法達成。

特別是，如 WO 2009/125825 所示，此方法包括，例如，可藉由將抗原-結合分子中的胺基酸置換為組胺酸，或插入組胺酸至抗原-結合分子中，以達成降低(減少)在酸性 pH 值範圍下抗原-結合分子的抗原-結合活性至低於在中性 pH 值範圍下(給予 pH-依賴性結合活性的方法)的方法。目前已知可藉由將抗體中的胺基酸置換為組胺酸使抗體具 pH-依賴性抗原-結合活性(FEBS Letter (1992) 309(1): 85-88)。此組胺酸突變(置換)或插入位置並無特別限制；且任何位置的胺基酸可被置換為組胺酸或組胺酸可插入任何位置。組胺酸突變(置換)或插入的較佳位置，包括，例如，突變或置換對抗原-結合分子之抗原-結合活性產生影響的區域。此區域包括相較於突變或插入前，突變或插入後降低(減少)在酸性 pH 值範圍下抗原-結合分子的抗原-結合活性至低於在中性 pH 值範圍下(KD(在酸性 pH 範圍)/KD(在中性 pH 範圍)值增加)的位置。當抗原-結合分子為一抗體時，此區域包括，例如，抗體可變區及 CDRs。發生(完成)組胺酸突變或插入的數目可以習知方法判斷。組胺酸的置換可僅發生於單一位置、或二個或以上的位置。再者，組胺酸可僅插入單一位置、或二個或以上的位置。另外，除了組胺酸突變外，也可導入除了組胺酸突變以外的其他突變(除了組胺酸其他胺基酸的突變(刪除、增加、插入、及/或置換))。另外，組胺酸突變可合併組胺酸插入。此胺酸酸置換或插入可以隨機的方法來達成，例如，組胺酸掃描，其為在習知之丙胺酸掃描中以組胺酸置換丙胺酸。於是，具有比導入突變前更高 KD(在酸性 pH 範圍)/KD(在中性 pH 範圍)值的抗原-結合分子可藉由篩選經隨

機組胺酸突變或插入之抗原-結合分子資料庫獲得。

【0076】當以組胺酸置換抗原-結合分子中的胺基酸，或將組胺酸插入抗原-結合分子中時，於中性 pH 範圍下在組胺酸置換或插入後之抗原-結合分子的抗原-結合活性較佳與於中性 pH 範圍下在組胺酸置換或插入前之抗原-結合分子的抗原-結合活性相同，但不特別限於此。本發明中所述之"於中性 pH 範圍下在組胺酸置換或插入後之抗原-結合分子的抗原-結合活性較佳與於中性 pH 範圍下在組胺酸置換或插入前之抗原-結合分子的抗原-結合活性相同"係指抗原-結合分子在經組胺酸置換或插入後保有 10%或以上，較佳 50%或以上，更佳 80%或以上，且更佳 90%或以上於組胺酸置換或插入前之抗原-結合分子的抗原-結合活性。當抗原-結合分子的抗原-結合活性因組胺酸置換或插入而降低時，抗原-結合活性可藉由置換、刪除、增加及/或插入一或多個胺基酸至抗原-結合分子中來進行調整，使抗原-結合活性變為與在組胺酸置換或插入前相同。本發明也包括在組胺酸置換或插入後，藉由置換、刪除、增加及/或插入一或多個胺基酸至抗原-結合分子中使複數個抗原結合分子具有相同的結合活性。

【0077】其他降低(減少)在酸性 pH 值範圍下抗原-結合分子的抗原-結合活性至低於在中性 pH 值範圍下的方法包括將抗原-結合分子中的胺基酸置換為非天然胺基酸，或插入非天然胺基酸至抗原-結合分子中。目前已知 pKa 可利用非天然胺基酸進行人為的調整(Angew. Chem. Int. Ed. 2005, 44, 34; Chem Soc Rev. 2004 Sep 10, 33 (7): 422-30; Amino Acids.

(1999) 16(3-4): 345-79)。因此，在本發明中，可利用非天然胺基酸置換上述之組胺酸。導入非天然胺基酸的位置並無特別限制，且非天然胺基酸可於任何位置進行置換或插入。非天然胺基酸置換或插入的較佳位置包括，例如，置換或插入會對抗原-結合分子之抗原-結合活性造成影響的區域。例如，當抗原-結合活性為抗體時，此區域包括抗體可變區及互補決定區(CDRs)。非天然胺基酸被導入的數目並無特別限制；且可僅於一、二或多個位置上置換非天然胺基酸。再者，非天然胺基酸可僅插入一個位置、或二個或以上。除了非天然胺基酸的置換或插入，其他胺基酸也可被刪除、增加、插入及/或置換。再者，非天然胺基酸的置換及/或插入可合併上述組胺酸的置換及/或插入。 任何的非天然胺基酸皆可用於本發明中。可使用此技藝人士所習知的非天然胺基酸。

【0078】在本發明中，當抗原-結合分子為抗體時，組胺酸或非天然胺基酸置換的可能位置包括，例如，CDR 序列及與抗體 CDR 結構有關的序列，包括，例如，WO 2009/125825 所揭示的位置。胺基酸的位置依據 Kabat 編號規則(Kabat EA et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH)。

【0079】Kabat 編號系統一般用於表示可變區的殘基(輕鏈約 1-107 的殘基及重鏈約 1-113 的殘基)(例如，Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。“EU 編號系統”或“EU 索引”一般用於表示免疫球蛋白重鏈恆定區中的殘基(例如，EU 編號揭示於 Kabat et al., supra)。“Kabat

中的 EU 索引"表示人類 IgG_1 EU 抗體的殘基編號。除非本文另有說明，抗體可變區中殘基編號的表示係指利用 Kabat 編號系統的殘基編號。除非本文另有說明，抗體恆定區中殘基的編號係指利用 EU 編號系統的殘基編號(參照，例如，WO 2006073941)。

重鏈：H27、H31、H32、H33、H35、H50、H58、H59、H61、H62、H63、H64、H65、H99、H100b 及 H102

輕鏈：L24、L27、L28、L32、L53、L54、L56、L90、L92 及 L94

【0080】這些改變的位置 H32、H61、L53、L90 及 L94 被認為是高度通用的改變位置。

【0081】當抗原為 IL-6 受體時(例如，人類 IL-6 受體)，較佳的改變位置包括以下。然而，此改變位置並無特別限制。

重鏈：H27、H31、H32、H35、H50、H58、H61、H62、H63、H64、H65、H100b 及 H102

輕鏈：L24、L27、L28、L32、L53、L56、L90、L92 及 L94

【0082】特別是，組胺酸或非天然胺基酸置換的較佳組合包括，例如，H27、H31 及 H35 的組合；H27、H31、H32、H35、H58、H62 及 H102 的組合；L32 及 L53 的組合；以及 L28、L32 及 L53 的組合。再者，重鏈及輕鏈中較佳的置換組合包括，例如，H27、H31、L32 及 L53 的組合。

【0083】這些位置中，組胺酸或非中性胺基酸可僅在一個位置或一個以上的位置被置換。

【0084】當抗原-結合分子為具有抗體恆定區的物質時，降低(減少)在酸性 pH 值範圍下抗原-結合分子的抗原-結合活性至低於在中性 pH 值範圍下的方法，包括，例如，改變抗體恆定區中胺基酸的方法。特別是，此方法包括，例如，置換恆定區的方法，如 WO 2009/125825 (序列識別號 s: 11、12、13 及 14)所示。置換抗體恆定區的方法包括，例如，評估各種恆定區的亞型(isotype)(IgG1、IgG2、IgG3 及 IgG4)，以及選擇降低在酸性 pH 值範圍下抗原-結合活性的同型種類(增加在酸性 pH 值範圍下的解離速率)。此方法也包括藉由對野生型亞型(野生型 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的胺基酸序列)的胺基酸序列進行胺基酸置換，以降低在酸性 pH 值範圍下抗原-結合活性的方法。抗體恆定區中的絞鍊區(hinge region)序列在不同亞型中(IgG1、IgG2、IgG3 及 IgG4)有很大的不同，且絞鍊區胺基酸的差異會對抗原-結合活性造成很大的影響。因此，可依據抗原或抗原決定位的種類，可選擇適當的亞型以降低在酸性 pH 值範圍下的抗原-結合活性。再者，由於絞鍊區胺基酸的差異會對抗原-結合活性造成很大的影響，因此野生型亞型胺基酸序列的較佳胺基酸置換位置可在絞鍊區內。

【0085】當抗原-結合分子於酸性 pH 值範圍下的抗原-結合活性利用上述方法或其類似方法被減少(減弱)至小於其在中性 pH 值範圍下的活性(當 KD (於酸性 pH 值範圍)/KD (於中性 pH 值範圍)值增加時)時，相較於原抗體，KD(於酸性 pH 值範圍)/KD(於中性 pH 值範圍)值一般為兩倍或以上，較佳為 5 倍或以上，且更佳為 10 倍或以上，但不以此為限。

【0086】上述方法可用於形成抗原-結合分子，其於酸性 pH 值範圍下的抗原-結合活性小於在中性 pH 值範圍下的活性，可藉由對不具此特性的抗原結合分子進行胺基酸置換或插入完成。其他方法包括直接獲得具有上述特性之抗原-結合分子的方法。例如，利用由抗原免疫動物(小鼠、大鼠、倉鼠、兔子、人免疫球蛋白轉基因小鼠、人免疫球蛋白轉基因大鼠、人免疫球蛋白轉基因兔、無峰駝、駱駝等)所獲得之抗體的 pH-依賴性抗原結合特性作為篩選指標，直接選擇出具所欲特性的抗體。抗體可以融合瘤技術或 B-細胞複製技術製備 (Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Jul 23; 93(15): 7843-8; J Immunol Methods. 2006 Oct 20; 316(1-2): 133-43；Journal of the Association for Laboratory Automation；WO 2004/106377；WO 2008/045140；及 WO 2009/113742)，其為習知技術，但不限於此。再者，利用由體內(in vivo)表現抗原-結合區的資料庫獲得之 pH-依賴性抗原結合特性作為篩選指標，以直接選擇出具所欲特性的抗體。此資料庫包括習知的人類自然資料庫(human naive library)、非人類動物及人類免疫資料庫、半合成資料庫及合成資料庫(Methods Mol Biol. 2002; 178: 87-100; J Immunol Methods. 2004 Jun; 289(1-2): 65-80; and Expert Opin Biol Ther. 2007 May; 7(5): 763-79)，但不限於此。然而，此方法並不特別限於這些例子。

【0087】本發明使用不同的pH值以作為血漿及核內體間不同的環境，以用於分析抗原結合分子在血漿及核內體對抗原不同的結合親和力(血漿中的強結合力及核內體的弱結合力)。由

於血漿及核內體的環境差異不僅是 pH 不同，抗原-結合分子對抗原的 pH-依賴性結合活性可因使用其他在血漿及核內體具有不同濃度的因子而被置換。此因子也可被使用產生一種抗體，其在血漿中與抗原結合，但在核內體中與抗原分離。因此，本發明也包括一包含抗原-結合區及人類 FcRn-結合區的抗原-結合分子，其在酸性及中性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性，以及於核內體有一比在血漿中低的抗原-結合活性，其中血漿中的人類 FcRn-結合活性比完整人類 IgG 的人類 FcRn-結合活性強。

【0088】增加在中性 pH 範圍下本發明之抗原-結合分子中人類 FcRn-結合區之人類-結合活性的方法並無特別限制，且可以任何方法增加。特別是，當 IgG 型免疫球蛋白的 Fc 區被用作人類 FcRn-結合區時，可藉由改變其胺基酸來增加中性 pH 範圍下的人類 FcRn-結合活性。此較佳之 IgG 型免疫球蛋白的 Fc 區可被改變包括，例如，親代人類 IgG 的 Fc 區(IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 及其基因工程的變異)。任何位置的胺基酸可被改變為其他胺基酸，只要可給予或增加在中性 pH 範圍下的人類 FcRn-結合活性。當抗原-結合分子具有一人類 IgG1 Fc 區，如同人類 FcRn-結合區，則相較於親代人類 IgG1，較佳此分子在中性 pH 範圍下與人類 FcRn 的結合位置有改變。胺基酸的改變包括，例如，第 221 至 225、227、228、230、232、233 至 241、243 至 252、254 至 260、262 至 272、274、276、278 至 289、291 至 312、315 至 320、324、325、327 至 339、341、343、345、360、362、370、375 至 378、380、382、385 至 387、

389、396、414、416、423、424、426至438、440及442(EU編號)位置的胺基酸。更特別是，此胺基酸改變包括，例如，如表1所示。可藉由上述改變，使中性pH範圍下IgG型之免疫球蛋白的Fc區具有人類FcRn結合活性。

【0089】再者，相較於親代人類IgG，此改變可給予在酸性pH範圍下與人類FcRn結合的能力，如表2所述之例子。當適當地改變擇自於上述改變，使其可給予在中性pH範圍下結合至人類FcRn的能力時，其皆適用於本發明。再者，改變的組合，使Fv4-IgG1具有在酸性環境下結合至人類FcRn的能力，如表6-1及6-2。親代人類IgG Fc區較佳的胺基酸改變包括，例如，第237、238、239、248、250、252、254、255、256、257、258、265、270、286、289、297、298、303、305、307、308、309、311、312、314、315、317、325、332、334、360、376、380、382、384、385、386、387、389、424、428、433、434及436(EU編號)位置的胺基酸。可藉由將擇自於上述任一胺基酸置換為其他胺基酸，以增加抗原-結合分子的人類FcRn-結合活性。

【0090】此改變更佳包括，例如，

親代IgG Fc區的第237個胺基酸由Gly置換為Met；

第238個胺基酸由Pro置換為Ala；

第239個胺基酸由Ser置換為Lys；

第248個胺基酸由Lys置換為Ile；

第250個胺基酸由Thr置換為Ala、Phe、Ile、Met、Gln、Ser、Val、Trp、或Tyr；

第 252 個胺基酸由 Met 置換為 Phe、Trp、或 Tyr；

第 254 個胺基酸由 Ser 置換為 Thr；

第 255 個胺基酸由 Arg 置換為 Glu；

第 256 個胺基酸由 Thr 置換為 Asp、Glu、或 Gln；

第 257 個胺基酸由 Pro 置換為 Ala、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr 或 Val；

第 258 個胺基酸由 Glu 置換為 His；

第 265 個胺基酸由 Asp 置換為 Ala；

第 270 個胺基酸由 Asp 置換為 Phe；

第 286 個胺基酸由 Asn 置換為 Ala 或 Glu；

第 289 個胺基酸由 Thr 置換為 His；

第 297 個胺基酸由 Asn 置換為 Ala；

第 298 個胺基酸由 Ser 置換為 Gly；

第 303 個胺基酸由 Val 置換為 Ala；

第 305 個胺基酸由 Val 置換為 Ala；

第 307 個胺基酸由 Thr 置換為 Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、Trp、或 Tyr；

第 308 個胺基酸由 Val 置換為 Ala、Phe、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、或 Thr；

第 309 個胺基酸由 Leu 或 Val 置換為 Ala、Asp、Glu、Pro、或 Arg；

第 311 個胺基酸由 Gln 置換為 Ala、His 或 Ile；

第 312 個胺基酸由 Asp 置換為 Ala 或 His；

第 314 個胺基酸由 Leu 置換為 Lys 或 Arg；

第 315 個胺基酸由 Asn 置換為 Ala 或 His；

第 317 個胺基酸由 Lys 置換為 Ala；

第 325 個胺基酸由 Asn 置換為 Gly；

第 332 個胺基酸由 Ile 置換為 Val；

第 334 個胺基酸由 Lys 置換為 Leu；

第 360 個胺基酸由 Lys 置換為 His；

第 376 個胺基酸由 Asp 置換為 Ala；

第 380 個胺基酸由 Glu 置換為 Ala；

第 382 個胺基酸由 Glu 置換為 Ala；

第 384 個胺基酸由 Asn 或 Ser 置換為 Ala；

第 385 個胺基酸由 Gly 置換為 Asp 或 His；

第 386 個胺基酸由 Gln 置換為 Pro；

第 387 個胺基酸由 Pro 置換為 Glu；

第 389 個胺基酸由 Asn 置換為 Ala 或 Ser；

第 424 個胺基酸由 Ser 置換為 Ala；

第 428 個胺基酸由 Met 置換為 Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、Trp、或 Tyr；

第 433 個胺基酸由 His 置換為 Lys；

第 434 個胺基酸由 Asn 置換為 Ala、Phe、His、Ser、Trp、或 Tyr；

以及第 436 個胺基酸由 Tyr 置換為 His 或 Phe (EU 編號)；

【0091】再者，胺基酸改變的數目並無特別限制；其可能僅在一個位置或二個或以上位置改變。二個或多個胺基酸改變

的組合包括，例如，如表 3 所示。相較於表 4-1 至 4-5 的親代人類 IgG，此改變的組合可賦與在酸性 pH 範圍下結合至人類 FcRn 的能力。當適當的改變組合擇自於上述改變以賦與在中性 pH 範圍下結合至人類 FcRn 的能力時，其皆適用於本發明。再者，改變的組合，使 Fv4-IgG1 在酸性環境下具有結合至人類 FcRn 的能力，如表 6-1 及 6-2。

【0092】表中的符號"^"顯示插入於氨基酸 EU 編號數目之後。例如，^281S 係指 S 插入第 281 及 282 EU 編號位置之間。

【0093】表 1

位置	胺基酸的置換
256	P
280	K
339	T
385	H
428	L
434	W、Y、F、A、H

【0094】表 2

位置	胺基酸的改變	位置	胺基酸的改變
221	Y, K	299	W, F, H, Y
222	Y	300	K, A, G, V, M, Q, N, E
223	E, K	301	E
224	Y, E	302	I
225	E, K, W	303	Y, E, A
227	K, E, G	304	N, T
228	Y, K, G	305	A, H
230	E, G	306	Y
232	K	307	A, E, M, G, Q, H
233	R, S, M, T, W, Y, G	308	A, R, F, C, Y, W, N, H
234	H, R, E, I, V, F, D, Y, G	311	A, I, K, L, M, V, W, T, H
235	Y, V, N, S, T, Q, D	312	A, P, H
236	I, V, K, P, E, Q, H, W, Y, D, T, M, A, F, S, N, R	315	T, H
237	I, W, S, T, E, R, N, Q, K, H, D, P, L, M	316	K
238	A, L, D, S, T, H, W, V, I, G, M, F, E, K	317	A, P, H
239	M, R, T, G, V, E, D, L, A	318	N, T, R, L, Y
240	I, M, T	319	L, I, W, H, M, V, A
241	E, W, L	320	L, W, H, N
243	E, W	324	T, D
244	L	325	F, M, D
245	R	326	A
246	Y, H	327	D, K, M, Y, H, L
247	D	328	G, A, W, R, F
248	Y	329	K, R, W
249	P, Q, Y, H	330	G, W, V, P, H, F
250	I, E, Q	331	L, F, Y
251	T, D	332	F, H, K, L, M, R, S, W, T, Q, E, Y, D, N, V
252	Y, W, Q	333	L, F, M, A
254	H	334	A
255	E, Y, H	335	H, F, N, V, M, W, I, S, P, L
256	A	336	E, K
257	A, I, M, N, S, V, T, L, Y, C	337	A
258	D, Y, H, A	338	A
259	I, F, N	339	N, W
260	S, D, E, H, Y	341	P
262	L, E	343	E, H, K, Q, R, T, Y
263	I	360	H, A
264	F, A, I, T, N, S, D	362	A
265	R, P, G, A	375	R
266	I	376	A, G, I, M, P, T, V
267	K, E, A	377	K
268	E, M	378	Q, D, N, W
269	M, W, K, P, I, S, G, V, F, Y, A	380	A, N, S, T, Q, R, H
270	K, S, I, A	382	A, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y
271	A, V, S, Y, I, T	385	N, E
272	A, L, R, I, D, H, V, W, Y, P, T	386	H
274	M, F, G, E, I ,T, N	387	H, Q
276	D, F, H, R, L, V, W, A	414	A
278	R, S, V, M, N, I, L, D	423	N
279	A, D, G, H, M, N, Q, R, S, T, W, Y, C, I	424	A
281	D, Y	426	H, L, V, R
282	G, K, E, Y	427	N
283	A, D, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, W, Y	428	F
284	T, L, Q, E	429	Q
285	N, Y, W, Q, K, E, D, Y	430	A, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, Y
286	F, L, Y, E, P, D, K, A	431	H, K
287	S, H	432	H
288	N, P, Y, H, D, I, V, C, E, G, L, Q, R	433	P
299	H	434	G, T, M, S
291	Q, H	435	K
292	Y, E, D	436	I, L, T
293	V	437	H
294	I, K, G	438	K, L, T, W
295	V, T	440	K
296	E, I, L	442	K
298	F, E, T, H		

【0095】表 3

胺基酸置換的合併
M252Y/S254T/T256E
M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F/Y436H
H433K/N434F/Y436H
T307A/E380A
T307A/E380A/N434H
T307A/E380A/N434A
N434H/N315H
N434H/T289H
N434H/T370A/E380A
T250Q/M428L
T250Q/N434A
M252W/N434A
M252Y/N434A
T256A/N434A
T256D/N434A
T256E/N434A
T256S/N434A
P257I/Q311I
T307A/N434A
T307E/N434A
T308Q/N434A
V308P/N434A
L309G/N434A
Q311H/N434A
Q311R/N434A
N315D/N434A
A378V//N434A
E380S//N434A
E382V/N434A
S424E/N434A
M428L/N434A
N434A/Y436I
T437Q/N434A
T437R/N434A

【0096】表 4-1

胺基酸置換的合併
L243I/L235D
G236/V308F/I332E
G236R/L328R
G236A/I332E/N434S
S239E/V264I/A330Y/I332E
S239E/V264I/I332E
S239E/264I/S298A/A330Y/I332E
S239D/D265H/N297D/I332E
S239D/E272Y/I332E
S239D/E272S/I332E
S239D/E272I/I332E
S239D/N297D/I332E
S239D/K326T/I332E
S239Q/I332Q
S239Q/I332N
S239D/I332D
S239D/I332E
S239Q/I332E
S239E/I332E
F241W/F243W
F241Y/F243Y/V262T/V264T
F241W/F243W/V262A/V264A
F241L/262I
F243L/V262I/V264W
F243L/K288D/R292P/Y300L/V305I/P396L/H435K
F243L/K288D/R292P/Y300L/H435K
F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L/H435K
P245G/V308F
T250I/V259I/V308F
T250I/V308F
T250I/308F/N434S
T250Q/V308F/M428L
T250Q/M428L
L251I/N434S
L251N/N434S
L251F/N434S
L251V/N434S
L251M/N434S
T252L/T254S/T256F
M252Y/S254T/T256E/N434M
M252Y/S254T/T256E/M428L/N434S
M252Y/S254T/T256E
M252Y/S254T/T256E/V308F
M252Y/S254T/T256E/N434S
M252Y/S254T/T256E/N434A
M252Y/S254T/T256E/M428L
M252Y/S254T/T256E/T307Q
M252F/T256D
M252Y/T256Q
M252Y/P257L
M252Y/P257N
M252Y/V259I
M252Y/V279Q
M252Y/V308P/N434Y
M252Q/V308F
M252Y/V308F

表 4-2 接續表 4-1

【0097】表 4-2

M252Q/V308F/N434S
M252Y/V308F/M428L
M252Y/V308F/N434M
M252Y/V308F/N434S
M252Y/Y319I
M252Q/M428L/N434S
M252Y/M428L
M252Y/N434M
M252Y/N434S
M252Y/N434A
M252Y/N434Y
S254T/V308F
R255H/N434A
R255Q/N434S
R255H/N434S
T256V/V308F
T256P/Q311I
T256P/I332E
T256P/I332E/S440Y
T256P/E430Q
T256P/N434H
T256E/N434Y
T256P/S440Y
P257Y/V279Q
P257L/V279E
P257N/V279Q
P257N/V279E
P257N/V279Y
P257L/V279Q
P257N/^281S
P257L/^281S
P257N/V284E
P257N/L306Y
P257L/V308Y
P257L/V308F
P257N/V308Y
P257I/Q311I/N434H
P257L/Q311V
P257L/G385N
P257L/M428L
P257I/E430Q
P257I/N434H
P257L/N434Y
E258H/N434A
E258H/N434H
V259I/T307Q/V308F
V259I/V308F
V259I/V308F/Y319L
V259I/V308F/Y319I
V259A/V308F
V259I/V308F/N434M
V259I/V308F/N434S
V259I/V308F/M428L/N434S
V259I/V308F/M428L
V259I/Y319I
V259I/Y319I/N434S
V259I/M428L
V259I/M428L/N434S
V259I/N434S

表 4-3 接續表 4-2。

【0098】表 4-3

V259I/N434Y
V246I/A330L/I332E
V264I/I332E
D265F/N297E/I332E
S267L/A327S
E272R/V279L
V279E/V284E
V279Q/V306Y
V297Y/V308F
V279Q/G385H
^281S/V308Y
^281S/V308F
^281S/N434Y
E283F/V284E
V284E/V308F
V284E/G385H
K288A/N434A
K288D/H435K
K288V/H435D
T289H/N434A
T289H/N434H
L306I/V308F
T307P/V308F
T307Q/V308F/N434S
T307Q/V308F/Y319L
T307S/V308F
T307Q/V308F
T307A/E310A/N434A
T307Q/E380A/N434A
T307Q/M428L
T307Q/N434M
T307I/N434S
T307V/N434S
T307Q/N434S
T307Q/N434Y
V308T/L309P/Q311S
V308F/L309Y
V308F/Q311V
V308F/Y319F
V308F/Y319I/N434M
V308F/Y319I
V308F/Y319L
V308F/Y319I/M428L
V308F/Y319I/M428L/N434S
V308F/Y319L/N434S
V308F/I332E
V308F/G385H
V308F/M428L/N434M
V308F/M428L
V308F/M428L/N434S
V308P/N434Y
V308F/N434M
V308F/N434S
V308F/N434Y
Q311G/N434S
Q311D/N434S
Q311E/N434S
Q311N/N434S

表 4-4 接續表 4-3

【0099】表 4-4

Q311Y/N434S
Q311F/N434S
Q311W/N434S
Q311A/N434S
Q311K/N434S
Q311T/N434S
Q311R/N434S
Q311L/N434S
Q311M/N434S
Q311V/N434S
Q311I/N434S
Q311A/N434Y
D312H/N434A
D312H/N434H
L314Q/N434S
L314V/N434S
L314M/N434S
L314F/N434S
L314I/N434A
N315H/N434H
Y319I/V308F
Y319I/M428L
Y319I/M428L/N434S
Y319I/N434M
Y319I/N434S
L328H/I322E
L328N/I322E
L328E/I322E
L328I/I322E
L328Q/I322E
L328D/I322E
L328R/M428L/N434S
A330L/I332E
A330Y/I332E
I332E/D376V
I332E/E345D
D376V/E430Q
D376V/E430R
D376V/N434H
E380A/N434A
G385R/Q386T/P387R/N389P
G385D/Q386P/N389S
N414F/Y416H
M428L/N434M
M428L/N434S
M428L/N434A
M428L/N434Y
H429N/N434S
E430D/N434S
E430T/N434S
E430S/N434S
E430A/N434S
E430F/N434S
E430Q/N434S
E430L/N434S
E430I/N434S
A431T/N434S

表 4-5 接續表 4-4

【0100】表 4-5

A431S/N434S
A431G/N434S
A431V/N434S
A431N/N434S
A431F/N434S
A431H/N434S
L432F/N434S
L432N/N434S
L432Q/N434S
L432H/N434S
L432G/N434S
L432I/N434S
L432V/N434S
L432A/N434S
H433K/N434F
H433L/N434S
H433M/N434S
H433A/N434S
H433V/N434S
H433K/N434S
H433S/N434S
H433P/N434S
H433S/M428L
H433S/Y436D
H433S/Y436Q
H433S/Y436M
H433S/Y436G
H433S/Y436E
H433S/Y436F
H433S/Y436T
H433S/Y436R
H433S/Y436S
H433S/Y436H
H433S/Y436K
H433S/Y436L
H433S/Y436V
H433S/Y436W
H433S/Y436I
H433S/Y437I

【0101】胺基酸適當地的改變可利用習知方法完成。例如完整人類 IgG1 Fc 區中的改變可參照 Drug Metab Dispos. 2007 Jan. 35(1): 86-94; Int Immunol. 2006 Dec. 18, (12): 1759-69；J Biol Chem. 2001 Mar. 2, 276(9): 6591-604; J Biol Chem. (2007) 282(3): 1709-17；J Immunol. (2002) 169(9): 5171-80；J Immunol. (2009) 182(12): 7663-71；Molecular Cell, Vol. 7, 867-877, April, 2001; Nat Biotechnol. 1997 Jul. 15, (7): 637-40；Nat Biotechnol. 2005 Oct. 23, (10): 1283-8；Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Dec.

5, 103(49): 18709-14; EP 2154157；US 20070141052；WO 2000/042072；WO 2002/060919；WO 2006/020114；WO 2006/031370；WO 2010/033279；WO 2006/053301；及 WO 2009/086320。

【0102】根據 Journal of Immunology (2009) 182: 7663-7671 的內容，在酸性 pH 範圍下(pH 6.0)完整人類 IgG1 的人類 FcRn-結合活性為 KD 1.7 微莫耳，但在中性 pH 範圍下無法偵測到此活性。因此，在一較佳實施例中，此抗原-結合分子可用於本發明之方法中，包括在酸性 pH 範圍下人類 FcRn-結合活性為 KD 20 微莫耳或更高，以及在中性 pH 範圍下比完整人類 IgG 相同或更高。在一更佳實施例中，此抗原-結合分子包括在酸性 pH 範圍下人類 FcRn-結合活性為 KD 2.0 微莫耳或更高，及在中性 pH 範圍下為 KD 40 微莫耳或更高的抗原-結合分子。在一更佳實施例中，此抗原-結合分子包括在酸性 pH 範圍下人類 FcRn-結合活性為 KD 0.5 微莫耳或更高，及在中性 pH 範圍下為 KD 15 微莫耳或更高的抗原-結合分子。上述 KD 值可以 Journal of Immunology (2009) 182: 7663-7671 (藉由將抗原-結合分子固定於晶片上，並滴入人類 FcRn 作為分析物)所述方法偵測。

【0103】解離常數(KD)可被使用作為人類 FcRn-結合活性的數值。然而，因為完整人類 IgG 的人類 FcRn-結合活性在中性 pH 範圍下(pH 7.4)具有低的人類 FcRn-結合活性，因此難以計算活性即 KD。用於評估人類 FcRn-結合活性在 pH 7.4 時是否高於完整人類 IgG 之 FcRn-結合活性的方法包括在滴入相同

濃度的分析後 Biacore 反應強度的評估方法。特別是，當在人類 FcRn 晶片與 pH 7.4 之抗原-結合分子固定後的反應高於在人類 FcRn 晶片與 pH 7.4 之完整的人類 IgG 固定後的反應，則判斷在 pH 7.4 下抗原-結合分子的人類 FcRn-結合活性高於完整人類 IgG 的人類 FcRn-結合活性。

【0104】pH 7.0 可作為一種中性 pH 範圍。使用 pH 7.0 作為中性 pH 可促進人類 FcRn 與 FcRn-結合區間微弱的反應。對於分析條件中所使用的溫度，可在 10℃至 50℃的任何溫度下進行分析結合親和力。為偵測人類 FcRn-結合區及人類 FcRn 間的結合親和力，較佳可使用 15℃至 40℃之間的溫度。為偵測人類 FcRn-結合區及人類 FcRn 間的結合親和力，更佳可使用 20℃至 35℃之間的溫度，例如 20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34 及 35℃中的任一種溫度。實施例 5 中所述之 25℃為本發明之一實施例。在一較佳實施例，人類 FcRn 與 FcRn-結合區之間的反應可在 pH 7.0 及 25℃下進行測定，如實施例 5 所述。抗原-結合分子的結合親和力可利用 Biacore 進行測定，如實施例 5 所述。

【0105】在一更佳實施例中，本發明之抗原-結合分子在 pH 7.0 及 25℃下具有 FcRn-結合活性，其高於完整的人類 IgG。在一較佳實施例中，人類 FcRn-結合活性在 pH 7.0 及 25℃下比完整的人類 IgG 高 28 倍，或大於 KD 3.2 微莫耳。在一較佳實施例中，人類 FcRn-結合活性在 pH 7.0 及 25℃下比完整的人類 IgG 高 38 倍，或大於 KD 2.3 微莫耳。

【0106】相較於抗原-結合分子之人類 FcRn 結合活性或體

內活性，完整人類 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 較佳被使用作為對照之完整人類 IgG(reference intact human IgG)的完整人類 IgG。對照之抗原-結合分子較佳可包括相同的抗原-結合區以作為所欲抗原-結合分子，以及完整的人類 IgG Fc 區作為人類 FcRn-結合區。相較於抗原-結合分子之人類 FcRn 結合活性或體內活性，完整的人類 IgG1 較佳可被使用作為對照之完整人類 IgG。

【0107】更特別是，本發明之抗原-結合分子具有長時間移除血漿中抗原的能力，其人類 FcRn-結合活性在 pH 7.0 及 25℃下比完整的人類 IgG 高 28 倍至 440 倍，或具有 3.0 微莫耳至 0.2 微莫耳的 KD。為了評估本發明抗原-結合分子在移除血漿中抗原之活性的長時間效果，可藉由測量總或自由血漿抗原濃度，及在給予抗原-結合分子後的 2、4、7、14、28、56 或 84 天測量抗原/抗原-結合分子的莫耳比來得知長時間的血漿抗原濃度。不論血漿抗原濃度或抗原/抗原-結合分子莫耳比的減少是否為利用本發明之抗原-結合分子所達成，仍可藉由評估上述一或多個時間點的減少來判斷。

【0108】更特別是，本發明之抗原-結合分子具有短時間移除血漿中抗原的能力，人類 FcRn-結合活性在 pH 7.0 及 25℃下比完整的人類 IgG 高 440 倍，或具有 0.2 微莫耳的 KD。為了評估本發明抗原-結合分子在移除血漿中抗原之活性的短時間效果，可藉由測量總或自由血漿抗原濃度，及在給予抗原-結合分子後的 15 分鐘、1、2、4、8、12 或 24 小時測量抗原/抗原-結合分子莫耳比來得知短時間的血漿抗原濃度。

【0109】不論目標抗原的種類，本發明之方法可適用於任何抗原-結合分子。

【0110】抗原可被抗原-結合分子所辨識，例如，本發明之方法中所欲之抗體並無特別限制。此所欲之抗體可辨識任何抗原。藥物動力特性藉由本發明方法被改善的抗體，包括，例如，受體蛋白(膜結合型受體與可溶性受體)、辨識膜抗原之抗體，例如，細胞表面標誌物，以及辨識可溶性抗原之抗體，例如，細胞激素。藥物動力特性藉由本發明方法被改善之抗體所辨識的抗原包括，例如：17-IA、4-1 BB、4Dc、6-keto-PGF1a、8-iso-PGF2a、8-oxo-dG、A1 腺苷酸受體、A33、ACE、ACE-2、激活素(Activin)、激活素 A、激活素 AB、激活素 B、激活素 C、激活素 RIA、激活素 RIA ALK-2、激活素 RIB ALK-4、激活素 RIIA、激活素 RIIB、ADAM、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17/TACE、ADAM8、ADAM9、ADAMTS、ADAMTS4、ADAMTS5、Addressins、脂聯素、ADP 核醣環化酶、aFGF、AGE、ALCAM、ALK、ALK-1、ALK-7、過敏原、α1-抗胰凝乳白酶、α1-抗胰蛋白酶、α-突觸核蛋白、α-V/β-1 拮抗劑、aminin、澱素、類澱粉 β、類澱粉免疫球蛋白重鏈可變區、類澱粉免疫球蛋白輕鏈可變區、雄激素、ANG、血管收縮素原、促血管生成素配體-2、抗-Id、抗凝血酶 III、炭疽病、APAF-1、APE、APJ、apo A1、apo 血清澱粉 A、Apo-SAA、APP、APRIL、AR、ARC、ART、Artemin、ASPARTIC、心房利尿鈉因子、心房利尿鈉肽、心房利尿鈉 A、心房利尿鈉 B、心房利尿鈉 C、av/b3 整合素、Axl、B7-1、B7-2、B7-H、BACE、BACE-1、炭疽桿

菌保護抗原、Bad、BAFF、BAFF-R、Bag-1、BAK、Bax、BCA-1、BCAM、Bcl、BCMA、BDNF、b-ECGF、β-2-微球蛋白、β內醯胺酶、bFGF、BID、Bik、BIM、BLC、BL-CAM、BLK、B-淋巴細胞刺激因子(BIyS)、BMP、BMP-2 (BMP-2a)、BMP-3 (成骨素)、BMP-4 (BMP-2b)、BMP-5、BMP-6 (Vgr-1)、BMP-7 (OP-1)、BMP-8 (BMP-8a)、BMPR、BMPR-IA (ALK-3)、BMPR-IB (ALK-6)、BMPR-II (BRK-3)、BMPs、BOK、Bombesin、骨源神經營養因子、牛生長激素、BPDE、BPDE-DNA、BRK-2、BTC、B-淋巴細胞黏附分子、C10、C1-抑製劑、C1q、C3、C3a、C4、C5、C5a(補體 5a)、CA125、CAD-8、鈣黏蛋白-3、降鈣素、cAMP、碳酸酐酶-IX、癌胚胎抗原(CEA)、癌相關抗原、心肌營養素-1、細胞自溶素 A、細胞自溶素 B、細胞自溶素 C/DPPI、細胞自溶素 D、細胞自溶素 E、細胞自溶素 H、細胞自溶素 L、細胞自溶素 O、細胞自溶素 S、細胞自溶素 V、細胞自溶素 X/Z/P、CBL、CCI、CCK2、CCL、CCL1/I-309、CCL11/趨化激素、CCL12/MCP-5、CCL13/MCP-4、CCL14/HCC-1、CCL15/HCC-2、CCL16/HCC-4、CCL17/TARC、CCL18/PARC、CCL19/ELC、CCL2/MCP-1、CCL20/MIP-3-α、CCL21/SLC、CCL22/MDC、CCL23/MPIF-1、CCL24/趨化激素-2、CCL25/TECK、CCL26/趨化激素-3、CCL27/CTACK、CCL28/MEC、CCL3/M1P-1-α、CCL3L1/LD-78-β、CCL4/MIP-1-β、CCL5/RANTES、CCL6/C10、CCL7/MCP-3、CCL8/MCP-2、CCL9/10/MTP-1-γ、CCR、CCR1、CCR10、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CD1、CD10、CD105、CD11a、CD11b、CD11c、CD123、

CD13、CD137、CD138、CD14、CD140a、CD146、CD147、CD148、CD15、CD152、CD16、CD164、CD18、CD19、CD2、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD26、CD27L、CD28、CD29、CD3、CD30、CD30L、CD32、CD33 (p67 蛋白)、CD34、CD37、CD38、CD3E、CD4、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD49a、CD49b、CD5、CD51、CD52、CD54、CD55、CD56、CD6、CD61、CD64、CD66e、CD7、CD70、CD74、CD8、CD80 (B7-1)、CD89、CD95、CD105、CD158a、CEA、CEACAM5、CFTR、cGMP、CGRP 受體、CINC、CKb8-1、Claudin18、CLC、肉毒桿菌毒素、困難梭狀桿菌毒素、產氣莢膜梭菌毒素、c-Met、CMV、CMV UL、CNTF、CNTN-1、補體因子 3 (C3)、補體因子 D、皮質類固醇結合球蛋白、集落刺激因子-1 受體、COX、C-Ret、CRG-2、CRTH2、CT-1、CTACK、CTGF、CTLA-4、CX3CL1/Fractalkine、CX3CR1、CXCL、CXCL1/Gro-α、CXCL10、CXCL11/I-TAC、CXCL12/SDF-l-α/β、CXCL13/BCA-1、CXCL14/BRAK、CXCL15/Lungkine、CXCL16、CXCL16、CXCL2/Gro-β、CXCL3/Gro-γ、CXCL3、CXCL4/PF4、CXCL5/ENA-78、CXCL6/GCP-2、CXCL7/NAP-2、CXCL8/IL-8、CXCL9/Mig、CXCL10/IP-10、CXCR、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、半胱氨酸蛋白酶抑制劑 C、細胞角質蛋白腫瘤相關抗原、DAN、DCC、DcR3、DC-SIGN、衰變加速因子、類 Delta 蛋白配體 4、des(1-3)-IGF-1 (腦 IGF-1)、Dhh、DHICA 氧化酶、Dickkopf-1、地高辛、二肽基肽酶 IV、DKl、DNAM-1、Dnase、Dpp、DPPIV/CD26、Dtk、ECAD、EDA、

EDA-A1、EDA-A2、EDAR、EGF、EGFR (ErbB-1)、類表皮生長因子域蛋白 7、彈性蛋白酶、彈性蛋白、EMA、EMMPRIN、ENA、ENA-78、內皮唾酸蛋白、內皮素受體、內毒素、腦啡肽酶、eNOS、Eot、趨化因子、趨化因子-2、eotaxini、EpCAM、Ephrin B2/EphB4、Epha2 酪氨酸激酶受體、表皮生長因子受體(EGFR)、ErbB2 受體、ErbB3 酪氨酸激酶受體、ERCC、紅細胞生成素(EPO)、紅細胞生成素受體、E-選擇素、ET-1、Exodus-2、RSV 的 F 蛋白、F10、F11、F12、F13、F5、F9、第 Ia 凝血因子、第 IX 凝血因子、第 Xa 凝血因子、第 VII 凝血因子、第 VIII 凝血因子、第 VIIIc 凝血因子、Fas、FcαR、Fc epsilonRI、FcγIIb、FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIIa、FcγRIIIb、FcRn、FEN-1、Ferritin、FGF、FGF-19、FGF-2、FGF-2 receptor、FGF-3、FGF-8、FGF-酸性、FGF-鹼性、FGFR、FGFR-3、纖維蛋白、成纖維細胞激活蛋白(FAP)、成纖維細胞生長因子、成纖維細胞生長因子-10、纖維連接蛋白、FL、FLIP、Flt-3、FLT3 配體、葉酸受體、黃體刺激素(FSH)、Fractalkine (CX3C)、自由重鏈、自由輕鏈、FZD1、FZD10、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、G250、Gas 6、GCP-2、GCSF、G-CSF、G-CSF 受體、GD2、GD3、GDF、GDF-1、GDF-15(MIC-1)、GDF-3(Vgr-2)、GDF-5 (BMP-14/CDMP-1)、GDF-6 (BMP-13/CDMP-2)、GDF-7 (BMP-12/CDMP-3)、GDF-8 (肌肉生長抑制素)、GDF-9、GDNF、凝溶膠蛋白、GFAP、GF-CSF、GFR-α1、GFR-α2、GFR-α3、GF-β1、gH 套膜醣蛋白、GITR、胰高糖素、胰高血糖素受體、類胰高血糖素胜肽 1 受體、Glut 4、麩胺酸

羧基胜肽 II、醣蛋白激素受體、醣蛋白 IIb/IIIa (GP IIb/IIIa)、磷脂醯肌醇-3、GM-CSF、GM-CSF 受體、gp130、gp140、gp72、顆粒球-CSF (G-CSF)、GRO/MGSA、生長激素釋放因子、GRO-β、GRO-γ、幽門螺旋菌、半抗原(NP-cap 或 NIP-cap)、HB-EGF、HCC、HCC 1、HCMV gB 套膜醣蛋白、HCMV UL、造血生長因子(HGF)、Hep B gp120、肝素酶、肝素輔因子 II、肝細胞生長因子、炭疽芽孢桿菌保護性抗原、C 型肝炎病毒 E2 醣蛋白、E 型肝炎、人鐵調素、Her1、Her2/neu (ErbB-2)、Her3 (ErbB-3)、Her4 (ErbB-4)、單純皰疹病毒(HSV) gB 醣蛋白、HGF、HGFA、高分子量黑色素瘤相關抗原(HMW-MAA)、HIV 套膜蛋白，例如 GP120、HIV MIB gp 120 V3 loop、HLA、HLA-DR、HM1.24、HMFG PEM、HMGB-1、HRG、Hrk、HSP47、Hsp90、HSV gD 醣蛋白、人類心肌肌球蛋白、人類巨細胞病毒(HCMV)、人類生長激素(hGH)、人類血清白蛋白、組人類組織型纖溶酶原激活物(t-PA)、亨丁頓、HVEM、IAP、ICAM、ICAM-1、ICAM-3、ICE、ICOS、IFN-α、IFN-β、IFN-γ、IgA、IgA 受體、IgE、IGF、IGF 結合蛋白、IGF-1、IGF-1 R、IGF-2、IGFBP、IGFR、IL、IL-1、IL-10、IL-10 受體、IL-11、IL-11 受體、IL-12、IL-12 受體、IL-13、IL-13 受體、IL-15、IL-15 受體、IL-16、IL-16 受體、IL-17、IL-17 受體、IL-18 (IGIF)、IL-18 受體、IL-1α、IL-1β、IL-1 受體、IL-2、IL-2 受體、IL-20、IL-20 受體、IL-21、IL-21 受體、IL-23、IL-23 受體、IL-2 受體、IL-3、IL-3 受體、IL-31、IL-31 受體、IL-3 受體、IL-4、IL-4 受體、IL-5、IL-5 受體、IL-6、IL-6 受體、IL-7、IL-7 受

體、IL-8、IL-8 受體、IL-9、IL-9 受體、免疫球蛋白免疫複合物、免疫球蛋白、INF-α、INF-α 受體、INF-β、INF-β 受體、INF-γ、INF-γ 受體、IFN type-I、IFN type-I 受體、流行性感冒、抑制素、抑制素 α、抑制素 β、iNOS、胰島素、胰島素 A-鏈、胰島素 B-鏈、類胰島素生長因子 1、類胰島素生長因子 2、類胰島素生長因子結合蛋白、整合素(integrin)、整合素 α2、整合素 α3、整合素 α4、整合素 α4/β1、整合素 α-V/β-3、整合素 α-V/β-6、整合素 α4/β7、整合素 α5/β1、整合素 α5/β3、整合素 α5/β6、整合素 α-δ(αV)、整合素 α-θ、整合素 β1、整合素 β2、整合素 β3(GPIIb-IIIa)、IP-10、I-TAC、JE、舒血管素(kalliklein)、舒血管素 11、舒血管素 12、舒血管素 14、舒血管素 15、舒血管素 2、舒血管素 5、舒血管素 6、舒血管素 L1、舒血管素 L2、舒血管素 L3、舒血管素 L4、kallistatin、KC、KDR、角質細胞生長因子(KGF)、角質細胞生長因子-2 (KGF-2)、KGF、殺手免疫球蛋白樣受體、kit 配體(KL)、酪氨酸激酶受體 Kit 酪胺酸激脢、層黏連蛋白 5、LAMP、LAPP (Amylin、islet-amyloid polypeptide)、LAP (TGF- 1)、潛伏型胜肽、Latent TGF-1、Latent TGF-1 bp1、LBP、LDGF、LDL、LDL 受體、LECT2、Lefty、瘦體素、促黃體激素(LH)、Lewis-Y 抗原、Lewis-Y 相關抗原、LFA-1、LFA-3、LFA-3 受體、Lfo、LIF、LIGHT、脂蛋白、LIX、LKN、Lptn、L-Selectin、LT-a、LT-b、LTB4、LTBP-1、肺表面活性劑、促黃體激素、淋巴细胞趨化因子、淋巴细胞趨化因子 β 受體、溶性鞘脂受體、Mac-1、巨噬細胞-CSF (M-CSF)、MAdCAM、MAG、MAP2、MARC、maspin、MCAM、MCK-2、

MCP、MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-I (MCAF)、M-CSF、MDC、MDC (67 a.a.)、MDC (69 a.a.)、megsin、Mer、MET 酪氨酸激酶受體家族、金屬蛋白酶、膜醣蛋白 OX2、間皮素、MGDF 受體、MGMT、MHC (HLA-DR)、微生物蛋白、MIF、MIG、MIP、MIP-1α、MIP-1β、MIP-3α、MIP-3β、MIP-4、MK、MMAC1、MMP、MMP-1、MMP-10、MMP-11、MMP-12、MMP-13、MMP-14、MMP-15、MMP-2、MMP-24、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、單核細胞趨化因子、單核細胞集落抑制因子、鼠標促性腺激素相關胜肽、MPIF、Mpo、MSK、MSP、MUC-16、MUC18、mucin (Mud)、穆氏管抑制物、Mug、MuSK、髓磷脂相關糖蛋白、骨髓原始細胞抑制因子-1 (MPIF-I)、NAIP、納米抗體、NAP、NAP-2、NCA 90、NCAD、N-鈣黏著素、NCAM、腦啡肽酶、神經細胞黏附分子、neroserpin、神經生長因子(NGF)、神經營養因子-3、神經營養因子-4、神經營養因子-6、神經纖毛 1、Neurturin、NGF-β、NGFR、NKG20、N-甲硫人生長激素、nNOS、NO、Nogo-A、Nogo 受體、C 型肝炎病毒非結構蛋白第 3 型(NS3)、NOS、Npn、NRG-3、NT、NT-3、NT-4、NTN、OB、OGG1、抑瘤素 M、OP-2、OPG、OPN、OSM、OSM 受體、骨誘導因子、骨橋蛋白、OX40L、OX40R、氧化 LDL、p150、p95、PADPr、甲狀旁腺激素、PARC、PARP、PBR、PBSF、PCAD、P-Cadherin、PCNA、PCSK9、PDGF、PDGF receptor、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、PDGF-D、PDK-1、PECAM、PEDF、PEM、PF-4、PGE、PGF、PGI2、PGJ2、PIGF、PIN、PLA2、胎盤生長因子、胎盤鹼性磷酸酶(PLAP)、胎盤催乳素、纖溶酶原激活

物抑製劑-1、血小板生長因子、plgR、PLP、不同大小的聚乙二醇鏈(例如，PEG-20、PEG-30、PEG40)、PP14、prekallikrein、普利恩蛋白、前降鈣素、程序性細胞死亡的蛋白 1、前胰島素、催乳素、Proprotein convertase PC9、prorelaxin、前列腺特異性膜抗原(PSMA)、蛋白 A、蛋白 C、蛋白 D、蛋白 S、蛋白質 Z、PS、PSA、PSCA、PsmAr、PTEN、PTHrp、Ptk、PTN、P-選擇素醣蛋白配體-1、R51、RAGE、RANK、RANKL、RANTES、鬆弛素、鬆弛素 A-鏈、鬆弛素 B-鏈、腎素、呼吸融合病毒(RSV) F、Ret、網狀內皮素 4(reticulon 4)、類風濕因子、RLI P76、RPA2、RPK-1、RSK、RSV Fgp、S100、RON-8、SCF/KL、SCGF、骨硬化素、SDF-1、SDF1α、SDF1β、SERINE、血清類澱粉 P、血清白蛋白、sFRP-3、Shh、類志賀氏毒素 II、SIGIRR、SK-1、SLAM、SLPI、SMAC、SMDF、SMOH、SOD、SPARC、鞘氨醇 1-磷酸受體 1、金黃色葡萄球菌脂磷壁酸、Stat、STEAP、STEAP-II、幹細胞因子(SCF)、鏈激酶、超氧化物歧化酶、syndecan-1、TACE、TACI、TAG-72 (腫瘤相關醣蛋白-72)、TARC、TB、TCA-3、T-細胞受體 α/β、TdT、TECK、TEM1、TEM5、TEM7、TEM8、肌腱蛋白、TERT、睪丸類 PLAP 鹼性磷酸酶、TfR、TGF、TGF-α、TGF-β、TGF-β Pan Specific、TGF-β RII、TGF-β RIIb、TGF-β RIII、TGF-β Rl (ALK-5)、TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3、TGF-β4、TGF-β5、TGF-I、凝血酶、血小板生成素(TPO)、胸腺基質淋巴蛋白受體、胸腺 Ck-1、促甲狀腺激素(TSH)、甲狀腺素、甲狀腺素結合球蛋白、Tie、TIMP、TIQ、組織因子、組織因子蛋白酶抑製劑、組織因子蛋白、

TMEFF2、Tmpo、TMPRSS2、TNF 受體 I、TNF 受體 II、TNF-α、TNF-β、TNF-β2、TNFc、TNF-RI、TNF-RII、TNFRSF10A (TRAIL R1 Apo-2/DR4)、TNFRSF10B (TRAIL R2 DR5/KILLER/TRICK-2A/TRICK-B)、TNFRSF10C (TRAIL R3 DcR1/LIT/TRID)、TNFRSF10D (TRAIL R4 DcR2/TRUNDD)、TNFRSF11A (RANK ODF R/TRANCE R)、TNFRSF11B (OPG OCIF/TR1)、TNFRSF12 (TWEAK R FN14)、TNFRSF12A、TNFRSF13B (TACI)、TNFRSF13C (BAFF R)、TNFRSF14 (HVEM ATAR/HveA/LIGHT R/TR2)、TNFRSF16 (NGFR p75NTR)、TNFRSF17 (BCMA)、TNFRSF18 (GITR AITR)、TNFRSF19(TROY TAJ/TRADE)、TNFRSF19L (RELT)、TNFRSF1A (TNF Rl CD120a/p55-60)、TNFRSF1B (TNF RII CD120b/p75-80)、TNFRSF21 (DR6)、TNFRSF22 (DcTRAIL R2 TNFRH2)、TNFRSF25 (DR3 Apo-3/LARD/TR-3/TRAMP/WSL-1)、TNFRSF26 (TNFRH3)、TNFRSF3 (LTbR TNF RIII/TNFC R)、TNFRSF4 (OX40 ACT35/TXGP1 R)、TNFRSF5 (CD40 p50)、TNFRSF6 (Fas Apo-1/APT1/CD95)、TNFRSF6B (DcR3 M68/TR6)、TNFRSF7 (CD27)、TNFRSF8 (CD30)、TNFRSF9 (4-1 BB CD137/ILA)、TNFRST23 (DcTRAIL R1 TNFRH1)、TNFSF10 (TRAIL Apo-2 配體/TL2)、TNFSF11 (TRANCE/RANK 配體 ODF/OPG 配體)、TNFSF12 (TWEAK Apo-3 配體/DR3 配體)、TNFSF13 (APRIL TALL2)、TNFSF13B (BAFF BLYS/TALL1/THANK/TNFSF20)、TNFSF14 (LIGHT HVEM 配體/LTg)、TNFSF15 (TL1A/VEGI)、TNFSF18 (GITR 配體 AITR 配體/TL6)、TNFSF1A (TNF-a Conectin/DIF/

TNFSF2)、TNFSF1B (TNF-b LTa/TNFSF1)、TNFSF3 (LTb TNFC/p33)、TNFSF4 (OX40 配體 gp34/TXGP1)、TNFSF5 (CD40 配體 CD154/gp39/HIGM1/IMD3/TRAP)、TNFSF6 (Fas 配體 Apo-1 配體/APT1 配體)、TNFSF7 (CD27 配體 CD70)、TNFSF8 (CD30 配體 CD153)、TNFSF9 (4-1 BB 配體 CD137 配體)、TNF-α、TNF-β、TNIL-I、有毒代謝物、TP-1、t-PA、Tpo、TRAIL、TRAIL R、TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRANCE、運鐵蛋白受體、轉化生長因子(TGF)，如 TGF-α 及 TGF-β、穿膜醣蛋白 NMB、轉甲狀腺素、TRF、Trk、TROP-2、囊胚外圍的滋養層細胞醣蛋白、TSG、TSLP、腫瘤壞死因子(TNF)、腫瘤相關抗原 CA 125、表現 Lewis Y 相關醣類的腫瘤相關抗原、TWEAK、TXB2、Ung、uPAR、uPAR-1、Urokinase、VAP-1、血管內皮生長因子(VEGF)、vaspin、VCAM、VCAM-1、VECAD、VE-鈣黏蛋白、VE-鈣黏蛋白-2、VEFGR-1 (flt-1)、VEFGR-2、VEGF 受體(VEGFR)、VEGFR-3 (flt-4)、VEGI、VIM、病毒抗原、VitB12 受體、玻璃黏連蛋白(Vitronectin)受體、VLA、VLA-1、VLA-4、VNR 整合素、溫韋伯氏因子(vWF)、WIF-1、WNT1、WNT10A、WNT10B、WNT11、WNT16、WNT2、WNT2B/13、WNT3、WNT3A、WNT4、WNT5A、WNT5B、WNT6、WNT7A、WNT7B、WNT8A、WNT8B、WNT9A、WNT9B、XCL1、XCL2/SCM-1-β、XCL1/淋巴細胞趨化因子、XCR1、XEDAR、XIAP 及 XPD。

【0111】本發明所述之抗原結合分子可降低上述抗原的總抗原血漿濃度。本發明中所述之抗原也可藉由與病毒、細菌及真菌的結構部位來消除血漿中的病毒、細菌及真菌。特別是，

RSV 的 F 蛋白，金黃色葡萄球菌脂磷壁酸，困難腸梭菌毒素，類志賀氏毒素 II，炭疽芽孢桿菌保護性抗原及 C 型肝炎病毒 E2 醣蛋白可作為病毒、細菌及真菌的結構部位。

【0112】儘管本發明之方法並不限於任何特定的理論，但在酸性 pH 範圍下抗原-結合分子的抗原-結合活性小於在中性 pH範圍下及/或在中性 pH範圍下人類 FcRn-結合活性及單一抗原-結合分子可結合抗原數目增加之間的關係，由於促進抗原-結合分子攝入細胞中，及增加血漿中抗原的移除可解釋如下。

【0113】例如，當抗原-結合分子為一結合至膜抗原的抗體時，給予至人體內的抗體與抗原結合，接著此抗體與抗原透過內在化(internalization)攝入細胞的核內體中，且此抗體保持與抗原結合。接著，在抗體保持與抗原結合的狀態下，此抗體轉位(translocate)至溶小體，且此抗體與抗原在溶小體中被分解。此由血漿的內在化移除(internalization-mediated elimination)被稱為抗原依賴性移除，且已有文獻揭露與各種抗體分子的移除作用(Drug Discov Today. 2006 Jan; 11(1-2): 81-8)。當單一分子之 IgG 抗體以二價的方式結合至抗原時，此單一抗體分子被內在化此時此抗體保持與二個抗原結合，並在溶小體中被分解。因此，在傳統的抗體中，IgG 抗體的分子不能結合至三個或以上的抗原。例如，一個具有中和活性的 IgG 抗體不能中和三個或以上的抗原分子。

【0114】IgG 分子在血漿中的相對延長滯留(緩慢消除)是由於人類 FcRn 的功能，其已知為一 IgG 分子的拯救受體(salvage receptor)。當透過吞飲作用進入核內體時，IgG 分子

在核內體的酸性環境下與核內體中的人類 FcRn 結合。若 IgG 分子未結合至人類 FcRn，則會傳送至溶小體並在此被分解，若 IgG 分子結合至人類 FcRn 則會轉位至細胞表面，並在血漿的中性環境下與人類 FcRn 分離，再次返迴至血漿中。

【0115】再者，當抗原-結合分子為一可溶性抗體時，此給予至體內的抗體結合至抗原，並接著被攝入細胞中，且此抗體保持與抗原結合。許多被攝入細胞內的抗體透過 FcRn 釋放至細胞外。然而，由於許多抗體在保持與抗原結合的狀態下被釋放至細胞外，因此這些抗體無法再與抗原結合。因此，在傳統的抗體中，類似於結合至膜蛋白的抗體，IgG 抗體的一個分子不能與三個或以上的抗原分子結合。

【0116】pH-依賴性抗原-結合抗體在血漿的中性環境下會非常穩定地與抗原結合，但在核內體的酸性環境下會與抗原分離(抗體在中性環境下結合但在酸性環境下分離)。當 pH-依賴性抗體與抗原分離後藉由 FcRn 返迴至血漿時，此 pH-依賴性抗體可再次結合至抗原；因此，每個抗體可重覆地與一數目的抗原結合。再者，與抗原-結合分子結合之抗原在核內體中分離，且不會再次返迴至血漿中。此有利於抗原藉由抗原-結合分子攝入至細胞中。因此，抗原-結合分子的給予可促進抗原的移除，進而降低血漿抗原濃度。

【0117】可進一步利用在中性環境下(pH 7.4)對抗體所給予之人類 FcRn-結合活性促使藉由抗原-結合分子使抗原攝入至細胞中，此抗體在 pH-依賴性方法中與抗原結合(在中性環境下結合但在酸性環境下分離)。因此，抗原-結合分子的給予可

促進抗原移除，進而降低血漿抗原濃度。通常，抗體及抗原-抗體複合物藉由非專一性的內噬作用攝入細胞中，接著利用在核內體酸性環境下與 FcRn 的結合傳送至細胞表面。抗體及抗原-抗體複合物在細胞表面的中性環境與FcRn分離後再返回至血漿中。因此，當抗體在抗原結合上呈現足夠的 pH-依賴特性(在中性環境下結合但在酸性環境下分離)在血漿中與抗原結合，且接著在核內體與抗原分離時，可假設抗原移除率等於透過非專一性內噬作用的抗原攝入率。另一方面，當 pH-依賴特性不足時，抗原無法在核內體中分離，也無法再次返回血漿。再者，當 pH-依賴特性充足時，則移除抗原的速率決定步驟在於非專一性內噬作用的細胞攝入。由於 FcRn 將抗體由核內體傳送至細胞表面，因此有些 FcRn 被認為存在於細胞表面。

【0118】本發明人認為 IgG 型免疫球蛋白為一種抗原-結合分子，通常在中性 pH 範圍下具有低的 FcRn-結合活性，但其在中性 pH 範圍下所呈現的 FcRn-結合活性可與細胞表面的 FcRn 結合，且因此可藉由結合至細胞表面 FcRn 的 FcRn-依賴型方法攝入細胞。藉由 FcRn 攝入細胞的速率大於藉由非專一性內噬作用攝入細胞內的速率。因此，在中性 pH 範圍下利用 FcRn-結合活性更可加速抗原移除速率。特別是，一具有 FcRn-結合活性的抗原-結合分子在中性 pH 範圍下傳送一抗原至細胞中更快於一般(完整人類)的 IgG 型免疫球蛋白，且接著抗原-結合分子在核內體中與抗原分離。此抗原-結合分子再次返回至細胞表面或血漿，且再次與其他抗原結合，並利用 FcRn 攝入細胞中。可藉由增加中性 pH 範圍下的 FcRn-結合活性以增

加此循環的速率，進而增加將抗原由血漿中移除的速率。再者，也可藉由降低在酸性 pH 範圍下抗原-結合分子的抗原-結合活性至低於在中性 pH 範圍下的抗原-結合活性來增加此效率。再者，單一抗原-結合分子可結合的抗原數目可透過增加單一抗原-結合分子的循環次數來增加。本發明之抗原-結合分子包括一抗原-結合區及一 FcRn-結合區。由於 FcRn-結合區不影響抗原結合，或上述機制，因此可預期藉由 FcRn 使抗原被攝入細胞的促進與抗原的種類無關，且利用降低抗原-結合分子在酸性 pH 範圍下的抗原-結合活性(結合活性)至低於在中性 pH 範圍下的抗原-結合活性及/或增加其在血漿 pH 的 FcRn-結合活性以增加抗原速率。

【0119】<作為抗原-結合分子之物質>

再者，本發明提供抗原-結合分子，其在酸性及中性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性，且其在酸性 pH 範圍下的抗原-結合活性低於在中性 pH 範圍下的抗原-結合活性。抗原-結合分子的具體例子包括在 pH 5.8 至 pH 6.0 及 pH 7.4 下具有人類 FcRn-結合活性，其分別模擬體內早期內核體及血漿的 pH 值，且在 pH 5.8 下的抗原-結合活性低於在 pH 7.4 下的抗原-結合活性。抗原-結合分子在 pH 5.8 下的抗原-結合活性低於 pH 7.4 下的抗原-結合活性又可稱為在 pH 7.4 下的抗原-結合活性大於在 pH 5.8 下的抗原-結合活性。

【0120】本發明之抗原-結合分子在酸性及中性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性，且較佳在酸性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性，且在中性 pH 範圍下具有比完整人類 IgG

高的人類 FcRn-結合活性。此結合活性的比率並無限制，只要其人類 FcRn-結合活性在 pH 7.4 下時略強。

【0121】依據 Journal of Immunology (2009) 182: 7663-7671 之內容，完整人類 IgG1 於酸性 pH 範圍下(pH 6.0)的人類 FcRn-結合活性為 KD 1.7 微莫耳，而在中性 pH 範圍下幾乎無法測得此能力。因此，在一較佳實施例中，本發明之在酸性及中性 pH 範圍下具人類 FcRn-結合活性的抗原-結合分子包括在酸性 pH 範圍下 FcRn-結合活性為 KD 20 微莫耳或更高的抗原-結合分子，其與在中性 pH 範圍下之完整人類 IgG 的 FcRn-結合活性相同或更高。在一更佳實施例中，本發明之抗原-結合分子包括在酸性 pH 範圍下之人類 FcRn-結合活性為 KD 2.0 微莫耳或更高，且在中性 pH 範圍下之人類 FcRn-結合活性為 KD 40 微莫耳或更高的抗原-結合分子。在一較佳實施例中，本發明之抗原-結合分子包括在酸性 pH 範圍下之人類 FcRn-結合活性為 KD 0.5 微莫耳或更高，且在中性 pH 範圍下之人類 FcRn-結合活性為 KD 15 微莫耳或更高的抗原-結合分子。上述 KD 值可利用 Journal of Immunology (2009) 182: 7663-7671 (將抗原-結合分子固定於晶片上，並加入人類 FcRn 作為分析物)所述之方法進行偵測。

【0122】本發明提供一包括一抗原-結合區及一人類 FcRn-結合區之抗原-結合分子，其在酸性及中性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性，其中人類 FcRn 及在酸性 pH 範圍下比在中性 pH 範圍下低之抗原-結合活性大於 KD 3.2 微莫耳。本發明亦提供一包括一抗原-結合區及一人類 FcRn-結合區之抗原-

結合分子，其在中性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性，其中人類 FcRn-結合活性在中性 pH 範圍下比完整的人類 IgG 高 28 倍。本發明之抗原-結合分子在 pH 7.0 及 25℃時具有人類 FcRn-結合活性，其大於完整的人類 IgG。在一更較佳實施例中，人類 FcRn-結合活性在 pH 7.0 及 25℃時為完整人類 IgG 的 28 倍或大於 KD 3.2 微莫耳。

【0123】本發明提供一包括一抗原-結合區及一人類 FcRn-結合區之抗原-結合分子，其在中性 pH 範圍下具有一人類 FcRn-結合活性，其中一人類 FcRn-結合活性在中性 pH 範圍下大於 KD 2.3 微莫耳。本發明亦提供一包括一抗原-結合區及一人類 FcRn-結合區之抗原-結合分子，其在中性 pH 範圍下具有一人類 FcRn-結合活性，其中一人類 FcRn-結合活性在中性 pH 範圍下為完整之人類 IgG 的 38 倍。

【0124】在本發明之中，酸性 pH 範圍一般指 pH 4.0 至 pH 6.5。酸性 pH 範圍較佳為 pH 5.5 至 pH 6.5 中的任一 pH 值，更佳擇自於 5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4 及 6.5，更佳為 pH 5.8 至 pH 6.0，其近似於人體內早期核內體中的 pH 值。再者，本發明之中性 pH 範圍一般指 pH 6.7 至 pH 10.0。此中性 pH 範圍較佳為 pH 7.0 至 pH 8.0 中的任一 pH 值，更佳擇自於 pH 7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9 及 8.0，更佳為 pH 7.4，其近似於人體內血漿(血液)中的 pH 值。當因人類 FcRn-結合區及人類 FcRn 的結合親和力在 pH 7.4 的過低而難以評估時，可使用 pH 7.0 來代替 pH 7.4。對於使用於分析條件的溫度，人類 FcRn-結合區與人類 FcRn 之間的

結合親和力可在 10℃至 50℃中的任一溫度下進行分析。較佳使用 15℃至 40 ℃來測定人類 FcRn-結合區及人類 FcRn 之間的結合親和力。更佳使用在 20℃至 35℃中的任何溫度，例如，20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34 及 35℃中的任一溫度來測定人類 FcRn-結合區及人類 FcRn 之間的結合親和力。實施例 5 中所述的 25℃為本發明之一例子。

【0125】在一更佳實施例中，人類 FcRn-結合活性在 pH 7.0 及 25℃時為完整人類 IgG 的 38 倍或大於 KD 2.3 微莫耳。以完整的人類 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 作為完整的人類 IgG，以其作為對照之完整人類與抗原-結合分子比較其人類 FcRn 結合活性。更佳以完整的人類 IgG1 作為對照之完整人類 IgG，與抗原-結合分子比較其人類 FcRn 結合活性。

【0126】本發明提供一包括一抗原-結合區及一人類 FcRn-結合區之抗原-結合分子，其中在給予抗原-結合分子至非人類動物中後的血漿總抗原濃度低於在給予對照之抗原-結合分子至非人類動物中後的血漿總抗原濃度。

【0127】本發明亦提供一抗原-結合分子，在給予此抗原-結合分子至非人類動物後的血漿總抗原濃度低於未給予此抗原-結合分子至非人類動物後的血漿總抗原濃度。

【0128】在給予本發明抗原-結合分子後血漿中總抗原濃度，低於給予包括以完整人類 IgG Fc 區作為人類 FcRn-結合區之對照抗原-結合分子，或未給予本發明抗原-結合分子的 2 倍、5 倍、10 倍、20 倍、50 倍、100 倍、200 倍、500 倍及 1000

倍或更高。

【0129】在另一實施例中，本發明提供一包括一抗原-結合區及一人類 FcRn-結合區之抗原-結合分子，本發明抗原-結合分子的抗原/抗原-結合分子莫耳比(C)計算如下：

C=A/B，

低於包括與抗原-結合區及完整人類 IgG Fc 區相同之人類 FcRn-結合區的一莫耳抗原/抗原-結合分子比(C')，其如下所計算；

C'=A'/B'，

其中；

A 為在給予此抗原-結合分子至非人類動物後的血漿總抗原濃度，

B 為在給予此抗原-結合分子至非人類動物後的血漿抗原-結合分子濃度，

A'為在給予一參考抗原-結合分子(reference antigen-binding molecule)至非人類動物後的血漿總抗原濃度，

B' 為在給予一參考抗原-結合分子至非人類動物後的血漿抗原-結合分子濃度；

在給予本發明抗原-結合分子後，抗原/抗原-結合分子的莫耳比低於給予包括以完整人類 IgG Fc 區作為人類 FcRn-結合區之對照抗原-結合分子的 2 倍、5 倍、10 倍、20 倍、50 倍、100 倍、200 倍、500 倍及 1000 倍或更高。

【0130】血漿中總抗原濃度或抗原/抗體莫耳比的減少可以如實施例 6、8 及 13 所述之內容進行評估。特別是，可使用人

類 FcRn 轉殖小鼠株 32 或 276(Jackson Laboratories, Methods Mol Biol. 2010; 602: 93-104)，當抗原-結合分子不與小鼠對應抗原反應時，可藉由抗原-抗體共注射模式(antigen-antibody co-injection model)或穩定抗原注射模式(steady-state antigen infusion model)來評估。

【0131】當抗原-結合分子與小鼠的對應抗原反應時，其可單純將抗原-結合分子注射至人類 FcRn 轉殖小鼠株 32 或 276 (Jackson Laboratories)來進行評估。在共注射模式中，將抗原-結合分子與抗原之混合物給予至小鼠中。在穩定抗原注射模式中，將含有抗原溶液的注入幫浦植入小鼠中以維持一定的血漿抗原濃度，接著將抗原-結合分子注射至小鼠中。注射相同劑量的測試用抗原-結合分子。在適當的時間點以習知的方法偵測血漿中總抗原濃度、血漿中游離抗原濃度及血漿抗原-結合分子濃度。

【0132】本發明抗原-結合分子的給予方式可擇自於皮內、靜脈、玻璃體、皮下、腹腔、靜脈及肌肉注射。

【0133】更特別是，本發明之抗原-結合分子具有長時間移除血漿中抗原的能力，其人類 FcRn-結合活性在 pH 7.0 及 25℃下比完整的人類 IgG 高 28 倍至 440 倍，或具有 3.0 微莫耳至 0.2 微莫耳的 KD。為了評估本發明抗原-結合分子在移除血漿中抗原能力的長時間效果，可藉由測量總或游離血漿抗原濃度，及在給予抗原-結合分子後的 2、4、7、14、28、56 或 84 天測量抗原/抗原-結合分子的莫耳比來得知長時間的血漿抗原濃度。不論血漿抗原濃度或抗原/抗原-結合分子莫耳比的減少

是否為利用本發明之抗原-結合分子所達成，仍可藉由評估上述一或多個時間點的減少來判斷。

【0134】更特別是，本發明之抗原-結合分子具有短時間移除血漿中抗原的能力，人類 FcRn-結合活性在 pH 7.0 及 25℃下比完整的人類 IgG 高 440 倍，或具有 0.2 微莫耳的 KD。為了評估本發明抗原-結合分子在移除血漿中抗原之活性的短時間效果，可藉由測量總或游離血漿抗原濃度，及在給予抗原-結合分子後的 15 分鐘、1、2、4、8、12 或 24 小時測量抗原/抗原-結合分子莫耳比來得知短時間的血漿抗原濃度。

【0135】再者，本發明抗原-結合分子具有一在酸性 pH 範圍下比在中性 pH 範圍下低的抗原-結合活性，其結合活性並無限制，只要抗原-結合活性在酸性 pH 範圍比在中性 pH 範圍低。只要抗原-結合活性在酸性 pH 範圍下略低，此抗原-結合分子就可被接受。在一較佳實施例，本發明之抗原-結合分子包括抗原-結合活性在 pH 7.4 時為在 pH 5.8 的 2 倍或更多之抗原-結合分子。在一更佳實施例，本發明之抗原-結合分子包括抗原-結合活性在 pH 7.4 時為在 pH 5.8 的 10 倍或更多的抗原-結合分子。在另一更佳實施例中，本發明之抗原-結合分子包括抗原-結合活性在 pH 7.4 時為在 pH 5.8 的 40 倍或更多的抗原-結合分子。

【0136】特別是，本發明之抗原-結合分子，例如 WO 2009/125825 所示之例子。更特別是，在一較佳實施例中，本發明抗原-結合分子之抗原-結合活性在 pH 5.8 下低於在 pH 7.4 下，其中 KD (pH5.8)/KD (pH7.4)值為抗原在 pH 5.8 及 pH 7.4

下之 KD 比值較佳為 2 或更大，更佳為 10 或更大，更佳為 40 或更大。KD (pH5.8)/KD (pH7.4)值的上限並無特別限制，可為任何數值，例如 400、1,000 或 10,000，只要可以利用習知技術產生。

【0137】在另一較佳實施例中，本發明之抗原-結合分子之抗原-結合活性在 pH 5.8 下低於在 pH 7.4 下，其具有一 k_d (pH5.8)/k_d (pH7.4)值，此為抗原在 pH 5.8 之 k_d 值及抗原在 pH 7.4 之 k_d 值的比值，較佳為 2 或以上，更佳為 5 或以上，更佳為 10 或以上，且更佳為 30 或以上。k_d (pH5.8)/k_d (pH7.4)的上限並無特別限制，且可為任何數值，例如，50、100 或 200，只要可以利用習知技術產生。

【0138】抗原-結合活性或人類 FcRn-結合活性的分析條件除了 pH 值外此技藝人士自可適合地選擇，且此條件並無特別限制；然而，可在 MES 緩衝液及 37°C 的條件下，如實施例所示。再者，抗原-結合分子的抗原-結合活性可以習知方法進行測定，例如，利用 Biacore (GE Healthcare)或其類似，如實施例所示。

【0139】本發明之抗原-結合分子可促使抗原攝入細胞中。此分子可輕易地在核內體中與抗原分離，並藉由結合至人類 FcRn 以釋放至細胞外。本發明之抗原-結合分子被認為可輕易地於血漿中再次與抗原結合。因此，例如，當本發明之抗原-結合分子為中和性抗原-結合分子時，可藉由給予此分子以促進血漿抗原濃度的減少。因此，在酸性 pH 範圍下具人類 FcRn-結合活性的抗原-結合分子具有在酸性 pH 範圍比在中性 pH

範圍低的抗原-結合活性；且在中性 pH 範圍下具人類 FcRn-結合活性的抗原-結合分子為具良好藥物動力特性的抗原-結合分子，每個分子可結合至複數個抗原。

【0140】在一較佳實施例中，在酸性及中性 pH 範圍下具人類 FcRn-結合活性的抗原-結合分子包括具有可直接或間接結合至人類 FcRn 之人類 FcRn-結合區的抗原-結合分子。當此區域在酸性及中性 pH 範圍下已具有人類 FcRn-結合活性，則其可被使用。再者，即使此區域在酸性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性但在中性 pH 範圍下呈現弱或不具有人類 FcRn-結合活性，經改變其胺基酸序列使其於中性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性後也可使用。再者，若在酸性及中性 pH 範圍下已具有人類 FcRn-結合活性，也可藉由改變一區域中的胺基酸來改善人類 FcRn-結合活性。此抗原-結合分子包括，例如，具 IgG Fc 區胺基酸序列之抗原-結合分子，其含有至少一個胺基酸的改變。此胺基酸的改變並無特別限制，且此改變可發生於任何位置，只要人類 FcRn-結合活性在中性 pH 範圍下比改變前更高。

【0141】特別是，可在酸性及中性 pH 範圍下產生人類 FcRn-結合活性的胺基酸改變包括，例如，上述親代 IgG 之 Fc 區中第 221 至 225、227、228、230、232、233 至 241、243 至 252、254 至 260、262 至 272、274、276、278 至 289、291 至 312、315 至 320、324、325、327 至 339、341、343、345、360、362、370、375 至 378、380、382、385 至 387、389、396、414、416、423、424、426 至 438、440 及 442 位置(EU 編號)的胺基

酸置換。更特別是，此胺基酸的改變包括揭示於表 1、2、6-1、6-2 及 9 的位置(EU 編號)。較佳之抗原-結合分子包括在擇自於第 237、238、239、248、250、252、254、255、256、257、258、265、270、286、289、297、298、303、305、307、308、309、311、312、314、315、317、325、332、334、360、376、380、382、384、385、386、387、389、424、428、433、434 及 436 位置(EU 編號)中有至少一個胺基酸改變之胺基酸序列的抗原-結合分子。

【0142】在一較佳實施例中，此胺基酸改變包括：

第 237 個胺基酸由 Gly 置換為 Met；

第 238 個胺基酸由 Pro 置換為 Ala；

第 239 個胺基酸由 Ser 置換為 Lys；

第 248 個胺基酸由 Lys 置換為 Ile；

第 250 個胺基酸由 Thr 置換為 Ala、Phe、Ile、Met、Gln、Ser、Val、Trp、或 Tyr；

第 252 個胺基酸由 Met 置換為 Phe、Trp、或 Tyr；

第 254 個胺基酸由 Ser 置換為 Thr；

第 255 個胺基酸由 Arg 置換為 Glu；

第 256 個胺基酸由 Thr 置換為 Asp、Glu、或 Gln；

第 257 個胺基酸由 Pro 置換為 Ala、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr 或 Val；

第 258 個胺基酸由 Glu 置換為 His；

第 265 個胺基酸由 Asp 置換為 Ala；

第 270 個胺基酸由 Asp 置換為 Phe；

第 286 個胺基酸由 Asn 置換為 Ala 或 Glu；

第 289 個胺基酸由 Thr 置換為 His；

第 297 個胺基酸由 Asn 置換為 Ala；

第 298 個胺基酸由 Ser 置換為 Gly；

第 303 個胺基酸由 Val 置換為 Ala；

第 305 個胺基酸由 Val 置換為 Ala；

第 307 個胺基酸由 Thr 置換為 Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、Trp、或 Tyr；

第 308 個胺基酸由 Val 置換為 Ala、Phe、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、或 Thr；

第 309 個胺基酸由 Leu 或 Val 置換為 Ala、Asp、Glu、Pro、或 Arg；

第 311 個胺基酸由 Gln 置換為 Ala、His 或 Ile；

第 312 個胺基酸由 Asp 置換為 Ala 或 His；

第 314 個胺基酸由 Leu 置換為 Lys 或 Arg；

第 315 個胺基酸由 Asn 置換為 Ala 或 His；

第 317 個胺基酸由 Lys 置換為 Ala；

第 325 個胺基酸由 Asn 置換為 Gly；

第 332 個胺基酸由 Ile 置換為 Val；

第 334 個胺基酸由 Lys 置換為 Leu；

第 360 個胺基酸由 Lys 置換為 His；

第 376 個胺基酸由 Asp 置換為 Ala；

第 380 個胺基酸由 Glu 置換為 Ala；

第 382 個胺基酸由 Glu 置換為 Ala；

第 384 個胺基酸由 Asn 或 Ser 置換為 Ala；

第 385 個胺基酸由 Gly 置換為 Asp 或 His；

第 386 個胺基酸由 Gln 置換為 Pro；

第 387 個胺基酸由 Pro 置換為 Glu；

第 389 個胺基酸由 Asn 置換為 Ala 或 Ser；

第 424 個胺基酸由 Ser 置換為 Ala；

第 428 個胺基酸由 Met 置換為 Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、Trp、或 Tyr；

第 433 個胺基酸由 His 置換為 Lys；

第 434 個胺基酸由 Asn 置換為 Ala、Phe、His、Ser、Trp、或 Tyr；

以及第 436 個胺基酸由 Tyr 置換為 His 或 Phe (EU 編號)。

【0143】胺基酸改變的數目並無特別限制；可僅在一個位置或二個或以上的位置改變一個胺基酸。合併二個或以上胺基酸的改變包括，例如，如表 3、4-1 至 4-5、6-1、6-2 及 9 中所述。

【0144】再者，在酸性及中性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性的區域，包括，例如，包括擇自下列至少一個胺基酸的人類 FcRn-結合區：

親代 IgG Fc 區中的第 237 個胺基酸為 Met；

第 238 個胺基酸為 Ala；

第 239 個胺基酸為 Lys；

第 248 個胺基酸為 Ile；

第 250 個胺基酸為 Ala、Phe、Ile、Met、Gln、Ser、Val、Trp 或 Tyr；

第 252 個胺基酸為 Phe、Trp 或 Tyr；

第 254 個胺基酸為 Thr；

第 255 個胺基酸為 Glu；

第 256 個胺基酸為 Asp、Glu 或 Gln；

第 257 個胺基酸為 Ala、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr 或 Val；

第 258 個胺基酸為 His；

第 265 個胺基酸為 Ala；

第 270 個胺基酸為 Phe；

第 286 個胺基酸為 Ala 或 Glu；

第 289 個胺基酸為 His；

第 297 個胺基酸為 Ala；

第 298 個胺基酸為 Gly；

第 303 個胺基酸為 Ala；

第 305 個胺基酸為 Ala；

第 307 個胺基酸為 Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、Trp 或 Tyr；

第 308 個胺基酸為 Ala、Phe、Ile、Leu、Met、Pro、Gln 或 Thr；

第 309 個胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Pro 或 Arg；

第 311 個胺基酸為 Ala、His 或 Ile；

第 312 個胺基酸為 Ala 或 His；

第 314 個胺基酸為 Lys 或 Arg；

第 315 個胺基酸為 Ala 或 His；

第 317 個胺基酸為 Ala；

第 325 個胺基酸為 Gly；

第 332 個胺基酸為 Val；

第 334 個胺基酸為 Leu；

第 360 個胺基酸為 His；

第 376 個胺基酸為 Ala；

第 380 個胺基酸為 Ala；

第 382 個胺基酸為 Ala；

第 384 個胺基酸為 Ala；

第 385 個胺基酸為 Asp 或 His；

第 386 個胺基酸為 Pro；

第 387 個胺基酸為 Glu；

第 389 個胺基酸為 Ala 或 Ser；

第 424 個胺基酸為 Ala；

第 428 個胺基酸為 Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr；

第 433 個胺基酸為 Lys；

第 434 個胺基酸為 Ala、Phe、His、Ser、Trp 或 Tyr；

以及第 436 個胺基酸(EU 編號)為 His 或 Phe。

【0145】一個位置的一個胺基酸或二個或以上個位置的複數個胺基酸可具有上述胺基酸。二個或以上個位置胺基酸的合併包括，例如，如表 3、4-1 至 4-5、6-1、6-2 及 9 中所述。

【0146】再者，在一較佳實施例中，包括在酸性 pH 範圍下之抗原-結合活性低於在中性 pH 範圍下之抗原-結合活性的抗原-結合分子，其抗原-結合分子中的至少一個胺基酸被置換為組胺酸或一非自然胺基酸，或插入至少一個組胺酸或一非自然胺基酸。發生組胺酸或非自然胺基酸突變的位置並無特別限制，可為任何位置，只要相較於置換之前，在酸性 pH 範圍下之抗原-結合活性低於在中性 pH 範圍下之抗原-結合活性(KD (於酸性 pH 值範圍)/KD (於中性 pH 值範圍)值較高或 k_d (於酸性 pH 值範圍)/k_d (於中性 pH 值範圍)值較高)。在此例子中，包括抗體的可變區及 CDRs，抗原-結合分子為一抗體。此技藝人士可適當地決定被置換為組胺酸或非自然胺基酸的數目以及被插入胺基酸的數目。一個胺基酸可被置換為組胺酸或非自然胺基酸，或一個胺基酸可被插入，或二個或以上的胺基酸可被置換為組胺酸或非自然胺基酸，或二個或以上的胺基酸可被插入。再者，除了組胺酸或非自然胺基酸的置換或組胺酸或非自然胺基酸的插入之外，其他胺基酸的刪除、增加、插入及/或置換等也可同時進行。組胺酸突變可合併組胺酸插入。此胺酸酸置換或插入可以隨機的方法來達成，例如，組胺酸掃描，其為在習知之丙胺酸掃描中以組胺酸置換丙胺酸。具有比產生突變前更高 KD(pH5.8)/KD(pH7.4)或 k_d(pH5.8)/k_d (pH7.4)值的抗原-結合分子可藉由篩選經組胺酸或非自然胺基酸隨機突變之抗原-結合分子來獲得。

【0147】較佳之經組胺酸或非自然胺基酸突變的抗原-結合分子，其在酸性 pH 範圍下的抗原-結合活性低於在中性 pH 範

圍下的抗原-結合活性，此抗原-結合分子包括，例如，在組胺酸或非自然胺基酸突變後 pH 7.4 之抗原-結合活性等同於在組胺酸或非自然胺基酸突變前 pH 7.4 之抗原-結合活性的抗原-結合分子。在本發明中，“抗原-結合分子在經組胺酸或非自然胺基酸突變後具有與經組胺酸或非自然胺基酸突變前相同的抗原-結合活性”係指當將抗原-結合分子的抗原-結合活性定為100%時，抗原-結合分子在經組胺酸或非自然胺基酸突變後的抗原-結合活性為至少 10%或更高，較佳為 50%或更高，更佳為 80%或更高，以及更佳為 90%或更高。在組胺酸或非自然胺基酸突變後 pH 7.4 的抗原-結合活性高於在組胺酸或非自然胺基酸突變前 pH 7.4 的抗原-結合活性。當抗原-結合分子的抗原-結合活性因組胺酸或非自然胺基酸的置換或插入而減少時，此抗原-結合活性可藉由對抗原-結合分子進行一或複數個胺基酸的置換、刪除、增加及/或插入，使抗原-結合活性變為與組胺酸置換或插入前相同。本發明更包括在經組胺酸置換或插入後，利用一或複數個胺基酸之置換、刪除、增加及/或插入使結合活性相同的抗原-結合分子。

【0148】再者，在另一較佳實施例中，當抗原-結合分子為一包括抗體恆定區的物質時，抗原-結合分子在 pH 5.8 下的抗原-結合活性低於在 pH 7.4 下的抗原-結合活性，本發明包括改變抗原-結合分子中恆定區的方法。抗體恆定區改變後的特定例子包括 WO 2009/125825 中實施例所述之恆定區(序列識別號s: 11、12、13 及 14)。

【0149】當藉由上述方法使抗原-結合物質在 pH 5.8 下的抗

原-結合活性低於在 pH 7.4 下的抗原-結合活性時(當 KD (pH5.8)/KD (pH7.4)值增加)，相較於原抗體 KD (pH5.8)/KD (pH7.4)此值較佳為 2 倍或以上，更佳為 5 倍或以上，更佳為 10 倍或以上，但不限於此。

【0150】再者，本發明提供在至少一個位置的至少一個胺基酸進行組胺酸或非自然胺基酸置換的抗原-結合分子，如下所述。胺基酸位置以 Kabat 編號來表示(Kabat EA et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH)。

重鏈：H27、H31、H32、H33、H35、H50、H58、H59、H61、H62、H63、H64、H65、H99、H100b 及 H102

輕鏈：L24、L27、L28、L32、L53、L54、L56、L90、L92 及 L94

【0151】在這些改變的位置中，H32、H61、L53、L90 及 L94 一般被認為是高度改變的位置。

【0152】特別是，組胺酸或非自然胺基酸置換的較佳位置組合包括，例如，H27、H31 及 H35 組合；H27、H31、H32、H35、H58、H62 及 H102 組合；L32 及 L53 組合；以及 L28、L32 及 L53 組合。再者，較佳的重鏈及輕鏈置換位置組合包括，例如，H27、H31、L32 及 L53 組合。

【0153】本發明的抗原-結合分子可具有其他特性，例如具有致效或拮抗作用的抗原-結合分子，只要其抗原-結合活性在酸性 pH 範圍下比在中性 pH 範圍下低，且其在酸性及中性 pH 範圍具有人類 FcRn-結合活性。本發明較佳之抗原-結合分子包括，例如，拮抗性抗原-結合分子。拮抗性抗原-結合分子

一般可藉由阻止配體(致效劑)與受體間的結合來抑制受體介導的細胞內信號傳遞。

【0154】再者，本發明的抗原-結合分子可辨識任何抗原。特別是，可被本發明抗原-結合分子辨識的抗原包括，例如，上述受體蛋白(膜結合受體和可溶性受體)、膜抗原，如細胞表面標誌物及可溶性抗原，如細胞激素。此抗原包括，例如，上述抗原。

【0155】在一較佳實施例中，本發明之抗原-結合分子包括具抗原-結合區及人類 FcRn-結合區的 IgG-型免疫球蛋白(IgG 抗體)。當 IgG 抗體被使用為抗原-結合分子時，此種類並無特別限制，可使用 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 及其類似。

【0156】本發明抗原-結合分子的來源並無特別限制，可為任何來源。其可使用，例如，鼠抗體，人類抗體，大鼠抗體，兔抗體，山羊抗體，駱駝抗體等。再者，此抗體可為，例如，上述嵌合抗體，特別為經胺基酸序列置換的改變抗體，例如人源化抗體。此抗體也可為上述雙特異性抗體，經各種分子連結的抗體修飾產物，含抗體片段的多胜肽、及經醣鏈修飾的抗體。

【0157】雙特異性抗體係指具可辨識不同抗原決定位之可變區的抗體。雙特異性或多特異性抗體為可辨識二個或以上抗原的抗體，或可辨識一相同抗原上二個或以上抗原決定位的抗體。

【0158】再者，含抗體片段的多胜肽包括，例如，Fab 片段、F(ab')2 片段、scFvs(Nat Biotechnol. 2005 Sep; 23(9): 1126-36)、功能域抗體 (dAbs) (WO 2004/058821, WO

2003/002609)、scFv-Fc (WO 2005/037989)、dAb-Fc 及 Fc 融合蛋白。當一分子包含 Fc 區時，Fc 區可作為人類 FcRn-結合區。再者，FcRn-結合區可融合至這些分子中。

【0159】再者，可應用於本發明之抗原-結合分子可為類抗體分子。類抗體分子(支架分子(scaffold molecule)、胜肽分子)為一具結合至一目標分子功能的分子(Current Opinion in Biotechnology (2006) 17: 653-658; Current Opinion in Biotechnology (2007) 18: 1-10; Current Opinion in Structural Biology (1997) 7: 463-469; Protein Science (2006) 15: 14-27)，且包括，例如，DARPins (WO 2002/020565), Affibody (WO 1995/001937)、Avimer (WO 2004/044011; WO 2005/040229)及 Adnectin (WO 2002/032925)。若這些類抗體分子可在 pH 值依賴性下結合至目標分子及/或在中性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性，則其可藉由抗原-結合分子促使抗原被攝入細胞中，藉由抗原-結合分子的給予促進血漿抗原濃度的降低，改善抗原-結合分子的藥物特性，以及增加單一抗原-結合分子可結合抗原的數目。

【0160】再者，抗原-結合分子可為融合人類 FcRn-結合區與受體蛋白的蛋白質，其可結合至一含有配體的目標，且包括，例如，TNFR-Fc 融合蛋白、IL1R-Fc 融合蛋白、VEGFR-Fc 融合蛋白、以及 CTLA4-Fc 融合蛋白(Nat Med. 2003, Jan; 9(1): 47-52; BioDrugs. (2006) 20(3): 151-60)。若這些受體人類 FcRn-結合區融合蛋白可在 pH-值依賴性下結合至一含配體的目標分子及/或在中性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性，則其可藉

由抗原-結合分子促使抗原被攝入細胞中，藉由抗原-結合分子的給予促進血漿抗原濃度的降低，改善抗原-結合分子的藥物特性，以及增加單一抗原-結合分子可結合抗原的數目。受體蛋白特別被設計及修飾以包括一針對包含配體之目標的受體蛋白結合區。上述之例子包括 TNFR-Fc 融合蛋白、IL1R-Fc 融合蛋白、VEGFR-Fc 融合蛋白及 CTLA4-Fc 融合蛋白，較佳含有結合目標所必要之受體蛋白之細胞外區域的可溶性受體分子。這些經設計及修飾的受體分子較佳為本發明中的人造受體。設計及修飾受體分子以形成人造受體分子的方法為習知技術。

【0161】再者，抗原-結合分子可為一與人類 FcRn-結合區融合的抗原-結合分子，其中的人造配體蛋白可結合至一目標且具有中和效果，且人造配體蛋白包括，例如，突變之 IL-6 (EMBO J. 1994 Dec 15; 13(24): 5863-70)。若此人造配體融合蛋白可在 pH 值-依賴性下結合至目標分子及/或在中性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性，則其可藉由抗原-結合分子促使抗原被攝入細胞中，藉由抗原-結合分子的給予促進血漿抗原濃度的降低，改善抗原-結合分子的藥物特性，以及增加單一抗原-結合分子可結合抗原的數目。

【0162】再者，本發明之抗體可包括經修飾的醣鏈。具經修飾醣鏈的抗體包括，例如，具經修飾醣基化的抗體(WO 99/54342)、將醣鏈加至缺乏岩藻醣之抗體(WO 00/61739; WO 02/31140; WO 2006/067847; WO2 006/067913)，以及具有醣鏈及平分葡萄糖(bisecting GlcNAc)的抗體(WO 02/79255)。

【0163】除了 pH 值外，此技藝人士自可適合地選擇抗原-結合或人類 FcRn-結合活性的分析條件，且此條件並無特別限制。例如，WO 2009/125825 中所述之 MES 緩衝液，37°C 的條件可用於測定活性。同時，抗原-結合分子的抗原-結合活性及人類 FcRn-結合活性可利用習知的方法來測定，例如，利用 Biacore (GE Healthcare)或其類似。當此抗原為一可溶性抗原時，可藉由以抗原作為分析物，滴入一固定有抗原-結合分子的晶片上，以測定抗原-結合分子結合至可溶性抗原的能力。再者，當此抗原為一膜型抗原時，可藉由以抗原-結合分子作為分析物，滴入一固定有抗原的晶片上，以測定抗原-結合分子結合至膜型抗原的能力。抗原-結合分子的人類 FcRn-結合活性可藉由以人類 FcRn 或抗原-結合分子作為分析物，將其分別滴入一固定有抗原-結合分子或人類 FcRn 的晶片上來進行測定。

【0164】嵌合抗體的產生已為習知。在人類-小鼠嵌合抗體的一例子中，例如，將編碼抗體 V 區之 DNA 連結至編碼抗體 C 區的 DNA；其可被插入入至一表現載體以產生此嵌合抗體。

【0165】“人源化抗體”又稱為重塑之人類抗體，其為將非人類如小鼠之抗體的互補決定區(CDRs)移植至人類抗體的 CDRs。識別 CDRs 的方法已為習知(Kabat et al., Sequence of Proteins of Immunological Interest (1987), National Institute of Health, Bethesda, Md.; Chothia et al., Nature (1989) 342: 877). 一般適用之基因重組技術也為習知(參照 European Patent Application EP 125023;及 WO 96/02576)。人源化抗體可以習知

方法產生，例如，辨識小鼠抗體的 CDR，以獲得編碼抗體的 DNA，其中此 CDR 連結至一人類抗體的框架區(FR)。接著，人源化抗體可利用傳統表現載體系統產生。此 DNAs 可使用引子對以 PCR 合成，引子對為各種寡核苷酸，其具有與 CDR 及 FR 末端重疊的部分(參照 WO 98/13388 所述之方法)。可選擇經由 CDRs 與人類抗體 FRs 的連結，使 CDRs 形成一適合的抗原結合位置。若有需要，抗體可變區的 FRs 胺基酸可被改變，使重塑人類抗體的 CDRs 可形成一合適的抗原結合位置(Sato et al., Cancer Res. (1993) 53: 10.01-6)。FRs 中的胺基酸殘基可被改變，其包括複數個可透過複數個非共價鍵直接結合至抗原(Amit et al., Science (1986) 233: 747-53)的位置，此複數個位置可影響或在 CDR 結構上具有一影響力 (Chothia et al., J. Mol. Biol. (1987) 196: 901-17)，且此複數個位置與 VH-VL 的相互作用有關(EP 239400)。

【0166】當本發明之抗原-結合分子為嵌合抗體或人類化抗體時，這些抗體的 C 區域較佳源自於人類抗體。例如，可使用 C-γ1、C-γ2、C-γ3、及 C-γ4 作為 H 鏈，且可使用 C-κ 及 C-λ 作為 L 鏈。再者，若有需要，胺基酸突變可發生於人類抗體 C 區域，以促進或降低對 Fc-γ 受體的結合或改善抗體的穩定性或產量。本發明之嵌合抗體較佳包括源自於非人類哺乳動物抗體的可變區以及源自於人類抗體的恆定區。再者，人源化抗體較佳包括源自於非人類哺乳動物抗體的 CDRs 以及源自於人類抗體的 FRs 與 C 區域。源自於人類抗體的恆定區較佳包括一人類 FcRn-結合區。此抗體包括，例如，IgGs (IgG1、IgG2、IgG3

及 IgG4)。用於本發明人源化抗體之恆定區可為任何同型抗體的恆定區。較佳使用源自於人類 IgG1 的恆定區，但不限於此。可用於人源化抗體之源自人類抗體的 FR，並無特別限制，且可源於任何同型的抗體。

【0167】本發明嵌合及人源化抗體的可變區及恆定區可被改變、刪除、置換、插入及/或增加等，只要其具有原抗體的結合專一性。

【0168】由於人類抗體的免疫原性較低，因此當嵌合及人源化抗體給予至予至人類以進行治療目的等時，可使用源自人類的序列。

【0169】本發明之抗原-結合分子可以任何方法獲得。例如，在酸性 pH 及中性 pH 範圍下原本不具人類 FcRn-結合活性的抗原-結合分子，抗原-結合活性在酸性 pH 範圍下比在中性 pH 範圍下較強的抗原-結合分子，或在酸性及中性 pH 範圍下具有類似抗原結合活性的抗原-結合分子，藉由上述的胺基酸改變等以人造改變抗原-結合分子，使其具有所欲能力。再者，篩選利用抗體資料庫或下述融合瘤獲得之多個抗體，以獲得具所欲能力的抗體。

【0170】當改變抗原-結合分子中的胺基酸時，可使用改變前抗原-結合分子胺基酸序列的已知序列，或熟悉此技藝人士新發現之抗原-結合分子的胺基酸序列。例如，當抗抗原-結合分子為一抗體時，其可由抗體資料庫或由表現單株抗體之融合瘤的編碼抗體基因獲得。

【0171】關於抗體資料庫，許多抗體資料庫皆為已知，且

建構的方法也為已知，因此，熟悉此技藝人士自可獲得適當的抗體資料庫。例如，關於噬菌體資料庫，可參照，例如 Clackson et al., Nature (1991) 352: 624-8；Marks et al., J. Mol. Biol. (1991) 222: 581-97；Waterhouses et al., Nucleic Acids Res. (1993) 21: 2265-6；Griffiths et al., EMBO J. (1994) 13: 324.0-60；Vaughan et al., Nature Biotechnology (1996) 14: 309-14；及 Japanese Patent Kohyo Publication No. (JP-A) H20-504970(對應非日本國際公開之未審查的日本國家公開)。再者，可使用習知的方法，例如，以真核細胞為資料庫的方法(WO 95/15393)及核醣體展示方法。再者，篩選人類抗體資料庫以獲得人類抗體的技術為習知技術。例如，利用噬菌體表現方法，使人類可變區表現於噬菌體的表面上以形成單鏈抗體(scFvs)，且篩選與抗原結合的噬菌體。篩選噬菌體的基因體，分析以確定編碼可與抗體結合之人類可變區的 DNA 序列。一但得知可與抗體結合之 scFvs DNA 序列，便可根據此序列構築載體以獲得人類抗體。此方法已為習知，且可參照 WO 92/01047、WO 92/20791、WO 93/06213、WO 93/11236、WO 93/19172、WO 95/01438 及 WO 95/15388。

【0172】對由融合瘤獲得編碼抗體基因的方法可使用已知技術，其包括所欲抗原的使用或表現作為致敏抗原之所欲抗原的細胞，以傳統的免疫方法進行免疫，利用傳統的細胞融合方法將獲得的免疫細胞與已知的親代細胞融合，以傳統的篩選方法篩選單株抗體表現細胞(融合瘤)，使用反轉錄酶由融合瘤中所獲得的 mRNAs 合成抗體可變區(V 區)的 cDNAs，且將其與

編碼所欲抗體恆定區(C 區)的 DNAs 連結。

【0173】更特別是，獲得編碼 H 鏈及 L 鏈之上述抗原-結合分子基因的致敏抗原可包括，例如，具免疫原性的完整抗原與不含免疫原性的不完整抗原，其包含半抗原及類似物；但不限於此。例如，可使用整個蛋白質及所欲蛋白的部份胜肽。已知的物質包括多醣、核酸、脂類及可作為抗原的類似物。因此，本發明抗原-結合分子的抗原並無特別限制。此抗原可以此技藝人士所習知的方法製備，例如，以桿狀病毒為基礎的方法(例如，WO 98/46777)及其類似。融合瘤可利用 Milstein et al. (G. Kohler and C. Milstein, Methods Enzymol. (1981) 73: 3-46)及其類似的方法產生。當抗原的免疫原性低時，可將抗原與一具免疫原性的大分子，如白蛋白結合後進行免疫。再者，若有需要，抗原可藉由與其他分子連結而被轉換成可溶性抗原。當使用跨膜分子如膜抗原(例如，受體)作為抗原時，膜抗原細胞外區域的部份可作為一片段，或於其表面表現跨膜分子之細胞可作為免疫原。

【0174】可利用上述適當的致敏抗原對動物進行免疫以獲得可產生抗原-結合分子的細胞。再者，可產生抗原-結合分子的細胞可藉由體外淋巴球的免疫獲得，其可產生抗原-結合分子。許多哺乳動物可被用來進行免疫，常使用的哺乳動物包括鼠類、兔形目及靈長類。此動物包括，例如，鼠類如小鼠、大鼠及倉鼠；兔形目如兔子；以及靈長類動物包括猴子、如食蟹猴、獼猴、狒狒及黑猩猩。再者，帶有人類抗體基因庫的轉殖動物已為此技藝人士所習知；且可由這些動物獲得人類抗體

(參照 WO 96/34096; Mendez et al., Nat. Genet. (1997) 15: 146-56)。除了使用這些轉殖動物外，例如，可藉由體外人類淋巴球與所欲抗原致敏，或由表現所欲抗原的細胞獲得具與抗原結合活性之所欲人類抗體，且接著融合經致敏的淋巴球與人類骨髓瘤細胞，如 U266 (參照日本專利申請公開號(JP-B) H01-59878 (公開被審查和被核准的日本專利申請案以進行異議)。再者，可藉由帶有完整人類抗體基因庫及所欲抗原的免疫轉殖動物獲得所欲人類抗體(參照 WO 93/12227、WO 92/03918、WO 94/02602、WO 96/34096、及 WO 96/33735)。

【0175】可藉由將致敏抗原以磷酸鹽緩衝液(PBS)、生理鹽水或類似物適當地進行稀釋和懸浮，若有需要可與一佐劑混合乳化，以此進行動物免疫。接著以腹腔或皮下注射至動物。與弗氏不完全佐劑混合之致敏抗原較佳每 4 至 21 天給予數次。以傳統的方法偵測動物體內抗體的效價以證明抗體的產生。

【0176】藉由經所欲抗體免疫之淋巴球或動物可獲得產生抗體-結合分子的細胞，可利用傳統的融合劑(例如，聚乙二醇)與骨髓瘤細胞融合以形成融合瘤(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) 59-103)。當需要時，可培養生長融合瘤，且利用習知的分析方法，如免疫沉澱法、放射免疫分析法(RIA)及酵素免疫分析法(ELISA)偵測由融合瘤中所產生之具結合專一性的抗原-結合分子。因此，若有需要，可利用極限稀釋(limiting dilution)等方法偵測融合瘤產生之抗原-結合分子的專一性、親和力或能力。

【0177】接著，利用可與抗原-結合分子專一性結合的探

針，由融合瘤或抗原-結合分子表現細胞(致敏淋巴球及其類似)中複製編碼所選擇抗原-結合分子的基因(例如，與編碼抗體恆定區序列互補的寡核苷酸)。也可利用 RT-PCR 從 mRNA 複製基因。免疫球蛋白可分類為 5 種不同種類，IgA、IgD、IgE、IgG 及 IgM。這些種類更可被分為數種次群組(同型)(例如，IgG-1、IgG-2、IgG-3 及 IgG-4；IgA-1 及 IgA-2；及其類似)。在本發明中，抗原-結合分子所使用的 H 鏈及 L 鏈並無特別限制，且可源自於上述任何種類及次群組的抗體；然而較佳為 IgG。

【0178】在本發明中，可利用基因工程技術改變 H-鏈-編碼基因及 L-鏈-編碼基因。一般經改變的抗體，例如，嵌合抗體及人源化抗體，為經人造修飾以降低針對人類的異源性免疫源性及其類似，其可被適當地形成為抗體，例如，小鼠抗體、大鼠抗體、兔抗體、倉鼠抗體、羊抗體及駱駝抗體。嵌合抗體為具有非人類哺乳動物抗體，如小鼠抗體之 H-鏈及 L-鏈可變區的抗體，以及人類抗體之 H-鏈及 L-鏈恆定區。嵌合抗體可藉由將編碼小鼠抗體可變區之 DNA 與編碼人類抗體恆定區之 DNA 結合後，將其插入表現載體中，並將此載體導入寄主中生成抗體以獲得。人源化抗體，又稱為重塑之人類抗體，可使用數種寡核苷酸以 PCR 合成，寡核苷酸在 DNA 序列末端具有被設計可與非人類哺乳動物，如小鼠的互補決定區(CDRs)連結的重疊部分。此獲得的 DNA 可與編碼人類抗體恆定區的 DNA 結合。此結合之 DNA 可被插入表現載體中，且此載體可被導入寄主以產生抗體(參照 EP 239400 及 WO 96/02576)。當 CDR 形

成一適當的抗原-結合位置時，可篩選出透過 CDR 被結合的人類抗體 FR。若有需要，抗體可變區之框架區中的胺基酸可被置換，使重塑人類抗體的 CDR 形成一適當地抗原-結合位置(K. Sato et al., Cancer Res. (1993) 53: 10.01-10.06)。

【0179】除了上述人類化之外，抗體可被改變以改善其生物特性，例如，對抗原的結合。在本發明中，此改變可以利用定點突變(參照，例如 Kunkel (1910.0) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488)、PCR 突變及盒式突變(cassette mutagenesis)。一般來說，相較於原抗體可變區的胺基酸序列，改善生物特性之突變抗體的序列同源性及/或相似性為 70%或更高，更較為 80%或更高，更佳為 90%或更高(例如，95%或更高，97%、98%或 99%)。在本發明中，序列同源性及/或相似性為胺基酸殘基對原抗體殘基之同源性(相同殘基)或相似性(依據胺基酸支鏈的一般特性，此胺基酸被分類為相同群組)的比例，若有需要，序列同源性數值透用序列比對和間隙比對(gap introduction)得到最大化。一般來說，天然胺基酸殘基可根據其支鏈的特性被分類如下：

(1)疏水性：丙胺酸、異亮胺酸、纈胺酸、蛋胺酸及亮胺酸；

(2)中性親水性：天門冬醯胺、谷氨醯胺、半胱胺酸、蘇胺酸及絲胺酸；

(3)酸性：天門冬胺酸及谷胺酸；

(4)鹼性：精胺酸、組胺酸及賴胺酸；

(5)影響鏈方向的殘基：甘胺酸及脯胺酸；及

(6)芳香族：酪胺酸、色胺酸及苯丙胺酸。

【0180】一般來說，所有 6 種於 H 鏈及 L 鏈可變區的互補決定區(CDRs；高度變異區)可彼此作用以形成抗體的抗原-結合位。目前已知，即使單一可變區的親和力低於完整結合位的親和力，單一可變區也可辨識及結合至一抗原。因此，編碼本發明 H 鏈及 L 鏈的抗體基因可編碼數個片段，每個片段包括 H 鏈及 L 鏈抗原-結合位，只要此被基因編碼的多胜肽保有與所欲抗原結合的能力。

【0181】如上所述，重鏈可變區通常由 3 個 CDRs 及 4 個 FRs 所組成。在本發明一較佳實施例中，胺基酸殘基的改變可適當地擇自於例如在 CDR 或 FR 中的胺基酸殘基。一般來說，CDR 中胺基酸殘基的改變會降低抗原-結合活性。因此，本發明中適當的胺基酸殘基改變較佳擇自於 FR 中的胺基酸殘基，但不限於此。只要證明此改變不會降低結合活性，也可選擇 CDR 中的胺基酸。再者，此技藝人士可利用公開的資料庫或類似獲得適合的序列，其可作為人類或小鼠組織中抗體可變區的 FR

【0182】再者，本發明提供編碼本發明抗原-結合分子的基因。此編碼本發明抗原-結合分子的基因可為任何基因，且可為 DNAs、RNAs、核苷酸類似物或其類似物。

【0183】再者，本發明亦提供帶有上述基因的寄主。此寄主並無特別限定，且包括，例如，E. coli 及各種動物細胞。此寄主細胞可被用於作為，例如，製備及表現本發明抗體的表現系統。表現系統可為體外及體內胜肽表現系統。體外表現系統包括，例如，使用真核細胞或原核細胞的表現細胞。

【0184】真核細胞可被使用作為寄主細胞，包括，例如，動物細胞、植物細胞及真菌細胞。動物細胞包括，哺乳動物細胞，例如 CHO (J. Exp. Med. (1995) 108: 94.0)、COS、HEK293、3T3、myeloma、BHK (baby hamster kidney)、HeLa 及 Vero；兩棲類動物細胞，例如，非洲爪蟾卵母細胞(Valle et al., Nature (1981) 291: 338-340)；及昆蟲細胞，如 Sf9、Sf21 及 Tn5。CHO-DG44、CHO-DX11B、COS7 細胞、HEK293 細胞及 BHK 細胞較佳被使用於表現本發明之抗體。在動物細胞中，CHO 細胞特別較佳使用於大量表現(large-scale expression)。可藉由例如碳磷酸法、DEAE-dextran 法、陽離子微脂體 DOTAP 法(Boehringer-Mannheim)、電波法、及脂質體轉染法(lipofection)將載體導入寄主細胞中。

【0185】關於植物細胞，例如，煙草(Nicotiana tabacum)來源細胞及浮萍(Lemna minor)等已知的蛋白質表現系統。可培養由這些細胞所獲得之癒傷組織以產生本發明之抗原-結合分子。關於真菌細胞，已知的蛋白質表現系統為利用酵母菌細胞，例如，釀酒酵母屬之細胞(例如，芽殖酵母(Saccharomyces cerevisiae)和裂殖酵母(Schizosaccharomyces pombe))；以及絲狀真菌(filamentous fungi)的細胞，例如，曲霉屬(例如，黑麴菌(Aspergillus niger))。這些細胞可作為寄主細胞以產生本發明之抗原-結合分子。

【0186】在原核表現系統中，可使用細菌細胞。關於細菌細胞，除了上述利用 E. coli 之外，利用枯草芽孢桿菌作為表現系統已為習知。這些系統可被使用於表現本發明之抗原-結

合分子。

【0187】<篩選方法>

本發明提供在酸性及中性 pH 範圍下具 FcRn-結合活性之抗原-結合分子的篩選方法。本發明亦提供在酸性及中性 pH 範圍下具 FcRn-結合活性，且在酸性 pH 範圍之 FcRn-結合活性比在中性 pH 範圍下低之抗原-結合分子的篩選方法。本發明亦提供可促使抗原攝入細胞內之抗原-結合分子的篩選方法。本發明亦提供經修飾使可每分子可結合多個抗原之抗原-結合分子的篩選方法。本發明亦提供可促使抗原移除之抗原-結合分子的篩選方法。本發明亦提供藥物動力特性經改善之抗原-結合分子的篩選方法。本發明亦提供可促使於細胞內與胞外-結合之抗原分離之抗原-結合分子的篩選方法。本發明亦提供可在抗原-結合型式下攝入細胞內後，以無抗原型式於細胞內釋放之抗原-結合分子的篩選方法。本發明亦提供可特別作為藥學組成物之抗原-結合分子的篩選方法。上述抗原-結合分子的篩選方法可用於篩選具有較佳血漿滯留及可移除血漿中抗原之抗原-結合分子。

【0188】特別是，本發明提供篩選抗原-結合分子的方法，其包括下列步驟：

(a) 篩選一抗原-結合分子，其在中性 pH 範圍下比在改變於酸性 pH 範圍下具人類 FcRn-結合活性之抗原-結合分子 FcRn-結合區中至少一個胺基酸前，具有較強的人類 FcRn-結合活性；以及

(b) 改變一抗原-結合分子之抗原-結合區中至少一個胺基

酸，且篩選抗原-結合活性在中性 pH 範圍下比在酸性 pH 範圍下高之抗原-結合分子。

【0189】可以在任何順序下進行步驟(a)及(b)。再者，每各步驟可重覆二次或以上。步驟(a)及(b)重覆的次數並無特別限制；然而，一般為 10 次或更少。

【0190】在本發明之篩選方法中，抗原-結合分子在中性 pH 範圍下的抗原-結合活性並無特別限制，只要其在 pH 6.7 至 10.0 下具有一抗原-結合活性。例如，包括 WO 2009/125825 所述之例子。較佳之抗原-結合活性包括在 pH 7.0 至 8.0 範圍下的抗原-結合活性。更佳之抗原-結合活性包括在 pH 7.0 下的抗原-結合活性。同時，抗原-結合分子的抗原-結合活性在酸性 pH 範圍下並無特別限制，只要其為在 pH 4.0 至 6.5 下的抗原-結合活性。較佳之抗原-結合活性包括在 pH 5.5 至 6.5 下的抗原-結合活性。更佳之抗原-結合活性包括在 pH 5.8 至 5.5 下的抗原-結合活性。

【0191】抗原-結合分子在中性 pH 範圍下的人類 FcRn-結合活性並無特別限制，只要其為在 pH 6.7 至 10.0 範圍下的人類 FcRn-結合活性。較佳之人類 FcRn-結合活性包括在 pH 7.0 至 8.0 範圍下的人類 FcRn-結合活性。更佳之人類 FcRn-結合活性包括在 pH 7.4 下的人類 FcRn-結合活性。

【0192】抗原-結合分子在酸性 pH 範圍下的人類 FcRn-結合活性並無特別限制，只要其為在 pH 4.0 至 6.5 範圍下之人類 FcRn-結合活性。較佳之人類 FcRn-結合活性包括在 pH 5.5 至 6.5 範圍下之人類 FcRn-結合活性。更佳為之人類 FcRn-結合活

性包括在 pH 5.8 至 6.0 範圍下之人類 FcRn-結合活性。

【0193】在本發明中，酸性 pH 範圍一般係指 pH 4.0 至 pH 6.5。此酸性 pH 範圍較佳為 pH 5.5 至 pH 6.5 中之任一 pH 範圍，更佳擇自於 pH 5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4 或 6.5，更佳為 pH 5.8 至 pH 6.0，其與體內早期核內體的 pH 值相近。再者，本發明中之中性 pH 範圍一般介於 pH 6.7 至 pH 10.0。此中性 pH 範圍較佳為介於 pH 7.0 至 pH 8.0 中的任一 pH 值範圍，較佳擇自於 pH 7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9 及 8.0，更佳為 pH 7.4，其與體內血漿(血液)的 pH 值相近。當因 pH 7.4 的結合親和力低而難以評估人類 FcRn-結合區與人類 FcRn 之間的結合親和力時，可改變 pH 7.4 而使用 pH 7.0。對於分析條件的溫度，人類 FcRn-結合區與人類 FcRn 之間的結合親和力可在 10℃至 50℃的任何溫度下進行分析。為了偵測人類 FcRn-結合區與人類 FcRn 之間的結合親和力，較佳在 15℃至 40℃下進行分析。更佳也可在介於 20℃-35℃下的任何溫度，例如 20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34 及 35℃之任一溫度下偵測人類 FcRn-結合區與人類 FcRn 之間的結合親和力。實施例 5 中所揭示之 25℃為本發明一實施例。

【0194】抗原-結合分子的抗原-結合活性及人類 FcRn-結合活性可利用習知方法測得。除了 pH 之外，此技藝人士自可選擇適當條件。抗原-結合分子的抗原-結合活性及人類 FcRn-結合活性可利用解離常數(KD)、視解離常數 (apparent KD)、解離速率常數(k_d)、視解離速率常數(apparent k_d),或其類似來進

行評估。其可利用習知方法來測定，例如，使用 Biacore (GE Healthcare)、史考特法(Scatchard plot)、流式細胞儀、或其類似。

【0195】根據 Journal of Immunology (2009) 182: 7663-7671 的內容，在酸性 pH 範圍下(pH 6.0)完整人類 IgG1 的人類 FcRn-結合活性為 KD 1.7 微莫耳 (microM)，但在中性 pH 範圍下無法偵測到此活性。因此，在一較佳實施例中，本發明之在酸性及中性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性的抗原-結合分子可被篩選出來，其在酸性 pH 範圍下的人類 FcRn-結合活性為 KD 20 微莫耳或更高，其與完整人類 IgG 在中性範圍下的人類 FcRn-結合活性相同或更高。在一更佳實施例中，在酸性 pH 範圍下之人類 FcRn-結合活性為 KD 2.0 微莫耳或更高，且在中性 pH 範圍下為 KD 40 微莫耳或更高的本發明抗原-結合分子可被篩選出來。在一更佳實施例中，在酸性 pH 範圍下人類 FcRn-結合活性為 KD 0.5 微莫耳或更高，及在中性 pH 範圍下為 KD 15 微莫耳或更高的本發明抗原-結合分子可被篩選出來。上述 KD 值可以 Journal of Immunology (2009) 182: 7663-7671 (藉由將抗原-結合分子固定於晶片上，並加入人類 FcRn 作為分析物)所述方法偵測。

【0196】本發明提供一種篩選抗原-結合分子的方法，其包括下列步驟：

(a) 篩選一抗原-結合分子，該抗原-結合分子在中性 pH 範圍下的人類 FcRn-結合活性大於 KD 3.2 微莫耳，該抗原-結合分子獲得自改變該抗原-結合分子之人類 FcRn-結合區的至少

一個胺基酸，

(b) 獲得編碼步驟(a)的抗原-結合分子的基因，該抗原-結合分子的人類 FcRn-結合區與抗原-結合區連結；以及

(c) 利用步驟(b)之基因產生抗原-結合分子。

【0197】在一實施例中，此技藝人士可利用上述方法篩選出包含一抗原-結合區及一人類 FcRn-結合區的抗原-結合分子，其在酸性及中性 pH 範圍下具有一人類 FcRn-結合活性，其中人類 FcRn 及在酸性 pH 範圍比在中性 pH 範圍下低的抗原-結合活性大於 KD 3.2 微莫耳。在一更佳實施例中，人類 FcRn-結合活性在 pH 7.0 及 25℃下大於 KD 2.3 微莫耳。

【0198】本發明提供一種篩選包含一抗原-結合區及一人類 FcRn-結合區之抗原-結合分子的方法，其在中性 pH 範圍下具有一人類 FcRn-結合活性，其中人類 FcRn-結合活性在中性 pH 範圍下大於 KD 2.3 微莫耳。本發明提供一種篩選包含一抗原-結合區及一人類 FcRn-結合區之抗原-結合分子的方法，在中性 pH 範圍下具有一人類 FcRn-結合活性，其中人類 FcRn-結合活性在在中性 pH 範圍下大於完整人類 IgG 的 38 倍以上。

【0199】本發明在中性 pH 範圍下具人類 FcRn-結合活性的抗原-結合分子並無特別限制，只要其在 pH 6.7 至 10.0 下具有人類 FcRn-結合活性。然而，較佳之抗原-結合分子在 pH 6.7 至 10.0 下的人類 FcRn-結合活性大於完整人類 IgG 的人類 FcRn-結合活性。

【0200】本發明在酸性 pH 範圍下具人類 FcRn-結合活性的抗原-結合分子並無特別限制，只要其在 pH 4.0 至 6.5 下具有

人類 FcRn-結合活性。然而，較佳之抗原-結合分子在 pH 5.5 至 6.5 下的人類 FcRn-結合活性大於完整人類 IgG 的人類 FcRn-結合活性。

【0201】其中，篩選抗原-結合活性於中性 pH 範圍下比於酸性 pH 範圍下強之抗原-結合分子的步驟，與篩選抗原-結合活性於酸性 pH 範圍下比於中性 pH 範圍下弱之抗原-結合分子的步驟同義。

【0202】中性及酸性 pH 範圍之抗原-結合活性之間的比率並無特別限制，只要抗原-結合活性在中性 pH 範圍下比在酸性 pH 範圍下強。然而，pH 6.7 至 10.0 之抗原-結合活性較佳為 pH 4.0 至 6.5 之抗原-結合活性的 2 倍或以上，更佳為 10 倍或以上，更佳為 40 倍或以上。

【0203】在本發明之篩選方法中，可使用資料庫，例如，噬菌體資料庫(phage libraries)。

【0204】在本發明之方法中，抗原與抗原-結合分子可在任何狀態下相互連結，且此狀態並無特別限制。例如，抗原可與一固定化抗原-結合分子接觸以完成連結。再者，此抗原-結合分子可與一固定化抗原接觸以完成連結。再者，抗原與抗原-結合分子可在一溶液狀態下相互接觸以完成連結。

【0205】可以任何方法以本發明篩選方法來篩選抗原-結合分子。例如，可使用預先存在之抗體(preexisting antibodies)、預先存在之抗原-結合區資料庫(噬菌體資料庫等)、來自於免疫動物的 B 細胞或免疫動物所獲得之融合瘤的抗體或抗體-結合區資料庫、對上述抗體或抗原-結合區資料庫進行隨機胺基酸

改變所獲得的抗體或抗原-結合區資料庫、具有組胺酸突變或非自然胺基酸突變的抗體或抗原-結合區資料庫(具高組胺酸或非自然胺基酸含量的資料庫，在特定位置上進行組胺酸或非自然胺基酸突變的抗原-結合區資料庫)，或其類似。

【0206】抗原-結合分子可利用本發明之篩選方法獲得，由於此抗原-結合分子可與抗原多次結合，因此其在血漿滯留中具有優勢。因此，本發明之篩選方法可用於作為獲得在血漿滯留中具優勢之抗原-結合分子的篩選方法。

【0207】再者，可利用本發明之篩選方法獲得在給予至動物，例如人類、小鼠或猴子時，可結合抗原 2 次或更多次的抗原-結合分子。因此，本發明之篩選方法可用於作為獲得可結合抗原 2 次或更多次之抗原-結合分子的篩選方法。

【0208】再者，可利用本發明之篩選方法獲得相較於抗原-結合位的數目，在給予至動物，例如人類、小鼠或猴子時，可結合更多抗原之抗原-結合分子。因此，本發明之篩選方法可用於作為獲得比其抗原-結合位數目結合更多抗原之抗原-結合分子的篩選方法。例如，當此抗體為一中和抗體時，本發明之篩選方法可用於作為獲得比其抗原-結合位數目中和更多抗原之抗原-結合分子的篩選方法。

【0209】再者，在給予至動物，例如人類、小鼠或猴子時，可利用本發明之篩選方法獲得於胞外結合抗原在細胞內分離之抗原-結合分子。因此，本發明之篩選方法可用於作為獲得在胞外結合抗原在細胞內分離之抗原-結合分子的篩選方法。

【0210】再者，可利用本發明之篩選方法獲得在給予至動

物，例如人類、小鼠或猴子時，可結合至抗原，且攝入至細胞中，並且以無抗原型式(antigen free form)釋放至細胞外的抗原-結合分子。因此，本發明之篩選方法可用於作為獲得可結合至抗原，且攝入至細胞中，並且以無抗原型式釋放至細胞外之抗原-結合分子的篩選方法。

【0211】再者，可利用本發明之篩選方法獲得在給予至動物，例如人類、小鼠或猴子時，可很快地移除血漿中抗原的抗原-結合分子。因此，本發明之之篩選方法可用於作為獲得具增加(高)移除血漿中抗原能力之抗原-結合分子的篩選方法。

【0212】再者，由於可減少給予至病患的劑量及頻率使其總劑量可以降低，因此，可預測此抗原-結合分子與藥物一樣良好。所以，本發明之之篩選方法可用於作為可當作藥物組成物使用之之抗原-結合分子的篩選方法。

【0213】<生產抗原-結合分子的方法>

本發明提供在核內體 pH 值及血漿 pH 值下具人類 FcRn-結合活性，且在核內體 pH 值下之抗原-結合活性比在血漿 pH 下低之抗原-結合分子的生產方法。本發明亦提供在給予後具良好藥物動力特性，且可促進血漿中抗原濃度降低之抗原-結合分子的生產方法。本發明亦提供可作為藥物使用之抗原-結合分子的生產方法。

【0214】特別是，本發明提供生產抗原-結合分子的方法，其包括下列步驟：

(a) 篩選一抗原-結合分子，該抗原-結合分子在中性 pH 範圍下的人類 FcRn-結合活性大於該抗原-結合分子的人類

FcRn-結合區至少一個胺基酸改變前在酸性 pH 範圍下的人類 FcRn-結合活性；

(b) 改變一抗原-結合分子之抗原-結合區的至少一個胺基酸，並篩選在中性 pH 範圍下的抗原-結合活性大於在酸性 pH 範圍下的抗原-結合活性之抗原-結合分子；

(c) 獲得一編碼步驟(a)及(b)所製備的抗原-結合分子的基因，該抗原-結合分子的人類 FcRn-結合區與抗原-結合區連結；以及

(d) 利用步驟(c)所獲得的基因生產抗原-結合分子。

【0215】可以在任何順序下進行步驟(a)及(b)。再者，每各步驟可重覆二次或以上。步驟(a)及(b)重覆的次數並無特別限制；然而，一般為 10 次或更少。

【0216】連結子(linker)可以任何形式連結步驟(a)及(b)中所製備之人類 FcRn-結合區及抗原-結合區。人類 FcRn-結合區與抗原-結合區可以共價鏈或非共價鏈的方式連結。特別是，此連結子可為一胜肽連結子或化學連結子或結合對(binding pair)，如生物素和鏈黴卵白素的組合。包含人類 FcRn-結合區及抗原-結合區之聚胜肽的修飾已為習知。在另一實施例中，本發明之人類 FcRn-結合區及抗原-結合區可被連結以在人類 FcRn-結合區及抗原-結合區之間形成一融合蛋白。為了在人類 FcRn-結合區及抗原-結合區形成融合蛋白，編碼人類 FcRn-結合區及抗原-結合區之基因可被選擇性連結以形成融合聚胜肽。較佳地，包含由各種胺基酸組成之胜肽的連結子可插入人類 FcRn-結合區及抗原-結合區之間。各種彎曲性連結子，如由

$(GGGGS)_n$序列組成之連結子已為習知。

【0217】使用於本發明生產方法中的抗原-結合分子可以任何方法獲得。例如，可使用可使用預先存在之抗體(preexisting antibodies)、預先存在之抗原-結合區資料庫(噬菌體資料庫等)、來自於經免疫動物的 B 細胞或免疫動物所獲得之融合瘤的抗體或抗體-結合區資料庫、對上述抗體或抗原-結合區資料庫進行隨機胺基酸改變所獲得的抗體或抗原-結合區資料庫、具有組胺酸突變或非自然胺基酸突變的抗體或抗原-結合區資料庫(具高組胺酸或非自然胺基酸含量的資料庫，在特定位置上進行組胺酸或非自然胺基酸突變的抗原-結合區資料庫)，或其類似。

【0218】在上述生產方法中，抗原-結合分子在中性 pH 範圍下的人類 FcRn-結合活性並無特別限制，只要其為在 pH 6.7 至 10.0 範圍下的人類 FcRn-結合活性。較佳之人類 FcRn-結合活性包括在 pH 7.0 至 8.0 範圍下的人類 FcRn-結合活性。更佳之人類 FcRn-結合活性包括在 pH 7.4 下的人類 FcRn-結合活性。

【0219】抗原-結合分子在酸性 pH 範圍下的人類 FcRn-結合活性並無特別限制，只要其為在 pH 4.0 至 6.5 範圍下之人類 FcRn-結合活性。較佳之人類 FcRn-結合活性包括在 pH 5.5 至 6.5 範圍下之人類 FcRn-結合活性。更佳之人類 FcRn-結合活性包括在 pH 6.0 下之人類 FcRn-結合活性。

【0220】在本發明中，酸性 pH 範圍一般係指 pH 4.0 至 pH 6.5。此酸性 pH 範圍較佳為 pH 5.5 至 pH 6.5 中之任一 pH 範圍，更佳擇自於 pH 5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、

6.4 或 6.5，更佳為 pH 5.8 至 pH 6.0，其與體內早期核內體的 pH 值相近。再者，本發明中之中性 pH 範圍一般介於 pH 6.7 至 pH 10.0。此中性 pH 範圍較佳為介於 pH 7.0 至 pH 8.0 中的任一 pH 值範圍，較佳擇自於 pH 7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9 及 8.0，更佳為 pH 7.4，其與體內血漿(血液)的 pH 值相近。當因 pH 7.4 的結合親和力低而難以評估人類 FcRn-結合區與人類 FcRn 之間的結合親和力時，可改變 pH 7.4 而使用 pH 7.0。對於分析條件的溫度，人類 FcRn-結合區與人類 FcRn 之間的結合親和力可在 10℃至 50℃的任何溫度下進行分析。為了偵測人類 FcRn-結合區與人類 FcRn 之間的結合親和力，較佳在 15℃至 40℃下進行分析。更佳也可在介於 20℃-35℃下的任何溫度，例如 20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34 及 35℃之任一溫度下偵測人類 FcRn-結合區與人類 FcRn 之間的結合親和力。實施例 5 中所揭示之 25℃為本發明一實施例。

【0221】本發明提供一種生產抗原-結合分子的方法，其包括下列步驟：

(a) 篩選一抗原-結合分子，該抗原-結合分子在中性 pH 範圍下的人類 FcRn-結合活性大於 KD 3.2 微莫耳，該抗原-結合分子獲得自改變該抗原-結合分子之人類 FcRn-結合區的至少一個胺基酸；

(b) 獲得編碼步驟(a)的抗原-結合分子的基因，該抗原-結合分子的人類 FcRn-結合區與抗原-結合區連結；以及

(c) 利用步驟(b)所獲得的基因製備抗原-結合分子。

【0222】在一較佳實施例中，可產生在酸性及中性 pH 範圍下具人類 FcRn-結合活性之本發明抗原-結合分子，其人類 FcRn-結合活性在酸性 pH 範圍下為 KD 20 微莫耳或更高，以及在中性 pH 範圍下與完整人類 IgG 相同或更高。在一更佳實施例中，可產生本發明之抗原-結合分子，其包括在酸性 pH 範圍下人類 FcRn-結合活性為 KD 2.0 微莫耳或更高，及在中性 pH 範圍下為 KD 40 微莫耳或更高的抗原-結合分子。在另一更佳實施例中，可產生本發明之抗原-結合分子，其包括在酸性 pH 範圍下人類 FcRn-結合活性為 KD 0.5 微莫耳或更高，及在中性 pH 範圍下為 KD 15 微莫耳或更高的抗原-結合分子。上述 KD 值可利用 Journal of Immunology (2009) 182: 7663-7671 (藉由將抗原-結合分子固定於晶片上，並滴入人類 FcRn 作為分析物)所述方法偵測。在一實施例中，包含一抗原-結合區及一人類 FcRn-結合區之抗原-結合分子，其在酸性及中性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性，其中人類 FcRn，以及在酸性 pH 範圍下比在中性 pH 範圍下低且大於 KD 3.2 微莫耳之抗原-結合活性可利用本發明中所述之習知方法獲得。在一更佳實施例中，所產生之抗原-結合分子的人類 FcRn-結合活性在 pH 7.0 及 25℃時大於 KD 3.2 微莫耳。

【0223】本發明提供一種生產包括一抗原-結合區及一人類 FcRn-結合區之抗原-結合分子的方法，其在中性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性，其中在中性 pH 範圍下的人類 FcRn-結合活性大於 KD 2.3 微莫耳。本發明亦提供一種生產包括一抗原-結合區及一人類 FcRn-結合區之抗原-結合分子的方法，

其在中性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性，其中人類 FcRn-結合活性在中性 pH 範圍下比完整之人類 IgG 大 38 倍。

【0224】在上述生產方法中，抗原-結合分子在中性 pH 範圍下的抗原-結合活性並無特別限制，只要其在 pH 6.7 至 10.0 下具有一抗原-結合活性。例如，包括 WO 2009/125825 所述之例子。較佳之抗原-結合活性包括在 pH 7.0 至 8.0 範圍下的抗原-結合活性，且更佳之抗原-結合活性包括在 pH 7.4 下的抗原-結合活性。再者，抗原-結合分子的抗原-結合活性在酸性 pH 範圍下並無特別限制，只要其為在 pH 4.0 至 6.5 下的抗原-結合活性。較佳之抗原-結合活性包括在 pH 5.5 至 6.5 下的抗原-結合活性。更佳之抗原-結合活性包括在 pH 5.8 至 5.5 下的抗原-結合活性。

【0225】抗原-結合分子之抗原-結合活性及人類 FcRn-結合活性可以習知方法測得。除了 pH 之外，此技藝人士自可適合地選擇條件。

【0226】在本發明之生產方法中，在中性 pH 範圍下具人類 FcRn-結合活性之抗原-結合分子並無特別限制，只要其在 pH 6.7 至 10.0 下具有人類 FcRn-結合活性。然而，抗原-結合分子之人類 FcRn-結合活性在 pH 6.7 至 10.0 下較佳高於完整人類 IgG 的人類 FcRn-結合活性。更佳，此抗原-結合分子的人類 FcRn-結合活性大於 KD 40 微莫耳，更佳大於 KD 15 微莫耳。

【0227】在本發明之生產方法中，在中性 pH 範圍下具人類 FcRn-結合活性之抗原-結合分子並無特別限制，只要其在 pH 4.0 至 6.5 下具有人類 FcRn-結合活性。然而，在 pH 5.5 至 6.5

下，此抗原-結合分子的人類 FcRn-結合活性較佳大於 KD 20 微莫耳。此人類 FcRn-結合活性更較與完整人類 IgG1 的人類 FcRn-結合活性相同或更大(大於 KD 1.7 微莫耳)，更佳大於 0.5 微莫耳。

【0228】上述 KD 值可利用 Journal of Immunology (2009) 182: 7663-7671 (藉由將抗原-結合分子固定於晶片上，並滴入人類 FcRn 作為分析物)所述方法偵測。

【0229】在本發明之生產方法中，抗原-結合活性在 pH 6.7 至 pH 10.0 比在 pH 4.0 至 pH 6.5 大之抗原-結合分子的篩選步驟，與抗原-結合活性在 pH 6.7 至 pH 10.0 比在 pH 4.0 至 pH 6.5 小之抗原-結合分子的篩選步驟同義。

【0230】抗原-結合活性在中性 pH 範圍下與酸性 pH 範圍下的比值並無特別限制，只要抗原-結合活性在中性 pH 範圍下比在酸性 pH 範圍下大。pH 6.7 至 10.0 之抗原-結合活性較佳為 pH 4.0 至 6.5 之抗原-結合活性的 2 倍或以上，更佳為 10 倍或以上，更佳為 40 倍或以上。

【0231】在上述生產方法中，抗原與抗原-結合分子可在任何位置上相互結合，且人類 FcRn 及抗原-結合分子可在任何位置上相互結合。此狀態並無特別限制，例如，抗原或人類 FcRn 可與一固定化抗原-結合分子接觸以結合至抗原-結合分子。再者，此抗原-結合分子可與一固定化抗原或人類 FcRn 接觸以結合至抗原-結合分子。再者，抗原-結合分子可在一溶液狀態下與抗原或人類 FcRn 接觸以結合至抗原-結合分子。

【0232】以上述方法所生產之抗原-結合分子可為任何之抗

原-結合分子；且較佳之抗原-結合分子包括，例如，其具有一抗原-結合區及一人類 FcRn-結合區，在人類 FcRn-結合區中含有至少一個胺基酸的改變，以及對胺基酸進行組胺酸置換或插入至少一個組胺酸。

【0233】人類 FcRn-結合區中的胺基酸改變並無特別限制，只要其可增加在中性 pH 範圍下的人類 FcRn-結合活性。此改變包括，例如，上述 IgG Fc 區中第 221 至 225、227、228、230、232、233 至 241、243 至 252、254 至 260、262 至 272、274、276、278 至 289、291 至 312、315 至 320、324、325、327 至 339、341、343、345、360、362、370、375 至 378、380、382、385 至 387、389、396、414、416、423、424、426 至 438、440 及 442 (EU 編號)位置的胺基酸。更特別是，此胺基酸改變包括表 1、2、6-1 及 6-2 (EU 編號)所示之胺基酸位置。可藉由上述改變，使中性 pH 範圍下 IgG 型之免疫球蛋白的 Fc 區具有人類 FcRn 結合活性。較佳可藉由改變擇自第 237、238、239、248、250、252、254、255、256、257、258、265、270、286、289、297、298、303、305、307、308、309、311、312、314、315、317、325、332、334、360、376、380、382、384、385、386、387、389、424、428、433、434 及 436 (EU 編號)位置之至少一個胺基酸以增加人類 FcRn-結合活性。可藉由將擇自於上述任一胺基酸置換為其他胺基酸，以增加抗原-結合分子的人類 FcRn-結合活性。胺基酸改變的數目並無特別限制；可僅在一個位置或二個或以上的位置改變一個胺基酸。二個或以上胺基酸改變的合併包括，例如，如表 3、4-1 至 4-5、6-1 及 6-2

中所述。

【0234】此組胺酸突變的位置並無特別限制；其可為任何位置，只要此組胺酸突變可降低在酸性 pH 值範圍下抗原-結合分子的抗原-結合活性，使其低於在中性 pH 值範圍下的抗原-結合活性。此組胺酸突變可發生於單一或 2 個或以上的位置。

【0235】因此，本發明之生產方法更包括改變上述胺基酸及置換或插入組胺酸之步驟。在本發明之生產方法中，可使用非自然之胺基酸來置換組胺酸。因此，本發明也可以非自然之胺基酸置換上述組胺酸。

【0236】再者，在另一實施例中，此抗原-結合分子可以上述方法生產，包括，例如，含有經改變之抗體恆定區的抗原-結合分子。因此，本發明之生產方法更包括改變抗體恆定區胺基酸之步驟。

【0237】可藉由給予以本發明生產方法所生產之抗原-結合分子以促進血漿抗原濃度的降低。因此，本發明之生產方法可作為在給予時可促進血漿抗原濃度降低之抗原-結合分子的生產方法。

【0238】再者，本發明生產方法所生產之抗原-結合分子可促進藥物動力特性。因此，本發明之生產方法可作為促進藥物動力特性之抗原-結合分子的生產方法。

【0239】再者，本發明生產方法所生產之抗原-結合分子在給予至動物，例如人類、小鼠或猴子時，可增加單一抗原-結合分子結合的抗原的數目。因此，本發明之生產方法可作為增加單一抗原-結合分子可結合抗原數目之抗原-結合分子的生產

方法。

【0240】再者，本發明生產方法所生產之抗原-結合分子在給予至動物，例如人類、小鼠或猴子時，被預期可在細胞內與胞外-結合之抗原分離。因此，本發明之之生產方法可作為在細胞內與胞外-結合之抗原分離之抗原-結合分子的生產方法。

【0241】再者，本發明生產方法所生產之抗原-結合分子在給予至動物，例如人類、小鼠或猴子時，被預期可與抗原結合並攝入細胞內，並以無抗原型式釋放至細胞外。因此，本發明之生產方法可作為可與抗原結合並攝入細胞內，並以無抗原型式釋放至細胞外之抗原分離之抗原-結合分子的生產方法。

【0242】再者，相較於一般的抗原-結合分子，此抗原-結合分子在給予時具有更佳之降低血漿抗原濃度的能力，因此可預期特別可作為藥物。因此，本發明之生產方法可作為用於藥物組成物之抗原-結合分子的生產方法。

【0243】由本發明生產方法所獲得之基因一般可以適當的載體攜帶，接著導入寄主細胞內。此載體並無特別限制，只要其可保有插入的核酸。例如，當使用 E. coli 作為寄主時，較佳之複製載體 (cloning vectors) 包括 pBluescript 載體 (Stratagene)；然而，也可使用各種市售的載體。當使用載體來產生本發明之抗原-結合分子時，較佳使用表現載體。 表現載體並無特別限制，只要此載體可於體外、於 E. coli 內、於培養細胞內、或組織體內表現此抗原-結合分子。例如，pBEST 載體 (Promega) 較佳可用於體外表現；pET 載體 (Invitrogen) 較佳可用於 E. coli；pME18S-FL3 載體 (GenBank Accession No.

AB009864)較佳可用於培養細胞；以及 pME18S 載體(Mol Cell Biol. (1988) 8: 466-472)較佳可用於組織體內。本發明之 DNAs 可利用傳統的方法插入載體中，例如利用限制酶位置進行接合(ligation)(Current protocols in Molecular Biology, edit. Ausubel et al., (1987) Publish. John Wiley & Sons, Section 11.4-11.11)。

【0244】上述寄主細胞並無特別限制，可根據目的決定使用的各種寄主細胞。用於表現抗原-結合分子之細胞包括，細菌(如，鏈球菌(Streptococcus)、葡萄球菌(Staphylococcus)、大腸桿菌(E. coli)、鏈黴菌(Streptomyces)及枯草桿菌(Bacillus subtilis))，真核細胞(如，酵母菌及麴菌(Aspergillus))，昆蟲細胞(如，Drosophila S2 及 Spodoptera SF9)，動物細胞(如，CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293 及黑色素瘤(Bowes melanoma)細胞)，以及植物細胞。載體可利用已知的方法導入寄主細胞中，例如，磷酸鈣沉澱法、電擊法(Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons, Section 9.1-9.9)、脂質體轉染法及微注射法。

【0245】此寄主細胞可以習知的方法進行培養。例如，當使用動物細胞作為寄主時，可使用 DMEM、MEM、RPMI1640 或 IMDM 作為培養基。其可與血清補充物，如 FBS 或小牛血清(FCS)合併使用。此細胞可無血清培養方式進行培養。在培養的過程中，較佳之 pH 為約 pH 6 至 8。一般可於 30 至 40 ℃ 下進行約 15 至 200 小時的培養。若有需要可改變、充氣或攪拌培養基。

【0246】可將適當的分泌訊號(secretion signals)導入所欲之胜肽中，使得表現於寄主細胞的抗原-結合分子可被釋效至內質網內腔、間質空間(periplasmic space)、或細胞外。此訊號可為所欲抗原-結合分子之內源性或外源訊號。

【0247】另一方面，例如，利用動物或植物之生產系統可作為體內生產胜肽的系統。將所欲胜肽導入動物或植物中，且此胜肽可在動物或植物體內生產，並收集。本發明之"寄主"包括動物及植物。

【0248】利用動物之生產系統包括使用動物或昆蟲之系統。可使用動物，如山羊，豬，羊，老鼠和牛(Vicki Glaser SPECTRUM Biotechnology Applications (1993))。此此動物可為基因轉殖動物。

【0249】例如，編碼本發明抗原-結合分子之聚核酸可為帶有編碼專一性表現於乳汁之胜肽基因(如山羊β-酪蛋白)的融合基因。接著，將含有此融合基因之聚核酸片段注入山羊胚胎，並移植到母山羊中。所欲之抗原-結合分子可由轉殖山羊中之乳汁中獲得，轉殖山羊為接受此胚胎之山羊所生，或為其後代。可給予適當的賀爾蒙以增加轉殖山羊所生產之含抗原-結合分子乳汁的量(Ebert et al., Bio/Technology (1994) 12: 699-702)。

【0250】昆蟲，如蠶，可用於生產本發明之抗原-結合分子。當使用蠶時，可使用攜帶編碼所欲抗原-結合分子之聚核苷酸的桿狀病毒感染蠶，且此所欲之抗原-結合分子可由其體液中獲得。

【0251】再者，當使用植物來生產本發明之抗原-結合分子時，例如可使用煙草。當使用煙草時，可將編碼所欲抗原-結合分子之聚核苷酸插入植物表現載體，例如 pMON 530，接著將此載體導入細菌中，如農桿腫瘤菌(Agrobacterium tumefaciens)。此細菌接著可感染煙草，如紅花煙草(Nicotiana tabacum)，且此所欲抗原-結合分子可由其葉子中收集獲得(Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24: 131-138)。再者，其也可以類似的細菌感染浮萍(青萍(Lemna minor))。經無性複製後，所欲抗原-結合分子可由浮萍細胞中獲得(Cox KM et al., Nat. Biotechnol. 2006 Dec; 24(12): 1591-1597)。

【0252】因此，所獲得之抗原-結合分子可由寄主細胞的內部或外部(如，培養基及乳汁)分離出來，並純化如實質上純及同質的(homogenous)抗原-結合分子。用於分離及純化抗原-結合分子的方法並無特別限制，且可使用一般通常用於分離及純化聚胜肽的方法。可藉由適當的選擇及合併，如，層析管柱、過濾、超過濾、鹽析，溶劑沉澱、溶劑萃取，蒸餾，免疫沉澱、SDS -聚丙烯醯胺凝膠電泳、等電點聚焦、透析及再結晶，分離及純化抗原-結合分子。

【0253】層析包括，例如，親和性層析，離子交換層析，疏水層析，凝膠過濾，逆相色譜，吸附色譜(Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., (1996) Cold Spring Harbor Laboratory Press)。此層析法可為液相層析，如 HPLC 及 FPLC。用於親和性層析的管柱包括，蛋白 A 管柱及蛋白 G 管柱。使

用蛋白 A 的管柱包括，例如，Hyper D、POROS、及 Sepharose F. F. (Pharmacia)。

【0254】若有需要，抗原-結合分子可被任意修飾，且在抗原-結合分子純化之前或之後，可以適當的蛋白質修飾酶刪除部分胜肽。此蛋白質修飾酶包括，例如，胰蛋白酶，糜蛋白酶，離胺醯內切酶(lysyl endopeptidases)，蛋白激酶及葡萄糖苷酶。

【0255】<藥學組成物>

本發明更有關於藥學組成物，其包括本發明之抗原-結合分子，以本發明之篩選方法所分離之抗原-結合分子，或以本發明之生產方法所產生之抗原-結合分子。相較於傳統的抗原-結合分子，本發明之抗原-結合分子及以本發明之生產方法所產生之抗原-結合分子具有更強的降低血漿抗原濃度能力，且因此可作為藥學組成物。本發明之藥學組成物包括藥學上可接受之載體。

【0256】在本發明中，藥學組成物一般係指治療或預防，或檢測及診斷疾病的藥物。

【0257】本發明之藥學組成物可習知方法配製。例如，其可以包含藥學上可接受水或其他液體之無菌注射溶液或懸浮液的形式用於腸道。例如，此組成物可利用在一般經核准之藥物製造規範下與藥學上可接受之載體或介質，特別是與無菌水，生理鹽水，植物油，乳化劑，懸浮，界面活性劑，穩定劑，調味劑，賦形劑，車輛，防腐劑，黏結劑等類似物合併，以配製成單一劑量的混合形式。在此配方中，可調整活性成分的含量以獲得在預先確定範圍內的適量含量。

【0258】可依據標準的配方實例，使用介質，如注射用無菌水以配製注射用無菌組成物。注射用水溶液包括，例如，生理鹽水及包含葡萄糖或其他佐劑(例如，D-山梨醇、D-甘露、D-甘露醇及氯化鈉)之等滲透壓溶液。其也可與適當的增溶劑合併，例如，醇類(乙醇及其類似物)、多元醇(丙二醇、聚乙二醇及其類似物)、非離子性界面活性劑(聚山梨酯 80(TM)、HCO-50 及其類似物)。

【0259】油類包括芝麻油和大豆油。苯甲酸苄酯和/或苯甲醇可作為增溶劑合併使用。可與緩衝液(例如，磷酸溶液及醋酸鈉緩衝液)、潤膚劑(例如，鹽酸普魯卡因(procaine hydrochloride))、穩定劑(例如，苯甲醇和苯酚)、及/或抗氧化劑合併使用。將製備好的注射液填充至適當的安瓿中。

【0260】本發明之藥學組成物較佳為腸外給予。例如，此組成物可為注射劑型、鼻腔給予劑型、經肺給予劑型、或經皮給予劑型。例如，其可以靜脈注射，肌肉注射，腹腔注射，皮下注射等局部或全身給予。

【0261】可依據病患的年紀及症狀選擇適當的給予方式。含有抗原-結合分子之藥學組成物的劑量可為，例如，每次給予 0.0001 至 1,000 mg/kg。再者，此劑量可為，例如，每個病患 0.001 至 100,000 mg。然而，本發明並不限於上述數值。劑量與給予方法可依據病患的體種、年紀、病徵等改變。此技藝人士可根據上述考慮因子而決定適當的劑量及給予方式。

【0262】本發明胺基酸序列中的胺基酸可經轉譯後修飾(post-translationally modified)。例如，此技藝人士所習知之利

用焦麩醯胺化(pyroglutamylation)將 N 端麩醯胺酸轉變為焦麩醯胺酸(pyroglutamic acid)的修飾。當然，此種經轉譯後修飾之胺基酸也包含在本發明之胺基酸中。

【0263】本發明提供：

透過抗原-結合分子促使抗原攝入細胞的方法；增加單一抗原-結合分子可結合抗原數目的方法；以及藉由給予抗原-結合分子以增進血漿中抗原濃度下降的方法。當透過抗原-結合分子抗原攝入細胞被促進時，可藉由給予此抗原-結合分子以增進血漿中抗原濃度的下降，以及抗原-結合分子的藥物動力特性可被改善以增加單一抗原-結合分子可結合的抗原數目。因此，此抗原-結合分子具有比傳統抗原結合分子更好的體內效果。

【0264】本發明中所引用之前案皆屬於本發明之範圍。

【實施例】

【0265】以下揭示本發明特定實施例，但其不可用以限制本發明的範圍。

實施例 1：抗體促使加速抗原移除功效的試驗

抗-IL-6 受體抗體

在中性 pH 環境下具 FcRn-結合活性之抗-人類 IL-6 受體抗體的製備

WO 2009/125825 所揭示之含有 H54 (序列辨識號：1)與 L28 (序列識別號：2)的 H54/L28-IgG1 為一人源化抗-IL-6 受體抗體。對 H54 (序列識別號：1)進行突變以增加在中性 pH 環境下

(pH7.4)的 FcRn 結合。特別是，將 IgG1 重鏈恆定區中 EU 編碼第 252 位置的 Met 置換為 Trp，以及將第 434 位置的 Asn 置換為 Trp 以形成 H54-IgG1-F14 (序列識別號: 3)。此胺基酸的置換可以比較例 1 中所述之習知方法完成。

【0266】含有 H54 (序列識別號: 1)與 L28 (序列識別號: 2)之 H54/L28-IgG1 以及含有 H54-IgG1-F14 (序列識別號: 3)與 L28 (序列識別號: 2)之 H54/L28-IgG1-F14 以比較例 2 中所述之習知方法進行表現與純化。

【0267】利用人類 FcRn 轉殖小鼠株 276 之穩定融合模式進行抗體的體內試驗

使用上述所完成的 H54/L28-IgG1 與 H54/L28-IgG1-F14，以利用人類 FcRn 轉殖小鼠株 276 之穩定融合模式進行抗體的體內測試。將含有可溶性人類 IL-6 受體之輸液幫浦(MINI-OSMOTIC PUMP MODEL 2004; alzet)移植至人類 FcRn 轉殖小鼠株 276(B6.mFcRn-/-.hFcRn Tg line 276 +/+ mouse (B6.mFcRn-/- hFCRN Tg276 B6.Cg-Fcgrt<tm1Dcr> Tg(FCGRT) 276Dcr (Jackson #4919)), Jackson Laboratories; Methods Mol Biol. (2010) 602: 93-104)的背部皮膚下以獲得血漿中可溶性人類 IL-6 受體濃度保持恆定的模型動物(model animals)。將抗-人類 IL-6 受體抗體給予至模型動物中以評估在給予可溶性人類 IL-6 受體後的體內動力特性。在移植輸液幫浦前與由尾靜脈給予抗體以抑制針對可溶性人類 IL-6 受體之中和性抗體的產生後 14 天，給予 20 mg/kg 的抗-小鼠 CD4 單株抗體(R&D)。接著，將含有 92.8 μg/ml 可溶性人類 IL-6 受體的輸液幫浦移

植至小鼠的背部皮膚下。在移植輸液幫浦後 3 天，給予 1 mg/kg 的抗-人類 IL-6 受體抗體(H54/L28-IgG1 與 H54/L28-IgG1-F14)至尾靜脈。分別在給予抗-人類 IL-6 受體抗體後的 15 分鐘、7 小時、1 天、21 天、及 28 天收集血液。將收集到的血液立刻以 15,000 rpm，於 4 ℃下離心 15 分鐘以分離血漿。分析前，將分離的血漿儲存於-20 冰箱。

【0268】以電化學發光分析法偵測血漿 hsIL-6R 的濃度

以電化學發光分析法偵測小鼠血漿中 hsIL-6R 的濃度。將 hsIL-6R 校準曲線樣品的濃度調整至 2,000、1,000、500、250、125、62.5 與 31.25 pg/ml，並將小鼠血漿樣本稀釋 50 倍或以上。將此樣本與經以磺酸基標籤 NHS 酯(Sulfo-Tag NHS Ester)(Meso Scale Discovery)釕標定之抗-人類 IL-6R 單株抗體(R&D)、經生物素化之抗-人類 IL-6R 單株抗體(R&D)、以及 WT-IgG1 混合，並於 37℃反應隔夜。作為抗-人類 IL-6R 單株抗體之含有 H (WT) (序列識別號：4)與 L (WT) (序列識別號：5)的 WT-IgG1 最終濃度為 333 μg/ml，其超過樣本中抗-人類 IL-6R 單株抗體的濃度，使樣本中幾乎所有的 hsIL-6R 分子結合至 WT-IgG1。接著，將樣本置於 MA400 PR 卵白素盤(Meso Scale Discovery)中，與室溫反應 1 小時，並進行清洗。在給予讀取緩衝液 T (Read Buffer T) (x4) (Meso Scale Discovery)後馬上以 Sector PR 400 Reader (Meso Scale Discovery)進行偵測。依據校準曲線利用 SOFTmax PRO (Molecular Devices)分析軟體計算出 hsIL-6R 濃度。在靜脈給予 H54/L28-IgG1 與 H54/L28-IgG1-F14 後，以此方法測偵各時間點的血漿 hsIL-6R

濃度，如第 1 圖所示。

【0269】如第 1 圖所示，相較於無抗體之基礎 hsIL-6R 濃度，H54/L28-IgG1 的給予會導致血漿 hsIL-6R 濃度明顯上升。另一方面，相較於 H54/L28-IgG1，H54/L28-IgG1-F14 的給予會導致血漿 hsIL-6R 濃度上升程度的下降。此下降是源自於相較 H54/L28-IgG1，在中性 pH 下之 H54/L28-IgG1-F14 具有更多的人類 FcRn 結合。此結果證明增加抗體在中性 pH 下對 FcRn 的結合活性，可促進抗原的移除，即使相較 H54/L28-IgG1，H54/L28-IgG1-F14 所增加之抗原移除的程度較小。.

【0270】實施例 2：pH-依賴性抗原-結合分子之促進抗原加速移的試驗(抗體的製備)

pH-依賴性人類 IL-6 受體-結合抗體

WO 2009/125825 所揭示之含有 H54 (序列識別號：1)與 L28 (序列識別號：2)之 H54/L28-IgG1 為一人源化抗-IL-6 受體抗體。含有 VH3-IgG1 (序列識別號：6)與 VL3-CK (序列識別號：7)之 Fv4-IgG1 為一人源化抗-IL-6 受體抗體，其藉由使 H54/L28-IgG1 在 pH-依賴性下具有與可溶性人類 IL-6 受體結合的能力而來(在 pH 7.4 時結合，但在 pH 5.8 時分離)。體內分析方法如 WO 2009/125825 所示，利用小鼠證明相較於給予 H54/L28-IgG1 與以可溶性人類 IL-6 受體作為抗原之混合物，在給予 Fv4-IgG1 與以可溶性人類 IL-6 受體作為抗原之混合物更可加速可溶性人類 IL-6 受體的移除。

【0271】可溶性人類 IL-6 受體結合至一般抗體，可溶性人

類 IL-6 受體可透過 FcRn 與抗體返回血漿中。同時，抗體在 pH-依賴性下與可溶性人類 IL-6 受體結合，與可溶性人類 IL-6 受體結合之抗體在核內體之酸性環境下與可溶性人類 IL-6 受體分離。此分離之可溶性人類 IL-6 受體在溶小體中被分解。其可有效地加速人類可溶性 IL -6 受體的移除。接著，在 pH-依賴性下與可溶性人類 IL-6 受體結合之抗體可透過 FcRn 返回血漿中。此返回的抗體可與其他的可溶性人類 IL-6 受體結合。藉由此循環，單一之抗體分子可重覆與可溶性人類 IL-6 受體多次結合(第 2 圖)。

【0272】在 pH-依賴性下與可溶性人類 IL-6 受體結合之抗體加速可溶性抗體的移除。此抗體具有重覆與可溶性抗原結合多次的效果。因此，此抗體非常有用。測試增加 FcRn 在中性環境下(pH 7.4)結合活性的方法以進一步促進抗原移除效果。

【0273】在中性環境下具 FcRn-結合活性之 pH-依賴性人類 IL-6 受體-結合抗體的製備

對含有 VH3-IgG1 (序列識別號：6)與 VL3-CK (序列識別號：7)之 Fv4-IgG1 進行突變，以增加在中性環境下(pH 7.4)的 FcRn 結合。特別是，將 IgG1 重鏈恆定區 EU 編碼中第 252 位置的 Met 置換為 Tyr，將第 254 位置的 Ser 置換為 Thr，以及將第 256 位置的 Thr 置換為 Glu 以形成 VH3-IgG1-v1 (序列識別號：8)日，且將 IgG1 重鏈恆定區中 EU 編碼第 434 位置的 Asn 置換為 Trp 以形成 VH3-IgG1-v2 (序列識別號：9)。此胺基酸的置換可以比較例 1 中所述之習知方法完成。

【0274】含有 H54 (序列識別號：1)與 L28 (序列識別號：2)

之 H54/L28-IgG1，含有 VH3-IgG1 (序列識別號: 6)與 VL3-CK (序列識別號: 7)之 Fv4-IgG1，含有 VH3-IgG1-v1 (序列識別號: 8)與 VL3-CK (序列識別號: 7)之 Fv4-IgG1-v1，以及含有 VH3-IgG1-v2 (序列識別號: 9)與 VL3-CK (序列識別號: 7)之 Fv4-IgG1-v2 可以比較例 2 中所述之習知方法表現及純化。

【0275】實施例 3：pH-依賴性抗原-結合抗體之促進抗原加速移除的試驗(體內試驗)

人類 FcRn 轉殖小鼠與正常小鼠的體內試驗

在單獨給予 hsIL-6R 或合併給予 hsIL-6R 與抗-人類 IL-6 受體抗體至人類 FcRn 轉殖小鼠(B6.mFcRn-/-.hFcRn Tg line 276 +/+ mouse, Jackson Laboratories; Methods Mol Biol. (2010) 602: 93-104)及正常小鼠(C57BL/6J mouse; Charles River Japan)後，分析 hsIL-6R (可溶性人類 IL-6 受體：如比較例 3 方法製備)及抗-人類 IL-6 受體抗體的體內動力特性。給予 10 ml/kg 的 hsIL-6R 溶液(5 μg/ml)或 hsIL-6R 與抗-人類 IL-6 受體抗體(分別為 5 μg/ml 與 0.1 mg/ml)之混合物至尾靜脈中。在此例子中，抗-人類 IL-6 受體抗體的量超過 hsIL-6R，因此幾乎每個 hsIL-6R 皆結合至抗體。在給予後的 15 分鐘、7 小時、1 天、2 天、3 天、4 天、7 天、14 天、21 天及 28 天收集血液。將收集的血液立刻以 15,000 rpm，於 4 ℃下離心 15 分鐘以分離血漿。分析前，將分離的血漿儲存於-20 冰箱。抗-人類 IL-6 受體抗體的使用為：上述 H54/L28-IgG1, Fv4-IgG1, and Fv4-IgG1-v2 用於人類 FcRn 轉殖小鼠，且上述 H54/L28-IgG1, Fv4-IgG1, Fv4-IgG1-v1, and Fv4-IgG1-v2 用於正常小鼠。

【0276】以 ELISA 進行抗-人類 IL-6 受體抗體血漿濃度的偵測

以 ELISA 偵測小鼠血漿中抗-人類 IL-6 受體抗體的濃度。抗-人類 IgG (特定 γ-鏈) F(ab')2 抗體片段(Sigma)置於 Nunc-ImmunoPlate MaxiSorp (Nalge Nunc International)上，並於 4℃下靜置隔夜以製備固定化之抗-人類 IgG 盤。校準曲線的樣本具有 0.8、0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、及 0.0125 μg/ml 的血漿濃度，且將小鼠血漿樣本稀釋 100 倍或更多。將 200 μl (μL) 的 ng/ml hsIL-6R 加至 100 μl 的校準曲線樣本及血漿樣本，將樣本於室溫下靜置 1 小時。將樣本添加置固定化抗-人類 IgG 盤中，並於室溫下靜置 1 小時。加入生物素化之抗-人類 IL-6R 抗體(R&D)於室溫下反應 1 小時。接著，加入鏈黴卵白素-聚 HRP80 (立體特異性偵測技術)入生物素化之抗-人類 IL-6R 抗體(R&D)，並以 TMP One Component HRP Microwell Substrate 作為基質進行顯色反應。在以硫酸(Showa Chemical)停止反應後，以微孔盤分析儀偵測 450 nm 的吸光值。450 nm 吸光值的濃度以微孔盤分析儀偵測。小鼠血漿中的濃度可利用分析軟體 SOFTmax PRO (Molecular Devices)由校準曲線的吸光值計算獲得。在靜脈給予後，以此方法測偵各時間點的血漿濃度，如第 1 圖所示之人類 FcRn 轉殖小鼠及第 5 圖所示之正常小鼠。

【0277】以電化學發光分析進行 hsIL-6R 血漿濃度的偵測

小鼠血漿中 hsIL-6R 的濃度以電化學發光分析進行偵測。將 hsIL-6R 校準曲線樣本調整成 2,000、1,000、500、250、125、62.5 與 31.25 pg/ml 的濃度，且將小鼠血漿樣本稀釋 50 倍或更

多。將此樣本與經以磺酸基標籤 NHS 酯(Sulfo-Tag NHS Ester)(Meso Scale Discovery)釘標定之抗-人類 IL-6R 單株抗體(R&D)、經生物素化之抗-人類 IL-6R 單株抗體(R&D)、以及 WT-IgG1 混合，並於 37℃下反應隔夜。作為抗-人類 IL-6 受體抗體之含有 H (WT) (序列識別號: 4) and L (WT) (序列識別號: 5)的 WT-IgG1 最終濃度為 333 μg/ml，此為過量之抗-人類受體抗體，使得樣本中幾乎所有的 hsIL-6R 分子皆結合至 WT-IgG1。接著，將此樣本置於 MA400 PR 鏈黴卵白素盤(Meso Scale Discovery)，於室溫下反應 1 小時，並進行清洗。在添加讀取緩衝液 T(x4) (Meso Scale Discovery)後立刻以 Sector PR 400 分析儀 (Meso Scale Discovery)進行偵測。利用分析軟體 SOFTmax PRO (Molecular Devices)以校準曲線為基礎計算 hsIL-6R 的濃度。在靜脈給予後，以此方法測偵各時間點的血漿 hsIL-6R 濃度，如第 4 圖所示之人類 FcRn 轉殖小鼠及第 6 圖所示之正常小鼠。

【0278】以電化學發光分析進行游離 hsIL-6R 血漿濃度的偵測

為評估血漿中可溶性人類 IL-6 受體的中和程度，以電化學發光分析小鼠血漿中不具有(未被中和)抗-人類 IL-6 受體抗體之可溶性人類 IL-6 受體(游離 hsIL-6 受體)的濃度。所有血漿中的 IgG-型抗體(小鼠 IgG、抗-人類 IL-6 受體抗體、以及抗-人類 IL-6 受體抗體-可溶性人類 IL-6 受體複合物)可藉由加入 12 μl 之 10,000、5,000、2,500、1,250、625、312.5 或 156.25 pg/ml 的 hsIL-6 標準樣本中，且將小鼠血漿樣本置於含有適量蛋白 A

瓊脂糖凝膠速流(GE Healthcare)樹脂之 0.22 微莫耳的濾杯(Millipore)，而被蛋白 A 吸附。接著，將濾杯中的溶液以高速離心沉降收集。此經通過濾杯的溶液不含有蛋白 A-結合抗-人類 IL-6 受體抗體-可溶性人類 IL-6 受體複合物。因此，血漿中游離 hsIL-6R 的濃度可藉由經偵測通過濾杯溶液中 hsIL-6R 的濃度測得。接著，將此過濾杯的溶液經以磺酸基標籤 NHS 酯(Sulfo-Tag NHS Ester)(Meso Scale Discovery)釕標定之抗-人類 IL-6R 單株抗體(R&D)、以及經生物素化之抗-人類 IL-6R 單株抗體(R&D)混合。將此混合物於室溫下反應 1 小時，並分裝至 MA400 PR 鏈黴卵白素盤(Meso Scale Discovery)。於室溫下另外反應 1 個小時後，清洗反應盤，並將讀取緩衝液 T (x4) (Meso Scale Discovery)分裝至其中。立刻以 SECTOR PR 400 reader (Meso Scale Discovery)進行偵測。利用分析軟體 SOFTmax PRO (Molecular Devices)以校準曲線為基礎計算 hsIL-6R 的濃度。在靜脈給予後，以此方法測偵各時間點之血漿中游離 hsIL-6R 的濃度，如第 7 圖所示。

【0279】pH-依賴性結合至人類 IL-6 受體的效果

進行 H54/L28-IgG1 與 Fv4-IgG1 以 pH-依賴性結合至人類 IL-6 受體的分析與比較。如第 3 及 5 圖所示，血漿中的抗體滯留的比較。同時，如第 4 及 6 圖所示，相較於同時給予 hsIL-6R 與 H54/L28-IgG1，同時給予 hsIL-6R 與 pH-依賴性結合至人類 IL-6 受體之 Fv4-IgG1，可加速 hsIL-6R 的移除。此趨勢可同時在人類 FcRn 轉殖小鼠及正常小鼠中發現；因此藉由 pH-依賴性人類 IL-6 受體的結合活性，在給予後 4 天，血漿中 hsIL-6R

濃度可分別減少 17 及 34 倍。

【0280】中性環境下(pH 7.4)FcRn 的結合效果

已知完整人類 IgG1 在中性環境下(pH 7.4)難以結合(具有非常低的親和力)至人類 FcRn。已知將 EU 編號第 434 位置的 Asn 置換為 Trp 可提升完整人類 IgG1 在中性環境下(pH 7.4)的人類 FcRn 結合活性。(J Immunol. (2009) 182 (12): 7663-71)。對 Fv4-IgG1 進行上述胺基酸置換以獲得 Fv4-IgG1-v2，利用人類 FcRn 轉殖小鼠進行體內試驗。與 Fv4-IgG1 比較其試驗結果。如第 3 圖所示，比較兩者的抗體血漿滯留時間。同時，如第 4 圖所示，相較於 hsIL-6R 與 Fv4-IgG1，同時給予 hsIL-6R 與在中性環境下(pH 7.4)具促進人類 FcRn 結合活性的 Fv4-IgG1-v2 時更快被移除。因此，證明藉由給予在中性環境下(pH 7.4)結合至人類 FcRn 的能力，在給予後 4 天，hsIL-6R 的血漿濃度可減少約 4 倍。

【0281】依據人類 FcRn 與小鼠 FcRn 之間的同源性，將 EU 編號第 434 位置的 Asn 置換為 Trp 被認為可增加在中性環境下(pH 7.4)結合至小鼠 FcRn。同時，已知可藉由將第 252 位置的 Met 置換為 Tyr，將第 254 位置的 Ser 置換為 Thr，以及將 EU 編號第 256 位置的 Thr 置換為 Glu 可增加在中性環境下(pH 7.4)結合至小鼠 FcRn(J Immunol. (2002) 169(9): 5171-80)。對 Fv4-IgG1 進行上述胺基酸置換以獲得之 Fv4-IgG1-v1 與 Fv4-IgG1-v2，以正常小鼠進行體內試驗。與 Fv4-IgG1 比較其試驗結合。如第 5 圖所示，相較於 Fv4-IgG1，Fv4-IgG1-v1 與 Fv4-IgG1-v2 已被促進於中性環境下(pH 7.4)增

加與小鼠 FcRn 的結合，Fv4-IgG1-v1 與 Fv4-IgG1-v2 的血漿滯留時間略短(在給多予後 1 天，血漿中的中和抗體濃度分別減少 1.5 及 1.9 倍)。

【0282】如第 6 圖所示，相較於同時給予 hsIL-6R 與 Fv4-IgG1，同時給予 hsIL-6R 與被促進在中性環境下(pH 7.4)與小鼠 FcRn 結合的 Fv4-IgG1-v1 或 Fv4-IgG1-v2，已被證實可明顯加速移除。在給予後 1 天，Fv4-IgG1-v1 與 Fv4-IgG1-v2 分別降低血漿 hsIL-6R 濃度約 32 及 80 倍。因此，由此得知可藉由在中性環境下(pH 7.4)提供小鼠 FcRn-結合活性以降低血漿濃度。由上述可知，藉由在中性環境下(pH 7.4)提供小鼠 FcRn-結合活性，血漿抗體濃度略為降低；然而，血漿 hsIL-6R 濃度的降低卻較遠大於抗體濃度的降低。再者，相較於僅給予 hsIL-6R 時，同時給予 hsIL-6R 與 Fv4-IgG1-v1 或 Fv4-IgG1-v2 可更快移除。如第 6 圖所示，其證明相較於僅給予 hsIL-6R 時，同時給予 hsIL-6R 與 Fv4-IgG1-v1 或 Fv4-IgG1-v2 後 1 天，血漿 hsIL-6R 濃度分別降低 4 或 11 倍。特別是，其表示可藉由給予在中性環境下(pH 7.4)具 pH-依賴性結合至可溶性 IL-6 受體的抗體以加速可溶性 IL-6 受體的移除。特別是，可藉由給予此抗體至體內以降低體內血漿抗原濃度。

【0283】如第 7 圖所示，在給予 H54/L28-IgG1 後 7 天，游離 hsIL-6R 的濃度在一可偵測的範圍內，但在給予 Fv4-IgG1 後 1 天，即無法偵測到游離 hsIL-6R。另一方面，在給予 Fv4-IgG1-v1 或 Fv4-IgG1-v2 後 7 小時，無法偵測到游離 hsIL-6R。特別是，相較於 H54/L28-IgG1，游離 hsIL-6R 的濃

度在可 pH-依賴性結合至 hsIL-6R 之 Fv4-IgG1 的存在下為更低，表示可藉由給予 pH-依賴性 hsIL-6R-結合活性以產生強大的 hsIL-6R-中和效果。再者，游離 hsIL-6R 的濃度在 Fv4-IgG1-v1 或 Fv4-IgG1-v2 的存在下非常低，Fv4-IgG1-v1 或 Fv4-IgG1-v2 兩者皆藉由修飾 Fv4-IgG1 以增加在 pH 7.4 時的 FcRn-結合活性。由此證明可藉由增加在 pH 7.4 時的 FcRn-結合活性以產生更強的 hsIL-6R-中和效果。

【0284】在給予傳統中和抗體，如 H54/L28-IgG1 時，可降低結合抗原的清除，導致長時間的抗原血漿滯留。在較不佳的情況為給予之抗體增加抗原的血漿滯留，抗原的反應為被抗體所中和。抗原的血漿滯留可藉由給予 pH-依賴性抗原結合(此在中性環境下的抗體結合在酸性環境下被分離)被縮短。在本發明中，可藉由額外提供在中性環境下(pH 7.4)之人類 FcRn-結合活性以進一步縮短血漿中的抗原滯留時間。再者，已證明相較於僅是抗原的清除，可藉由給予具 pH-依賴性結合至抗原且在中性環境下(pH 7.4)具 FcRn-結合活性的抗體，以增加抗原的清除。至今，相較於僅是抗原的清除，仍沒有方法可藉由給予抗體以增加抗原的清除。因此，本實施例中所述之方法非常有用於作為藉由給予抗體使抗原由血漿中移除的方法。再者，本發明人首次發現增加中性環境下(pH 7.4)之 FcRn-結合活性的好處。再者，Fv4-IgG1-v1 與 Fv4-IgG1-v2 皆具有增加在中性環境下(pH 7.4)的 FcRn-結合活性，其不同胺基酸的置換產生類似的效果。由此顯示不論任何形式的胺基酸置換，每個可增加在中性環境下(pH 7.4)FcRn-結合活性的胺基酸置換皆具

有加速移除抗原的效果。特別是，在給予時，可移除血漿中抗原之抗體分子可利用下列單獨或合併之胺基酸置換以產生：

【0285】EU 編號之第 257 位置的 Pro 置換為 Ile，且第 311 位置的 Gln 置換為 Ile，上述兩者皆已揭示於 J Biol Chem. 2007, 282(3): 1709-17；EU 編號第 434 位置的 Asn 置換為 Ala、Tyr 或 Trp，第 252 位置的 Met 置換為 Tyr，第 307 位置的 Thr 置換為 Gln，第 308 位置的 Val 置換為 Pro，第 250 位置的 Thr 置換為 Gln，第 428 位置的 Met 置換為 Leu，第 380 位置的 Glu 置換為 Ala，第 378 位置的 Ala 置換為 Val，以及第 436 位置的 Tyr 置換為 Ile，上述皆已揭示於 J Immunol. (2009) 182(12): 7663-71；EU 編號第 252 位置的 Met 置換為 Tyr，第 254 位置的 Ser 置換為 Thr，以及第 256 位置的 Thr 置換為 Glu，上述皆已揭示於 J Biol Chem. 2006 Aug. 18, 281(33): 23514-24；EU 編號之第 433 位置的 His 置換為 Lys，第 434 位置的 Asn 置換為 Phe，以及第 436 位置的 Tyr 置換為 His，上述皆已揭示於 Nat Biotechnol. 2005 Oct. 23(10): 1283-8，及其類似。

【0286】實施例 4：人類 FcRn-結合活性的評估

關於試驗抗體與 FcRn 間反應的 Biacore 基礎分析系統為一種將抗體固定化於一感測晶片上，且使用人類 FcRn 作為分析物的系統，其已揭示於 J Immunol. (2009) 182(12): 7663-71。對此目的，以比較例 4 所述之方法製備人類 FcRn。以上述系統評估 Fv4-IgG1、Fv4-IgG1-v1、及 Fv4-IgG1-v2 於 pH 6.0 及 pH 7.4 的人類 FcRn-結合活性(解離常數(KD))。在將抗體直接固定於 S 系列感測晶片(Series S Sensor Chip CM5)上後，以此

抗體作為測試物質。依據廠商的使用說明書使用胺類偶合套組(amino-coupling kit)，將抗體固定於感測晶片上，以獲得 500 RU 的固定量。所使用的檢測緩衝液(running buffer)為含有 0.05% (v/v%)介面活性劑 P20 (pH 6.0)之 50 mmol/l Na-磷酸鹽/150 mmol/l NaCl)。

【0287】關於此所形成之感測器晶片，分析時使用含有 0.05% (v/v%)介面活性劑 P20 (pH 6.0)之 50 mmol/l Na 磷酸鹽/150 mmol/l NaCl 或含有 0.05%介面活性劑 P20 (pH 7.4)之 50 mmol/l Na-磷酸鹽/150 mmol/l NaCl 作為檢測緩衝液。分析限定於在 25℃下進行。將作為對照溶液(reference solution)之經稀釋的人類 FcRn 溶液及檢測緩衝液(running buffer)以 5 μl/分鐘的流速注入 10 分鐘，使人類 FcRn 在晶片上與抗體反應。接著，將檢測緩衝液以 5 μl/分鐘的流速注入 1 分鐘以觀察 FcRn 的分離。可藉由將 20 mmol/l Tris-HCl/150 mmol/l NaCl (pH 8.1)以 30μl/分鐘的流速注入 15 秒，注入 2 次，使感測器晶片再生。

【0288】將偵測結果利用 Biacore T100 分析軟體(Ver. 2.0.1)進行分析。藉由穩定親和力(steady-state affinity)方法，在 6 種不同的 FcRn 濃度下偵測解離常數(KD)。Fv4-IgG1、Fv4-IgG1-v1、及 Fv4-IgG1-v2 在 pH 6.0 與 pH 7.4 下之人類 FcRn-結合活性的結果如表 5 所示。

【0289】表 5

	KD (微莫耳)	
	pH 6.0	pH 7.4
Fv4-IgG1	1.99	NA
Fv4-IgG-v1	0.32	36.55
Fv4-IgG-v2	0.11	11.03

【0290】在 pH 7.4 下，對於 KD 值(NA)的偵測，人類 FcRn 與 Fv4-IgG1 的結合太弱。同時，可在 pH 7.4 下觀察到 Fv4-IgG1-v1 與 Fv4-IgG1-v2 結合至人類 FcRn，且偵測到的 KD 分別為 36.55 微莫耳及 11.03 微莫耳。人類 FcRn 在 pH 6.0 下的 KD 值為 1.99、0.32 及 0.11 微莫耳。如第 3 圖所示，在與 Fv4-IgG1 比較時，Fv4-IgG1-v2 加速 hsIL-6R 在人類 FcRn 轉殖小鼠中的移除。因此，可推測利用改變人類 IgG1 使人類 FcRn 在 pH 7.4 下的結合至少大於 11.03 微莫耳以加速抗原的移除。再者，如 J Immunol. (2002) 169(9): 5171-80 之記載，人類 IgG1 對小鼠 FcRn 的結合大於對人類 FcRn 結合的約 10 倍以上。因此，也可推測 Fv4-IgG1-v1 與 Fv4-IgG1-v2 在 pH 7.4 下對小鼠 FcRn 的結合是對人類 FcR 結合的約 10 倍以上。第 6 圖所示之利用 Fv4-IgG1-v1 或 Fv4-IgG1-v2 在正常小鼠中對 hsIL-6R 移除的加速比起第 4 圖所示之利用 Fv4-IgG1-v2 在人類 FcRn 轉殖小鼠中的移除加速更為明顯。此結果顯示 hsIL-6R 移除的加速程度依據 pH 7.4 下 FcRn 的結合強度而增加。

【0291】實施例 5： 在中性環境下人類 FcRn 結合經改善之 pH-依賴性人類 IL-6 受體-結合抗體的製備

將對 Fv4-IgG1 進行各種可在中性環境下增加 FcRn 結合的改變，以進一步促進 pH-依賴性人類 IL-6 受體-結合抗體在人類 FcRn 轉殖小鼠中的抗原移除效果。特別是，對 Fv4-IgG1 重鏈恆定區進行表 6-1 及 6-2 中所述之胺基酸的改變以產生各種突變(突變位置的胺基酸編號為依據 EU 編碼規定)。胺基酸的置換以比較例 1 中所示之習知方法完成。

【0292】表 6-1

突變名稱	KD (M)	胺基酸的置換
IgG1	ND	無
IgG1-v1	3.2E-06	M252Y/S254T/T256E
IgG1-v2	8.1E-07	N434W
IgG1-F3	2.5E-06	N434Y
IgG1-F4	5.8E-06	N434S
IgG1-F5	6.8E-06	N434A
IgG1-F7	5.6E-06	M252Y
IgG1-F8	4.2E-06	M252W
IgG1-F9	1.4E-07	M252Y/S254T/T256E/N434Y
IgG1-F10	6.9E-08	M252Y/S254T/T256E/N434W
IgG1-F11	3.1E-07	M252Y/N434Y
IgG1-F12	1.7E-07	M252Y/N434W
IgG1-F13	3.2E-07	M252W/N434Y
IgG1-F14	1.8E-07	M252W/N434W
IgG1-F19	4.6E-07	P257L/N434Y
IgG1-F20	4.6E-07	V308F/N434Y
IgG1-F21	3.0E-08	M252Y/V308P/N434Y
IgG1-F22	2.0E-06	M428L/N434S
IgG1-F25	9.2E-09	M252Y/S254T/T256E/V308P/N434W
IgG1-F26	1.0E-06	I332V
IgG1-F27	7.4E-06	G237M
IgG1-F29	1.4E-06	I332V/N434Y
IgG1-F31	2.8E-06	G237M/V308F
IgG1-F32	8.0E-07	S254T/N434W
IgG1-F33	2.3E-06	S254T/N434Y
IgG1-F34	2.8E-07	T256E/N434W
IgG1-F35	8.4E-07	T256E/N434Y
IgG1-F36	3.6E-07	S254T/T256E/N434W
IgG1-F37	1.1E-06	S254T/T256E/N434Y
IgG1-F38	1.0E-07	M252Y/S254T/N434W
IgG1-F39	3.0E-07	M252Y/S254T/N434Y
IgG1-F40	8.2E-08	M252Y/T256E/N434W
IgG1-F41	1.5E-07	M252Y/T256E/N434Y
IgG1-F42	1.0E-06	M252Y/S254T/T256E/N434A
IgG1-F43	1.7E-06	M252Y/N434A
IgG1-F44	1.1E-06	M252W/N434A
IgG1-F47	2.4E-07	M252Y/T256Q/N434W
IgG1-F48	3.2E-07	M252Y/T256Q/N434Y
IgG1-F49	5.1E-07	M252F/T256D/N434W
IgG1-F50	1.2E-06	M252F/T256D/N434Y
IgG1-F51	8.1E-06	N434F/Y436H
IgG1-F52	3.1E-6	H433K/N434F/Y436H
IgG1-F53	1.0E-06	I332V/N434W
IgG1-F54	8.4E-08	V308P/N434W
IgG1-F56	9.4E-07	I332V/M428L/N434Y
IgG1-F57	1.1E-07	G385D/Q386P/N389S
IgG1-F58	7.7E-07	G385D/Q386P/N389S/N434W
IgG1-F59	2.4E-06	G385D/Q386P/N389S/N434Y
IgG1-F60	1.1E-05	G385H
IgG1-F61	9.7E-07	G385H/N434W
IgG1-F62	1.9E-07	G385H/N434Y
IgG1-F63	2.5E-06	N434F
IgG1-F64	5.3E-06	N434H

表 6-2 接續表 6-1

【0293】表 6-2

突變名稱	KD (M)	胺基酸的置換
IgG1-v65	2.9E-07	M252Y/S254T/T256E/N434F
IgG1-v66	4.3E-07	M252Y/S254T/T256E/N434H
IgG1-F67	6.3E-07	M252Y/N434F
IgG1-F68	9.3E-07	M252Y/N434H
IgG1-F69	5.1E-07	M428L/N434W
IgG1-F70	1.5E-06	M428L/N434Y
IgG1-F71	8.3E-08	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434W
IgG1-F72	2.0E-07	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434Y
IgG1-F73	1.7E-07	M252Y/M428L/N434W
IgG1-F74	4.6E-07	M252Y/M428L/N434Y
IgG1-F75	1.4E-06	M252Y/M428L/N434A
IgG1-F76	1.0E-06	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434A
IgG1-F77	9.9E-07	T256E/M428L/N434Y
IgG1-F78	7.8E-07	S254T/M428L/N434W
IgG1-F79	5.9E-06	S254T/T256E/N434A
IgG1-F80	2.7E-06	M252Y/T256Q/N434A
IgG1-F81	1.6E-06	M252Y/T256E/N434A
IgG1-F82	1.1E-06	T256Q/N434W
IgG1-F83	2.6E-06	T256Q/N434Y
IgG1-F84	2.8E-07	M252W/T256Q/N434W
IgG1-F85	5.5E-07	M252W/T256Q/N434Y
IgG1-F86	1.5E-06	S254T/T256Q/N434W
IgG1-F87	4.3E-06	S254T/T256Q/N434Y
IgG1-F88	1.9E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434W
IgG1-F89	3.6E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434Y
IgG1-F90	1.9E-08	M252Y/T256E/V308P/N434W
IgG1-F91	4.8E-08	M252Y/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F92	1.1E-08	M252Y/S254T/T256E/V308P/M428L/N434W
IgG1-F93	7.4E-07	M252W/M428L/N434W
IgG1-F94	3.7E-07	P257L/M428L/N434Y
IgG1-F95	2.6E-07	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434F
IgG1-F99	6.2E-07	M252Y/T256E/N434H

【0294】利用比較例 2 中所示之習知方法表現及純化各個含有經製備之重鏈及 L (野生型) (序列識別號: 5)的變異體。

【0295】人類 FcRn 結合的評估

利用 Biacore T100 (GE Healthcare)對抗體與人類 FcRn 之間的結合進行動力分析。對此目的，以比較例 4 之方法製備人類 FcRn。將適量之蛋白質 L (ACTIGEN)以胺類偶合方式固定於感測晶片 CM4 (GE Healthcare)上，且使晶片可捕捉到有興趣之抗原。接著，注入經稀釋的 FcRn 溶液與檢測緩衝液(對照溶液)使人類 FcRn 與感測晶片上被捕捉的抗體反應。檢測緩衝液

含有 50 mmol/l 的磷酸鈉、150 mmol/l NaCl、以及 0.05% (w/v) 的 Tween20 (pH 7.0)。FcRn 以每個緩衝液進行稀釋。此晶片可利用 10 mmol/l 甘胺酸-HCl (pH 1.5)再生。分析限定於 25℃下進行。結合速率常數 Ka(1/Ms)及解離常數 k_d (1/s)皆為動力學參數，其可感根據分析所獲得的感應譜(sensorgram)計算，且每個針對人類 FcRn 的抗體 KD (M)可利用此數值判定。每個參數可利用 Biacore T100 分析軟體進行計算。

【0296】利用 Biacore 評估在中性環境(pH 7.0)下人類 FcRn 結合的結果揭示於表 6-1 與 6-2。由於完整 IgG1 的結合非常微弱，故完整 IgG1 的 KD 值可不需計算。因此，此 KD 值在表 6-1 中以 ND 表示。

【0297】實施例 6：在中性環境下人類 FcRn 結合經改善之 pH-依賴性人類 IL-6 受體-結合抗體的體內試驗

在中性環境下具人類 FcRn 結合活性之 pH-依賴性人類 IL-6 受體-結合抗體利用實施例 4 所述之重鏈製備而得，使其在中性環境下具人類 FcRn 結合活性。評估此抗體的體內抗原移除效果。

特別是，以比較例 2 所述之習知方法表現及純下列抗體：

含有 VH3-IgG1 與 VL3-CK 的 Fv4-IgG1；

含有 VH3-IgG1-v2 與 VL3-CK 的 Fv4-IgG1-v2；

含有 VH3-IgG1-F14 與 VL3-CK 的 Fv4-IgG1-F14；

含有 VH3-IgG1-F20 與 VL3-CK 的 Fv4-IgG1-F20；

含有 VH3-IgG1-F21 與 VL3-CK 的 Fv4-IgG1-F21；

含有 VH3-IgG1-F25 與 VL3-CK 的 Fv4-IgG1-F25；

含有 VH3-IgG1-F29 與 VL3-CK 的 Fv4-IgG1-F29；

含有 VH3-IgG1-F35 與 VL3-CK 的 Fv4-IgG1-F35；

含有 VH3-IgG1-F48 與 VL3-CK 的 Fv4-IgG1-F48；

含有 VH3-IgG1-F93 與 VL3-CK 的 Fv4-IgG1-F93；以及

含有 VH3-IgG1-F94 與 VL3-CK 的 Fv4-IgG1-F94。

【0298】利用與實施例 3 相同的方法，以人類 FcRn 轉殖小鼠(B6.mFcRn-/-.hFcRn Tg 276+/+小鼠株，Jackson Laboratories；Methods Mol Biol. (2010) 602: 93-104)體內測試 pH-依賴性人類 IL-6 受體-結合抗體。

【0299】可溶性人類 IL-6 受體在靜脈給予至人類 FcRn 轉殖小鼠後各時間點的濃度如第 8 圖所示。此分析結果顯示相較於在中性環境幾乎不具有人類 FcRn 結合活性的 Fv4-IgG1 存在下，於在中性環境具有人類 FcRn 結合活性之 pH-依賴性人類 IL-6 受體-結合抗體存在下，可溶性人類 IL-6 受體的血漿濃度保持較低。其中，可產生明顯效果的抗體包括，例如 Fv4-IgG1-F14。相較於給予 Fv4-IgG1 的可溶性 IL-6 受體的血漿濃度，給予 Fv4-IgG1-F14 後 1 天之可溶性 IL-6 受體的血漿濃度被證實可降低約 54 倍。再者，相較於給予 Fv4-IgG1 的可溶性 IL-6 受體的血漿濃度，給予 Fv4-IgG1-F21 後 7 小時之可溶性 IL-6 受體的血漿濃度被證實可降低約 24 倍。再者，給予 Fv4-IgG1-F25 後 7 小時之可溶性 IL-6 受體的血漿濃度低於偵測極限(1.56 ng/ml)。因此，推測給予 Fv4-IgG1-F25 後的可溶性 IL-6 受體濃度可比給予 Fv4-IgG1 後的可溶性 IL-6 受體濃度明顯地降低 200 倍或以上。上述之試驗結果證實在中性環境下

pH-依賴性抗原-結合抗體之人類 FcRn 結合活性的增加可有效地促進抗原的移除。再者，為增加於中性環境下人類 FcRn 結合以促進抗原移除效果的胺基酸改變並無特別限制，且此改變包括表 6-1 及 6-2 中所述內容。可推測任何導入的改變可促進體內的抗原移除效果。

【0300】再者，相較於單獨給予可溶性人類 IL-6 受體，同時給予 4 種 pH-依賴性人類 IL-6 受體-結合抗體 Fv4-IgG1-F14、Fv4-IgG1-F21、Fv4-IgG1-F25 與 Fv4-IgG1-F48 中任一種使可溶性人類 IL-6 受體的濃度在各時間點維持較低。此 pH-依賴性人類 IL-6 受體-結合抗體可給予至體內，此體內可溶性人類 IL-6 受體的血漿濃度保持恆定(穩定狀態)，此 pH-依賴性人類 IL-6 受體-結合抗體使可溶性人類 IL-6 受體的血漿濃度低於穩定狀態時的血漿濃度。特別是，可藉由給予抗體至體內以減少體內的抗原濃度。

【0301】實施例 7： 低劑量(0.01 mg/kg)Fv4-IgG1-F14 的效力評估

以與實施例 6 中所述之相同的方法進行低劑量(0.01 mg/kg)實施例 6 所製備之 Fv4-IgG1-F14 的體內試驗。將此試驗結果(如第 9 圖所示)與實施例 6 中的結果相比，實施例 6 的結果由給予 1 mg/kg 的 Fv4-IgG1 與 Fv4-IgG1-F14 所獲得。

【0302】此結果顯示即使給予 0.01 mg/kg Fv4-IgG1-F14 組的血漿抗體濃度比給予 1 mg/kg 組低約 100 倍(第 10 圖)，相互比較各時間點可溶性人類 IL-6 受體的血漿濃度。再者，其證實在給予 0.01 mg/kg Fv4-IgG1-F14 之組於 7 小時後的可溶性

人類 IL-6 受體的血漿濃度比給予 1 mg/kg 組低約 3 倍。再者，在 Fv4-IgG1-F14 的存在下，可溶性人類 IL-6 受體的血漿濃度在各個時間點低於僅給予不同濃度之可溶性人類 IL-6 受體的血漿濃度。

【0303】此發現證實即使給予 Fv4-IgG1 劑量的 1/100，經修飾 Fv4-IgG1 所獲得在中性環境下具增強人類 FcRn 結合活性的 Fv4-IgG1-F14，可有效地降低可溶性人類 IL-6 受體的血漿濃度。特別是，可推測當修飾 pH-依賴性抗原-結合抗體以增加其在中性環境的人類 FcRn 結合活性時，此抗原可在更低劑量下被有效地移除。

【0304】實施例 8 正常小鼠之穩定狀態模式的體內試驗

在中性環境下與小鼠 FcRn 結合的評估

包含 VH3-IgG1 (序列識別號：6)與 L (WT) (序列識別號：5)之 VH3/L (WT)-IgG1、包含 VH3-IgG1-v2 (序列識別號：9)與 L (WT) (序列識別號：5)之 VH3/L (WT)-IgG1-v2、以及包含 VH3-IgG1-F20 (序列識別號：10)與 L (WT) (序列識別號：5)之 VH3/L (WT)-IgG1-F20 皆以實施例 5 之方法製備，其以下述方法評估在中性環境下(pH 7.4)對小鼠 FcRn 的結合。

【0305】以 Biacore T100 (GE Healthcare)進行抗體與小鼠 FcRn 之間結合的動力分析。利用胺類偶合法將適量之蛋白 L (ACTIGEN)固定於感測晶片 CM4 (GE Healthcare)上，且使此晶片可捕捉有興趣的抗體。接著，注入稀釋的 FcRn 溶液與檢測緩衝液(對照溶液)使小鼠 FcRn 與於晶片上被捕捉的抗體反應。所使用之檢測緩衝液含有 50 mmol/l 的磷酸鈉、150 mmol/l

的 NaCl、以及 0.05% (w/v)的 Tween20 (pH 7.4)。FcRn 以各個緩衝液進行稀釋。此晶片可利用 10 mmol/l 甘胺酸-HCl (pH 1.5)再生。分析限定於 25℃下進行。結合速率常數 Ka(1/Ms)及解離常數 k_d (1/s)皆為動力學參數，其可感根據分析所獲得的感應譜(sensorgram)計算，且每個針對人類 FcRn 的抗體 KD (M)可利用此數值判定。每個參數可利用 Biacore T100 分析軟體(GE Healthcare)進行計算。

【0306】結果如表 7 所示(在 pH 7.4 下對小鼠的親和力)。VH3/L (WT)-IgG1 (表 7 中的 IgG1)的恆定區為完整 IgG1 的恆定區，其對小鼠 FcRn 的結合非常微弱。因此，其 KD 無法被計算，且在表 7 中以 ND 表示。此分析結果顯示經促進在中性環境下人類 FcRn 結合活性的抗體也呈現在中性環境下增強與小鼠 FcRn 的結合。

【0307】表 7

	KD (M)
IgG1	ND
IgG1-v2	1.04E-06
IgG-F20	1.17E-07

【0308】具恆定可溶性人類 IL-6 受體血漿濃度之正常小鼠的體內試驗

使用實施例 1 及 5 中所製備的 H54/L28-IgG1、Fv4-IgG1、Fv4-IgG1-v2、及 Fv4-IgG1-F20，以下述方法進行體內試驗。

【0309】以正常小鼠進行體內輸液試驗

將含有可溶性人類 IL-6 受體的輸液幫浦(MINI-OSMOTIC PUMP MODEL 2004；alzet)移植至正常小鼠(C57BL/6J mice；Charles River Japan)的背部皮膚下以形成模型動物(model

animals)，其可溶性 IL-6 受體的血漿濃度保持恆定。將抗-人類 IL-6 受體抗體給予至模型動物中以評估在給予可溶性人類 IL-6 受體後的體內動力學。

【0310】將每次 20 mg/kg 劑量的抗-小鼠 CD4 單株抗體(R&D)給予至尾靜脈以抑制針對可溶性人類 IL-6 受體之中和性抗體的產生。接著，將含有 92.8 μg/ml 可溶性人類 IL-6 受體的輸液幫浦移植至小鼠的背部皮膚下。在移植輸液幫浦後 3 天，每次給予 1 mg/kg 的抗-人類 IL-6 受體抗體至尾靜脈。分別在給予抗-人類 IL-6 受體抗體後的 15 分鐘、7 小時、1 天、2 天、3 天、4 天、7 天、14 天、21 天及 28 天後收集血液。將收集的血液立刻以 15,000 rpm 於 4℃ 下離心 15 分鐘以分離血漿。將分離的血漿儲存於-20℃ 的冰箱備用。

【0311】以 ELISA 進行抗-人類 IL-6 受體抗體血漿濃度的測定

使用的方法與實施例 3 相同。

【0312】以電化學發光法進行血漿 hsIL-6R 濃度的測定

使用的方法與實施例 1 相同

如第 11 圖所示，正常小鼠之可溶性人類 IL-6 受體的血漿濃度恆定維時於約 40 ng/ml，當給予針對可溶性人類 IL-6 受體之中和抗體 H54/L28-IgG1 至正常小鼠時，可溶性人類 IL-6 受體的血漿濃度提升至 650 ng/ml (給予前的 15 倍)。另一方面，給予 Fv4-IgG1(其可產生具有 pH-依賴性抗原結合活性之 H54/L28-IgG1)之組別中，可溶性人類 IL-6 受體的血漿濃度仍維持於約 70 ng/ml。此結果顯示藉由給予 H54/L28-IgG1 所導

致之可溶性IL-6受體血漿濃度的增加可被具pH-依賴性抗原結合活性之一般抗體抑制至約 1/10。

【0313】再者，可溶性 IL-6 受體血漿濃度被證實可藉由給予 Fv-IgG1-v2 或 Fv-IgG1-F20 以維持或低於穩定狀態(steady-state)濃度的 1/10，兩者係對 pH-依賴性人類 IL-6 受體-結合抗體進行改變以增加在中性環境下的 FcRn 結合。當給予 Fv-IgG1-v2 時，在給予後 14 天可溶性 IL-6 受體的血漿濃度為約 2 ng/ml。因此，Fv-IgG1-v2 可降低濃度至給予前的 1/20。再者，當給予 Fv-IgG1-F20 時，在給予 7 小時、1 天、2 天及 4 天後，可溶性 IL-6 受體的血漿濃度低於偵測極限(1.56 ng/ml)。此結果顯示 Fv-IgG1-F20 可降低濃度至給予前的 1/25。

【0314】上述結果證實可藉由給予在中性環境具有 pH-依賴性抗原-結合活性及 FcRn-結合活性的抗體至血漿抗原濃度維持恆定的模型動物中，以增加血漿中的抗原移除速率，進而有效地降低血漿抗原濃度。

【0315】一般抗體，例如 H54/L28-IgG1 僅可藉由與目標抗原結合而中和目標抗原，且更糟糕的是，其會增加血漿抗原濃度。相較之下，在中性環境下具有 pH-依賴性抗原-結合活性及 FcRn-結合活性的抗體被發現不僅可中和目標抗原，也可降低目標抗原的血漿濃度。預期移除血漿中抗原的效果更有利於中和效果。再者，抗原移除也可作用於中和反應中未被中和的目標抗原。

【0316】實施例 9 促進抗原移除所需在中性 pH 下對人類 FcRn 結合親和力的閾值，以及抗原移除與於中性 pH 下對人類

FcRn 結合親和力的關係

用於體內試驗的抗體製備

製備在中性環境下 FcRn 結合增加之 Fv4-IgG1 的 Fc 變異體，其含有 VH3-IgG1 (序列識別號：6)與 VL3-CK (序列識別號：7)。特別是，製備 VH3-M73 (序列識別號：15)與 VH3-IgG1-v1 (序列識別號：8)。利用比較例 1 中所述之習知方法進行胺基酸的置換。

【0317】利用比較例 2 所述之習知方法表現及純化含有 H54 (序列識別號：1)與 L28 (序列識別號：2)的 H54/L28-IgG1，含有 VH3-IgG1 (序列識別號：6) 與 VL3-CK (序列識別號：7)的 Fv4-IgG1，含有 VH3-M73 (序列識別號：15) 與 VL3-CK (序列識別號：7)的 Fv4-M73，含有 VH3-IgG1-v1 (序列識別號：8)與 VL3-CK (序列識別號：7)的 Fv4-IgG1-v1，以及含有 VH3-IgG1-v2 (序列識別號：9)與 VL3-CK (序列識別號：7)的 Fv4-IgG1-v2。

【0318】對中性環境下人類 FcRn 之抗體結合親和力的評估

以實施例 2 所述之方法製備含有 VH3-IgG1 (序列識別號：6)與 L (WT) (序列識別號：5)之，含有 VH3-M73 (序列識別號：15) 與 L (WT) (序列識別號：5)之 VH3/L (WT)-M73，含有 VH3-IgG1-v1 (序列識別號：8)與 L (WT) (序列識別號：5)之 VH3/L (WT)-IgG1-v1，以及含有 VH3-IgG1-v2 (序列識別號：9) and L (WT) (序列識別號：5)之 VH3/L (WT)-IgG1-v2，並評估在中性 pH (pH 7.0)下對 FcRn 的結合。

【0319】以實施例 5 所述之方法計算 VH3/L (WT)-IgG1-v1 與 VH3/L (WT)-IgG1-v2 對人類 FcRn 的結合活性。由於 VH3/L

(WT)-IgG1 與 VH3/L (WT)-M73 對於人類 FcRn 的結合活性很弱，因此無法以實施例 5 所述方法計算出對人類 FcRn 的結合活性，故這些抗體必須以下列方法進行評估。利用 Biacore T100 (GE Healthcare)對抗體與人類 FcRn 之間的結合進行動力分析。利用胺類偶合法將適量之蛋白 L (ACTIGEN)固定於感測晶片 CM4 (GE Healthcare)上，且使此晶片可捕捉有興趣的抗體。接著，注入稀釋的 FcRn 溶液與檢測緩衝液(對照溶液)使人類 FcRn 與於晶片上被捕捉的抗體反應。所使用之檢測緩衝液含有 50 mmol/l 的磷酸鈉、150 mmol/l 的 NaCl、以及 0.05% (w/v)的 Tween20 (pH 7.0)。FcRn 以各個緩衝液進行稀釋。此晶片可利用 10 mmol/l 甘胺酸-HCl (pH 1.5)再生。分析限定於 25℃下進行。

【0320】利用 Biacore T100 分析軟體(GE Healthcare)計算感應譜數據(sensorgram data)以獲得各抗體的 KD (M)值，其同時符合感應譜(sensorgram)的結合和解離階段，且完全符合工作集中的曲線。感應譜符合由 Biacore T100 分析軟體提供之 1:1 結合模型("朗繆爾結合"模型)。對於某些結合反應，利用平衡方法由 R_{eq}(平衡結合反應)圖與分析物濃度 log 值之非線性回歸分析獲得 KD 值。

【0321】以 Biacore 分析在中性環境(pH 7.0)下人類結合的結果如表 8 所示。

【0322】表 8

	KD (M)
IgG1	8.8E-05
M73	1.4E-05
IgG1-v1	3.2E-06
IgG1-v2	8.1E-07

【0323】利用人類 FcRn 轉殖小鼠株 276 在共注入模式中進行抗原移除之抗體效果的體內試驗

利用共注入模式進行抗體的體內試驗，如實施例 3 所述。此試驗中所使用的抗-人類 IL-6 受體抗體為上述之 H54/L28-IgG1、Fv4-IgG1、Fv4-M73、Fv4-IgG1-v1 與 Fv4-IgG1-v2。此試驗中所使用之小鼠為人類 FcRn 轉殖小鼠(B6.mFcRn-/-.hFcRn Tg 276+/+小鼠株，Jackson Laboratories; Methods Mol Biol. (2010) 602: 93-104)。

【0324】如第 12 圖所示，比較 H54/L28-IgG1、Fv4-IgG1、Fv4-M73、Fv4-IgG1-v1 的藥物動力特性，且在此試驗過程中抗體維持相似的血漿濃度。

【0325】血漿 hsIL-6R 各時間點的濃度如第 13 圖所示。相較於給予 hsIl-6R 與 Fv4-IgG1，給予 hsIL-6R 與 Fv4-IgG1-v2 可促進移除，而給予 hsIl-6R 與 Fv4-M73 及 Fv4-IgG1-v1 則降低移除。僅管所有的 Fc 變異體，M73、v1 及 v2 已增加在中性 pH 環境(pH 7.0)下與人類 FcRn 的結合親和力，但僅只有 Fv4-IgG1-v2 被證實可促進 hsIL-6R 的移除，而非 Fv4-M73 與 Fv4-IgG1-v1。此結果表示為了促進抗原移除，抗體在 pH 7.0 對人類 FcRn 的結合親和力需要至少大於 IgG1-v1，其在 pH 7.0 對人類 FcRn 的結合親和力為 KD 3.2 微莫耳或大於完整人類 IgG1(對人類 FcRn 的結合親和力為 KD 88 微莫耳)的 28 倍。

【0326】第 14 圖顯示 Fc 變異體在 pH 7.0 對人類 FcRn 之結合親和力與在共注射 hsIL-6R 及 Fc 變異體後 1 天血漿 hsIL-6R 濃度之間的關係。本實施例及實施例 6 中所述之 Fc 變異體

(Fv4-IgG1 、 Fv4-M73 、 Fv4-IgG1-v1 、 Fv4-IgG1-v2 、 Fv4-IgG1-F14、Fv4-IgG1-F20、Fv4-IgG1-F21、Fv4-IgG1-F25、Fv4-IgG1-F29、 Fv4-IgG1-F35、 Fv4-IgG1-F48、 Fv4-IgG1-F93 與 Fv4-IgG1-F94)被標示出來。藉由增加抗體在 pH 7.0 下對人類 FcRn 之結合親和力，可使得代表抗原移除的 hsIL-6R 血漿濃度先增加，但隨後降低。此結果證實為了比完整人類 IgG1 更促進抗原的清除，抗體在 pH 7.0 下對人類 FcRn 之結合親和力需要較佳大於 KD 2.3 微莫耳 (此數值來自於第 14 圖的曲線擬合(curve fitting))。抗體對人類 FcRn 的結合親和力介於 KD88 微莫耳與 KD 2.3 微莫耳會降低抗原的清除(較高的 hsIL-6R 濃度)。換句話說，在 pH 7.0 下對人類 FcRn 的抗體結合親和力較佳大於完整人類 IgG1 的 38 倍，以促進抗原移除，否則會降低抗原清除。

【0327】第 15 圖顯示 Fc 變異體在 pH 7.0 對人類 FcRn 之結合親和力與在共注射 hsIL-6R 及 Fc 變異體後 1 天血漿抗體濃度之間的關係。本實施例及實施例 6 中所述之 Fc 變異體 (Fv4-IgG1、Fv4-M73、Fv4-IgG1-v1、Fv4-IgG1-v2、Fv4-IgG1-F14、Fv4-IgG1-F20、Fv4-IgG1-F21、Fv4-IgG1-F25、Fv4-IgG1-F29、Fv4-IgG1-F35、Fv4-IgG1-F48、Fv4-IgG1-F93 與 Fv4-IgG1-F94)被標示出來。藉由增加抗體在 pH 7.0 下對人類 FcRn 之結合親和力，可使得代表抗體動力特性的抗體血漿濃度先維持恆定，但隨後降低。此結果證實為了使抗體所維持的藥物動力相似於完整的人類 IgG1(對人類 FcRn 的結合親和力為 KD 88 微莫耳)，抗體在 pH 7.0 下對人類 FcRn 的親和力需要低於 KD 0.2

微莫耳 (此數值來自於第 15 圖的曲線擬合(curve fitting))。抗體對人類 FcRn 的結合親和力大於 KD 0.2 微莫耳以增加抗體清除(更快將抗體由血漿中移除)。換句話說，抗體對人類 FcRn 的結合親和力需要在大於完整人類 IgG1 的 440 倍之內以呈現與完整人類 IgG1 類似的藥物動力特性，否則會加速抗體由血漿中移除。

【0328】同時考慮第 14 與 15 圖，相較於 IgG1 可促進抗原清除(降低抗原血漿濃度)並維持與完整人類 IgG1 類似的抗體藥物動力特性，在 pH 7.0 下對人類 FcRn 的抗體結合親和力需要介於 2.3 微莫耳及 0.2 微莫耳之間，或換句話說，在 pH 7.0 下對人類 FcRn 的抗體結合親和力需要在大於完整人類 IgG1 的 38 倍至 440 倍之間。此具有與 IgG1 類似藥物動力特性之抗體具有長時間的抗體移除能力，其長效特性有益於需要長給藥間隔(dosing interval)的抗體治療，例如，慢性疾病。

【0329】另一方面，藉由使抗體在 pH 7.0 下對人類 FcRn 之結合親和力大於 KD 0.2 微莫耳，或換句話說，使抗體在 pH 7.0 下對人類 FcRn 之結合親和力大於完整 IgG1 的 440 倍，即使抗體比完整人類 IgG1 更快由血漿中移除，其可在短時間內促進抗原的清除至一很高的程度。此可快速且有效降低抗原濃度的抗體，其快速作用特性有益於抗體治療，例如，需要將抗原由血漿中移除的急性疾病。

【0330】每單位抗體將抗原由血漿中移除的量是計算藉由給予經促進在 pH 7.0 下對人類 FcRn 結合親和力之抗體 Fc 變異體對抗原移除效力的重要因子。為評估每單位抗體的抗原移

除效率，利用下列計算方式評估本實施例及實施例 6 中所述體內試驗的每個時間點。

【0331】A 值：每個時間點的抗原莫耳濃度

B 值：每個時間點的抗體莫耳濃度

C 值:每個時間點之每單位抗體莫耳濃度之抗原濃度(抗原/抗體莫耳比)

C=A/B

每個抗體之各時間點的 C 值(抗原/抗體莫耳比)如第 16 圖所示。相似的 C 值代表每單位抗體有較高的抗原移除效率，而較高的 C 值代表每單位抗體有較低的抗原移除效率。相較於 IgG1 較低的 C 值代表 Fc 變異體具有較高的抗原移除效率，而相較於 IgG1 較高的 C 值代表 Fc 變異體對抗原移除效率具有不利的影響。除了 Fv4-M73 與 Fv4-IgG1-v1 之外，所有的 Fc 變異體皆被證明相較 Fv4-IgG1 具有增強的抗原移除效率。Fv4-M73 與 Fv4-IgG1-v1 被證明對抗原移除效率有不利的影響，如第 14 圖所示。

【0332】第 17 圖顯示 Fc 變異體在 pH 7.0 對人類 FcRn 之結合親和力與在共注射 hsIL-6R 及 Fc 變異體後 1 天的 C 值 (抗原/抗體莫耳比)之間的關係。本實施例及實施例 6 中所述之 Fc 變異體 (Fv4-IgG1、Fv4-M73、Fv4-IgG1-v1、Fv4-IgG1-v2、Fv4-IgG1-F14、Fv4-IgG1-F20、Fv4-IgG1-F21、Fv4-IgG1-F25、Fv4-IgG1-F29、Fv4-IgG1-F35、Fv4-IgG1-F48、Fv4-IgG1-F93 與 Fv4-IgG1-F94)被標示出來。此結果證明為了達到比完整人類 IgG1 較高的抗原移除效率，抗體在 pH 7.0 下對人類 FcRn

之結合親和力需要大於 KD 3.0 微莫耳(此數值來自於第 17 圖的曲線擬合)。換句話說，抗體在 pH 7.0 下對人類 FcRn 之結合親和力需要比完整人類大至少 29 倍使得比完整人類 IgG1 具有更高的抗原移除效率。

【0333】總言而之，在 pH 7.0 下對 FcRn 結合親和力介於 KD 3.0 微莫耳至 0.2 微莫耳的抗體變異體群組，或換句話說，在 pH 7.0 下對 FcRn 結合親和力大於完整人類 IgG1 29 倍至 440 倍的抗體變異體群組具有與 IgG1 相似的抗體藥學動力特性，但具有可增加抗體由血漿移除的能力。因此，此抗體具有比 IgG1 更強的抗原移除效率。與 IgG1 類似的藥物動力特性可長時間將抗原由血漿中移除(長效抗原移除)，且長給藥間隔較佳可用於慢性疾病的治療。在 pH 7.0 下對 FcRn 結合親和力大於 0.2 微莫耳的抗體變異體群組，或換句話說，在 pH 7.0 下對 FcRn 結合親和力大於完整人類 IgG1 440 倍的抗體變異體群組具有快速的抗體清除(短期抗體移除)。然而，由於此抗體可更快速的清除抗原(快速抗原移除)，因此，此抗體也具有比 IgG1 更強的抗原移除效率。如實施例 8 所示，正常小鼠中的 Fv4-IgG1-F20 可在非常短的時間內促進抗原由血漿中移除，但此抗原移除效果並不持久。此特徵較佳用於急性疾病，與此疾病相關的抗原需要在非常短的時間內從血漿中快速及大量地移除。

【0334】實施例 10 利用人類 FcRn 轉殖小鼠株 276 以穩定融合模式進行 Fv4-IgG1-F14 的體內試驗

利用實施例 1 所述之人類 FcRn 轉殖小鼠株 276 以穩定融

合模式進行 Fv4-IgG1-F14 的體內試驗。研究組包括對照組(不含抗體)、1 mg/kg 劑量的 Fv4-IgG1，以及 1 mg/kg、0.2 mg/kg 與 0.01 mg/kg 劑量的 Fv4-IgG1-F14。

【0335】第 18 圖顯示在給予抗體後各時間的 hsIL-6R 血漿濃度。相較於不含抗體的 hsIL-6R 基礎濃度，給予 1 mg/kg 的 Fv4-IgG1 可增加數倍的血漿 hsIL-6R 濃度。另一方面，相較於 Fv4-IgG1 組與基礎組，給予 1 mg/kg 的 Fv4-IgG1-F14 可顯著地降低血漿濃度。第 2 天，則無法偵測到血漿 hsIL-6R 濃度(在此偵測系統中血漿 hsIL-6R 濃度的偵測極限為 1.56 ng/mL)，且此情況維持至第 14 天。

【0336】如實施例 1 所述，相較於 H54/L28-IgG1，H54/L28-IgG1-F14 呈現血漿 hsIL-6R 濃度的降低，但降低的程度小。降低的程度遠大於具 pH 依賴性結合至 hsIL-6R 能力的 Fv4 可變區。此結果證明即使增加在 pH 7.0 對人類 FcRn 的結合親和力可有效降低血漿抗原濃度，但合併 pH 依賴性抗原結合及增加在中性 pH 對人類 FcRn 的結合親和力可明顯地促進抗原移除。

【0337】低劑量試驗顯示，即使是 0.01 mg/kg，1/100 之 1 mg/kg 的 Fv4-IgG1-F14 也可將抗原血漿濃度降低至基礎線以下，證明此分子顯著地將抗原由血漿移除。

【0338】實施例 11 人類 FcRn 轉殖小鼠株 276 與 32 在共注射模式中的比較

利用人類 FcRn 轉殖小鼠株 276(Jackson Laboratories)進行上述的體內試驗。為比較人類 FcRn 轉殖小鼠株 276 與一不同

轉殖小鼠株 32 的差異，利用人類 FcRn 轉殖小鼠株 32 (B6.mFcRn-/-.hFcRn Tg 32 +/+ 小鼠株(B6.mFcRn-/- hFCRN Tg32; B6.Cg-Fcgrt<tm1Dcr> Tg(FCGRT)32Dcr) (Jackson #4915)), Jackson Laboratories; Methods Mol Biol. (2010) 602: 93-104) 進行 H54/L28-IgG1、Fv4-IgG1 與 Fv4-IgG1-v2 的共注射試驗。試驗方法與實施例 3 的方法相同，但將人類 FcRn 轉殖小鼠株 276 置換為人類 FcRn 轉殖小鼠株 32。

【0339】第 19 圖顯示在人類 FcRn 轉殖小鼠株 276 與 32 中各時間點的血漿 hsIL-6R 濃度。H54/L28-IgG1、Fv4-IgG1 與 Fv4-IgG1-v2 呈現相似的血漿 hsIL-6R 濃度時間特徵(time profile)。在兩種小鼠中，增加在 pH 7.0 下對人類 FcRn 的結合親和力可促進抗原由血漿中移除(包括 Fv4-IgG1 與 Fv4-IgG1-v2)至相同程度。

【0340】第 20 圖顯示在人類 FcRn 轉殖小鼠株 276 與 32 中各時間點的血漿抗體濃度。H54/L28-IgG1、Fv4-IgG1 與 Fv4-IgG1-v2 呈現相似的血漿抗體濃度時間特徵(time profile)。

【0341】總結，轉殖株 276 及 32 之間並未觀察到明顯的差異，證明 Fc 變異體在 pH 7.0 下對人類 FcRn 結合親和力的增加可在二種不同表現人類 FcRn 之轉殖小鼠株中促進抗原血漿濃度的移除。

【0342】實施例 12 在中性 pH 下具增加對人類 FcRn 結合親和力之各種抗體 Fc 變異體的產生

Fc 變異體的產生

將可增加在中性 pH 對人類 FcRn 結合親和力的各種突變

導入 Fv4-IgG1 中以進一步促進抗原移除。特別是，可將表 9-1 至 9-4 中所述之胺基酸突變導入 Fv4-IgG1 的重鏈恆定區以產生 Fc 變異體(突變位置的胺基酸編號根據 EU 編號規則顯示)。可利用比較例 1 中所述之習知方法進行胺基酸的置換。

【0343】利用比較例 2 所述之習知方法表現及純化含有重鏈及 L(WT) (序列識別號：5)的額外變異體(IgG1-F100 to IgG1-F599)。

【0344】人類 FcRn 結合的評估

如實施例 5 所述，對 IgG1-v1、IgG1-v2 與 IgG1-F2 至 IgG1-F599，或如實施例 9 所述，對 IgG1 與 M73 進行抗體與人類 FcRn 間結合的動力分析。

以 Biacore 分析在中性環境(pH 7.0)的人類 FcRn 結合結果如表 9-1 至 9-14 所示。

【0345】表 9-1

變異體名稱	KD (M)	胺基酸置換
IgG1	8.8E-05	無
M73	1.4E-05	(WO2009/125825)
IgG1-v1	3.2E-06	M252Y/S254T/T256E
IgG1-v1	8.1E-07	N434W
IgG1-F3	2.5E-06	N434Y
IgG1-F4	5.8E-06	N434S
IgG1-F5	6.8E-06	N434A
IgG1-F7	5.6E-06	N434Y
IgG1-F8	4.2E-06	N434W
IgG1-F9	1.4E-07	N434Y/S254T/T256E/N434Y
IgG1-F10	6.9E-08	N434Y/S254T/T256E/N434W
IgG1-F11	3.1E-07	M252Y/N434Y
IgG1-F12	1.7E-07	M252Y/N434W
IgG1-F13	3.2E-07	N434W/N434Y
IgG1-F14	1.8E-07	N434W/N434W
IgG1-F19	4.6E-07	P257L/N434Y
IgG1-F20	4.6E-07	V308F/N434Y
IgG1-F21	3.0E-08	M252Y/V308P/N434Y
IgG1-F22	2.0E-06	M428L/N434S
IgG1-F25	9.2E-09	M252Y/S254T/T256E/V308P/N434W
IgG1-F26	1.0E-06	I332V
IgG1-F27	7.4E-06	G237M
IgG1-F29	1.4E-06	I332V/N434Y
IgG1-F31	2.8E-06	G237M/V308F
IgG1-F32	8.0E-07	S254T/N434W
IgG1-F33	2.3E-06	S254T/N434Y
IgG1-F34	2.8E-07	T256E/N434W
IgG1-F35	8.4E-07	T256E/N434Y
IgG1-F36	3.6E-07	S254T/T256E/N434W
IgG1-F37	1.1E-06	S254T/T256E/N434Y
IgG1-F38	1.0E-07	M252Y/S254T/N434W
IgG1-F39	3.0E-07	M252Y/S254T/N434Y

表 9-2 接續表 9-1

【0346】表 9-2

IgG1-F40	1.5E-08	M252Y/T256E/N434W
IgG1-F41	1.5E-07	M252Y/T256E/N434Y
IgG1-F42	1.0E-06	M252Y/S254T/T256E/N434A
IgG1-F43	1.7E-06	M252Y/N434A
IgG1-F44	1.1E-06	M252W/N434A
IgG1-F47	2.4E-07	M252Y/T256Q/N434W
IgG1-F48	3.2E-07	M252Y/T256Q/N434Y
IgG1-F49	5.1E-07	M252F/T256D/N434W
IgG1-F50	1.2E-06	M252F/T256D/N434Y
IgG1-F51	8.1E-06	N434F/Y436H
IgG1-F52	3.1E-06	H433K/N434F/Y436H
IgG1-F53	1.0E-06	I332V/N434W
IgG1-F54	8.4E-08	V308P/N434W
IgG1-F56	9.4E-07	I332V/M428L/N434Y
IgG1-F57	1.1E-05	G385D/Q386P/N389S
IgG1-F58	7.7E-07	G385D/Q386P/N389S/N434W
IgG1-F59	2.4E-06	G385D/Q386P/N389S/N434Y
IgG1-F60	1.1E-05	G385H
IgG1-F61	9.7E-07	G385H/N434W
IgG1-F62	1.9E-06	G385H/N434Y
IgG1-F63	2.5E-06	N434F
IgG1-F64	5.3E-06	N434H
IgG1-F65	2.9E-07	M252Y/S254T/T256E/N434F
IgG1-F66	4.3E-07	M252Y/S254T/T256E/N434H
IgG1-F67	6.3E-07	M252Y/N434F
IgG1-F68	9.3E-07	M252Y/N434H
IgG1-F69	5.1E-07	M428L/N434W
IgG1-F70	1.5E-06	M428L/N434Y
IgG1-F71	8.3E-08	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434W
IgG1-F72	2.0E-07	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434Y
IgG1-F73	1.7E-07	M252Y/M428L/N434W
IgG1-F74	4.6E-07	M252Y/M428L/N434Y
IgG1-F75	1.4E-06	M252Y/M428L/N434A
IgG1-F76	1.0E-06	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434A
IgG1-F77	9.9E-07	T256E/E428L/N434Y

表 9-3 接續表 9-2

【0347】表 9-3

IgG1-F78	7.8E-07	S254T/M428L/N434W
IgG1-F79	5.9E-06	S254T/T256E/N434A
IgG1-F80	2.7E-06	M252Y/T256Q/N434A
IgG1-F81	1.6E-06	M252Y/T256E/N434A
IgG1-F82	1.1E-06	T256Q/N434W
IgG1-F83	2.6E-06	T256Q/N434Y
IgG1-F84	2.8E-07	M252W/T256Q/N434W
IgG1-F85	5.5E-07	M252W/T256Q/N434Y
IgG1-F86	1.5E-06	S254T/T256Q/N434W
IgG1-F87	4.3E-06	S254T/T256Q/N434Y
IgG1-F88	1.9E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434W
IgG1-F89	3.6E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434Y
IgG1-F90	1.9E-08	M252Y/T256E/V308P/N434W
IgG1-F91	4.8E-08	M252Y/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F92	1.1E-08	M252Y/S254T/T256E/V08P/M428L/N434W
IgG1-F93	7.4E-07	M252W/M428L/N434W
IgG1-F94	3.7E-07	P257L/M428L/N434Y
IgG1-F95	2.6E-07	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434F
IgG1-F99	6.2E-07	M252Y/T256E/N434H
IgG1-F101	1.1E-07	M252W/T256Q/P257L/N434Y
IgG1-F103	4.4E-08	P238A/M252Y/V308P/N434Y
IgG1-F104	3.7E-08	M252Y/D265A/V308P/N434Y
IgG1-F105	7.5E-08	M252Y/T307A/V308P/N434Y
IgG1-F106	3.7E-08	M252Y/V303A/V308P/N434Y
IgG1-F107	3.4E-08	M252Y/V308P/D376A/N434Y
IgG1-F108	4.1E-08	M252Y/V305A/V308P/N434Y
IgG1-F109	3.2E-08	M252Y/V308P/Q311A/N434Y
IgG1-F111	3.2E-08	M252Y/V308P/K317A/N434Y
IgG1-F112	6.4E-08	M252Y/V308P/E380A/N434Y
IgG1-F113	3.2E-08	M252Y/V308P/E382A/N434Y
IgG1-F114	3.8E-08	M252Y/V308P/S424A/N434Y
IgG1-F115	6.6E-06	T307A/N434A
IgG1-F116	8.7E-06	E380A/N434A
IgG1-F118	1.4E-05	M428L
IgG1-F119	5.4E-06	T250Q/M428L

表 9-4 接續表 9-3

【0348】表 9-4

IgG1-F120	6.3E-08	P257LL/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F121	1.5E-08	M252Y/T256E/V308P/M428L/N434W
IgG1-F122	1.2E-07	M252Y/T256E/M428L/N434W
IgG1-F123	3.0E-08	M252Y/T256E/V308P/N434Y
IgG1-F124	2.9E-07	M252Y/T256E/M428L/N434Y
IgG1-F125	2.4E-08	M252Y/S254T/T256E/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F128	1.7E-07	P257L/M428L/N434W
IgG1-F129	2.2E-07	P257A/M428L/N434Y
IgG1-F131	3.0E-06	P257G/M428L/N434Y
IgG1-F132	2.1E-07	P257I/M428L/N434Y
IgG1-F133	4.1E-07	P257M/M428L/N434Y
IgG1-F134	2.7E-07	P257N/M428L/N434Y
IgG1-F135	7.5E-07	P257S/M428L/N434Y
IgG1-F136	3.8E-07	P257T/M428L/N434Y
IgG1-F137	4.6E-07	P257V/M428L/N434Y
IgG1-F139	1.5E-08	M252W/V308P/N434W
IgG1-F140	3.6E-08	S239K/M252Y/V308P/N434Y
IgG1-F141	3.5E-08	M252Y/S298G/V308P/N434Y
IgG1-F142	3.7E-08	M252Y/D270F/V308P/N434Y
IgG1-F143	2.0E-07	M252Y/V308A/N434Y
IgG1-F145	5.3E-08	M252Y/V308F/N434Y
IgG1-F147	2.4E-07	M252Y/V308I/N434Y
IgG1-F149	1.9E-07	M252Y/V308L/N434Y
IgG1-F150	2.0E-07	M252Y/V308M/N434Y
IgG1-F152	2.7E-07	M252Y/V308Q/N434Y
IgG1-F154	1.8E-07	M252Y/V308T/N434Y
IgG1-F157	1.5E-07	M257A/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F158	5.9E-08	P257T/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F159	4.4E-08	P257V/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F160	8.5E-07	M252W/M428I/N434Y
IgG1-F162	1.7E-07	M252W/M428Y/N434Y
IgG1-F163	3.5E-07	M252W/M428F/N434Y
IgG1-F164	3.7E-07	P238A/M252W/N434Y
IgG1-F165	2.9E-07	M252W/D265A/N434Y
IgG1-F166	1.5E-07	M252W/T307Q/N434Y

表 9-5 接續表 9-4

【0349】表 9-5

IgG1-F167	2.9E-07	M252W/V303A/N434Y
IgG1-F168	3.2E-07	M252W/D376A/N434Y
IgG1-F169	2.9E-07	M252W/V305A/N434Y
IgG1-F170	1.7E-07	M252W/Q311A/N434Y
IgG1-F171	1.9E-07	M252W/D312A/N434Y
IgG1-F172	2.2E-07	M252W/K317A/N434Y
IgG1-F173	7.7E-07	M252W/E308A/N434Y
IgG1-F174	3.4E-07	M252W/E382A/N434Y
IgG1-F175	2.7E-07	M252W/S424A/N434Y
IgG1-F176	2.9E-07	S239k/M252W/N434Y
IgG1-F177	2.8E-07	M252W/S298G/N434Y
IgG1-F178	2.7E-07	M252W/D270F/N434Y
IgG1-F179	3.1E-07	M252W/N325G/N434Y
IgG1-F182	6.6E-08	P257A/M428L/N434W
IgG1-F183	2.2E-07	P257T/M428L/N434W
IgG1-F184	2.7E-07	P257V/M428L/N434W
IgG1-F185	2.6E-07	M252W/I332V/N434Y
IgG1-F188	3.0E-06	P257I/Q311I
IgG1-F189	1.9E-07	M252Y/T307A/N434Y
IgG1-F190	1.1E-07	M252Y/T307Q/N434Y
IgG1-F191	1.6E-07	P257L/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F192	1.1E-07	P257A/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F193	8.5E-08	P257T/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F194	1.2E-07	P257V/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F195	5.6E-08	P257L/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F196	3.5E-08	P257A/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F197	3.3E-08	P257T/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F198	4.8E-08	P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F201	2.1E-07	M252Y/T307D/N434Y
IgG1-F203	2.4E-07	M252Y/T307F/N434Y
IgG1-F204	2.1E-07	M252Y/T307G/N434Y
IgG1-F205	2.0E-07	M252Y/T307H/N434Y
IgG1-F206	2.3E-07	M252Y/T307I/N434Y
IgG1-F207	9.4E-07	M252Y/T307K/N434Y
IgG1-F208	3.9E-07	M252Y/T307L/N434Y

表 9-6 接續表 9-5.

【0350】表 9-6

IgG1-F209	1.3E-07	M252Y/T307M/N434Y
IgG1-F210	2.9E-07	M252Y/T307N/N434Y
IgG1-F211	2.4E-07	M252Y/T307P/N434Y
IgG1-F212	6.8E-07	M252Y/T307R/N434Y
IgG1-F213	2.3E-07	M252Y/T307S/N434Y
IgG1-F214	1.7E-07	M252Y/T307V/N434Y
IgG1-F215	9.6E-08	M252Y/T307W/N434Y
IgG1-F216	2.3E-07	M252Y/T307Y/N434Y
IgG1-F217	2.3E-07	M252Y/K334L/N434Y
IgG1-F218	2.6E-07	M252Y/G385H/N434Y
IgG1-F219	2.5E-07	M252Y/T289H/N434Y
IgG1-F220	2.5E-07	M252Y/Q311H/N434Y
IgG1-F221	3.1E-07	M252Y/D312H/N434Y
IgG1-F222	3.4E-08	M252Y/N315H/N434Y
IgG1-F223	2.7E-07	M252Y/K360H/N434Y
IgG1-F225	1.5E-06	M252Y/L314R/N434Y
IgG1-F226	5.4E-07	M252Y/L314K/N434Y
IgG1-F227	1.2E-06	M252Y/N286E/N434Y
IgG1-F228	2.3E-07	M252Y/L309E/N434Y
IgG1-F229	5.1E-07	M252Y/R255E/N434Y
IgG1-F230	2.5E-07	M252Y/P387E/N434Y
IgG1-F236	8.9E-07	M428A/M428L/N434Y
IgG1-F237	2.3E-07	M252Y/M428A/N434Y
IgG1-F238	7.4E-07	M252Y/M428D/N434Y
IgG1-F240	7.2E-07	M252Y/M428F/N434Y
IgG1-F241	1.5E-06	M252Y/M428G/N434Y
IgG1-F242	8.5E-07	M252Y/M428H/N434Y
IgG1-F243	1.8E-07	M252Y/M428I/N434Y
IgG1-F244	1.3E-06	M252Y/M428K/N434Y
IgG1-F245	4.7E-07	M252Y/M428N/N434Y
IgG1-F246	1.1E-06	M252Y/M428P/N434Y
IgG1-F247	4.4E-07	M252Y/M428Q/N434Y
IgG1-F249	6.4E-07	M252Y/M428S/N434Y
IgG1-F250	2.9E-07	M252Y/M428T/N434Y
IgG1-F251	1.9E-07	M252Y/M428V/N434Y

表 9-7 接續表 9-6

【0351】表 9-7

IgG1-F252	1.0E-06	M252Y/M428W/N434Y
IgG1-F253	7.1E-07	M252Y/M428Y/N434Y
IgG1-F254	7.5E-08	M252W/T307Q/M428Y/N434Y
IgG1-F255	1.1E-07	M252Y/Q311A/M428Y/N434Y
IgG1-F256	5.4E-08	M252W/T307Q/Q311A/M428Y/N434Y
IgG1-F257	5.0E-07	M252Y/T307A/M428Y/N434Y
IgG1-F258	3.2E-07	M252Y/T307Q/M428Y/N434Y
IgG1-F259	2.8E-07	M252Y/D270F/N434Y
IgG1-F260	1.3E-07	M252Y/T307A/Q311A/N434Y
IgG1-F261	8.4E-08	M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
IgG1-F262	1.9E-07	M252Y/T307A/Q311H/N434Y
IgG1-F263	1.1E-07	M252Y/T307Q/Q311H/N434Y
IgG1-F264	2.8E-07	M252Y/E382A/N434Y
IgG1-F265	6.8E-07	M252Y/E382A/E428Y/N434Y
IgG1-F266	4.7E-07	M252Y/T307A/E382A/M428Y/N434Y
IgG1-F267	3.2E-07	M252Y/T307Q/E382A/M428Y/N434Y
IgG1-F268	6.3E-07	P238A/M252Y/M428F/N434Y
IgG1-F269	5.2E-07	M252Y/V305A/M428F/N434Y
IgG1-F270	6.6E-07	M252Y/N325G/M428F/N434Y
IgG1-F271	6.9E-07	M252Y/D376A/M428F/N434Y
IgG1-F272	6.8E-07	M252Y/E380A/M428F/N434Y
IgG1-F273	6.5E-07	M252Y/E382A/M428F/N434Y
IgG1-F274	7.6E-07	M252Y/E380A/E382A/M428F/N434Y
IgG1-F275	4.2E-08	S239K/M252Y/V308P/E382A/N434Y
IgG1-F276	4.1E-08	M252Y/D270F/V308P/E382A/N434Y
IgG1-F277	1.3E-07	S239K/M252Y/V308P/M428F/N434Y
IgG1-F278	3.0E-08	M252Y/T307Q/V308P/E382A/N434Y
IgG1-F279	6.1E-08	M252Y/V308P/Q311H/E382A/N434Y
IgG1-F280	4.1E-08	S239K/M252Y/D270E/V308P/N434Y
IgG1-F281	9.2E-08	M252Y/V308P/E382A/M428F/N434Y
IgG1-F282	2.9E-08	M252Y/V308P/E382A/M428L/N434Y
IgG1-F283	1.0E-07	M252Y/V308P/E382A/M428Y/N434Y
IgG1-F284	1.0E-07	M252Y/V308P/M428Y/N434Y
IgG1-F285	9.9E-08	M252Y/V308P/M428F/N434Y
IgG1-F286	1.2E-07	S239/M252Y/V308P/E382A/M428Y/N434Y

表 9-8 接續表 9-7

【0352】表 9-8

IgG1-F287	1.0E-07	M252Y/V308P/E380A/E382A/M428F/N434Y
IgG1-F288	1.9E-07	M252Y/T256E/E382A/N434Y
IgG1-F289	4.8E-07	M252Y/T256E/M428F/N434Y
IgG1-F290	4.6E-07	M252Y/T256E/E382A/M428F/N434Y
IgG1-F292	2.0E-08	S239K/M252Y/V308P/E382A/M428I/N434Y
IgG1-F293	5.3E-08	M252Y/V308P/E380A/E382A/M428I/N434Y
IgG1-F294	1.1E-07	S239K/M252Y/V308P/M428F/N434Y
IgG1-F295	6.8E-07	S239K/M252Y/E380A/E382A/M428F/N434Y
IgG1-F296	4.9E-07	M252Y/Q311A/M428Y/N434Y
IgG1-F297	5.1E-07	M252Y/D312A/M428Y/N434Y
IgG1-F298	4.8E-07	M252Y/Q311A/D312A/M428Y/N434Y
IgG1-F299	9.4E-08	S239K/M252Y/V308P/Q311A/M428Y/N434Y
IgG1-F300	8.3E-08	S239K/M252Y/V308P/D312A/M428Y/N434Y
IgG1-F301	7.2E-08	S239K/M252Y/V308P/Q311A/D312A/M428Y/N434Y
IgG1-F302	1.9E-07	M252Y/T256E/T307P/N434Y
IgG1-F303	6.7E-07	M252Y/T307P/M428Y/N434Y
IgG1-F304	1.6E-08	M252W/T308P/M428Y/N434Y
IgG1-F305	2.7E-08	M252Y/T256E/V308P/E382A/N434Y
IgG1-F306	3.6E-08	N252W/V308P/E382A/N434Y
IgG1-F307	3.6E-08	S239K/M252W/V308P/E382A/N434Y
IgG1-F308	1.8E-08	S239K/M252W/V308P/E382A/M428Y/N434Y
IgG1-F310	9.4E-08	S239K/M252W/V308P/E382A/M428I/N434Y
IgG1-F311	2.9E-08	S239K/M252W/V308P/M428F/N434Y
IgG1-F312	4.5E-07	S239K/M252W/V308A/E382A/M428F/N434Y
IgG1-F313	6.5E-07	S239K/M252Y/T307P/M428Y/N434Y
IgG1-F314	3.2E-07	M252Y/T256E/Q311A/D312A/M428Y/N434Y
IgG1-F315	6.8E-07	S239K/M252Y/M428Y/N434Y
IgG1-F316	7.0E-07	S239K/M252Y/D270F/M428Y/N434Y
IgG1-F317	1.1E-07	S239K/M252Y/D270F/V308P/M428Y/N434Y
IgG1-F318	1.8E-08	S239K/M252Y/V308P/M428Y/N434Y
IgG1-F320	2.0E-08	S239K/M252Y/V308P/N325G/E382A/M428I/N434Y
IgG1-F321	3.2E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/N325G/N434Y
IgG1-F322	9.2E-08	S239K/M252Y/D270F/T307P/V308P/N434Y
IgG1-F323	2.7E-08	S239K/M252Y/D256E/T307F/V308P/N434Y
IgG1-F324	2.8E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/V308P/N434Y

表 9-9 接續表 9-8

【0353】表 9-9

IgG1-F325	2.1E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
IgG1-F326	7.5E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/Q311A/N434Y
IgG1-F327	6.5E-08	S239K/M252Y/T256E/D270F/T307Q/Q311A/N434Y
IgG1-F328	1.9E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/M428I/N434Y
IgG1-F329	1.2E-08	S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/N434Y
IgG1-F330	3.6E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/L309E/N434Y
IgG1-F331	3.0E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/P387E/N434Y
IgG1-F333	7.4E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/L309E/Q311A/N434Y
IgG1-F334	1.9E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/N352G/M428I/N434Y
IgG1-F335	1.5E-08	S239K/M252Y/T256E/D270E/V308P/M428I/N434Y
IgG1-F336	1.4E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y
IgG1-F337	5.6E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/Q311A/M428I/N434Y
IgG1-F338	7.7E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/M428I/N434Y
IgG1-F339	1.9E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/L309E/M428I/N434Y
IgG1-F343	3.2E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F344	3.0E-08	S239K/M252Y/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F349	1.5E-07	S239K/M252Y/V308P/L309P/M428L/N434Y
IgG1-F350	1.7E-07	S239K/M252Y/V308P/L309R/M428L/N434Y
IgG1-F352	6.0E-07	S239K/M252Y/L309P/M428L/N434Y
IgG1-F353	1.1E-06	S239K/M252Y/L309R/M428L/N434Y
IgG1-F354	2.8E-08	S239K/M252Y/T307Q/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F356	3.4E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/L309E/P387E/N434Y
IgG1-F357	1.6E-08	S239K/M252Y/T256E/D270F/V308P/N325G/M428I/N434Y
IgG1-F358	1.0E-07	S239K/M252Y/T307Q/N434Y
IgG1-F359	4.2E-07	P257V/T307Q/M428I/N434Y
IgG1-F360	1.3E-06	P257V/T307Q/M428V/N434Y
IgG1-F362	5.4E-08	P257V/T307Q/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F363	4.1E-08	P257V/T307Q/Q311A/M428L/N434Y
IgG1-F364	3.5E-08	P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F365	5.1E-08	P257V/V305A/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F367	1.5E-08	S239K/M252Y/E258H/D270F/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
IgG1-F368	2.0E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/N325G/E382A/M428I/N434Y
IgG1-F369	7.5E-08	M252Y/P257V/T307Q/M428I/N434Y
IgG1-F372	1.3E-08	S239K/M252W/V308P/M428Y/N434Y
IgG1-F373	1.1E-08	S239K/M252W/V308P/Q311A/M428Y/N434Y

表 9-10 接續表 9-9

【0354】表 9-10

IgG1-F374	1.2E-08	S239K/M252W/T256E/V308P/M428Y/N434Y
IgG1-F375	5.5E-09	S239K/M252W/N286E/V308P/M428Y/N434Y
IgG1-F376	9.5E-09	S239K/M252W/T256E/D270F/N286E/V308P/N434Y
IgG1-F377	1.3E-07	S239K/M252W/T307P/M428Y/N434Y
IgG1-F379	1.0E-08	S239K/M252W/T256E/V308P/Q311A/M428Y/N434Y
IgG1-F380	5.6E-09	S239K/M252W/T256E/V286E/V308P/M428Y/N434Y
IgG1-F381	1.1E-07	P257V/T307A/Q311A/M428L/N434Y
IgG1-F382	8.7E-08	P257V/V305A/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F386	3.2E-08	M252Y/V308P/L309E/N434Y
IgG1-F387	1.5E-07	M252Y/V308P/L309D/N434Y
IgG1-F388	7.0E-08	M252Y/V308P/L309A/N434Y
IgG1-F389	1.7E-08	M252W/V308P/L309E/M428Y/N434Y
IgG1-F390	6.8E-08	M252W/V308P/L309D/M428Y/N434Y
IgG1-F391	3.6E-08	M252W/V308P/L309A/M428Y/N434Y
IgG1-F392	6.9E-09	S239K/M252Y/N286E/V308P/M428I/N434Y
IgG1-F393	1.2E-08	S239K/M252Y/N286E/V308P/N434Y
IgG1-F394	5.3E-08	S239K/M252Y/T307Q/Q311A/M428I/N434Y
IgG1-F395	2.4E-08	S239K/M252Y/T256E/V308P/N434Y
IgG1-F396	2.0E-08	S239K/M252Y/D270F/N286E/T307Q/Q311A/M428I/N434Y
IgG1-F397	4.5E-08	S239K/M252Y/D270F/N286E/T307Q/Q311A/M428I/N434Y
IgG1-F398	4.4E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y
IgG1-F399	6.5E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/T307Q/V308P/M428I/N434Y
IgG1-F400	6.1E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/Q311A/M428I/N434Y
IgG1-F401	6.9E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/P387E/M428I/N434Y
IgG1-F402	2.3E-08	P257V/T307Q/M428L/N434W
IgG1-F403	5.1E-08	P257V/T307A/M428L/N434W
IgG1-F404	9.4E-08	P257A/T307Q/L309P/M428L/N434Y
IgG1-F405	1.7E-07	P257V/T307Q/L309P/M428L/N434Y
IgG1-F406	1.5E-07	P257A/T307Q/L309R/M428L/N434Y
IgG1-F407	1.6E-07	P257V/T307Q/L309R/M428L/N434Y
IgG1-F408	2.5E-07	P257V/N256E/M428L/N434Y
IgG1-F409	2.0E-07	P257V/P387E/M428L/N434Y
IgG1-F410	2.2E-07	P257V/T307H/M428L/N434Y
IgG1-F411	1.3E-07	P257V/T307N/M428L/N434Y

表 9-11 接續表 9-10

【0355】表 9-11

IgG1-F412	8.8E-08	P257V/T307G/M428L/N434Y
IgG1-F413	1.2E-07	P257V/T307P/M428L/N434Y
IgG1-F414	1.1E-07	P257V/T307S/M428L/N434Y
IgG1-F415	5.6E-08	P257V/N286E/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F416	9.4E-08	P257V/T307A/P387E/M428L/N434Y
IgG1-F418	6.2E-07	S239K/M252Y/T307P/N325G/M428Y/N434Y
IgG1-F419	1.6E-07	M252Y/T307A/Q311H/K360H/N434Y
IgG1-F420	1.5E-07	M252Y/T307A/Q311H/P387E/N434Y
IgG1-F421	1.3E-07	M252Y/T307A/Q311H/M428A/N434Y
IgG1-F422	1.8E-07	M252Y/T307A/Q311H/E382A/N434Y
IgG1-F423	8.4E-08	M252Y/T307W/Q311H/N434Y
IgG1-F424	9.4E-08	S239K/P257A/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F425	8.0E-08	P257A/V308P/L309E/M428L/N434Y
IgG1-F426	8.4E-08	P257V/T307Q/N434Y
IgG1-F427	1.1E-07	M252Y/P257V/T307Q/M428V/N434Y
IgG1-F428	8.0E-08	M252Y/P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F429	3.7E-08	M252Y/P257V/T307Q/N434Y
IgG1-F430	8.1E-08	M252Y/P257V/T307Q/M428Y/N434Y
IgG1-F431	6.5E-08	M252Y/P257V/T307Q/M428F/N434Y
IgG1-F432	9.2E-07	P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428V/N434Y
IgG1-F433	6.0E-08	P257V/T307Q/Q311A/N325G/N434Y
IgG1-F434	2.0E-08	P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428Y/N434Y
IgG1-F435	2.5E-08	P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428F/N434Y
IgG1-F436	2.5E-07	P257A/T307Q/M428V/N434Y
IgG1-F437	5.7E-08	P257A/T307Q/N434Y
IgG1-F438	3.6E-08	P257A/T307Q/M428Y/N434Y
IgG1-F439	4.0E-08	P257A/T307Q/M428F/N434Y
IgG1-F440	1.5E-08	P257A/N286E/T307Q/Q311A/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F441	1.8E-07	P257A/Q311A/M428L/N434Y
IgG1-F442	2.0E-07	P257A/Q311H/M428L/N434Y
IgG1-F443	5.5E-08	P257A/T307Q/Q311A/M428L/N434Y
IgG1-F444	1.4E-07	P257A/T307A/Q311A/M428L/N434Y
IgG1-F445	6.2E-08	P257A/T307Q/Q311H/M428L/N434Y
IgG1-F446	1.1E-07	P257A/T307A/Q311H/M428L/N434Y
IgG1-F447	1.4E-08	P257A/N286E/T307Q/M428L/N434Y

表 9-12 接續表 9-11

【0356】表 9-12

IgG1-F448	5.3E-08	P257A/N286E/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F449	5.7E-07	S239K/M252Y/D270F/T307P/N325G/M428Y/N434Y
IgG1-F450	5.2E-07	S239K/M252Y/T307P/L309E/N325G/M428Y/N434Y
IgG1-F451	1.0E-07	P257S/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F452	1.4E-07	P257M/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F453	7.8E-08	P257N/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F454	9.6E-08	P257I/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F455	2.5E-08	P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F456	3.4E-08	P257V/T307Q/M428F/N434Y
IgG1-F457	4.0E-08	S239K/P257V/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F458	1.5E-08	P257V/T307Q/V308P/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F459	1.3E-08	P257V/T307Q/V308P/Q311A/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F460	4.7E-08	P257V/T307A/V308P/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F462	8.5E-08	P257V/V308P/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F463	1.3E-07	P257V/T307A/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F464	5.5E-08	P257V/T307Q/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F465	2.1E-08	P257V/N286E/T307Q/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F466	3.5E-07	T256E/P257V/N434Y
IgG1-F467	5.7E-07	T256E/P257T/N434Y
IgG1-F468	5.7E-08	S239K/P257T/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F469	5.6E-08	P257T/V308P/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F470	5.4E-08	T256E/P257T/V308P/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F471	6.6E-08	P257T/V308P/N325G/E382A/M428L/N434Y
IgG1-F472	5.4E-08	P257T/V308P/N325G/P387E/M428L/N434Y
IgG1-F473	4.5E-07	P257T/V308P/L309P/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F474	3.5E-07	P257T/V308P/L309R/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F475	4.3E-08	T256E/P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F476	5.5E-08	P257V/T307Q/E382A/M428L/N434Y
IgG1-F477	4.3E-08	P257V/T307Q/P387E/M428L/N434Y
IgG1-F480	3.9E-08	P257L/V308P/N434Y
IgG1-F481	5.6E-08	P257T/T307Q/N434Y
IgG1-F482	7.0E-08	P257V/T307Q/N325G/N434Y
IgG1-F483	5.7E-08	P257V/T307Q/Q311A/N434Y
IgG1-F484	6.2E-08	P257V/V305A/T307Q/N434Y
IgG1-F485	9.7E-08	P257V/N286E/T307A/N434Y

表 9-13 接續表 9-12

【0357】表 9-13

IgG1-F486	3.4E-07	P257V/T307Q/L309R/Q311H/M428L/N434Y
IgG1-F488	3.5E-08	P257V/V308P/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F490	7.5E-08	S239K/P257V/V308P/Q311H/M428L/N434Y
IgG1-F492	9.8E-08	P257V/V305A/T307A/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F493	4.9E-07	S239K/D270F/T307P/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F497	3.1E-06	P257V/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F498	1.3E-06	P257V/M428L/N434Y
IgG1-F499	5.2E-07	P257V/T307A/M428V/N434Y
IgG1-F500	4.3E-08	P257S/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F506	1.9E-07	P257V/N297A/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F507	5.1E-08	P257V/N286A/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F508	1.1E-07	P257V/T307Q/N315A/M428L/N434Y
IgG1-F509	5.8E-08	P257V/T307Q/N384A/M428L/N434Y
IgG1-F510	5.3E-08	P257V/T307Q/N389A/M428L/N434Y
IgG1-F511	4.2E-07	P257V/N434Y
IgG1-F512	5.8E-07	P257T/N434Y
IgG1-F517	3.1E-07	P257V/N286E/N434Y
IgG1-F518	4.2E-07	P257T/N286E/N434Y
IgG1-F519	2.6E-08	P257V/N286E/T307Q/N434Y
IgG1-F521	1.1E-08	P257V/N286E/T307Q/M428Y/N434Y
IgG1-F523	2.6E-08	P257V/V305A/T307Q/M428Y/N434Y
IgG1-F526	1.9E-08	P257T/T307Q/M428Y/N434Y
IgG1-F527	9.4E-09	P257V/T307Q/V308P/N325G/M428Y/N434Y
IgG1-F529	2.5E-08	P257T/T307Q/M428F/N434Y
IgG1-F533	1.2E-08	P257A/N286E/T307Q/M428F/N434Y
IgG1-F534	1.2E-08	P257A/N286E/T307Q/M428Y/N434Y
IgG1-F535	3.9E-08	T250A/P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F538	9.9E-08	T250F/P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F541	6.0E-08	T250I/P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F544	3.1E-08	T250M/P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F549	5.4E-08	T250S/P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F550	5.9E-08	T250V/P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F551	1.2E-07	T250W/P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F552	1.1E-07	T250Y/P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F553	1.7E-07	M252Y/Q311A/N434Y

表 9-14 接續表 9-13

【0358】表 9-14

IgG1-F554	2.8E-08	S239/M252Y/S254T/V308P/N434Y
IgG1-F556	1.5E-06	M252Y/T307Q/Q311A
IgG1-F559	8.0E-08	M252Y/S254T/N286E/N434Y
IgG1-F560	2.8E-08	M252Y/S254T/V308P/N434Y
IgG1-F561	1.4E-07	M252Y/S254T/V307A/N434Y
IgG1-F562	8.3E-08	M252Y/S254T/V307Q/N434Y
IgG1-F563	1.3E-07	M252Y/S254T/Q311A/N434Y
IgG1-F564	1.9E-07	M252Y/S254T/Q311H/N434Y
IgG1-F565	9.2E-08	M252Y/S254T/T307A/Q311A/N434Y
IgG1-F566	6.1E-08	M252Y/S254T/T307Q/Q311A/N434Y
IgG1-F567	2.2E-07	M252Y/S254T/M428I/N434Y
IgG1-F568	1.1E-07	M252Y/T256E/T307A/Q311H/N434Y
IgG1-F569	2.0E-07	M252Y/T256Q/T307A/Q311H/N434Y
IgG1-F570	1.3E-07	M252Y/S254T/T307A/Q311H/N434Y
IgG1-F571	8.1E-08	M252Y/N286E/T307A/Q311H/N434Y
IgG1-F572	1.0E-07	M252Y/T307A/Q311H/M428I/N434Y
IgG1-F576	1.6E-06	M252Y/T256E/T307Q/Q311H
IgG1-F577	1.3E-06	M252Y/N286E/T307A/Q311A
IgG1-F578	5.7E-07	M252Y/N286E/T307Q/Q311A
IgG1-F580	8.6E-07	M252Y/N286E/T307Q/Q311H
IgG1-F581	7.2E-08	M252Y/T256E/N286E/N434Y
IgG1-F582	7.5E-07	S239K/M252Y/V308P
IgG1-F583	7.8E-07	S239K/M252Y/V308P/E382A
IgG1-F584	6.3E-07	S239K/M252Y/T256E/V308P
IgG1-F585	2.9E-07	S239K/M252Y/N286E/V308P
IgG1-F586	1.4E-07	S239K/M252Y/N286E/V308P/M428I
IgG1-F587	1.9E-07	M252Y/N286E/M428L/N434Y
IgG1-F592	2.0E-07	M252Y/S254T/E382A/N434Y
IgG1-F593	3.1E-08	S239K/M252Y/S254T/V308P/M428I/N434Y
IgG1-F595	1.8E-07	S239K/M252Y/M428I/N434Y
IgG1-F596	4.0E-07	M252Y/D312A/E382A/M428Y/N434Y
IgG1-F597	2.2E-07	M252Y/E382A/P387E/N434Y
IgG1-F598	1.4E-07	M252Y/D312A/P387E/N434Y
IgG1-F599	5.2E-07	M252Y/P387E/M428Y/N434Y

【0359】實施例 13 利用人類 FcRn 轉殖小鼠株 32 以穩定

融合模式進行各種 Fc 變異體抗體的體內試驗

利用人類 FcRn 轉殖小鼠株 32 以穩定融合模式測試實施例 12 中所製備之 Fc 變異體將抗原由血漿中移除的能力。穩定融合模式的體內試驗如實施例 1 所述，但以人類 FcRn 轉殖小鼠株 32 代替轉殖小鼠株 276，且注射 2 次(在植入輸液幫浦之前以及抗體注射後 14 天)或 3 次(在植入輸液幫浦之前以及抗體注射後 10 天與 20 天)抗小鼠 CD4 單株抗體。

【0360】由表 9-1 至 9-14 中所述之 Fc 變異體選擇出下述的抗體 Fc 變異體，以比較例 2 所述之習方法進行表現及純化。

含有 VH3-IgG1 與 VL3-CK 的 Fv4-IgG1；

含有 VH3-IgG1-F11 與 VL3-CK 的 Fv4-IgG1-F11；

含有 VH3-IgG1-F14 與 VL3-CK 的 Fv4-IgG1-F14；

含有 VH3-IgG1-F39 與 VL3-CK 的 Fv4-IgG1-F39；

含有 VH3-IgG1-F48 與 VL3-CK 的 Fv4-IgG1-F48；

含有 VH3-IgG1-F140 與 VL3-CK 的 Fv4-IgG1-F140；

含有 VH3-IgG1-F157 與 VL3-CK 的 Fv4-IgG1-F157；

含有 VH3-IgG1-F194 與 VL3-CK 的 Fv4-IgG1-F194；

含有 VH3-IgG1-F196 與 VL3-CK 的 Fv4-IgG1-F196；

含有 VH3-IgG1-F198 與 VL3-CK 的 Fv4-IgG1-F198；

含有 VH3-IgG1-F262 與 VL3-CK 的 Fv4-IgG1-F262；

含有 VH3-IgG1-F264 與 VL3-CK 的 Fv4-IgG1-F264；

含有 VH3-IgG1-F393 與 VL3-CK 的 Fv4-IgG1-F393；

含有 VH3-IgG1-F434 與 VL3-CK 的 Fv4-IgG1-F424；以及

含有 VH3-IgG1-F447 與 VL3-CK 的 Fv4-IgG1-F447。

【0361】以 1 mg/kg 的劑量將這些抗體給予至人類 FcRn 轉殖小鼠株 32 中。

【0362】第 21 圖顯示小鼠中各時間點的血漿 hsIL-6R 濃度。相較於 Fv4-IgG1，具增強對人類 FcRn 在 pH 7.0 結合親和力之所有的 Fc 變異體呈現血漿 hsIL-6R 濃度的降低，因此促進抗原由血漿中移除。即使各 Fc 變異體之抗原濃度降低的程度與持久性不同，但相較於 IgG1，所有的變異體皆可降低血漿 hsIL-6R 濃度，其證明增加在 pH 7.0 下對人類 FcRn 結合親和力可促進抗原由血漿中移除。第 22 圖顯示小鼠中各時間點的抗體濃度。Fc 變異體中的抗體動力特性皆不相同。

【0363】如實施例 9 所述，每單位抗體將抗原由血漿中移除的量，為評估藉由給予增強在 pH 7.0 對人類 FcRn 結合親和力之抗體 Fc 變異體之抗原移除效率的重要的因子。因此，將各抗體在各時間點的 C 值(抗原/抗體莫耳比)揭示於第 23 圖中。第 24 圖顯示在給予抗體後 1 天，Fc 變異體在 pH 7.0 對人類 FcRn 的結合親和力與 C 值(抗原/抗體莫耳比)之間的關係。此證明相較於 Fv4-IgG1，試驗中所有的抗體 Fc 變異體皆具有較低的 C 值。因為試驗中所有的 Fc 變異體在 pH 7.0 下對人類 FcRn 的結合親和力大於 KD 3.0 微莫耳，因此相較於完整人類 IgG1，其具有較高的抗原移除效率。此與實施例 9(第 17 圖)的結果一致。

【0364】第 25 圖顯示此試驗中的 Fc 變異體，含有 F11、F39、F48 與 F264 Fc 變異體的抗體具有與 IgG1 類似的藥物動力特性。由於此試驗使用人類 FcRn 轉殖小鼠，因此推測此 Fc

變異體在人體中具有與 IgG1 類似的長半衰期。第 26 圖顯示注射具有與完整人類 IgG1 類似藥物動力特性(F11、F39、F48 與 F264)的抗體後，小鼠體內各時間點的 hsIL-6R 濃度。此變異體比 IgG1 減少約 10 倍的血漿 hsIL-6R 濃度。再者，此抗體降低 hsIL-6R 濃度至低於 hsIL-6R 基礎濃度(不含抗體的濃度)。因此，此抗體可長時間將抗原由血漿中移除，且長的給藥間隔較佳用於慢性疾病的抗體治療。

【0365】第 27 圖與 28 圖分別顯示 IgG1，以及 Fc 變異體 F157、F196 與 F262 在各時間點的血漿抗體濃度與血漿 hsIL-6R 濃度。另人驚訝的是，即使 F157 與 F262 的抗體藥物動力特性比完整人類 IgG1 顯示更快由血漿中清除，F157 與 F262 仍顯示非常廣泛和持久將 hsIL-6R 從血漿中移除的效果。特別是，從第 1 天至第 28 天(除了第 14 天)F157 的血漿 hsIL-6R 濃度低於偵測極限(1.56 ng/mL)，且從第 14 天至第 28 天 F262 的血漿 hsIL-6R 濃度低於偵測極限(1.56 ng/mL)。另一方面，相較於 F157，F196 具有更低的抗體清除效果，抗原濃度由第 14 天開始增加且在第 28 天下降至基礎濃度。在此 Fc 變異體的試驗中，只有 F157 與 F262 之 Fc 變異體可於第 28 天將血漿 hsIL-6R 濃度降至 1.56 ng/mL 以下。

【0366】因為相較於 IgG1，抗體可非常快地由血漿中被移除，因此 F157 與 F262 持久的長期效果為不可預期的抗體藥物動力特性。特別是，在第 21 天時偵測不到 F157 的血漿抗體濃度。然而，血漿 hsIL-6R 濃度在第 21 及 28 天仍持續降低至 1.56 ng/mL 偵測極限以下。推測此不可預期的效果是由於抗體存在於血管內

皮細胞表面形成 FcRn 結合形式。即使這些抗體在血漿中的濃度很低，這些抗體仍可存在於血管內皮細胞表面形成 FcRn 結合形式(此不可計入血漿抗體濃度)。此 FcRn 結合抗體仍可結合至血漿中的抗原，且抗原/抗體複合物藉由 FcRn 攝入後，抗原會在核內體中釋放並被溶小體分解，同時此抗體返回至細胞表面形成 FcRn 結合形式。因此，此 FcRn 結合抗體有助於抗原移除。此解釋為何血漿中的抗體濃度變低，仍可維持抗原移除能力。

【0367】實施例 14 傳統抗體與抗原移除抗體在矽試驗(silicon study)的比較

實施例 13 證明對抗原具 pH-依賴性結合活性以及增強於中性 pH 下對人類 FcRn 結合親和力的抗體可將抗原由血漿中移除。因此，此抗原移除抗體有用於標定抗原，其中單純結合及中和仍不足以治療疾病，且必須將抗原由血漿中移除。

【0368】抗原移除抗體也可用於單純結合及中和即足夠之標定抗原。抗原的抗體結合與中和需要至少與血漿中抗原相同莫耳含量的抗體(若抗體對抗原的親和力為無限大，則抗原可被與抗原相同莫耳含量的抗體中和)。與傳統抗體相比(抗體不具有 pH-依賴性抗原結合與 Fc 工程)，抗原移除抗體可降低血漿中抗原的濃度。此表示可降低中和抗原所需的抗體濃度。若相較於傳統的抗體，抗原移除抗體可降低血漿抗原濃度 10 倍，則中和抗原所需的抗體濃度也可減少 10 倍。因此，在治療環境中，相較於傳統的抗體，抗原移除抗體可降低抗體劑量或增加給藥間隔。

【0369】與 IgG1 相比，Fc 變異體，例如 F11、F39、F48

與 F264 可降低血漿抗原濃度約 10 倍。為了評估相較於傳統抗體此抗原移除抗體的效果，我們對傳統抗體與抗原移除抗體在治療環境中維持抗原中和所需抗體劑量進行矽評估(silico assessment)。我們判定出每 3 個月給藥間隔可維持中和的劑量(即劑量需要 Q3M)。

【0370】藥物動力模式的建立

我們利用 PK 分析軟體 SAAM II (The SAAM Institute, Inc.)建立藥物動力(PK)模式。PK 模式的建立可參考 Pharmacokinet Pharmacodyn. 2001 Dec; 28(6): 507-32 與 Br J Clin Pharmacol. 2007 May; 63(5): 548-61。PK 模式的構想如第 29 圖所示。每個部分(compartment)的數值以下列微分方程所示。

【0371】[數學式 1]

$$\frac{dXsc}{dt} = -ka \times Xsc$$

$$\frac{dXmab}{dt} = ka \times Xsc - CLmab \times \frac{Xmab}{Vmab} - kon \times \frac{Xmab \times Xag}{Vmab} + koff \times Xcom + \left(\frac{CLcom}{Vcom} - \frac{CLmab}{Vmab} \right) \times Xcom$$

$$\frac{dXcom}{dt} = -CLcom \times \frac{Xcom}{Vcom} + kon \times \frac{Xmab \times Xag}{Vmab} - koff \times Xcom$$

$$\frac{dXag}{dt} = -CLag \times \frac{Xag}{Vag} - kon \times \frac{Xmab \times Xag}{Vmab} + koff \times Xcom + R$$

Xsc：抗體在皮下組織的含量

Xmab：抗體在血清中的含量

Xcom：抗體及抗原之免疫複合物(複合物)的含量

Xag：血清中游離抗原的含量

Ka：吸收速率常數

在此模式中，將所有抗體的生物利用率(F)設為 1，且抗原(R)的生物合成速率以下列方程式進行計算。

【0372】[數學式 2]

$$R = CLag \times Cpre$$

Cpre：血清中穩定狀態的抗原濃度

【0373】在此矽試驗中所使用的藥物動力參數及抗原結合動力參數如表 10 所示。

【0374】表 10

CLmab	L/天/kg	0.0025
Clag	L/天/kg	0.0243
CLcom	L/天/kg	0.0045
Vmab=Vag	L/kg	0.0843
Vcom	L/kg	0.0519
Ka	1/day	0.4800
Koff	1/day	53.0496
Kon	1/nM/天	53.0496
	L/μg/天	0.353664

【0375】抗原移除抗體與親和力成熟的模擬計算

在抗體給予前，穩定狀態的濃度(Cpre)為 2,400 g/mL。在建立中 PK 模式中，我們計算出在一次皮下給藥後 48 天，使游離抗原濃度低於 35 ng/mL 的最低劑量。抗原的分子量訂為 190 kDa，且治療性抗體皆訂為 150 kDa。

【0376】關於抗體，在此矽試驗中使用傳統抗體與具有各種結合親和力的抗原移除抗體(源自於 KD 1 nM 親代抗體(parent antibody)之各程度的親和力成熟)。抗原移除抗體具有比傳統抗體更快清除抗原-抗體複合物的效果。抗原-抗體複合物的清除參數(CLcom)如表 11 所示。

【0377】表 11

		傳統抗體	抗原移除抗體
CLom	L/天/kg	0.0045	0.0729

【0378】同時也對源自於 KD 1 nM 親代抗體之親和力成熟的效果(親和力的變化在 100 倍範圍內)進行試驗。在矽試驗中使用 1 nM、300 pM、100 pM、30 pM 與 10 pM KD。親和力成熟反映出 koff 值的減少。koff 值的變化在 100 倍範圍內(koff = 53.05、17.68、5.30、1.77、0.53 [1/天])。

【0379】可由 1 nM、300 pM、100 pM、30 pM 及 10 pM 傳統抗體與抗原移除抗體之結合親和力得知在一次皮下給藥後 48 天使游離抗原濃度低於 35 ng/mL 的劑量。此結果如表 12 所示。

【0380】表 12

劑量	1 nM	333 pM	100 pM	33 pM	10 pM
傳統抗體	2868	1256	692	532	475
抗原移除抗體	180	81	46	36	33

【0381】1 nM 具結合親和力的親代傳統抗體需要 2,868 mg 以達到 Q3M 劑量。即使可藉由改善抗體對抗原的結合親和力來降低抗體劑量，但劑量的減少有其上限。此上限取決於抗原的抗體結合與中和需要至少與血漿中抗原相同莫耳數的抗體。即使是 10 pM 的結合親和力，傳統抗體需要 475 mg 以達到 Q3M 劑量，由於組成物抗體濃度與皮下注射體積的限制，使得此劑量無法以單一皮下注射。

【0382】另一方面，藉由生物工程使抗原結合具 pH 依賴性(或直接產生具 pH 依賴性結合的抗體)以及改善 Fc 區在中性 pH 下對 FcRn 的結合親和力將傳統抗體轉化為抗原移除抗體，則可大幅降低抗體劑量。具 1 nM 結合親和力之抗原移除抗體僅需要 180 mg 即可達到 Q3M 劑量。即使是具有無限親和力的傳

統抗體也無法達到此劑量。藉由將抗原移除抗體的結合親和力增加至 10 pM，可使劑量減少至 33 mg，而此劑量可輕易地以皮下注射給予。

【0383】因此，矽試驗證明抗原移除抗體比傳統抗體具有明顯的優勢。抗體的劑量可低於即使是具無限親和力的傳統抗體也無法達到的劑量。關於給藥間隔，當以與傳統抗體相同劑量注射抗原移除抗體時，抗原移除抗體可具有更持久的效果，因此可大幅增長給藥間隔。藉由抗原移除抗體的降低劑量與增長給藥間隔，可提供比傳統抗體更顯著的優勢。

【0384】應注意的是，如實施例 1 所示，抗原移除抗體並不必須要具有對抗原的 pH 依賴性結合。對抗原的 pH 依賴性結合可有效地促進抗體的抗原移除能力。再者，pH 依賴性結合活性可利用其他因子代替，此因子的濃度在血漿及核內體中的濃度不同。此因子也可用於產生在血漿中可結合至抗原，但在核內體與抗原分離的抗體。

【0385】實施例 15 pH 依賴性抗-人類 IL-6 抗體之促進加速人類 IL-6 移除效果的試驗

pH 依賴性人類 IL-6-結合抗體的產生

如 WO 2009/125825 所述，包含 CLB8H-IgG1 (序列識別號: 16) and CLB8L-CK (序列識別號: 17)之 CLB8-IgG1 為一嵌合抗-IL-6 抗體。含有 H16-IgG1 (序列識別號: 18) and L13-CK (序列識別號: 19)的 H16/L13-IgG1 為一嵌合抗-IL-6 抗體，其來自於使 CLB8-IgG1 在 pH-依賴性方法下具有結合至人類 IL-6 的能力(其在 pH 7.4 下結合，但在 pH 5.8 下分離)。

【0386】嵌合抗-IL-6抗體對人類IL-6之pH-依賴性結合活性的評估

利用 Biacore T100 (GE Healthcare)評估 CLB8-IgG1 與 H16/L13-IgG1 在 pH 5.5 與 pH 7.4 下的人類 IL-6 結合活性(解離常數(KD))。使用含有 0.05%界面活性劑 P20 (pH 7.4 與 pH 6.0)之 10 mmol/l ACES/150 mmol/l NaCl 作為檢測緩衝液進行分析。在抗體與利用胺類偶合法固定於感測晶片上之重組蛋白 A/G (Thermo Scientific)結合後，注入適當濃度的人類 IL-6 (TORAY)作為分析物。試驗在 37℃下進行。以 Biacore T100 分析軟體(GE Healthcare)進行分析此試驗結果，且由此試驗結果計算出結合速率常數，ka(1/Ms)，與解離速率常數，k_d(1/ S)。接著，由 ka 與 k_d 計算出 KD (M)值(表 13)。再者，藉由評估 pH-依賴性結合力以計算各抗體在 pH 7.4 與 pH 6.0 間的 KD 比值。

【0387】表 13

樣本	pH	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	KD(pH5.5)/KD(pH7.4)
CLB8-IgG1	pH7.4	3.6E+06	8.0E-04	2.2E-10	0.8
	pH5.5	3.7E+06	6.6E-04	1.8E-10	
H16/L13-IgG1	pH7.4	2.1E+06	4.6E-03	2.2E-09	7.4
	pH5.5	3.7E+05	5.9E-03	1.6E-08	

【0388】在中性環境下具 FcRn-結合活性之抗-人類 IL-6 抗體的製備

對含有 H16-IgG1 (序列識別號：18)與 L13-CK (序列識別號：19)之 H16/L13-IgG1 進行突變以增加在中性環境下(pH 7.4)的 FcRn 結合。特別是，藉由將 IgG1 重鏈恆定區 EU 編號第 434 位置的 Asn 置換為 Trp 以形成 H16-IgG1-v2 (序列識別號：20)，

並藉由將 IgG1 重鏈恆定區 EU 編號第 252 位置的 Met 置換為 Tyr，及將第 434 位置的 Asn 置換為 Trp 以形成 H16-F14 (序列識別號：21)。利用比較例 1 所述之習知方法進行上述的胺基置換。

【0389】利用比較例 2 所述之習知方法表現與純化含有 CLB8H-IgG1 (序列識別號：16)與 CLB8L-CK (序列識別號：17)之 CLB8-IgG1，含有 H16-IgG1 (序列識別號：18)與 L13-CK (序列識別號：19)之 H16/L13-IgG1，含有 H16-IgG1-v2 (序列識別號：20)與 L13-CK (序列識別號：19)之 H16/L13-IgG1-v2，含有 H16-F14 (序列識別號：21)與 L13-CK (序列識別號：19)之 H16/L13-F14。

【0390】在中性 pH 下 Fc 變異體之小鼠 FcRn 結合活性的評估

利用實施例 5 所述之方法製備含有 VH3-IgG1 與 L (WT)之 VH3/L (WT)-IgG1，含有 VH3-IgG1-v2 與 L (WT)之 VH3/L (WT)-IgG1-v2，以及含有 VH3-IgG1-F14 與 L (WT)之 VH3/L (WT)-IgG1-F14，並利用實施例 8 所述之方法評估在中性環境下(pH 7.4)對小鼠 FcRn 的結合。

【0391】此結果如表 14 所述。IgG1 在 pH7.4 下對小鼠 FcRn 呈現非常弱的結合活性，而 IgG1-v2 與 IgG1-F14 則呈現較強的結合活性。

【0392】表 14

	KD
IgG1	ND
IgG-v2	1.0E-06
IgG1-F14	1.3E-07

【0393】正常小鼠的體內試驗

在僅給予 hIL-6 或合併給予 hIL-6 與抗-human IL-6 抗體至正常小鼠(C57BL/6J 小鼠；Charles River Japan)中後，評估人類 IL-6(hIL-6；TORAY)與抗-人類 IL-6 抗體的體內動力特性。每次給予 10 ml/kg 之 hIL-6 溶液(5 μg/ml)或含有 hIL-6 與抗-人類 IL-6 抗體的混合物(CLB8-IgG1 組；5 μg/ml 的 hIL-6 與 0.025 mg/ml 的 CLB8-IgG1，H16/L13-IgG1、H16/L13-IgG1-v2 與 H16/L13-IgG1-F14 組；5 μg/ml 的 hIL-6 以及分別為 0.14 mg/mL 的 H16/L13-IgG1、H16/L13-IgG1-v2 與 H16/L13-IgG1-F14)至尾靜脈。因抗體劑量經設定，所以超過 99.8%的人類 IL-6 會與注射溶液中的抗體結合。在僅給予 hIL-6 後 5 分鐘、30 分鐘、2 小時、4 小時、7 小時與 1 天後，以及在給予 hIL-6 與抗-人類 IL-6 抗體溶液混合物後 5 分鐘、7 小時、1 天、2 天、3 天、4 天、7 天、14 天、21 天與 30 天，收集血液。將收集的血液立刻於 4℃下以 15,000 rpm 離心 15 分鐘以分離血漿。將分離的血漿於使用前儲存於-20℃或更低。

【0394】利用 ELISA 進行人類 IL-6 血漿濃度的測定

利用人類 IL-6 Quantikine HS ELISA 套組(R&D)測定小鼠中的人類 IL-6 濃度。製備含 20、10、5、2.5、1.25、0.625 與 0.3125 ng/ml 血漿濃度之校準曲線樣本以及經稀釋 100 倍或以上之小鼠血漿樣本。為了使樣本中所有的人類 IL-6 結合至 CLB8-IgG1，將 150 μl 的 5 μg/ml CLB8-IgG1 加至 150 μl 的校準曲線樣本與血漿樣本中，並於室溫下靜置 1 小時。接著，將此樣本添加至 ELISA 套組(R&D)所提供的反應盤中，並於室溫

下靜置 1 小時。加入 ELISA 套組(R&D)所提供的 IL-6 共軛物於室溫反應 1 小時，並加入 ELISA 套組(R&D)所提供的受質溶液(Substrate Solution)於室溫下反應 1 小時。接著，利用 ELISA 套組(R&D)所提供的放大溶液(Amplifier Solution)作為受質，於室溫下反應半小時以進行顯色反應。在以 ELISA 套組(R&D)所提供的停止溶液(Stop Solution)停止反應後，利用微孔板偵測儀讀取 490 nm 的吸光值。利用分析軟體 SOFTmax PRO (Molecular Devices)由校準曲線的吸光值計算小鼠血漿中的濃度。由此方法計算出靜脈注射後各時間點的正常小鼠血漿 hIL-6 濃度，如第 30 圖所示。

【0395】利用 ELISA 進行抗-人類 IL-6 抗體血漿濃度的測定

利用 ELISA 進行抗-人類 IL-6 抗體血漿濃度的測定。將抗-人類 IgG(特定 γ-鏈)F(ab')2 抗體片段(Sigma)置於 Nunc-ImmunoPlate MaxiSorp (Nalge Nunc International)上，於 4℃靜置隔夜以製備抗-人類 IgG-固定化反應盤。製備含 1.6、0.8、0.4、0.2、0.1、0.05 與 0.025 ng/ml 血漿濃度之校準曲線樣本以及經稀釋 100 倍或以上之小鼠血漿樣本。為了使樣本中所有的抗-人類 IL-6 結合至人類 IL-6，將 200 μl 的 1 μg/ml 人類 IL-6 加至 100 μl 的校準曲線樣本與血漿樣本中，並於室溫下靜置 1 小時。將此樣本加至抗-人類 IgG-固定化反應盤，並於室溫下靜置 1 小時。接著，加入山羊抗-人類 IgG (特定 γ-鏈)生物素(BIOT)共軛物(Southern Biotech Association)於室溫下反應 1 小時。接著，加入鏈黴卵白素-聚 HRP80(Stereospecific

Detection Technologies)於室溫下反應 1 小時，並以 TMB One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories)為受質進行顯色反應。在經 1 N 硫酸(Showa Chemical)停止反應後，利用微孔板偵測儀讀取 450 nm 的吸光值。以分析軟體 SOFTmax PRO (Molecular Devices)由校準曲線的吸光值計算小鼠血漿中的濃度。由此方法計算出靜脈注射後各時間點的正常小鼠血漿抗體濃度，如第 31 圖所示。

【0396】對人類 IL-6 pH-依賴性結合的效果

對 CLB8-IgG1 與 H16/L13-IgG1 以 pH-依賴性結合至人類 IL-6 進行體內試驗，並比較各試驗結果。如第 31 圖所示，抗體的藥物動力特性呈現線性清除效果。同時，如第 30 圖所示，同時給予 hIL-6 與以 pH-依賴性結合至人類 IL-6 之 H16/L13-IgG1 可觀察到比同時給予 hIL-6 與 CLB8-IgG1 更快的 hIL-6 移除效果。因此，此證明藉由提供 pH-依賴性人類 IL-6 結合活性，在給予後 4 天此血漿 hIL-6 濃度會降低約 76 倍。

【0397】中性環境下(pH 7.4)之 FcRn 結合效果

除了 H16/L13-IgG1、H16/L13-IgG1-v2 與 H16/L13-F14 之外，對 H16/L13-IgG1 進行上述胺基酸置換後之結果以正常小鼠進行體內試驗。將此試驗結果與 H16/L13-IgG1 之結果進行比較。如第 31 圖所示，在給予後 1 天， H16/L13-IgG1-v2 的血漿抗體濃度比 H16/L13-IgG1 低 29 倍，H16/L13-IgG1-v2 已增加在中性環境下(pH 7.4)對小鼠 FcRn 的結合。再者，在給予後 7 小時，H16/L13-F14 的血漿抗體濃度比 H16/L13-IgG1 低 21 倍，H16/L13-F14 已更進一步增加在中性環境下(pH 7.4)對

小鼠 FcRn 的結合。

【0398】如第 30 圖所示，同時給予 hIL-6 與 H16/L13-IgG1-v2 或 H16/L13-F14 證明比同時給予 hIL-6 與 H16/L13-IgG1 更快被移除，H16/L13-IgG1-v2 或 H16/L13-F14 已增加在中性環境下(pH 7.4)對小鼠 FcRn 的結合。在第 1 天，H16/L13-IgG1-v2 比 H16/L13-IgG1 降低 hIL-6 血漿濃度約 10 倍。在第 7 小時，H16/L13-F14 比 H16/L13-IgG1 降低 hIL-6 血漿濃度約 38 倍。因此，由此顯示可藉由賦予在中性環境(pH 7.4)下小鼠 FcRn-結合活性使血漿人類 IL-6 濃度降低。如上所述，可藉由賦予在中性環境(pH 7.4)下小鼠 FcRn-結合活性使血漿抗體濃度降低，但此血漿 IL-6 濃度降低的效果遠大於抗體濃度的減少。特別是，此表示可藉由給予 pH-依賴性結合至人類 IL-6 且在中性環境(pH 7.4)下具小鼠 FcRn-結合活性之抗體，來加速人類 IL-6 的移除。

【0399】由上述可證明藉由給予同時具 pH-依賴性結合活性及在中性環境(pH 7.4)下具 FcRn-結合活性之抗體，不僅可降低人類可溶性 IL-6 受體的血漿抗原濃度，也可降低抗原，如人類 IL-6 的血漿抗原濃度。

【0400】實施例 16 pH-依賴性結合至人類 IgA 之受體 Fc 融合蛋白之加速人類 IgA 移除效果的試驗

pH-依賴性結合至人類 IgA 之受體 Fc 融合蛋白的製備

含有 A0H-IgG1 (序列識別號：22)之二聚體(dimer)的 A0-IgG1 為人類 CD89-Fc 融合蛋白。如 J. Mol. Biol. (2003) 324: 645-657 所述，人類 CD89，也就是人類 Fc α 受體 I，pH-依賴

性結合接合至人類 IgA(即在中性 pH 值下強烈結合至人類 IgA，但在酸性 pH 值下微弱結合至人類 IgA)。

【0401】CD89-Fc 融合蛋白對人類 IgA 之 pH-依賴性結合活性的評估

利用 Biacore T100 (GE Healthcare)評估 A0-IgG1 在 pH 6.0 與 pH 7.4 下對人類 IgA 的結合活性(解離常數(KD))。利用含有 0.05%界面活性劑 P20 (pH 7.4 and pH 6.0)之 10 mmol/l ACES/150 mmol/l NaCl 作為檢測緩衝液(running buffer)進行試驗。在 CD89-Fc 融合蛋白利用胺類偶合法結合至固定於感測晶片上之蛋白 A/G (Thermo Scientific)後，注射適當濃度的 hIgA (human IgA：以比較例 5 之方法製備)作為分析物。試驗在 37℃下進行。以 Biacore T100 分析軟體(GE Healthcare)進行分析，且所獲得的感應譜(sensorgram)如第 32 圖所示。此結果清楚證明 CD89-Fc 融合蛋白具有 pH-依賴性人類 IgA 結合活性，其可在中性 pH 值下與人類 IgA 強烈結合，但在酸性 pH 值下與人類 IgA 微弱結合。

【0402】在中性環境下具 FcRn-結合活性之 pH-依賴性受體 Fc 融合蛋白的製備

對含有 A0H-IgG1 (序列識別號: 22)二聚體之 A0-IgG1 進行突變以增加在中性環境下(pH 7.4)的 FcRn 結合。特別是，藉由將 A0-IgG1 中第 426 位置的 Asn 置換為 Trp 以形成源自 IgG1 重鏈恆定區的 A0-IgG1-v2。利用比較例 1 所述之習知方法進行上述的胺基置換。

【0403】利用比較例 2 所述之習知方法表現及純化含有

A0H-IgG1 (序列識別號：22)二聚體之 A0-IgG1 與含有 A0H-IgG1-v2(序列識別號：23)二聚體之 A0-IgG1-v2。

【0404】正常小鼠的體內試驗

在單獨給予 hIgA 或給予 hIgA 與 CD89-Fc 融合蛋白(A0H-IgG1 或 A0H-IgG1-v2)至正常小鼠(C57BL/6J 小鼠；查理斯河日本)後，評估人類 IgA (hIgA)與 CD89-Fc 融合蛋白的體內動力特性。將 hIgA 溶液(80 μg/ml)或含有 hIgA 與 CD89-Fc 融合蛋白之混合物溶液(分別為 80 μg/ml 與 1.5 mg/ml，其中幾乎所有的 hIgA 結合至 CD89-Fc 融合蛋白) 分別以每次 10 ml/kg 的劑量給予至尾靜脈。在給予後 15 分鐘、7 小時、1 天、2 天、4 天及 7 天，收集血液。將收集的血液立刻於 4℃下以 15,000 rpm 離心 15 分鐘以分離血漿。在分析前，將分離的血漿儲存於-20℃或更低的冰箱中。

【0405】利用 ELISA 進行人類 IgA 血漿濃度的測定

由於重組人類 IgA 具有針對 hsIL-6R 的可變區，因此利用 hsIL-6R 以 ELISA 測定小鼠血漿中人類 IgA 的濃度。將山羊抗-人類 IgA 抗體(Bethyl Laboratories)添加分裝至 Nunc-ImmunoPlate MaxiSorp (Nalge Nunc International)，並於 4℃靜置隔夜以製備抗-人類 IgA 固定化反應盤。製備血漿濃度為 0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125 或 0.00625 μg/ml 的校準曲線樣本，以及稀釋 100 倍或更高的小鼠血漿樣本。為了使樣本中所有的人類 IgA 皆結合至 hsIL-6R，加入 200 μl 的 10 μg/ml hsIL-6R 至 100 μl 的校準曲線樣本及血漿樣本，並於室溫靜置 1 小時。將樣本分裝置於抗-人類 IgA-固定化反應盤中，並於

室溫靜置 1 小時。加入生物素化抗人 IL-6R 抗體(R&D)於室溫反應 1 小時。接著，加入鏈黴卵白素-聚 HRP80 (Stereospecific Detection Technologies)於室溫反應 1 小時，並以 TMB One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories)為受質進行顯色反應。在以硫酸(Showa Chemical)停止反應後，以微孔盤分析儀偵測 450 nm 的吸光值。小鼠血漿中的濃度可利用分析軟體 SOFTmax PRO (Molecular Devices)由校準曲線的吸光值計算獲得。在靜脈給予後，以此方法測偵各時間點正常小鼠的血漿濃度，如第 33 圖所示。

【0406】利用 ELISA 進行 CD89-Fc融合蛋白血漿濃度的測定

利用 ELISA 進行 CD89-Fc 融合蛋白血漿濃度的測定。將抗-人類 IgG (特定 γ-鏈) F(ab')2 抗體片段(Sigma)置於 Nunc-ImmunoPlate MaxiSorp (Nalge Nunc International)上，並於 4℃下靜置隔夜以製備固定化之抗-人類 IgG 盤。製備血漿濃度為 25.6、12.8、6.4、3.2、1.6、0.8 及 0.4 μg/ml 之校準曲線樣本，以及稀釋 100 倍或更多的小鼠血漿樣本。為了使樣本中所有的 CD89-Fc 融合蛋白皆結合至人類 IgA，加入 200 μl 的 5 μg/ml 人類 IgA 至 100 μl 的校準曲線樣本與血漿樣本中，並於室溫下靜置 1 小時。將樣本分裝置於抗-人類 IgG 固定化反應盤中，並於室溫下靜置 1 小時。添加山羊抗-人類 IgG(特定 Fc)-鹼性磷酸酶共軛物(SIGMA)於室溫下反應 1 小時。接著，以 BluePhos 微孔磷酸酶受質系統(Kirkegaard & Perry Laboratories)為受質進行顯色反應，並以微孔盤分析儀偵測 650 nm 的吸光

值。小鼠血漿中的濃度可利用分析軟體 SOFTmax PRO (Molecular Devices)由校準曲線的吸光值計算獲得。在靜脈給予後，以此方法測偵各時間點正常小鼠的血漿濃度，如第 34 圖所示。

【0407】中性環境(pH 7.4)下 FcRn 結合的效果

除了 A0-IgG1 之外，也利用正常小鼠對源自於對 A0-IgG1 進行上述胺基酸置換所獲得的 A0-IgG1-v2 進行體內試驗。將此試驗結果與 A0-IgG1 的試驗結果相互比較。如第 34 圖所示，在給予後 2 天，經增加在中性環境(pH 7.4)對小鼠 FcRn 結合之 A0-IgG1-v2 的血漿濃度比 A0-IgG1 低 1.8 倍。

【0408】如第 33 圖所示，同時給予 hIgA 與經增加在中性環境(pH 7.4)對小鼠 FcRn 結合之 A0-IgG1-v2 證明比同時給予 hIgA 與 A0-IgG1 更快被移除。在第 2 天，A0-IgG1-v2 比 A0-IgG1 降低約 5.7 倍的 hIgA 血漿濃度。如上所述，可藉由賦予在中性環境(pH 7.4)下對小鼠 FcRn 的結合活性以降低血漿抗體濃度，然而，血漿 hIgA 濃度降低的效果遠大於抗體濃度的降低。特別是，此證明可藉由給予 pH-依賴性結合至人類 IgA 且在中性環境(pH 7.4)下具有小鼠 FcRn 結合活性之受體 Fc 融合蛋白，以加速人類 IgA 的移除。

【0409】由上述發現證明藉由給予同時具有 pH-依賴性抗原結合活性以及在中性環境下具有 FcRn 結合活性之受體 Fc 融合蛋白，也可有效降低血漿抗原濃度，例如，人類 IgA。因此，受體 Fc 融合蛋白也可經生物工程而具有移除血漿中抗原(或配體)血漿濃度的能力。

【0410】實施例 17 pH-依賴性抗-人類 plexin A1 抗體促進 plexin A1 移除效果的試驗(抗體的製備)

關於 pH-依賴性人類 plexin A1 結合抗體

含有 PX268H-IgG1 (序列識別號: 24)與 PX268L-CK (序列識別號: 25)之 PX268-IgG1 為一嵌合抗-plexin A1 抗體。含有 PX141H-IgG1 (序列識別號: 26)與 PX141L-CK (序列識別號: 27)之 PX141-IgG1 為一嵌合抗- plexin A1 抗體，其 pH-依賴性結合至可溶性人類 plexin A1(即在中性 pH 下與可溶性人類 plexin A1 強烈結合，但在酸性 pH 下與可溶性人類 plexin A1 微弱結合)。

【0411】抗-人類 plexin A1 抗體對人類 plexin A1 之 pH-依賴性結合活性的評估

利用 Biacore T100 (GE Healthcare)評估 PX268-IgG1 與 PX141-IgG1 在 pH 6.0 與 pH 7.4 下對人類 plexin A1 的結合活性(解離常數(KD))。使用含有 0.05%界面活性劑 P20 (pH 7.4 與 pH 6.0)之 10 mmol/l ACES/150 mmol/l NaCl 作為檢測緩衝液進行分析。在抗體與以胺類偶合法固定於感測晶片上之重組蛋白 A/G (Thermo Scientific)結合後，注入適當濃度的 hsPlexin A1 (可溶性人類 plexin A1：以比較例 5 之方法製備)作為分析物。試驗在 37℃下進行。以 Biacore T100 分析軟體(GE Healthcare)進行分析，且由此試驗結果計算出結合速率常數，ka(1/Ms)，與解離速率常數，k_d(1/S)。接著，由 ka 與 k_d 計算出 KD (M)值(表 15)。再者，藉由評估 pH-依賴性結合力以計算各抗體在 pH 7.4 與 pH 6.0 間的 KD 比值。

【0412】表 15

配體	樣本_pH	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	KD(pH6.0)/KD(pH7.4)
PX268-IgG1	pH7.4	5.2E+04	2.8E-04	5.4E-09	0.8
	pH6.0	6.3E+04	2.7E-04	4.4E-09	
PX141-IgG1	pH7.4	1.5E+05	6.4E-04	4.2E-09	14.9
	pH6.0	7.9E+04	4.9E-03	6.3E-08	

【0413】在中性環境下具 FcRn-結合活性之 pH-依賴性抗-人類 plexin A1 抗體的製備

對含有 PX141H-IgG1 (序列識別號: 26)與 PX141L-CK (序列識別號: 27)之 PX141-IgG1 進行突變以增加在中性環境下(pH 7.4)的 FcRn 結合。特別是，藉由將 A0-IgG1 中 EU 編號第 434 位置的 Asn 置換為 Trp-以形成源自 IgG1 重鏈恆定區的 PX141H-IgG1-v2 (序列識別號: 28)。利用比較例 1 所述之習知方法進行上述的胺基置換。

【0414】利用比較例 2 所述之習知方法表現及純化含有 PX268H-IgG1 (序列識別號: 24)與 PX268L-CK (序列識別號: 25)之 PX268-IgG1，含有 PX141H-IgG1 (序列識別號: 26)與 PX141L-CK(序列識別號: 27)之 PX141-IgG1，以及含有 PX141H-IgG1-v2 (序列識別號: 28)與 PX141L-CK (序列識別號: 27)之 PX141-IgG1-v2。

【0415】正常小鼠的體內試驗

在單獨給予 hsPlexin A1 或給予 hsPlexin A1 與抗-人類 plexin A1 抗體至正常小鼠後，評估可溶性人類 plexin A1 (hsPlexin A1)與抗-人類 plexin A1 抗體的體內動力特性。hsPlexin A1 溶液(100 μg/ml)或含有 hsPlexin A1 與抗-人類 plexin A1 抗體的混合溶液(PX268-IgG1 組；100 μg/ml 的

hsPlexin A1 與 1.2 mg/ml 的 PX268-IgG1，PX141-IgG1 與 PX141-IgG1-v2 組；100 μg/ml 的 hsPlexin A1 與分別 1.0 mg/ml 的 PX141-IgG1 與 PX141-IgG1-v2)，每次 10 ml/kg 給予至尾靜脈。

【0416】抗體劑量經設定使得超過 99.9%的可溶性人類 plexin A1 結合至給予溶液中的抗體。在給予 hsPlexin A1 與抗-人類 plexin A1 抗體溶液混合物後 15 分鐘、7 小時、1 天、2 天、4 天、7 天收集血液。將收集的血液立刻於 4℃下以 15,000 rpm 離心 15 分鐘以分離血漿。在分析前，將分離的血漿儲存於-20℃或更低的冰箱中。

【0417】在單獨給予 hsPlexin A1 後，以 ELISA 進行人類 PlexinA1 血漿濃度的測定

由於重組人類 PlexinA1 具有 C 端 FLAG-標籤序列，因此利用生物素化抗-FLAG M2 抗體(Sigma)以 ELISA 測定小鼠血漿中人類 PlexinA1 的濃度。將以 plexin A1 免疫兔子所獲得之兔子抗-人類 plexin A1 多株抗體分裝置於 Nunc-ImmunoPlate MaxiSorp (Nalge Nunc International)，於 4℃靜置隔夜，以製備抗-人類 PlexinA1-固定化反應盤。製備血漿濃度為 25.6、12.8、6.4、3.2、1.6 及 0.8 μg/ml 的校準曲線樣本，以及經稀釋 100 倍或更多的小鼠血漿樣本。接著，將此樣本分裝置於抗-人類 PlexinA1-固定化反應盤，且於室溫下靜置 1 小時。接著，加入生物素化抗- FLAG M2 抗體(Sigma)於室溫下反應 1 小時。接著，加入鏈黴卵白素-聚 HRP80(Stereospecific Detection Technologies)於室溫下反應 1 小時，並以 TMB One Component

HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories)作為受質進行顯色反應。在以 1N 的硫酸(Showa Chemical)停止反應後，以微孔盤分析儀偵測 450 nm 的吸光值。小鼠血漿中的濃度可利用分析軟體 SOFTmax PRO (Molecular Devices)由校準曲線的吸光值計算獲得。在靜脈給予後，以此方法測偵各時間點的血漿 hsPlexin A1 濃度，如第 35 圖所示。

【0418】利用 ELISA 進行 PX268-IgG1 組之人類 PlexinA1 血漿濃度的測定

由於重組人類 PlexinA1 具有 C 端 FLAG-標籤序列，因此利用生物素化抗-FLAG M2 抗體(Sigma)以 ELISA 測定小鼠血漿中人類 PlexinA1 的濃度。將以 plexin A1 免疫兔子所獲得之兔子抗-人類 plexin A1 多株抗體分裝置於 Nunc-ImmunoPlate MaxiSorp (Nalge Nunc International)，於 4℃靜置隔夜，以製備抗-人類 PlexinA1-固定化反應盤。製備血漿濃度為 25.6、12.8、6.4、3.2、1.6 及 0.8 μg/ml 的校準曲線樣本，以及經稀釋 50 倍或更多的小鼠血漿樣本。為了使樣本中所有的人類 PlexinA1 皆結合至 PX268-IgG1，將 150 μl 的 40 μg/ml PX268-IgG1 加至 150 μl 的校準曲線樣本與血漿樣本中，將樣本於 37℃下靜置隔夜。接著，將樣本分裝置於抗-人類 PlexinA1-固定化反應盤，於室溫(或 4 ℃)下靜置 1 小時。接著，加入生物素化抗-FLAG M2 抗體(Sigma)，於室溫(或 4 ℃)下反應 1 小時。接著，加入鏈黴卵白素-聚 HRP80(Stereospecific Detection Technologies)於室溫(或 4 ℃)下反應 1 小時，並以 TMB One Component HRP Microwell Substrate (BioFX

Laboratories)作為受質進行顯色反應。在以 1N 的硫酸(Showa Chemical)停止反應後，以微孔盤分析儀偵測 450 nm 的吸光值。小鼠血漿中的濃度可利用分析軟體 SOFTmax PRO (Molecular Devices)由校準曲線的吸光值計算獲得。在靜脈給予後，以此方法測偵各時間點的血漿 hsPlexin A1 濃度，如第 35 圖所示。

【0419】利用 ELISA 進行 PX141-IgG1 與 PX141-IgG1-v2 組之人類 PlexinA1 血漿濃度的測定

由於重組人類 PlexinA1 具有 C 端 FLAG-標籤序列，因此利用生物素化抗-FLAG M2 抗體(Sigma)以 ELISA 測定小鼠血漿中人類 PlexinA1 的濃度。將 PX268-IgG1 分裝置於 Nunc-ImmunoPlate MaxiSorp (Nalge Nunc International)，於 4℃靜置隔夜，以製備抗-人類 PlexinA1-固定化反應盤。製備血漿濃度為 25.6、12.8、6.4、3.2、1.6 及 0.8 μg/ml 的校準曲線樣本，以及經稀釋 50 倍或更多的小鼠血漿樣本。為了使樣本中所有的人類 PlexinA1 皆結合至 PX141-IgG1 或 PX141-IgG1-v2，將 150 μl 的 40 μg/ml PX141-IgG1 或 PX141-IgG1-v2 加至 150 μl 的校準曲線樣本與血漿樣本中，將樣本於 37℃下靜置隔夜。接著，將樣本分裝置於抗-人類 PlexinA1-固定化反應盤，於室溫(或 4 ℃)下靜置 1 小時。接著，加入生物素化抗-FLAG M2 抗體(Sigma)，於室溫(或 4℃)下反應 1 小時。接著，加入鏈黴卵白素-聚 HRP80(Stereospecific Detection Technologies)於室溫(或 4 ℃)下反應 1 小時，並以 TMB One Component HRP Microwell Substrate (BioFX

Laboratories)作為受質進行顯色反應。在以 1N 的硫酸(Showa Chemical)停止反應後，以微孔盤分析儀偵測 450 nm 的吸光值。小鼠血漿中的濃度可利用分析軟體 SOFTmax PRO (Molecular Devices)由校準曲線的吸光值計算獲得。以此方法測偵在靜脈給予後第 7 小時的血漿 hsPlexin A1 濃度，如第 35 圖所示。

【0420】pH-依賴性結合至可溶性人類 plexin A1 的效果

對以 pH-依賴性結合至人類 IL-6 之 PX268-IgG1 與 PX141-IgG1 進行體內試驗，並比較各試驗結果。如第 35 圖所示，同時給予 hsPlexin A1 與 pH-依賴性結合至可溶性人類 plexin A1 之 PX141-IgG1 比同時給予 hsPlexin A1 與 PX268-IgG1 更降低 hsPlexin A1 的總血漿濃度。

【0421】中性環境下(pH 7.4) FcRn 結合的效果

除了 PX141-IgG1，也利用正常小鼠對 PX141-IgG1-v2 進行體內試驗，PX141-IgG1-v2 為對 PX141-IgG1 進行上述胺基酸置換所獲得。將此試驗結果與 PX141-IgG1 之結果進行比較。

【0422】如第 35 圖所示，同時給予 hsPlexin A1 與經增強在中性環境(pH 7.4)下對小鼠 FcRn 結合之 PX141-IgG1-v2，可降低 hsPlexin A1 的總血漿濃度至無法偵測的程度(偵測極限為 0.8 μg/mL)。因此，此結果發現可藉由賦予在中性環境(pH 7.4)下的小鼠 FcRn 結合活性來降低可溶性人類 plexin A1 的濃度。特別是，此證明可藉由給予 pH-依賴性結合至人類 plexinA1 且在中性環境(pH 7.4)下具有小鼠 FcRn 結合活性之抗體，以加速可溶性人類 plexin A1 的移除。

【0423】上述發現證明藉由給予 pH-依賴性抗原結合活性且在中性環境(pH 7.4)下具有 FcRn 結合活性之抗體，不僅可顯著地降低人類可溶性 IL-6 受體抗原的血漿抗原濃度，也可降低抗原，如人類 IL-6、人類 IgA 與人類可溶性 plexin A1 的血漿抗體濃度。

【0424】比較例 1 經胺基酸置換 IgG 抗體之表現載體的構築

利用 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)或 In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech)依據所提供說明書中所述之方法進行突變，且將所獲得的質體片段插入哺乳動物細胞表達載體以產生所欲之 H 鏈表現載體與 L 鏈表現載體。可利用此技藝人士所知方法判斷所獲得表現載體之核苷酸序列。

【0425】比較例 2 IgG 抗體的表現與純化

以下述方法表現載體。利用 FreestyleHEK293 (Invitrogen)表現抗體，如製造商或 HEK293H 細胞株(Invitrogen)所提供之實驗流程書所述。將人類胚胎腎細胞癌(Invitrogen)懸浮於含有 10%胎牛血清(Invitrogen)之 DMEM (Invitrogen)中。每個培養盤(直徑 10 cm；CORNING) 接種 10 ml 的細胞，細胞密度為 5 至 6 x 10^5 cells/ml，且培養於 CO_2 培養箱(37℃，5% CO_2)中整整一天一夜。接著，將培養基吸除，並加入 6.9 ml 的 CHO-S-SFM-II 培養基(Invitrogen)。利用脂質體轉染法將所製備的質體轉染至細胞中。收集並離心(約 2,000 x g，5 分鐘，室溫)最後的培養上清液以移除細胞，且藉由通過 0.22 微莫耳的濾膜 MILLEX (註冊商標)-GV (Millipore)進行消毒，以獲得上清液。利用

rProtein A Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences)以習知方法由培養上清液中純化出抗體。為偵測純化抗體的濃度，以分光光度計偵測 280 nm 的吸光值。利用以 Protein Science (1995) 4: 2411-2423 所述方法計算出的吸光係數，由所偵測到的數值計算出抗體濃度。

【0426】比較例 3 可溶性人類 IL-6 受體(hsIL-6R)的製備

作為抗原之重組人類 IL-6 受體的製備如下所述。利用習知方法建立暫時性表現具有 N 端第 1 至 357 位置胺基酸序列之可溶性人類 IL-6 受體(以下簡稱 hsIL-6R)的細胞株，如 J. Immunol. 152: 4958-4968 (1994)所述。培養此細胞以表現 hsIL-6R。利用此 2 步驟由培養上清液中純化 hsIL-6R：Blue Sepharose 6 FF 管柱層析及凝膠過濾層析。以最後步驟中主峰之沖提部分作為最後的純化產物。

【0427】比較例 4 人類 FcRn 的製備

FcRn 為 FcRn 與 β2-微球蛋白的複合物。依據公開的人類 FcRn 基因序列製備寡-DNA 引子(J Exp Med. 1994 Dec 1; 180(6): 2377-81)。使用作為模板的人類 cDNA(Human Placenta Marathon-Ready cDNA，Clontech)以及引子以 PCR 製備編碼整個基因的 DNA 片段。將所獲得的 DNA 片段為模板，以 PCR 複製編碼含有信息區域(Met1-Leu290)之胞膜外區(extracellular domain)DNA 片段，並插入哺乳動物細胞表達載體中。同樣地，以公開的人類 β2-微球蛋白基因序列製備寡-DNA 引子(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (26): 16899-16903 (2002))。使用作為模板的人類 cDNA(Human Placenta Marathon-Ready cDNA，

Clontech)以及引子以 PCR 製備編碼整個基因的 DNA 片段。將所獲得的 DNA 片段為模板，以 PCR 複製編碼含有信息區域(Met1-Met119)之整個蛋白，並插入哺乳動物細胞表達載體中。

【0428】以下列步驟表現可溶性人類 FcRn。將表現人類 FcRn (序列識別號：30)與 β2-微球蛋白(序列識別號：31)的質體使用 PEI (Polyscience)以脂質體轉染法導入人類胚胎腎癌細胞株 HEK293H (Invitrogen)中。收集最後的培養上清液，並以 IgG Sepharose 6 Fast Flow (Amersham Biosciences)純化 FcRn，接著以 HiTrap Q HP (GE Healthcare)進行更進一步的純化。(J Immunol. 2002 Nov 1; 169(9): 5171-80).

【0429】比較例 5 人類 IgA(hIgA)的製備

以習知方法使用 rProtein L-agarose (ACTIgen)與凝膠過濾層析(gel filtration chromatography)表現及純化含有 H (WT)-IgA1 (序列識別號：29)與 L (WT) (序列識別號：5)的 hIgA。

【0430】比較例 6 可溶性人類 plexin A1 (hsPlexin A1)的製備

作為抗原之重組可溶性人類 plexin A1(以下簡稱 hsPlexin A1)以下述方法製備。參照 NCBI 參考序列(NP_115618)構築 hsPlexin A1。特別是，hsPlexin A1 包含上述 NCBI 序列之第 27 至 1243 位置的胺基酸序列，且 FLAG-標誌(DYKDDDDK)與其 C 端相連接。利用 FreeStyle293 (Invitrogen)暫時性表現 hsPlexin A1，並利用此 2 步驟由培養上清液中純化 hsPlexin A1：抗- FLAG 管柱層析及凝膠過濾層析。以最後步驟中主峰

之沖提部分作為最後的純化產物。

【符號說明】

無。

序列表

<110> 中外製藥股份有限公司 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)

<120> 促進抗原消失之抗原-結合分子

<130> 2025-11635-P

<140> 100110549
<141> 2011-03-28

<150> JP 2010-079667
<151> 2010-03-30

<150> JP 2010-250830
<151> 2010-11-09

<160> 31

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 1

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

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

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

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

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

225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

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

405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 2
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 2

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

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Tyr Tyr Gly Ser Glu Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Ser Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 3
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

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

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

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Trp Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

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

```
        355                 360                 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

Ala Leu His Trp His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445
```

<210> 4
<211> 449
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

```
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
1               5                   10                  15

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

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

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
    50                  55                  60
```

```
Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65                  70                  75                  80

Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

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

Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        115                 120                 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240
```

```
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415
```

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 5
<211> 214
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

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

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

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

```
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 6
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 6

```
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
```

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
20 25 30

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

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

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

355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 7
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 7

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

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Thr Asp Ile Ser Ser His
20 25 30

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

```
Tyr Tyr Gly Ser His Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 8
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 8

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
20 25 30

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

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr
245 250 255

Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 9
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 9

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
            20                  25                  30

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

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        115                 120                 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175
```

```
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350
```

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Trp His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 10
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 10

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
20 25 30

His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Phe Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

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

385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Tyr His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 11
<211> 324
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 11

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

```
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
            100                 105                 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
        115                 120                 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
    130                 135                 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145                 150                 155                 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
                165                 170                 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
            180                 185                 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
        195                 200                 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
    210                 215                 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225                 230                 235                 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
                245                 250                 255
```

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro

<210> 12
<211> 324
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 12

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

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

225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro

<210> 13
<211> 326
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 13

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

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

```
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
            100                 105                 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
        115                 120                 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
    130                 135                 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145                 150                 155                 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
                165                 170                 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
            180                 185                 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
        195                 200                 205
```

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 14
<211> 324
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 14

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp

180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro

<210> 15
<211> 443
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 15

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
20 25 30

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

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

```
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu
    210                 215                 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
225                 230                 235                 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
                245                 250                 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
            260                 265                 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
        275                 280                 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
    290                 295                 300

Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305                 310                 315                 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
                325                 330                 335
```

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440

<210> 16
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 16

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe

20 25 30

Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gly Leu Trp Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

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

370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 17
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 17

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

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

```
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65                  70                  75                  80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr
                85                  90                  95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
            100                 105                 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
        115                 120                 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
    130                 135                 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145                 150                 155                 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
                165                 170                 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
            180                 185                 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
        195                 200                 205

Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 18
<211> 447
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 18

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

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

Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Glu Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr His Pro His Thr Val
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Gly Leu Trp Gly His Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        115                 120                 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
```

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

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

325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 19
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 19

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Gly His Pro Tyr Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 20
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 20

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

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

Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Glu Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr His Pro His Thr Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Leu Trp Gly His Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

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

275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Trp His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 21

<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 21

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

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

Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Glu Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr His Pro His Thr Val
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Gly Leu Trp Gly His Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        115                 120                 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140
```

```
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Trp Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320
```

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Trp His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 22
<211> 436
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 22

Gln Glu Gly Asp Phe Pro Met Pro Phe Ile Ser Ala Lys Ser Ser Pro

1 5 10 15

Val Ile Pro Leu Asp Gly Ser Val Lys Ile Gln Cys Gln Ala Ile Arg
20 25 30

Glu Ala Tyr Leu Thr Gln Leu Met Ile Ile Lys Asn Ser Thr Tyr Arg
35 40 45

Glu Ile Gly Arg Arg Leu Lys Phe Trp Asn Glu Thr Asp Pro Glu Phe
50 55 60

Val Ile Asp His Met Asp Ala Asn Lys Ala Gly Arg Tyr Gln Cys Gln
65 70 75 80

Tyr Arg Ile Gly His Tyr Arg Phe Arg Tyr Ser Asp Thr Leu Glu Leu
85 90 95

Val Val Thr Gly Leu Tyr Gly Lys Pro Phe Leu Ser Ala Asp Arg Gly
100 105 110

Leu Val Leu Met Pro Gly Glu Asn Ile Ser Leu Thr Cys Ser Ser Ala
115 120 125

His Ile Pro Phe Asp Arg Phe Ser Leu Ala Lys Glu Gly Glu Leu Ser
130 135 140

Leu Pro Gln His Gln Ser Gly Glu His Pro Ala Asn Phe Ser Leu Gly
145 150 155 160

Pro Val Asp Leu Asn Val Ser Gly Ile Tyr Arg Cys Tyr Gly Trp Tyr
165 170 175

Asn Arg Ser Pro Tyr Leu Trp Ser Phe Pro Ser Asn Ala Leu Glu Leu

180 185 190

Val Val Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
195 200 205

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro
210 215 220

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
225 230 235 240

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
245 250 255

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
260 265 270

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
275 280 285

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
290 295 300

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
305 310 315 320

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
325 330 335

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
340 345 350

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

355 360 365

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
370 375 380

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
385 390 395 400

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
405 410 415

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
420 425 430

Leu Ser Leu Ser
435

<210> 23
<211> 436
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 23

Gln Glu Gly Asp Phe Pro Met Pro Phe Ile Ser Ala Lys Ser Ser Pro
1 5 10 15

Val Ile Pro Leu Asp Gly Ser Val Lys Ile Gln Cys Gln Ala Ile Arg
20 25 30

Glu Ala Tyr Leu Thr Gln Leu Met Ile Ile Lys Asn Ser Thr Tyr Arg
35 40 45

```
Glu Ile Gly Arg Arg Leu Lys Phe Trp Asn Glu Thr Asp Pro Glu Phe
    50                  55                  60

Val Ile Asp His Met Asp Ala Asn Lys Ala Gly Arg Tyr Gln Cys Gln
65                  70                  75                  80

Tyr Arg Ile Gly His Tyr Arg Phe Arg Tyr Ser Asp Thr Leu Glu Leu
                85                  90                  95

Val Val Thr Gly Leu Tyr Gly Lys Pro Phe Leu Ser Ala Asp Arg Gly
            100                 105                 110

Leu Val Leu Met Pro Gly Glu Asn Ile Ser Leu Thr Cys Ser Ser Ala
        115                 120                 125

His Ile Pro Phe Asp Arg Phe Ser Leu Ala Lys Glu Gly Glu Leu Ser
    130                 135                 140

Leu Pro Gln His Gln Ser Gly Glu His Pro Ala Asn Phe Ser Leu Gly
145                 150                 155                 160

Pro Val Asp Leu Asn Val Ser Gly Ile Tyr Arg Cys Tyr Gly Trp Tyr
                165                 170                 175

Asn Arg Ser Pro Tyr Leu Trp Ser Phe Pro Ser Asn Ala Leu Glu Leu
            180                 185                 190

Val Val Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
        195                 200                 205

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro
    210                 215                 220
```

```
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
225                 230                 235                 240

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
                245                 250                 255

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
            260                 265                 270

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
        275                 280                 285

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
    290                 295                 300

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
305                 310                 315                 320

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
                325                 330                 335

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
            340                 345                 350

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
        355                 360                 365

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
    370                 375                 380

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
385                 390                 395                 400
```

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
405 410 415

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Trp His Tyr Thr Gln Lys Ser
420 425 430

Leu Ser Leu Ser
435

<210> 24
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 24

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

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Ala Cys Ile Tyr Ile Gly Ser Asp Ser Ala Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Thr Leu
65 70 75 80

Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala

85 90 95

Arg Trp Asp Asn Ser Gly Arg Ala Leu Lys Leu Trp Gly Pro Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

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

260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

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

435 440 445

<210> 25
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 25

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

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

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

Ile Tyr Phe Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys
50 55 60

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

Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Asn Tyr Asp Cys Gly
85 90 95

Ser Ala Asp Cys His Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 26
<211> 454
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 26

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

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

Tyr Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Ile Gly Cys Ile Val Thr Gly Ser Tyr Gly Arg Ser Trp Tyr Ala Ser
50 55 60

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

Val Thr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr
85 90 95

Phe Cys Ala Arg Asp Pro Phe Val Ile Ala Ser Ser His Tyr Gln Asn
100 105 110

Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
130 135 140

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
195 200 205

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro

210 215 220

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225 230 235 240

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
245 250 255

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
275 280 285

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
290 295 300

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305 310 315 320

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
325 330 335

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
340 345 350

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
355 360 365

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370 375 380

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

385 390 395 400

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
405 410 415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 27
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 27

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

Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Pro Asn Ile Tyr Asn Asn
20 25 30

Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

```
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val Gln
65                  70                  75                  80

Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Tyr Lys Ser Tyr Asp
                85                  90                  95

Asn Asp Asp Asn Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys Arg
            100                 105                 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
        115                 120                 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
    130                 135                 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145                 150                 155                 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
                165                 170                 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
            180                 185                 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
        195                 200                 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 28
<211> 454
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 28

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

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

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

Ile Gly Cys Ile Val Thr Gly Ser Tyr Gly Arg Ser Trp Tyr Ala Ser
50 55 60

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

Val Thr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr
85 90 95

Phe Cys Ala Arg Asp Pro Phe Val Ile Ala Ser Ser His Tyr Gln Asn
100 105 110

Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
130 135 140

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

145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
195 200 205

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
210 215 220

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225 230 235 240

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
245 250 255

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
275 280 285

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
290 295 300

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305 310 315 320

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

325 330 335

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
340 345 350

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
355 360 365

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370 375 380

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385 390 395 400

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
405 410 415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Trp His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 29
<211> 472
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成胜肽序列

<400> 29

```
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
1               5                  10                  15

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

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

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
    50                  55                  60

Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65                  70                  75                  80

Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

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

Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Pro Thr Ser Pro Lys Val Phe
        115                 120                 125

Pro Leu Ser Leu Cys Ser Thr Gln Pro Asp Gly Asn Val Val Ile Ala
    130                 135                 140

Cys Leu Val Gln Gly Phe Phe Pro Gln Glu Pro Leu Ser Val Thr Trp
145                 150                 155                 160

Ser Glu Ser Gly Gln Gly Val Thr Ala Arg Asn Phe Pro Pro Ser Gln
                165                 170                 175
```

```
Asp Ala Ser Gly Asp Leu Tyr Thr Thr Ser Ser Gln Leu Thr Leu Pro
            180                 185                 190

Ala Thr Gln Cys Leu Ala Gly Lys Ser Val Thr Cys His Val Lys His
        195                 200                 205

Tyr Thr Asn Pro Ser Gln Asp Val Thr Val Pro Cys Pro Val Pro Ser
    210                 215                 220

Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser
225                 230                 235                 240

Cys Cys His Pro Arg Leu Ser Leu His Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu
                245                 250                 255

Leu Leu Gly Ser Glu Ala Asn Leu Thr Cys Thr Leu Thr Gly Leu Arg
            260                 265                 270

Asp Ala Ser Gly Val Thr Phe Thr Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Ser
        275                 280                 285

Ala Val Gln Gly Pro Pro Glu Arg Asp Leu Cys Gly Cys Tyr Ser Val
    290                 295                 300

Ser Ser Val Leu Pro Gly Cys Ala Glu Pro Trp Asn His Gly Lys Thr
305                 310                 315                 320

Phe Thr Cys Thr Ala Ala Tyr Pro Glu Ser Lys Thr Pro Leu Thr Ala
                325                 330                 335

Thr Leu Ser Lys Ser Gly Asn Thr Phe Arg Pro Glu Val His Leu Leu
            340                 345                 350
```

```
Pro Pro Pro Ser Glu Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Leu Ala Arg Gly Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu
    370                 375                 380

Gln Gly Ser Gln Glu Leu Pro Arg Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala Ser
385                 390                 395                 400

Arg Gln Glu Pro Ser Gln Gly Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile
                405                 410                 415

Leu Arg Val Ala Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys
            420                 425                 430

Met Val Gly His Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile
        435                 440                 445

Asp Arg Leu Ala Gly Lys Pro Thr His Val Asn Val Ser Val Val Met
    450                 455                 460

Ala Glu Val Asp Gly Thr Cys Tyr
465                 470
```

<210> 30
<211> 365
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30

```
Met Gly Val Pro Arg Pro Gln Pro Trp Ala Leu Gly Leu Leu Leu Phe
1               5                   10                  15
```

```
Leu Leu Pro Gly Ser Leu Gly Ala Glu Ser His Leu Ser Leu Leu Tyr
            20                  25                  30

His Leu Thr Ala Val Ser Ser Pro Ala Pro Gly Thr Pro Ala Phe Trp
        35                  40                  45

Val Ser Gly Trp Leu Gly Pro Gln Gln Tyr Leu Ser Tyr Asn Ser Leu
    50                  55                  60

Arg Gly Glu Ala Glu Pro Cys Gly Ala Trp Val Trp Glu Asn Gln Val
65                  70                  75                  80

Ser Trp Tyr Trp Glu Lys Glu Thr Thr Asp Leu Arg Ile Lys Glu Lys
                85                  90                  95

Leu Phe Leu Glu Ala Phe Lys Ala Leu Gly Gly Lys Gly Pro Tyr Thr
            100                 105                 110

Leu Gln Gly Leu Leu Gly Cys Glu Leu Gly Pro Asp Asn Thr Ser Val
        115                 120                 125

Pro Thr Ala Lys Phe Ala Leu Asn Gly Glu Glu Phe Met Asn Phe Asp
    130                 135                 140

Leu Lys Gln Gly Thr Trp Gly Gly Asp Trp Pro Glu Ala Leu Ala Ile
145                 150                 155                 160

Ser Gln Arg Trp Gln Gln Gln Asp Lys Ala Ala Asn Lys Glu Leu Thr
                165                 170                 175

Phe Leu Leu Phe Ser Cys Pro His Arg Leu Arg Glu His Leu Glu Arg
            180                 185                 190
```

```
Gly Arg Gly Asn Leu Glu Trp Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu Lys
        195                 200                 205

Ala Arg Pro Ser Ser Pro Gly Phe Ser Val Leu Thr Cys Ser Ala Phe
    210                 215                 220

Ser Phe Tyr Pro Pro Glu Leu Gln Leu Arg Phe Leu Arg Asn Gly Leu
225                 230                 235                 240

Ala Ala Gly Thr Gly Gln Gly Asp Phe Gly Pro Asn Ser Asp Gly Ser
                245                 250                 255

Phe His Ala Ser Ser Ser Leu Thr Val Lys Ser Gly Asp Glu His His
            260                 265                 270

Tyr Cys Cys Ile Val Gln His Ala Gly Leu Ala Gln Pro Leu Arg Val
        275                 280                 285

Glu Leu Glu Ser Pro Ala Lys Ser Ser Val Leu Val Val Gly Ile Val
    290                 295                 300

Ile Gly Val Leu Leu Leu Thr Ala Ala Ala Val Gly Gly Ala Leu Leu
305                 310                 315                 320

Trp Arg Arg Met Arg Ser Gly Leu Pro Ala Pro Trp Ile Ser Leu Arg
                325                 330                 335

Gly Asp Asp Thr Gly Val Leu Leu Pro Thr Pro Gly Glu Ala Gln Asp
            340                 345                 350

Ala Asp Leu Lys Asp Val Asn Val Ile Pro Ala Thr Ala
        355                 360                 365
```

<210> 31
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31

Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser
1 5 10 15

Gly Leu Glu Ala Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg
20 25 30

His Pro Ala Glu Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser
35 40 45

Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu
50 55 60

Arg Ile Glu Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp
65 70 75 80

Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp
85 90 95

Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile
100 105 110

Val Lys Trp Asp Arg Asp Met
115

申請專利範圍

1. 一種抗原-結合分子，包括一抗原-結合區與一人類 FcRn-結合區，其在中性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性，其中該人類 FcRn-結合活性在中性 pH 範圍下大於 KD 3.2 微莫耳，其中該抗原-結合區的抗原-結合活性在酸性 pH 範圍下小於在中性 pH 範圍下的抗原-結合活性，其中該抗原-結合區包括一組胺酸殘基位於擇自由下列所組成之群組的一個或一個以上的位置：

   利用 Kabat 編號之

   重鏈：H27、H31、H32、H33、H35、H50、H58、H59、H61、H62、H63、H64、H65、H99、H100b 及 H102，

   輕鏈：L24、L27、L28、L32、L53、L54、L56、L90、L92 及 L94。

2. 一種抗原-結合分子，包括一抗原-結合區與一人類 FcRn-結合區，其在中性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性，其中該人類 FcRn-結合活性在中性 pH 範圍下是完整人類 IgG 的 28 倍，其中該抗原-結合區的抗原-結合活性在酸性 pH 範圍下小於在中性 pH 範圍下的抗原-結合活性，其中該抗原-結合區包括一組胺酸殘基位於擇自由下列所組成之群組的一個或一個以上的位置：

   利用 Kabat 編號之

   重鏈：H27、H31、H32、H33、H35、H50、H58、H59、H61、H62、H63、H64、H65、H99、H100b 及 H102，

   輕鏈：L24、L27、L28、L32、L53、L54、L56、L90、L92

及 L94。

3. 一種抗原-結合分子，包括一抗原-結合區與一人類 FcRn-結合區，其在中性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性，其中該人類 FcRn-結合活性在中性 pH 範圍下大於 KD 2.3 微莫耳，其中該抗原-結合區的抗原-結合活性在酸性 pH 範圍下小於在中性 pH 範圍下的抗原-結合活性，其中該抗原-結合區包括一組胺酸殘基位於擇自由下列所組成之群組的一個或一個以上的位置：

利用 Kabat 編號之

重鏈：H27、H31、H32、H33、H35、H50、H58、H59、H61、H62、H63、H64、H65、H99、H100b 及 H102，

輕鏈：L24、L27、L28、L32、L53、L54、L56、L90、L92 及 L94。

4. 一種抗原-結合分子，包括一抗原-結合區與一人類 FcRn-結合區，其在中性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性，其中該人類 FcRn-結合活性在中性 pH 範圍下是完整人類 IgG 的 38 倍，其中該抗原-結合區的抗原-結合活性在酸性 pH 範圍下小於在中性 pH 範圍下的抗原-結合活性，其中該抗原-結合區包括一組胺酸殘基位於擇自由下列所組成之群組的一個或一個以上的位置：

利用 Kabat 編號之

重鏈：H27、H31、H32、H33、H35、H50、H58、H59、H61、H62、H63、H64、H65、H99、H100b 及 H102，

輕鏈：L24、L27、L28、L32、L53、L54、L56、L90、L92

及 L94。

5. 如申請專利範圍第 1 至 4 項任一項所述之抗原-結合分子，其中該中性 pH 範圍為 pH 7.0 至 8.0。

6. 一種抗原-結合分子，包括一抗原-結合區與一人類 FcRn-結合區，該抗原-結合分子在酸性及中性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性，且在酸性 pH 範圍下的抗原結合活性低於在中性 pH 範圍下，其中該人類 FcRn-結合活性在中性 pH 範圍下大於完整人類 IgG 的人類 FcRn-結合活性，其中該抗原-結合區包括一組胺酸殘基位於擇自由下列所組成之群組的一個或一個以上的位置：

利用 Kabat 編號之

重鏈：H27、H31、H32、H33、H35、H50、H58、H59、H61、H62、H63、H64、H65、H99、H100b 及 H102，

輕鏈：L24、L27、L28、L32、L53、L54、L56、L90、L92 及 L94。

7. 如申請專利範圍第 6 項所述之抗原-結合分子，其中該中性 pH 範圍為 pH 7.0 至 8.0。

8. 如申請專利範圍第 1 至 4 及 6 項任一項所述之抗原-結合分子，其中該抗原-結合活性在酸性 pH 範圍及中性 pH 範圍下的 KD(酸性 pH 範圍下)/KD(中性 pH 範圍下)的比值至少為 2。

9. 如申請專利範圍第 1 至 4 及 6 項任一項所述之抗原-結合分子，其中位於該一個或一個以上的位置之該組胺酸殘基經由置換或插入已被導入。

10.如申請專利範圍第 1 至 4 及 6 項任一項所述之抗原-結合分子，其中該抗原-結合區獲得自抗原-結合區資料庫。

11.如申請專利範圍第 1 至 4 及 6 項任一項所述之抗原-結合分子，其包括在親代 IgG Fc 區的至少一個胺基酸以不同胺基酸置換所得的 Fc 區作為該人類 FcRn-結合區。

12.如申請專利範圍第 11 項所述之抗原-結合分子，其中該人類 FcRn-結合區為包含選自於親代 IgG 之 Fc 區中(EU 編號)第 237、238、239、248、250、252、254、255、256、257、258、265、270、286、289、297、298、303、305, 307、308、309、311、312、314、315、317、325、332、334、360、376、380、382、384、385、386、387、389、424、428、433、434 及 436 位置之至少一個胺基酸以不同的胺基酸置換之人類 FcRn-結合區。

13.如申請專利範圍第 11 項所述之抗原-結合分子，包括在親代 IgG 之 Fc 區包含胺基酸置換之人類 FcRn-結合區，該親代 IgG 之 Fc 區包含擇自下列之至少一個胺基酸置換：

第 237 位置的胺基酸由 Gly 置換為 Met；

第 238 位置的胺基酸由 Pro 置換為 Ala；

第 239 位置的胺基酸由 Ser 置換為 Lys；

第 248 位置的胺基酸由 Lys 置換為 Ile；

第 250 位置的胺基酸由 Thr 置換為 Ala、Phe、Ile、Met、Gln、Ser、Val、Trp、或 Tyr；

第 252 位置的胺基酸由 Met 置換為 Phe、Trp、或 Tyr；

第 254 位置的胺基酸由 Ser 置換為 Thr；

第 255 位置的胺基酸由 Arg 置換為 Glu；

第 256 位置的胺基酸由 Thr 置換為 Asp、Glu、或 Gln；

第 257 位置的胺基酸由 Pro 置換為 Ala、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr 或 Val；

第 258 位置的胺基酸由 Glu 置換為 His；

第 265 位置的胺基酸由 Asp 置換為 Ala；

第 270 位置的胺基酸由 Asp 置換為 Phe；

第 286 位置的胺基酸由 Asn 置換為 Ala 或 Glu；

第 289 位置的胺基酸由 Thr 置換為 His；

第 297 位置的胺基酸由 Asn 置換為 Ala；

第 298 位置的胺基酸由 Ser 置換為 Gly；

第 303 位置的胺基酸由 Val 置換為 Ala；

第 305 位置的胺基酸由 Val 置換為 Ala；

第 307 位置的胺基酸由 Thr 置換為 Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、Trp、或 Tyr；

第 308 位置的胺基酸由 Val 置換為 Ala、Phe、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、或 Thr；

第 309 位置的胺基酸由 Leu 或 Val 置換為 Ala、Asp、Glu、Pro、或 Arg；

第 311 位置的胺基酸由 Gln 置換為 Ala、His 或 Ile；

第 312 位置的胺基酸由 Asp 置換為 Ala 或 His；

第 314 位置的胺基酸由 Leu 置換為 Lys 或 Arg；

第 315 位置的胺基酸由 Asn 置換為 Ala 或 His；

第 317 位置的胺基酸由 Lys 置換為 Ala；

第 325 位置的胺基酸由 Asn 置換為 Gly；

第 332 位置的胺基酸由 Ile 置換為 Val；

第 334 位置的胺基酸由 Lys 置換為 Leu；

第 360 位置的胺基酸由 Lys 置換為 His；

第 376 位置的胺基酸由 Asp 置換為 Ala；

第 380 位置的胺基酸由 Glu 置換為 Ala；

第 382 位置的胺基酸由 Glu 置換為 Ala；

第 384 位置的胺基酸由 Asn 或 Ser 置換為 Ala；

第 385 位置的胺基酸由 Gly 置換為 Asp 或 His；

第 386 位置的胺基酸由 Gln 置換為 Pro；

第 387 位置的胺基酸由 Pro 置換為 Glu；

第 389 位置的胺基酸由 Asn 置換為 Ala 或 Ser；

第 424 位置的胺基酸由 Ser 置換為 Ala；

第 428 位置的胺基酸由 Met 置換為 Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、Trp、或 Tyr；

第 433 位置的胺基酸由 His 置換為 Lys；

第 434 位置的胺基酸由 Asn 置換為 Ala、Phe、His、Ser、Trp、或 Tyr；

以及第 436 位置的胺基酸由 Tyr 置換為 His 或 Phe(EU 編號)。

14. 如申請專利範圍第 11 項所述之抗原-結合分子，該人類 FcRn-結合區包括選自下列至少一個胺基酸：

於親代 IgG Fc 區(EU 編號)

第 237 位置的胺基酸為 Met；

第 238 位置的胺基酸為 Ala；

第 239 位置的胺基酸為 Lys；

第 248 位置的胺基酸為 Ile；

第 250 位置的胺基酸為 Ala、Phe、Ile、Met、Gln、Ser、Val、Trp、或 Tyr；

第 252 位置的胺基酸為 Phe、Trp、或 Tyr；

第 254 位置的胺基酸為 Thr；

第 255 位置的胺基酸為 Glu；

第 256 位置的胺基酸為 Asp、Glu、或 Gln；

第 257 位置的胺基酸為 Ala、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr、或 Val；

第 258 位置的胺基酸為 His；

第 265 位置的胺基酸為 Ala；

第 270 位置的胺基酸為 Phe；

第 286 位置的胺基酸為 Ala 或 Glu；

第 289 位置的胺基酸為 His；

第 297 位置的胺基酸為 Ala；

第 298 位置的胺基酸為 Gly；

第 303 位置的胺基酸為 Ala；

第 305 位置的胺基酸為 Ala；

第 307 位置的胺基酸為 Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、Trp、或 Tyr；

第 308 位置的胺基酸為 Ala、Phe、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、或 Thr；

第 309 位置的胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Pro、或 Arg；

第 311 位置的胺基酸為 Ala、His、或 Ile；

第 312 位置的胺基酸為 Ala 或 His；

第 314 位置的胺基酸為 Lys 或 Arg；

第 315 位置的胺基酸為 Ala 或 His；

第 317 位置的胺基酸為 Ala；

第 325 位置的胺基酸為 Gly；

第 332 位置的胺基酸為 Val；

第 334 位置的胺基酸為 Leu；

第 360 位置的胺基酸為 His；

第 376 位置的胺基酸為 Ala；

第 380 位置的胺基酸為 Ala；

第 382 位置的胺基酸為 Ala；

第 384 位置的胺基酸為 Ala；

第 385 位置的胺基酸為 Asp 或 His；

第 386 位置的胺基酸為 Pro；

第 387 位置的胺基酸為 Glu；

第 389 位置的胺基酸為 Ala 或 Ser；

第 424 位置的胺基酸為 Ala；

第 428 位置的胺基酸為 Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、Trp、或 Tyr；

第 433 位置的胺基酸為 Lys；

第 434 位置的胺基酸為 Ala、Phe、His、Ser、Trp、或 Tyr；以及第 436 位置的胺基酸為 His 或 Phe。

15.如申請專利範圍第 11 項所述之抗原-結合分子，其中該親代 IgG 擇自於一非人類動物之 IgG。

16.如申請專利範圍第 11 項所述之抗原-結合分子，其中該親代 IgG 為一人類 IgG。

17.如申請專利範圍第 1 至 4 及 6 項任一項所述之抗原-結合分子，其具有拮抗活性。

18.如申請專利範圍第 1 至 4 及 6 項任一項所述之抗原-結合分子，其結合至一膜抗原或可溶性抗原。

19.如申請專利範圍第 1 至 4 及 6 項任一項所述之抗原-結合分子，其中該抗原-結合區包括一結合至受體的人造配體。

20.如申請專利範圍第 1 至 4 及 6 項任一項所述之抗原-結合分子，其中該抗原-結合區包括一結合至配體的人造受體。

21.如申請專利範圍第 1 至 4 及 6 項任一項所述之抗原-結合分子，其為一抗體。

22.如申請專利範圍第 21 項所述之抗原-結合分子，其中該抗體擇自於嵌合抗體、人源化抗體、或人類抗體。

23.一種醫藥組成物，包括申請專利範圍第 1 項至第 22 項任一項所述之抗原-結合分子。

24.一種促使以抗原-結合分子媒介的抗原攝入至細胞的方法，係藉由增加在中性 pH 範圍下該抗原-結合分子之人類 FcRn-結合活性，其中該抗原-結合分子包括一抗原-結合區與一人類 FcRn-結合區，且在酸性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合

活性，其中該抗原-結合區包括一組胺酸殘基位於擇自由下列所組成之群組的一個或一個以上的位置：

利用 Kabat 編號之

重鏈：H27、H31、H32、H33、H35、H50、H58、H59、H61、H62、H63、H64、H65、H99、H100b 及 H102，

輕鏈：L24、L27、L28、L32、L53、L54、L56、L90、L92 及 L94。

25.一種促使抗原-結合分子媒介的抗原攝入至細胞的方法，係藉由增加在中性 pH 範圍下該抗原-結合分子之人類 FcRn-結合活性，及降低該抗原-結合分子在酸性 pH 範圍下之抗原-結合活性至小於在中性 pH 範圍下之抗原-結合活性，其中該抗原-結合分子包括一抗原-結合區與一人類 FcRn-結合區，且在酸性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性，其中該抗原-結合區包括一組胺酸殘基位於擇自由下列所組成之群組的一個或一個以上的位置：

利用 Kabat 編號之

重鏈：H27、H31、H32、H33、H35、H50、H58、H59、H61、H62、H63、H64、H65、H99、H100b 及 H102，

輕鏈：L24、L27、L28、L32、L53、L54、L56、L90、L92 及 L94。

26.一種增加單一抗原-結合分子結合的抗原量之方法，係藉由增加在中性pH範圍下該抗原-結合分子之人類FcRn-結合活性，其中該抗原-結合分子包括一抗原-結合區與一人類 FcRn-結合區，且在酸性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活

性，其中該抗原-結合區包括一組胺酸殘基位於擇自由下列所組成之群組的一個或一個以上的位置：

利用 Kabat 編號之

重鏈：H27、H31、H32、H33、H35、H50、H58、H59、H61、H62、H63、H64、H65、H99、H100b 及 H102，

輕鏈：L24、L27、L28、L32、L53、L54、L56、L90、L92 及 L94。

27.一種增加單一抗原-結合分子結合的抗原量之方法，係藉由增加在中性 pH 範圍下該抗原-結合分子之人類 FcRn-結合活性，且降低在酸性 pH 範圍下之該抗原-結合活性至小於在中性 pH 範圍下之抗原-結合活性，其中該抗原-結合分子包括一抗原-結合區與一人類 FcRn-結合區，且在酸性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性，其中該抗原-結合區包括一組胺酸殘基位於擇自由下列所組成之群組的一個或一個以上的位置：

利用 Kabat 編號之

重鏈：H27、H31、H32、H33、H35、H50、H58、H59、H61、H62、H63、H64、H65、H99、H100b 及 H102，

輕鏈：L24、L27、L28、L32、L53、L54、L56、L90、L92 及 L94。

28.一種增進抗原-結合分子移除血漿中抗原能力的方法，係藉由增加在中性 pH 範圍下該抗原-結合分子之人類 FcRn-結合活性，其中該抗原-結合分子包括一抗原-結合區與一人類 FcRn-結合區，且在酸性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活

性，其中該抗原-結合區包括一組胺酸殘基位於擇自由下列所組成之群組的一個或一個以上的位置：

利用 Kabat 編號之

重鏈：H27、H31、H32、H33、H35、H50、H58、H59、H61、H62、H63、H64、H65、H99、H100b 及 H102，

輕鏈：L24、L27、L28、L32、L53、L54、L56、L90、L92 及 L94。

29.一種增進抗原-結合分子移除血漿中抗原能力的方法，係藉由增加在中性 pH 範圍下該抗原-結合分子之人類 FcRn-結合活性，且降低在酸性 pH 範圍下該抗原-結合活性至小於在中性 pH 範圍下之抗原-結合活性，其中該抗原-結合分子包括一抗原-結合區與一人類 FcRn-結合區，且在酸性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性，其中該抗原-結合區包括一組胺酸殘基位於擇自由下列所組成之群組的一個或一個以上的位置：

利用 Kabat 編號之

重鏈：H27、H31、H32、H33、H35、H50、H58、H59、H61、H62、H63、H64、H65、H99、H100b 及 H102，

輕鏈：L24、L27、L28、L32、L53、L54、L56、L90、L92 及 L94。

30.一種改善抗原-結合分子之藥物動力特性的方法，係藉由增加在中性 pH 範圍下該抗原-結合分子之人類-結合活性，其中該抗原-結合分子包括一抗原-結合區與一人類 FcRn-結合區，且在酸性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性，其中該

抗原-結合區包括一組胺酸殘基位於擇自由下列所組成之群組的一個或一個以上的位置：

利用 Kabat 編號之

重鏈：H27、H31、H32、H33、H35、H50、H58、H59、H61、H62、H63、H64、H65、H99、H100b 及 H102，

輕鏈：L24、L27、L28、L32、L53、L54、L56、L90、L92 及 L94。

31.一種改善抗原-結合分子之藥物動力特性的方法，係藉由增加在中性 pH 範圍下該抗原-結合分子之人類 FcRn-結合活性，且降低在酸性 pH 範圍下之該抗原-結合活性至小於在中性 pH 範圍下之抗原-結合活性，其中該抗原-結合分子包括一抗原-結合區與一人類 FcRn-結合區，且在酸性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性，其中該抗原-結合區包括一組胺酸殘基位於擇自由下列所組成之群組的一個或一個以上的位置：

利用 Kabat 編號之

重鏈：H27、H31、H32、H33、H35、H50、H58、H59、H61、H62、H63、H64、H65、H99、H100b 及 H102，

輕鏈：L24、L27、L28、L32、L53、L54、L56、L90、L92 及 L94。

32.一種促使結合於細胞外抗原-結合分子之抗原的細胞內游離的方法，係藉由增加在中性 pH 範圍下該抗原-結合分子之人類 FcRn-結合活性，及降低在酸性 pH 範圍下該抗原-結合活性至小於在中性 pH 範圍下之抗原-結合活性，其中該抗

原-結合分子包括一抗原-結合區與一人類 FcRn-結合區，且在酸性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性，其中該抗原-結合區包括一組胺酸殘基位於擇自由下列所組成之群組的一個或一個以上的位置：

利用 Kabat 編號之

重鏈：H27、H31、H32、H33、H35、H50、H58、H59、H61、H62、H63、H64、H65、H99、H100b 及 H102，

輕鏈：L24、L27、L28、L32、L53、L54、L56、L90、L92 及 L94。

33.一種促使以抗原結合型式攝入細胞內的抗原-結合分子以無抗原型式胞外釋放的方法，係藉由增加在中性 pH 範圍下該抗原-結合分子之人類 FcRn-結合活性，及降低在酸性 pH 範圍下該抗原-結合活性至小於在中性 pH 範圍下之抗原-結合活性，其中該抗原-結合分子包括一抗原-結合區與一人類 FcRn-結合區，且其在酸性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性，其中該抗原-結合區包括一組胺酸殘基位於擇自由下列所組成之群組的一個或一個以上的位置：

利用 Kabat 編號之

重鏈：H27、H31、H32、H33、H35、H50、H58、H59、H61、H62、H63、H64、H65、H99、H100b 及 H102，

輕鏈：L24、L27、L28、L32、L53、L54、L56、L90、L92 及 L94。

34.一種減少血漿中總血漿抗原濃度或游離血漿抗原濃度的方法，係藉由增加在中性 pH 範圍下該抗原-結合分子之人類

FcRn-結合活性，其中該抗原-結合分子包括一抗原-結合區與一人類 FcRn-結合區，且在酸性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性，其中該抗原-結合區包括一組胺酸殘基位於擇自由下列所組成之群組的一個或一個以上的位置：

利用 Kabat 編號之

重鏈：H27、H31、H32、H33、H35、H50、H58、H59、H61、H62、H63、H64、H65、H99、H100b 及 H102，

輕鏈：L24、L27、L28、L32、L53、L54、L56、L90、L92 及 L94。

35.一種減少血漿中總血漿抗原濃度或游離血漿抗原濃度的方法，係藉由增加在中性 pH 範圍下該抗原-結合分子之人類 FcRn-結合活性，及降低在酸性 pH 範圍下該抗原-結合活性至小於在中性 pH 範圍下之抗原-結合活性，其中該抗原-結合分子包括一抗原-結合區與一人類 FcRn-結合區，且在酸性 pH 範圍下具有人類 FcRn-結合活性，其中該抗原-結合區包括一組胺酸殘基位於擇自由下列所組成之群組的一個或一個以上的位置：

利用 Kabat 編號之

重鏈：H27、H31、H32、H33、H35、H50、H58、H59、H61、H62、H63、H64、H65、H99、H100b 及 H102，

輕鏈：L24、L27、L28、L32、L53、L54、L56、L90、L92 及 L94。

36.如申請專利範圍第 24 至 35 項任一項所述之方法，其中該酸性 pH 範圍為 pH 5.5 至 pH 6.5，且該中性 pH 範圍為 pH 7.0

至 pH 8.0。

37.如申請專利範圍第 24 至 35 項任一項所述之方法，其中該人類 FcRn-結合活性在中性 pH 範圍下的增加為藉由將該人類 FcRn-結合區之親代 IgG Fc 區中的至少一個胺基酸置換為不同的胺基酸。

38.如申請專利範圍第 24 至 35 項任一項所述之方法，其中該人類 FcRn-結合活性在中性 pH 範圍下的增加為藉由將人類 FcRn-結合區之親代 IgG Fc 區之擇自(EU 編號)第 237、238、239、248、250、252、254、255、256、257、258、265、270、286、289、297、298、303、305、307、308、309、311、312、314、315、317、325、332、334、360、376、380、382、384、385、386、387、389、424、428、433、434、以及 436 位置之至少一個胺基酸置換為不同的胺基酸。

39.如申請專利範圍第 25、27、29、31 至 33 及 35 項任一項所述方法，其中藉由將該抗原-結合分子的至少一個胺基酸置換為組胺酸或插入至少一個組胺酸，以降低該抗原-結合分子在酸性 pH 範圍下的抗原-結合活性至小於在中性 pH 範圍下的抗原-結合活性。

40.如申請專利範圍第 25、27、29、31 至 33 及 35 項任一項所述之方法，其中該抗原-結合區獲得自抗原-結合區資料庫。

41.如申請專利範圍第 25、27、29、31 至 33 及 35 項任一項所述之方法，其中該抗原-結合活性的下降，相對於組胺酸的置換或插入前，以抗原-結合活性在酸性 pH 範圍與在中性 pH 範圍下的比值，即 KD(在酸性 pH 範圍)/KD(在中性 pH

範圍)值的增加來表示。

42.一種抗原-結合分子的製造方法，其包括下列步驟：

(a) 篩選一抗原-結合分子，該抗原-結合分子在中性 pH 範圍下的人類 FcRn-結合活性大於 KD 3.2 微莫耳，該抗原-結合分子獲得自改變該抗原-結合分子之人類 FcRn-結合區的至少一個胺基酸；

(b) 獲得編碼步驟(a)的抗原-結合分子的基因，該抗原-結合分子的人類 FcRn-結合區與抗原-結合區連結；以及

(c) 利用步驟(b)所獲得的基因製備抗原-結合分子，其中該抗原-結合區包括一組胺酸殘基位於擇自由下列所組成之群組的一個或一個以上的位置：

利用 Kabat 編號之

重鏈：H27、H31、H32、H33、H35、H50、H58、H59、H61、H62、H63、H64、H65、H99、H100b 及 H102，

輕鏈：L24、L27、L28、L32、L53、L54、L56、L90、L92 及 L94。

43.一種抗原-結合分子的製造方法，其包括下列步驟：

(a) 篩選一抗原-結合分子，該抗原-結合分子在中性 pH 範圍下的人類 FcRn-結合活性大於該抗原-結合分子的人類 FcRn-結合區至少一個胺基酸改變前在酸性 pH 範圍下的人類 FcRn-結合活性；

(b) 改變一抗原-結合分子之抗原-結合區的至少一個胺基酸，並篩選在中性 pH 範圍下的抗原-結合活性大於在酸性 pH 範圍下的抗原-結合活性之抗原-結合分子，其中該抗原-

結合區包括一組胺酸殘基位於擇自由下列所組成之群組的一個或一個以上的位置：

利用 Kabat 編號之

重鏈：H27、H31、H32、H33、H35、H50、H58、H59、H61、H62、H63、H64、H65、H99、H100b 及 H102，

輕鏈：L24、L27、L28、L32、L53、L54、L56、L90、L92 及 L94；

(c) 獲得編碼步驟(a)及(b)所製備的抗原-結合分子的基因，該抗原-結合分子的人類 FcRn-結合區與抗原-結合區連結；以及

(d) 利用步驟(c)所獲得的基因製備抗原-結合分子。

44.一種抗原-結合分子的製造方法，其包括下列步驟：

(a) 篩選一抗原-結合分子，該抗原-結合分子在中性 pH 範圍下的人類 FcRn-結合活性大於該抗原-結合分子的人類 FcRn-結合區至少一個胺基酸在改變前在酸性 pH 範圍下的人類 FcRn-結合活性；

(b) 篩選一抗原-結合分子，該抗原-結合分子在中性 pH 範圍下的抗原-結合活性在大於在酸性 pH 範圍下；

(c) 獲得編碼步驟(a)及(b)中所製備的抗原-結合分子的基因，該抗原-結合分子的人類 FcRn-結合區與抗原-結合區連結；以及

(d) 利用步驟(c)所獲得的基因製備一抗原-結合分子，其中該抗原-結合區包括一組胺酸殘基位於擇自由下列所組成之群組的一個或一個以上的位置：

利用 Kabat 編號之

重鏈：H27、H31、H32、H33、H35、H50、H58、H59、H61、H62、H63、H64、H65、H99、H100b 及 H102，

輕鏈：L24、L27、L28、L32、L53、L54、L56、L90、L92 及 L94。

45.一種抗原-結合分子，由申請專利範圍第 42 至 44 項任一項所述之製造方法所製造。

46.一種抗原-結合分子的篩選方法，包括下列步驟：

(a) 篩選一抗原-結合分子，該抗原-結合分子在中性 pH 範圍下的人類 FcRn-結合活性大於 KD 3.2 微莫耳，該抗原-結合分子獲得自改變該抗原-結合分子之人類 FcRn-結合區的至少一個胺基酸；

(b) 獲得編碼步驟(a)的抗原-結合分子的基因，該抗原-結合分子的人類 FcRn-結合區與抗原-結合區連結；以及

(c) 利用步驟(b)所獲得的基因製備抗原-結合分子，其中該抗原-結合區包括一組胺酸殘基位於擇自由下列所組成之群組的一個或一個以上的位置：

利用 Kabat 編號之

重鏈：H27、H31、H32、H33、H35、H50、H58、H59、H61、H62、H63、H64、H65、H99、H100b 及 H102，

輕鏈：L24、L27、L28、L32、L53、L54、L56、L90、L92 及 L94。

47.一種抗原-結合分子的篩選方法，包括下列步驟：

(a) 篩選一抗原-結合分子，該抗原-結合分子在中性 pH 範

圍下的人類 FcRn-結合活性大於該抗原-結合分子的人類 FcRn-結合區至少一個胺基酸改變前在酸性 pH 範圍下的人類 FcRn-結合活性；

(b) 改變一抗原-結合分子之抗原-結合區的至少一個胺基酸，並篩選在中性 pH 範圍下的抗原-結合活性大於在酸性 pH 範圍下的抗原-結合活性之抗原-結合分子，其中該抗原-結合區包括一組胺酸殘基位於擇自由下列所組成之群組的一個或一個以上的位置：

利用 Kabat 編號之

重鏈：H27、H31、H32、H33、H35、H50、H58、H59、H61、H62、H63、H64、H65、H99、H100b 及 H102，

輕鏈：L24、L27、L28、L32、L53、L54、L56、L90、L92 及 L94；

(c) 獲得一編碼步驟(a)及(b)所製備的抗原-結合分子的基因，該抗原-結合分子的人類 FcRn-結合區與抗原-結合區連結；以及

(d) 利用步驟(c)所獲得的基因製備抗原-結合分子。

48.一種抗原-結合分子的篩選方法，包括下列步驟：

(a) 篩選一抗原-結合分子，該抗原-結合分子在中性 pH 範圍下的人類 FcRn-結合活性大於該抗原-結合分子的人類 FcRn-結合區至少一個胺基酸在改變前在酸性 pH 範圍下的人類 FcRn-結合活性；

(b) 篩選一抗原-結合分子，該抗原-結合分子在中性 pH 範圍下的抗原-結合活性在大於在酸性 pH 範圍下；

(c) 獲得一編碼步驟(a)及(b)中所製備的抗原-結合分子的基因，該抗原-結合分子的人類 FcRn-結合區與抗原-結合區連結；以及

(d) 利用步驟(c)所獲得的基因製備一抗原-結合分子，其中該抗原-結合區包括一組胺酸殘基位於擇自由下列所組成之群組的一個或一個以上的位置：

利用 Kabat 編號之

重鏈：H27、H31、H32、H33、H35、H50、H58、H59、H61、H62、H63、H64、H65、H99、H100b 及 H102，

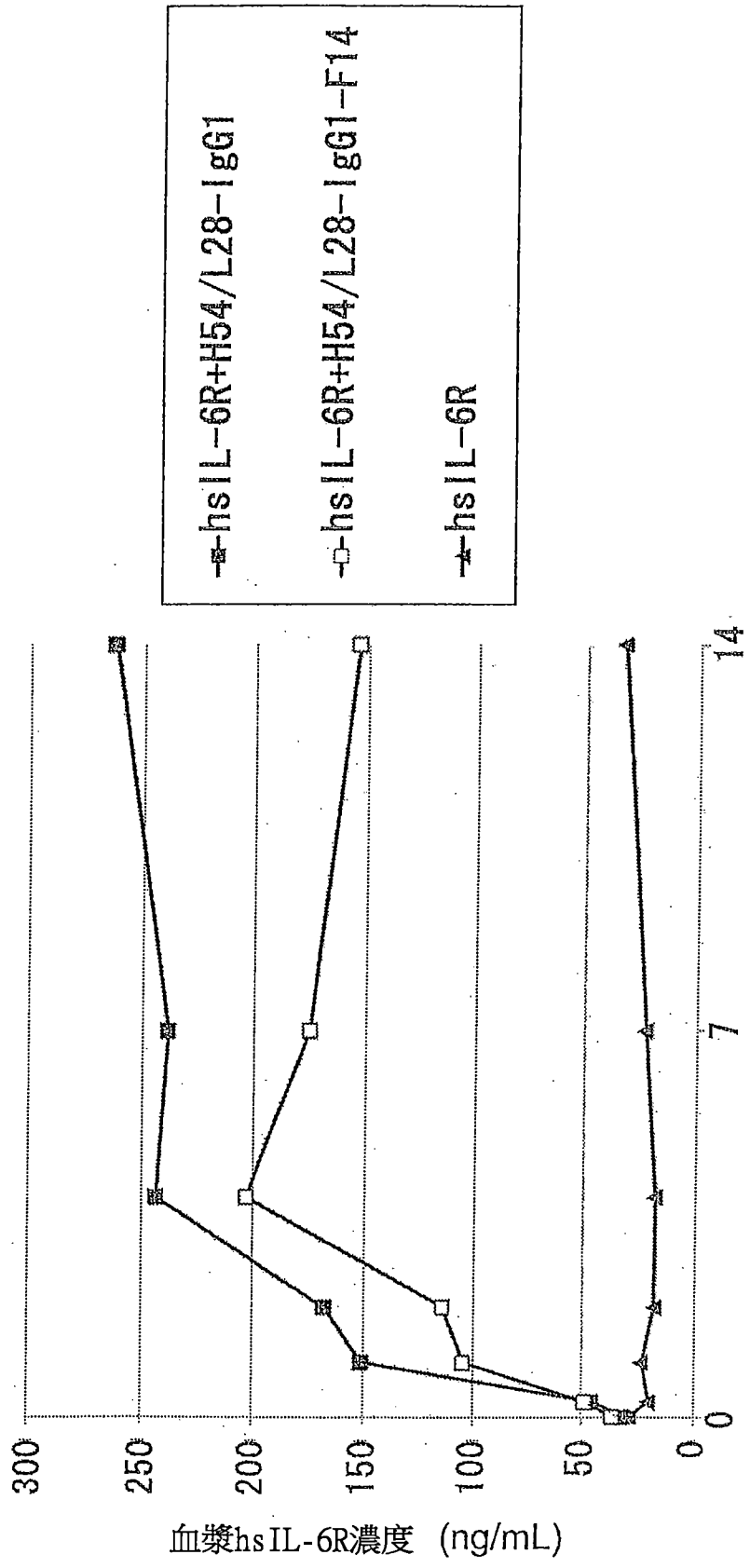
輕鏈：L24、L27、L28、L32、L53、L54、L56、L90、L92 及 L94。

49.如申請專利範圍第 24 至 35、42 至 44、及 46 至 48 項任一項所述之方法，其中該抗原-結合區包括一與受體結合的人造配體。

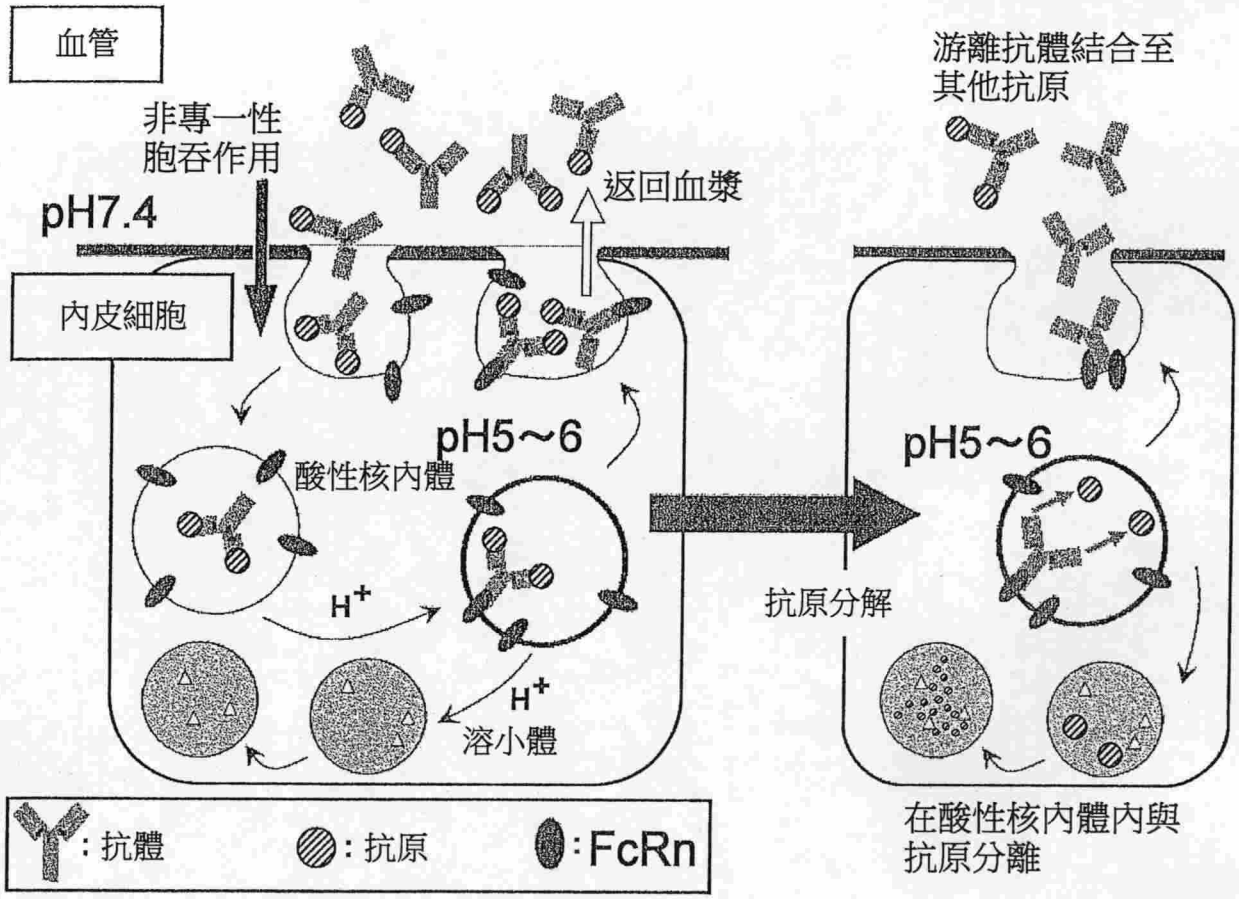
50.如申請專利範圍第 24 至 35、42 至 44、及 46 至 48 項任一項所述之方法，其中該抗原-結合區包括一與配體結合的人造受體。

51.如申請專利範圍第 24 至 35、42 至 44、及 46 至 48 項任一項所述之方法，其中該抗原-結合分子為抗體。

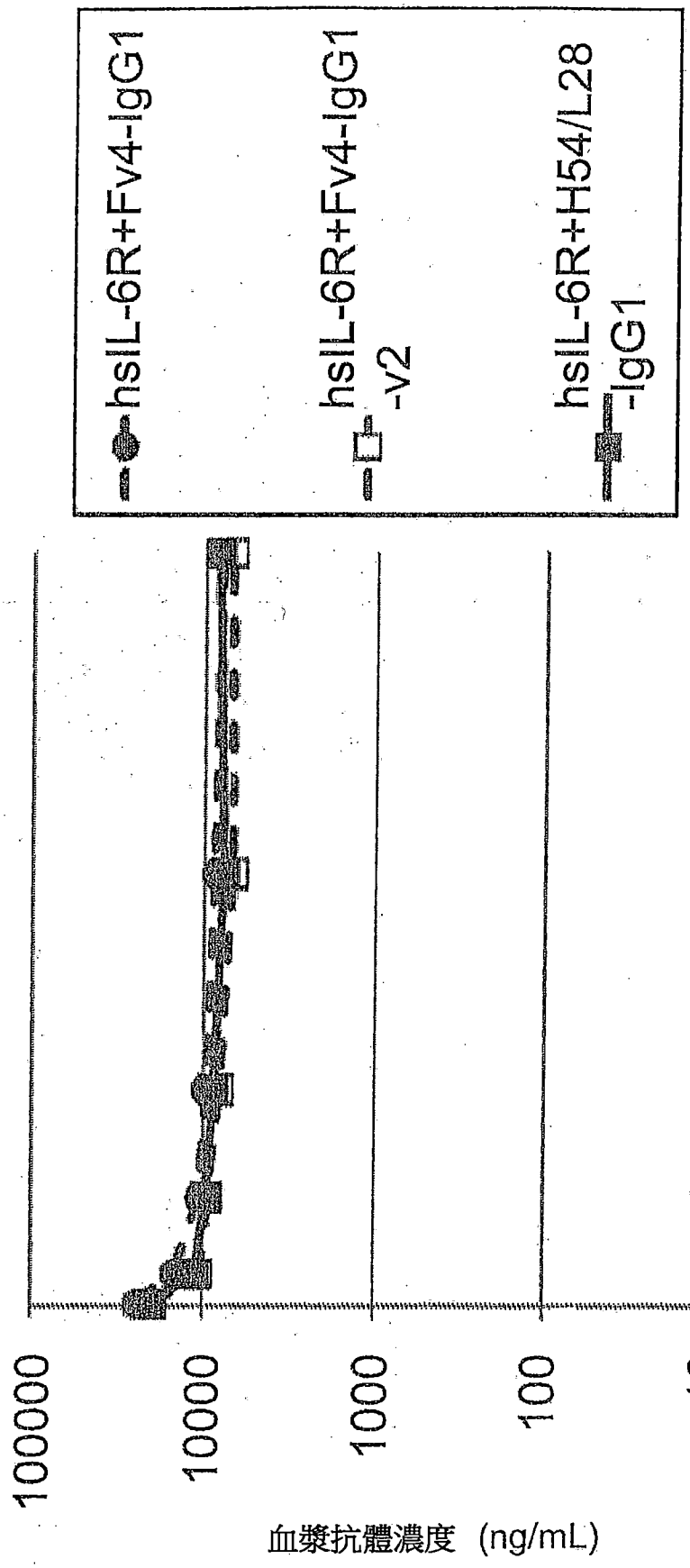
圖式


hsIL-6R+H54/L28-IgG1
hsIL-6R+H54/L28-IgG1-F14
hsIL-6R
血漿hsIL-6R濃度 (ng/mL)
300
250
200
150
100
50
0
0
7
14
時間(天)

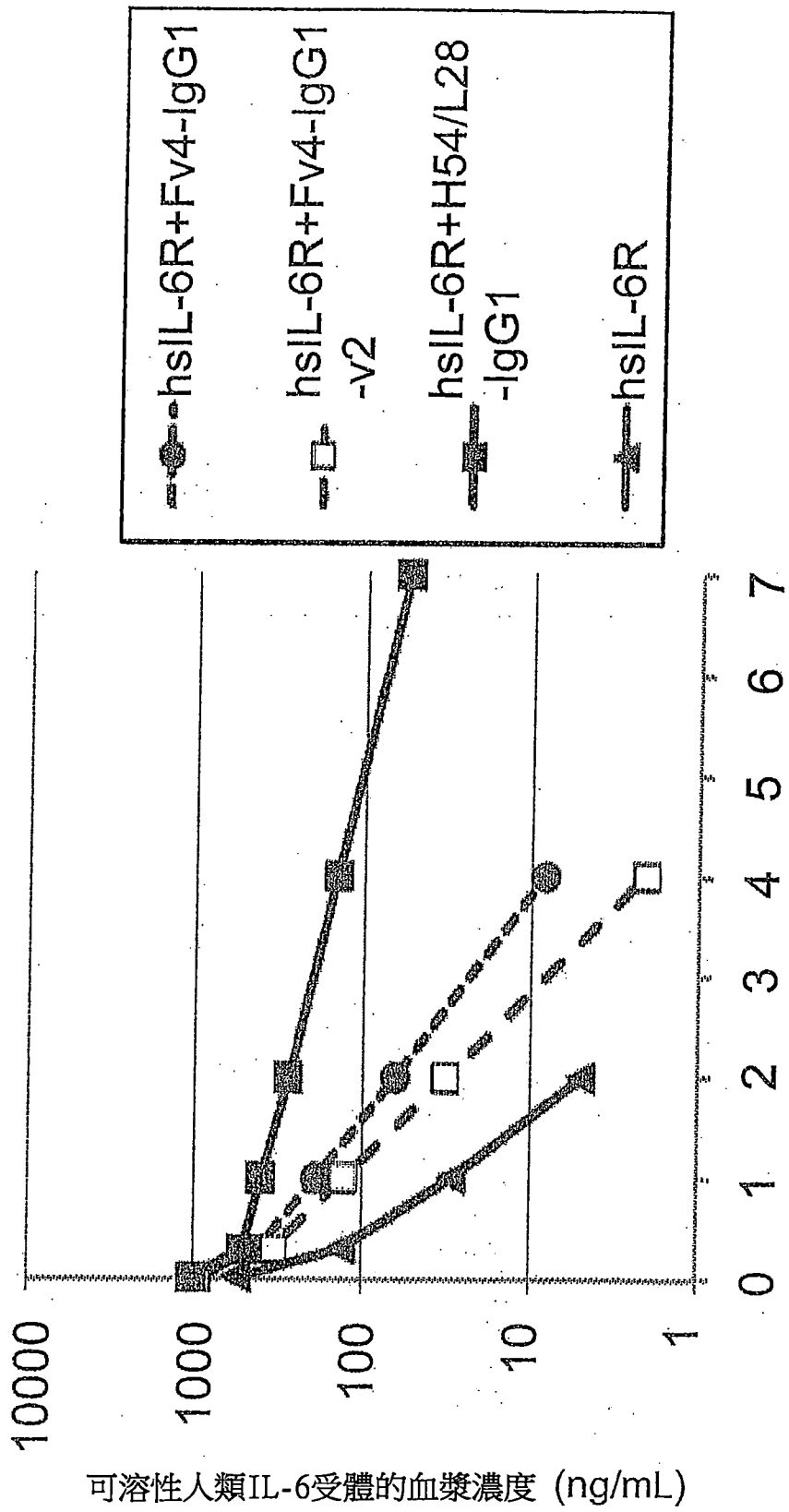
第1圖


血管
非專一性
胞吞作用
pH7.4
返回血漿
內皮細胞
pH5～6
酸性核內體
H+
H+
溶小體
抗原分解
游離抗體結合至
其他抗原
pH5～6
在酸性核內體內與
抗原分離
：抗體
：抗原
：FcRn

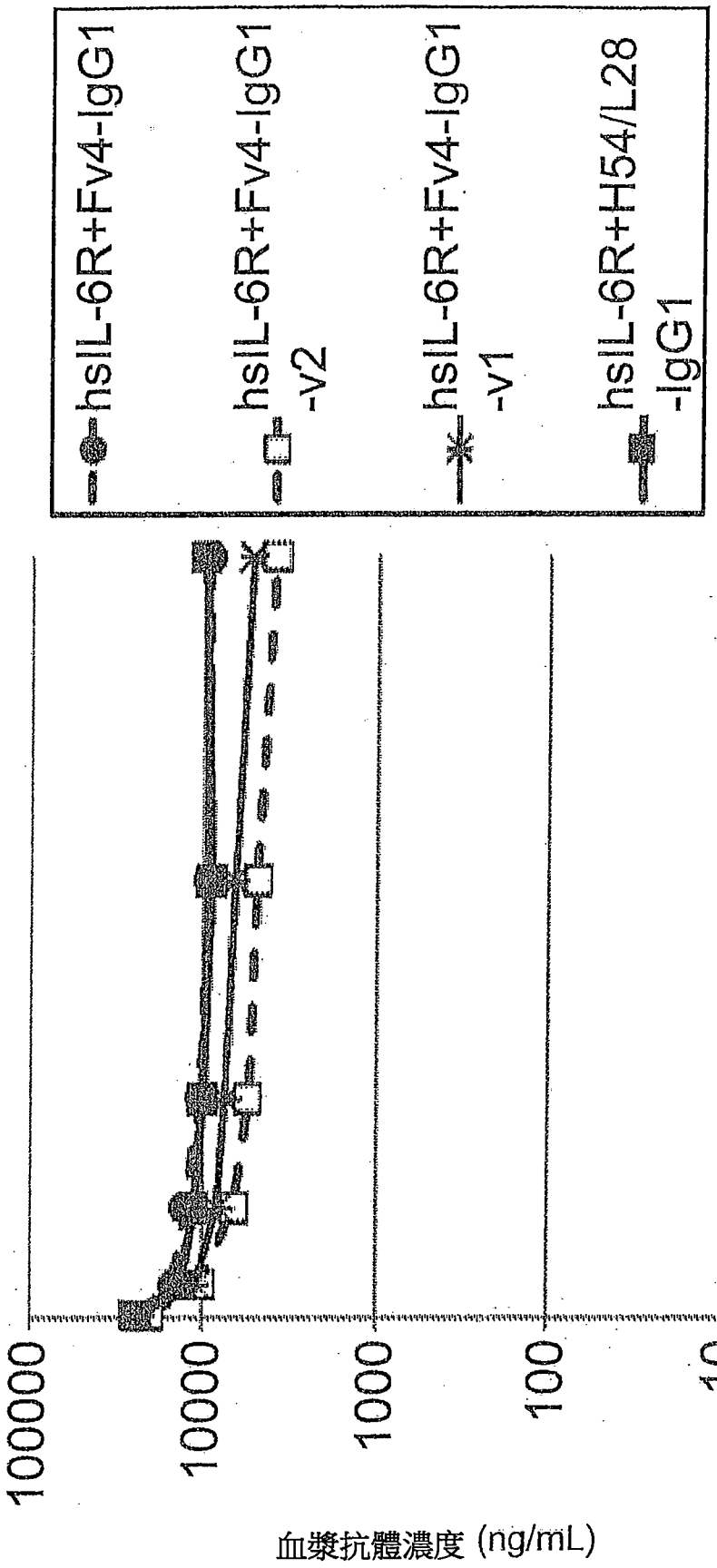
第2圖


hsIL-6R+Fv4-IgG1
hsIL-6R+Fv4-IgG1 -v2
hsIL-6R+H54/L28 -IgG1
100000
10000
1000
100
10
0
1
2
3
4
5
6
7
血漿抗體濃度 (ng/mL)
時間(天)

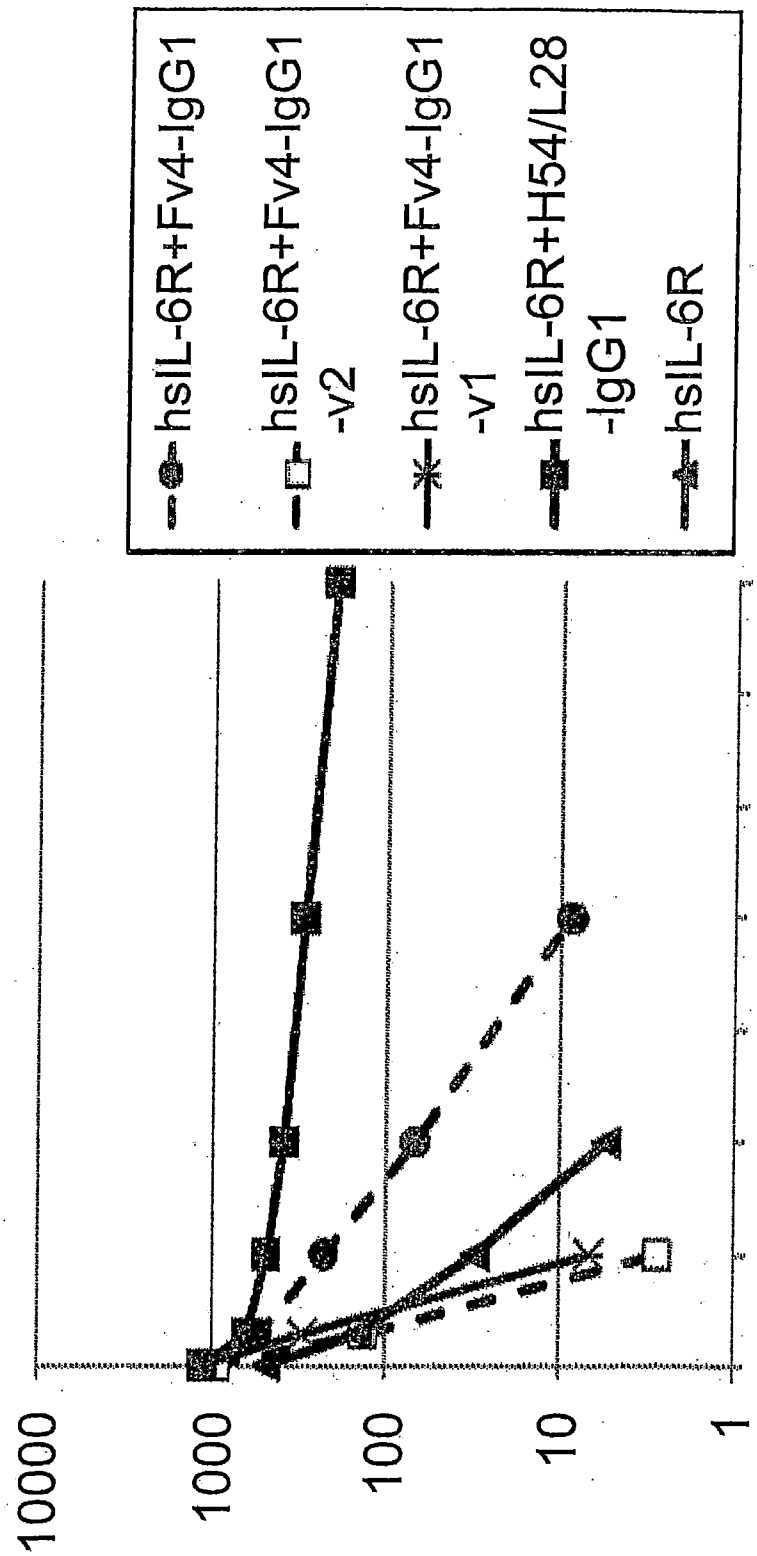
第3圖


hsIL-6R+Fv4-IgG1
hsIL-6R+Fv4-IgG1 -v2
hsIL-6R+H54/L28 -IgG1
hsIL-6R
10000
1000
100
10
1
0 1 2 3 4 5 6 7
時間(天)
可溶性人類IL-6受體的血漿濃度 (ng/mL)

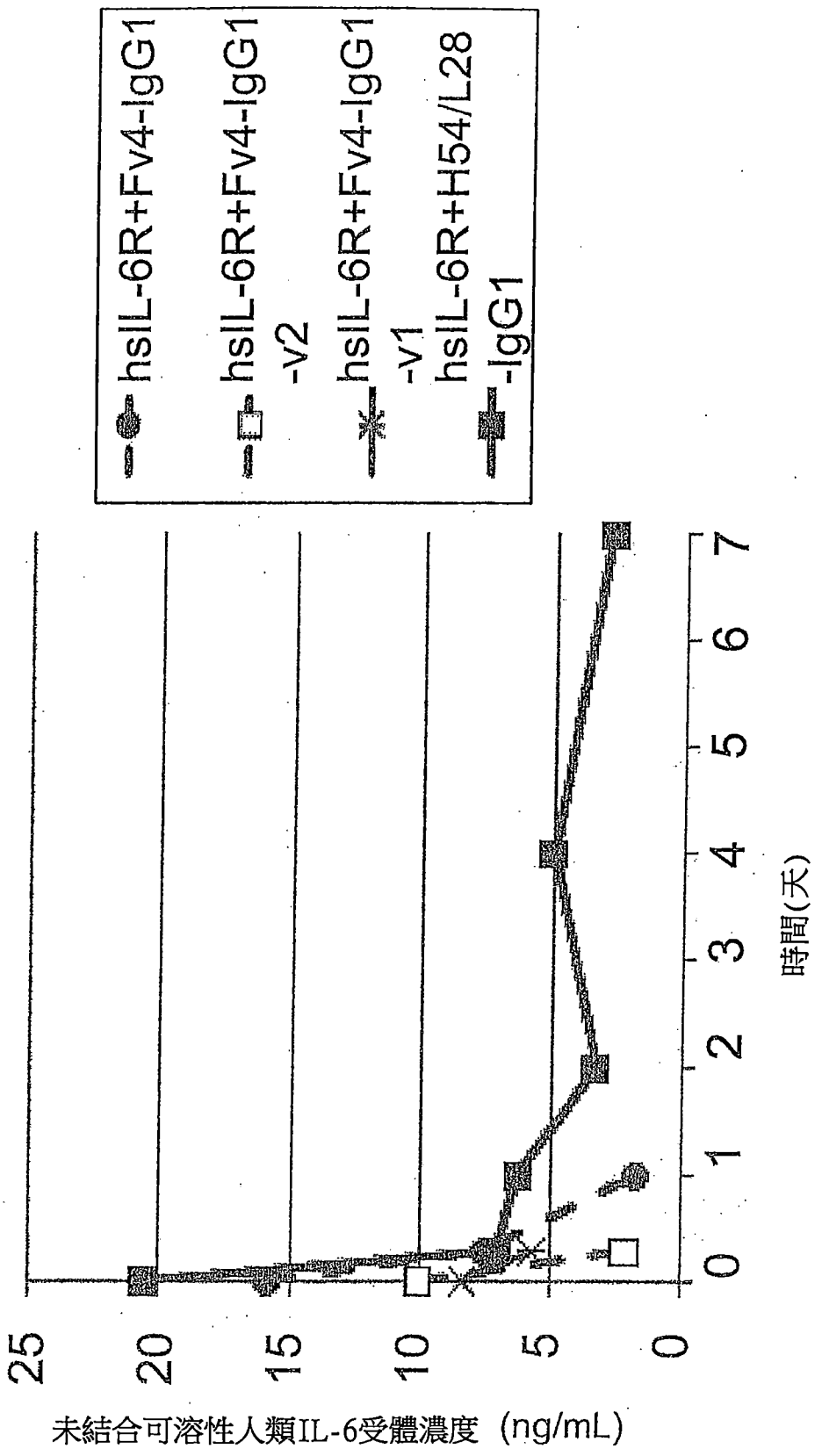
第4圖


hsIL-6R+Fv4-IgG1
hsIL-6R+Fv4-IgG1 -v2
hsIL-6R+Fv4-IgG1 -v1
hsIL-6R+H54/L28 -IgG1
100000
10000
1000
100
10
0 1 2 3 4 5 6 7
時間(天)
血漿抗體濃度 (ng/mL)

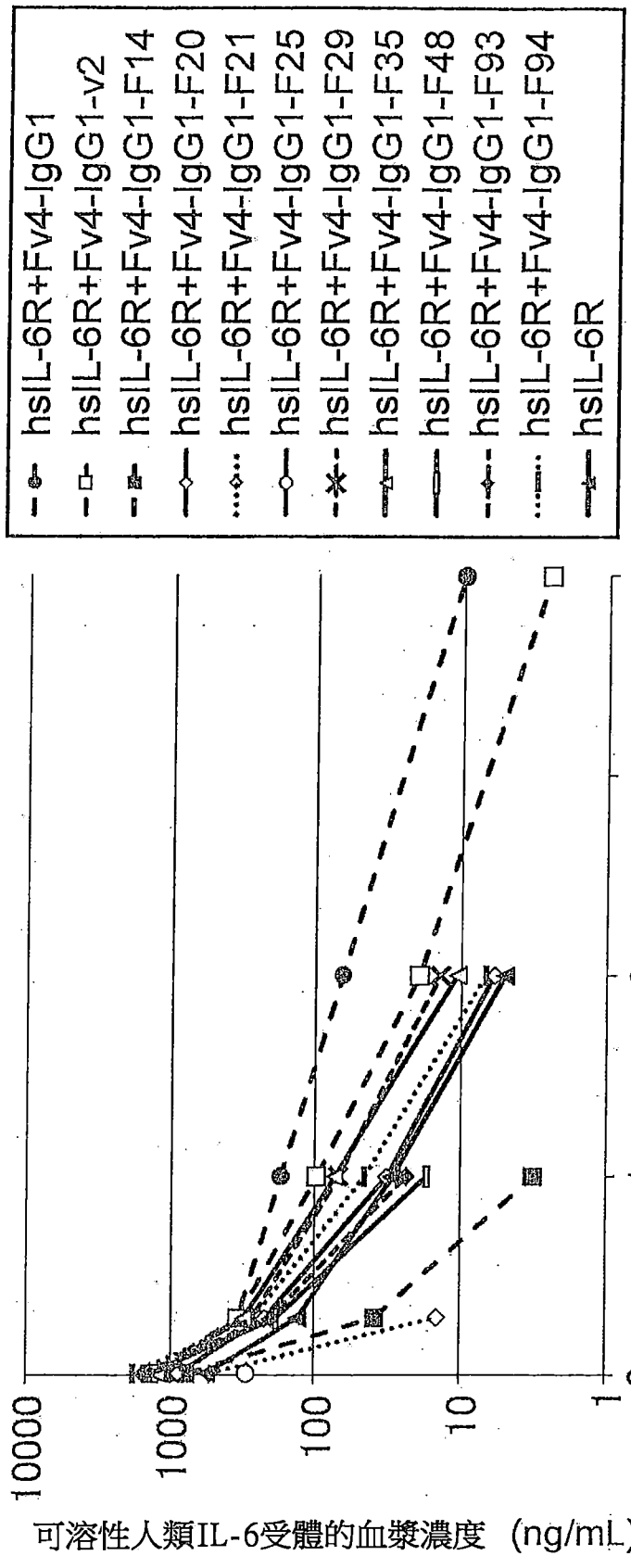
第5圖


hsIL-6R+Fv4-IgG1
hsIL-6R+Fv4-IgG1 -v2
hsIL-6R+Fv4-IgG1 -v1
hsIL-6R+H54/L28 -IgG1
hsIL-6R
10000
1000
100
10
1
0 1 2 3 4 5 6 7
時間(天)
可溶性人類IL-6受體的血漿濃度 (ng/mL)

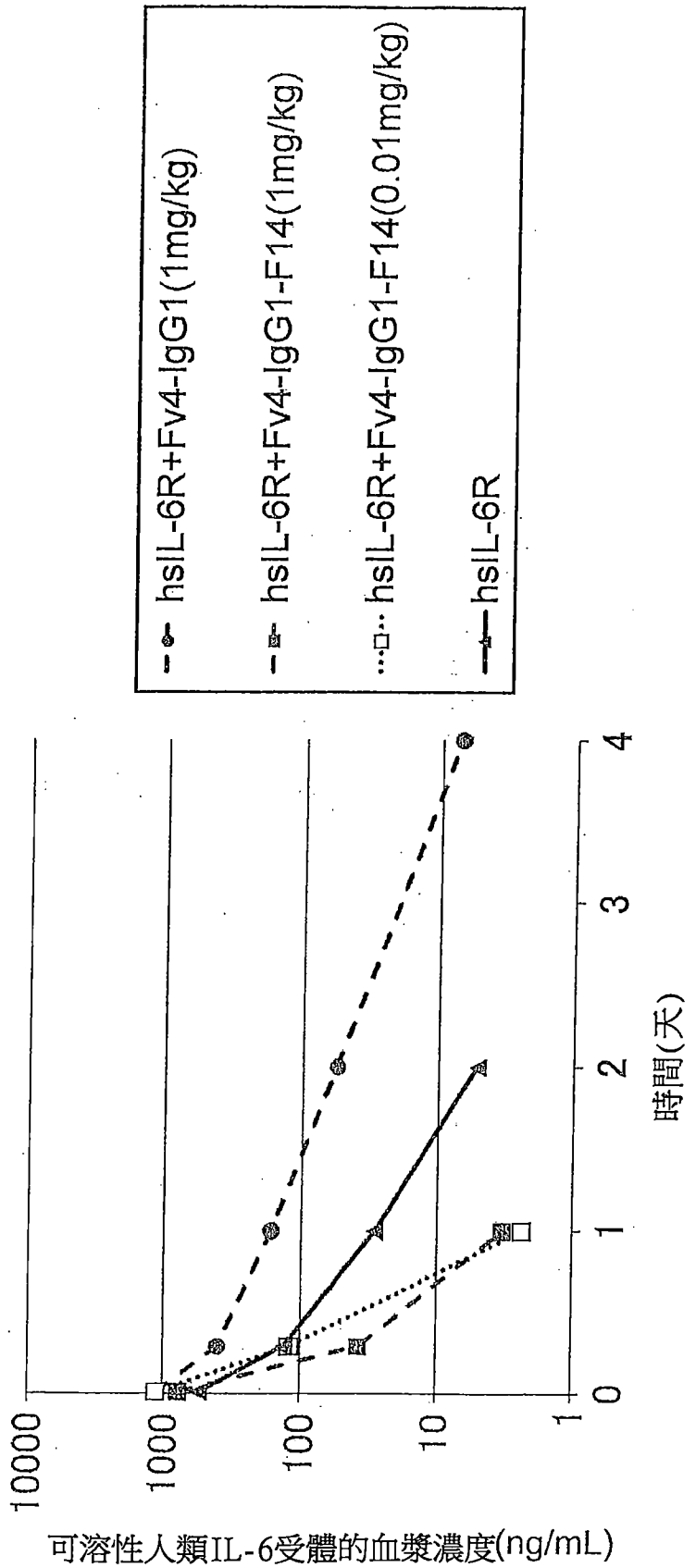
第6圖


hsIL-6R+Fv4-IgG1
hsIL-6R+Fv4-IgG1 -v2
hsIL-6R+Fv4-IgG1 -v1
hsIL-6R+H54/L28 -IgG1
25
20
15
10
5
0
0
1
2
3
4
5
6
7
時間(天)
未結合可溶性人類IL-6受體濃度 (ng/mL)

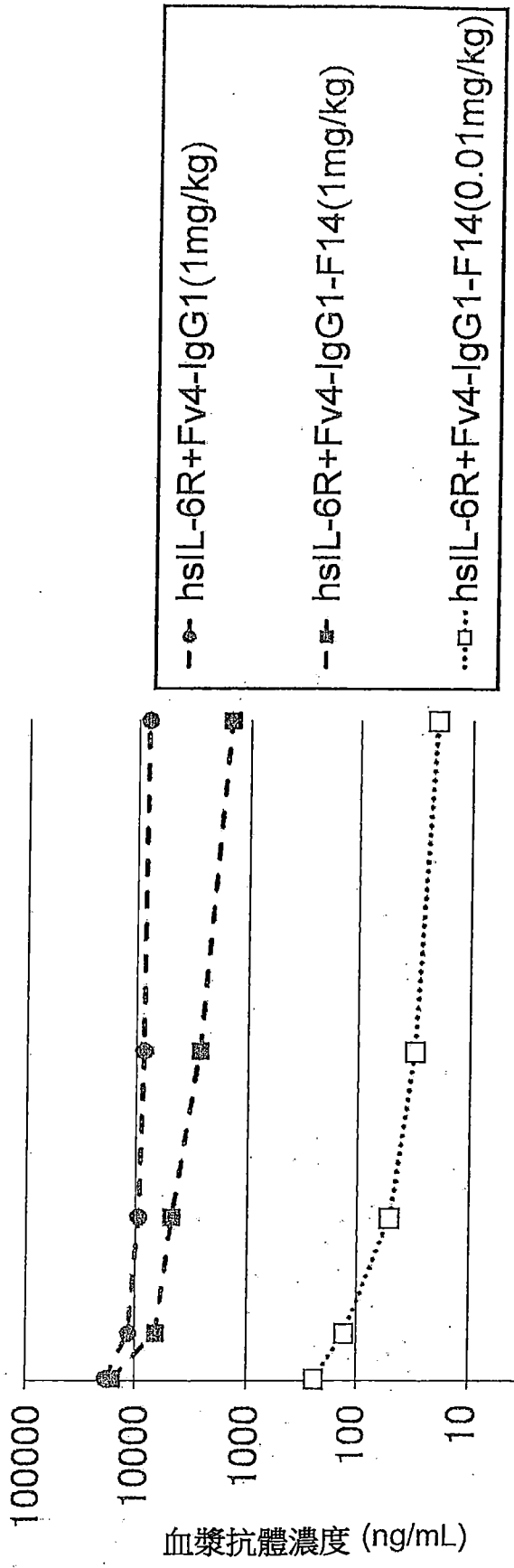
第7圖


hsIL-6R+Fv4-IgG1
hsIL-6R+Fv4-IgG1-v2
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F14
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F20
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F21
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F25
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F29
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F35
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F48
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F93
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F94
hsIL-6R
10000
1000
100
10
1
0
1
2
3
4
時間(天)
可溶性人類IL-6受體的血漿濃度 (ng/mL)

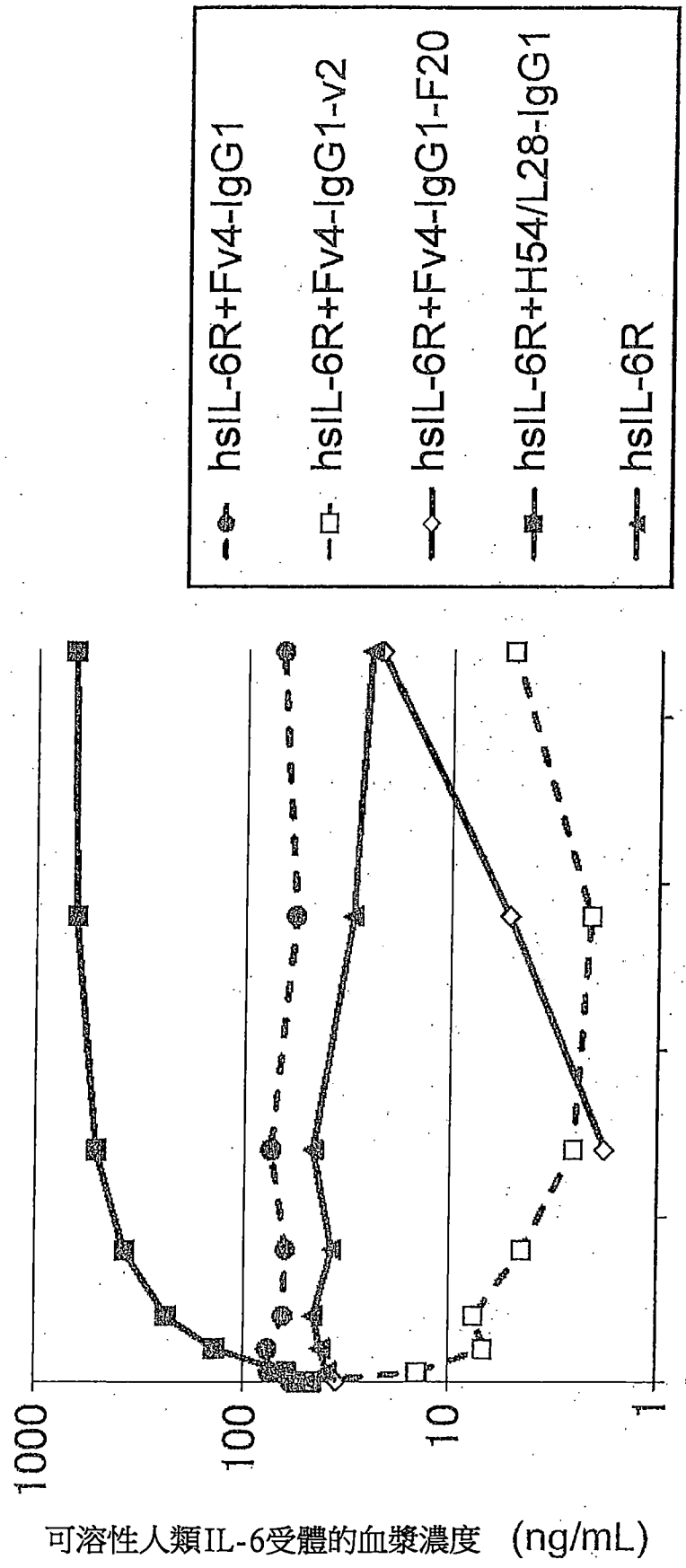
第8圖


hsIL-6R+Fv4-IgG1(1mg/kg)
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F14(1mg/kg)
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F14(0.01mg/kg)
hsIL-6R
10000
1000
100
10
1
0
1
2
3
4
時間(天)
可溶性人類IL-6受體的血漿濃度(ng/mL)

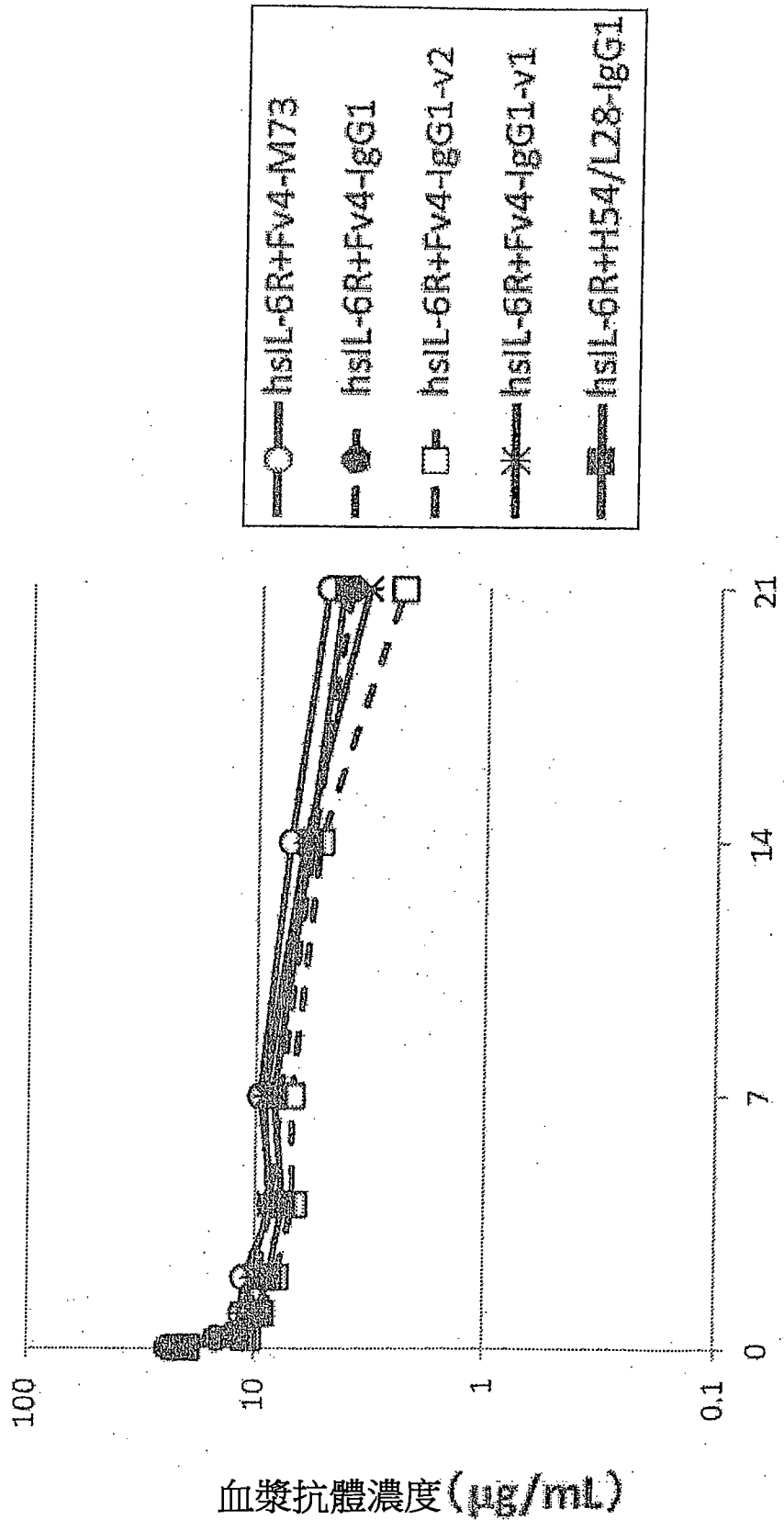
第9圖


hsIL-6R+Fv4-IgG1(1mg/kg)
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F14(1mg/kg)
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F14(0.01mg/kg)
血漿抗體濃度 (ng/mL)
100000
10000
1000
100
10
1
0
1
2
3
4
時間(天)

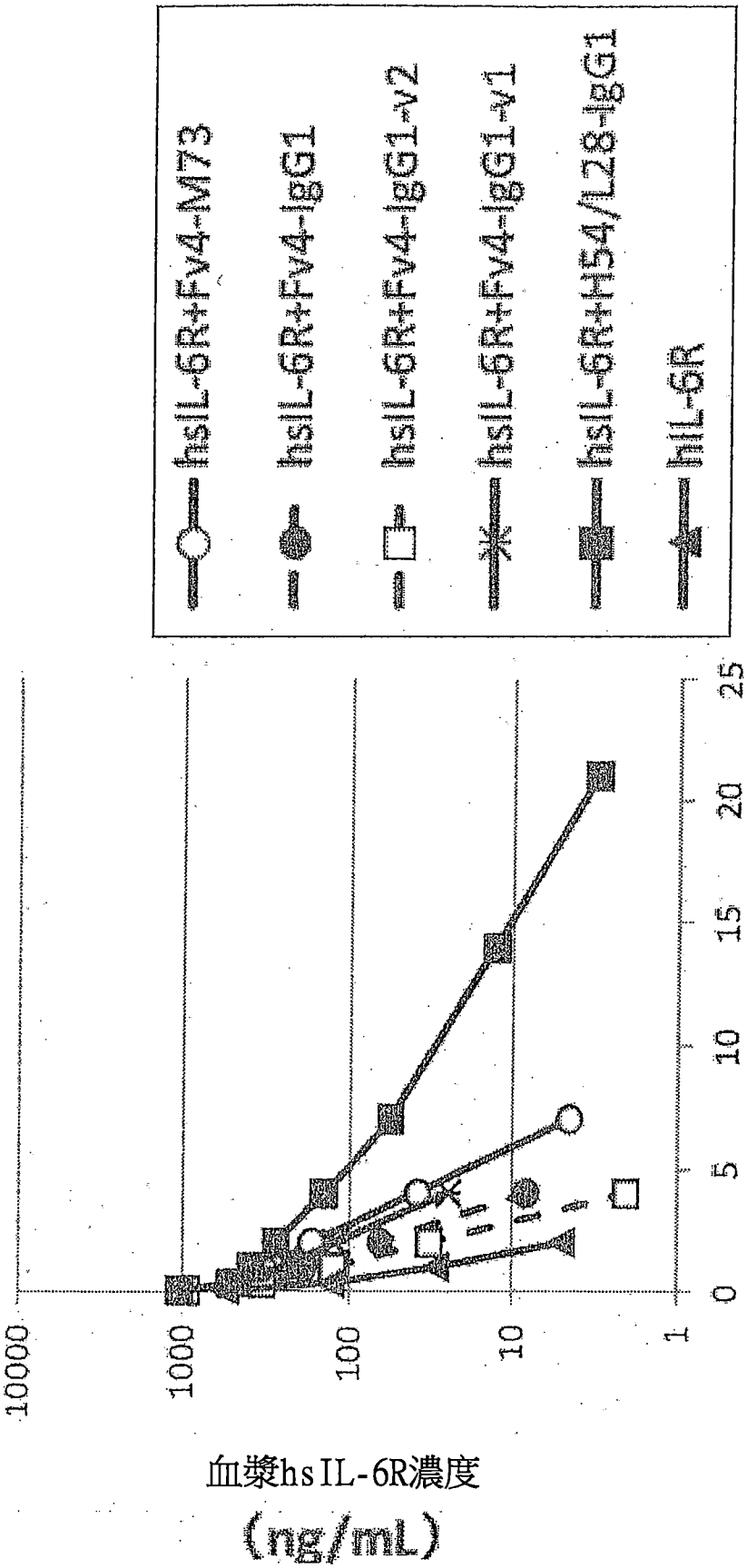
第10圖


hsIL-6R+Fv4-IgG1
hsIL-6R+Fv4-IgG1-v2
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F20
hsIL-6R+H54/L28-IgG1
hsIL-6R
1000
100
10
1
0
5
10
15
20
時間(天)
可溶性人類IL-6受體的血漿濃度 (ng/mL)

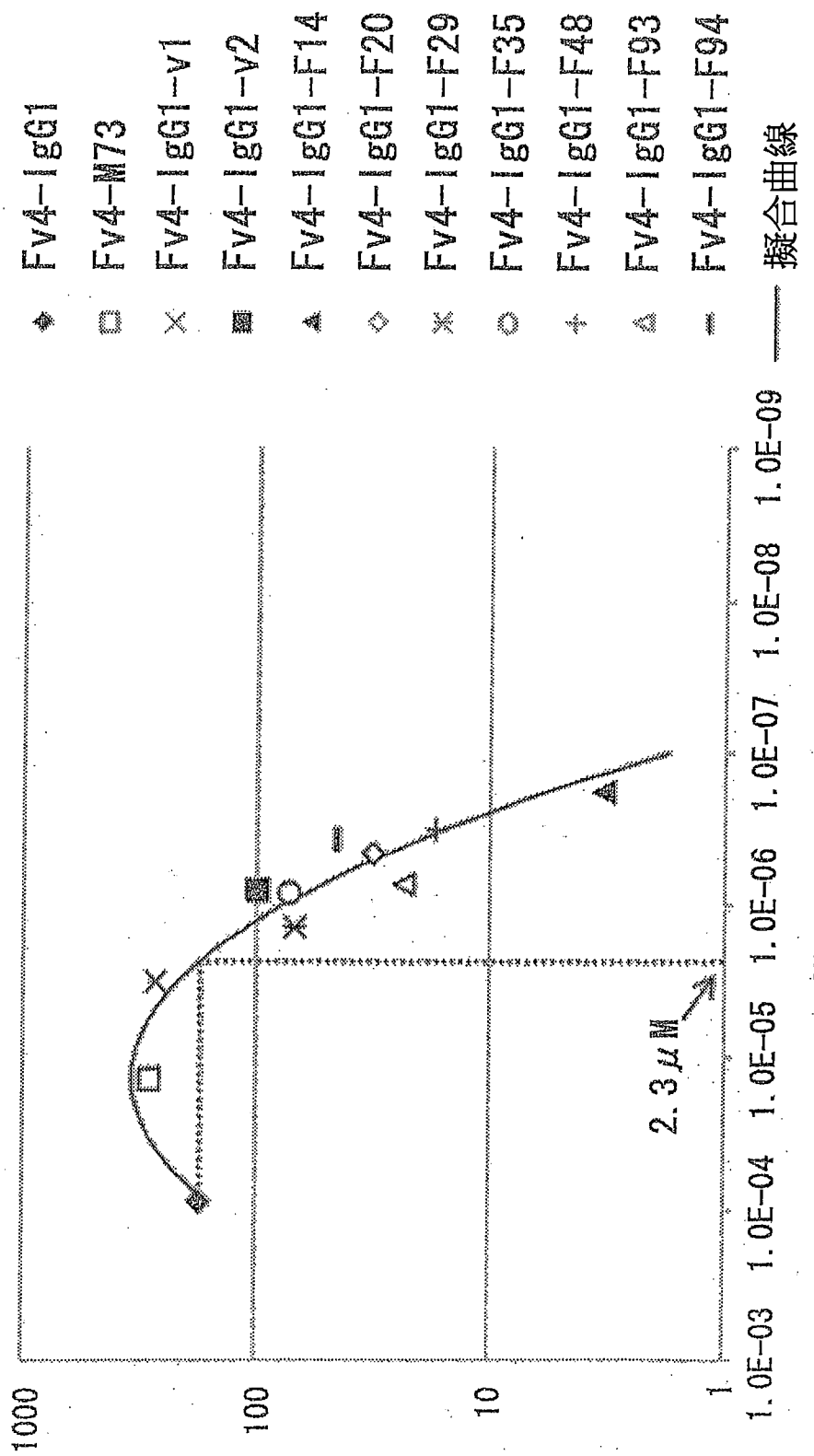
第11圖


hsIL-6R+Fv4-M73
hsIL-6R+Fv4-IgG1
hsIL-6R+Fv4-IgG1-v2
hsIL-6R+Fv4-IgG1-v1
hsIL-6R+H54/L28-IgG1
100
10
1
0,1
0
7
14
21
時間(天)
血漿抗體濃度(μg/mL)

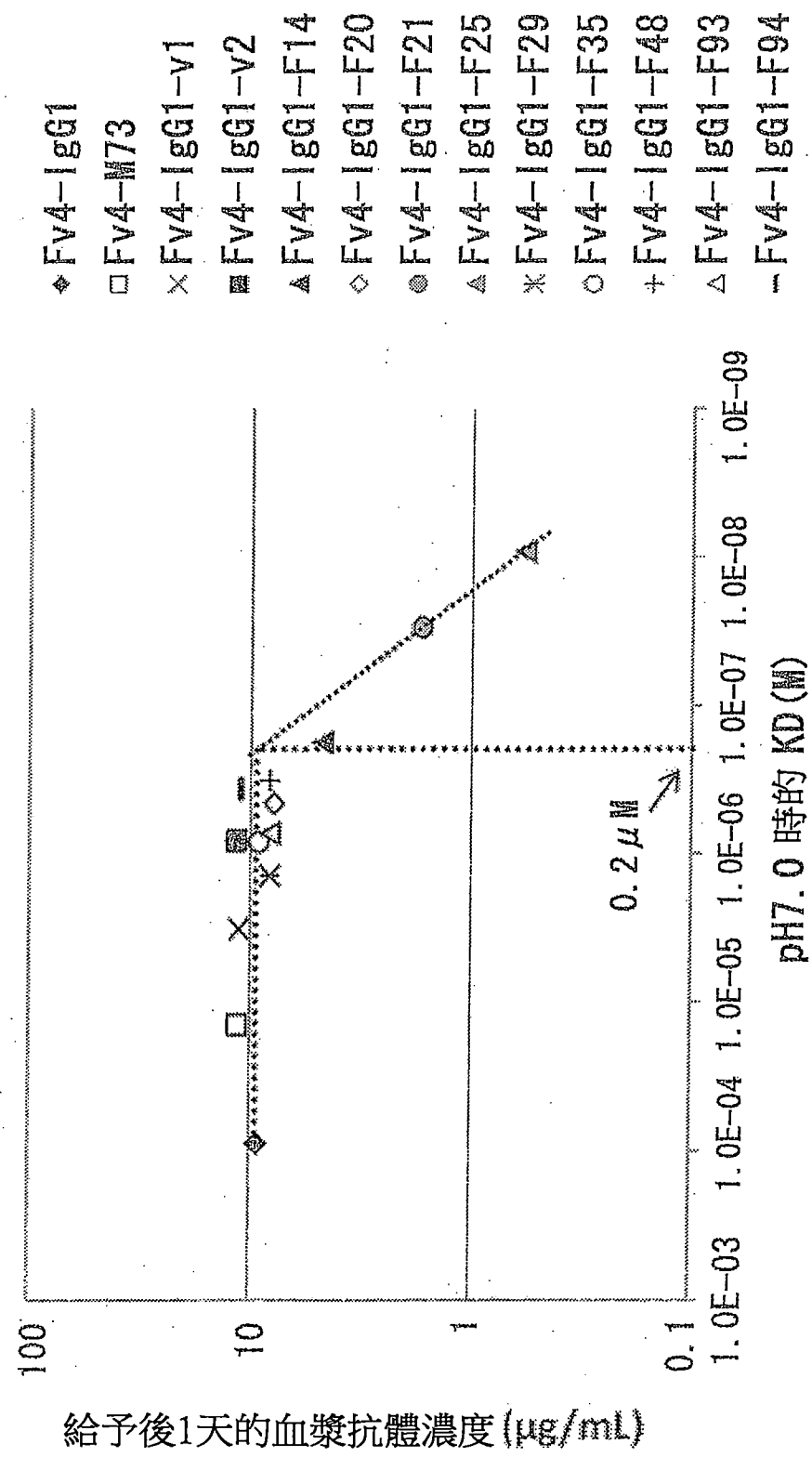
第12圖


hsIL-6R+Fv4-M73
hsIL-6R+Fv4-IgG1
hsIL-6R+Fv4-IgG1-v2
hsIL-6R+Fv4-IgG1-v1
hsIL-6R+H54/L28-IgG1
hIL-6R
10000
1000
100
10
1
0
5
10
15
20
25
血漿hsIL-6R濃度
(ng/mL)
時間(天)

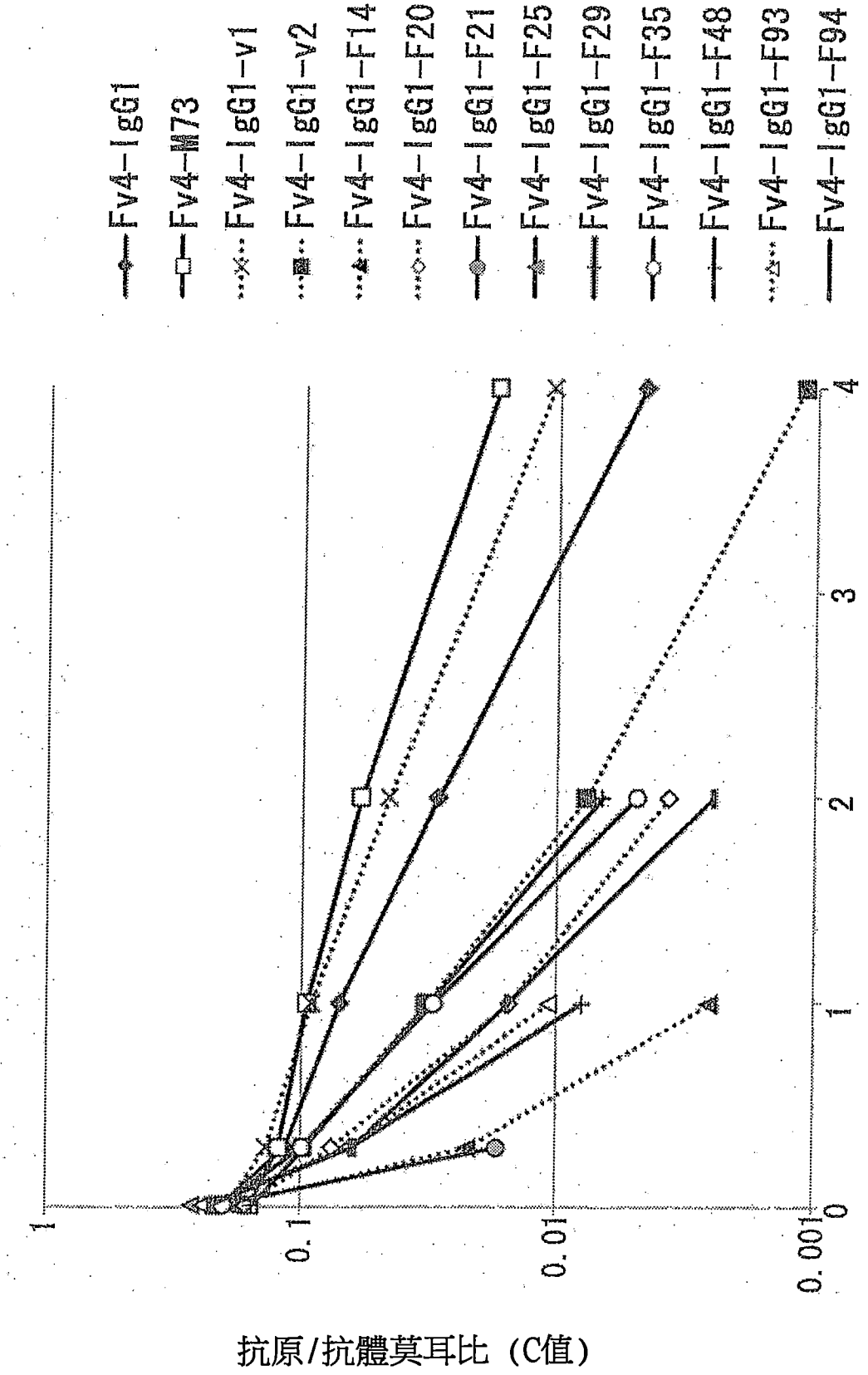
第13圖


Fv4-IgG1
Fv4-M73
Fv4-IgG1-v1
Fv4-IgG1-v2
Fv4-IgG1-F14
Fv4-IgG1-F20
Fv4-IgG1-F29
Fv4-IgG1-F35
Fv4-IgG1-F48
Fv4-IgG1-F93
Fv4-IgG1-F94
擬合曲線
1000
100
10
1
1.0E-03
1.0E-04
1.0E-05
1.0E-06
1.0E-07
1.0E-08
1.0E-09
2.3μM
pH7.0 時的 KD(M)
給予後1天的血漿hsIL-6R濃度 (ng/mL)

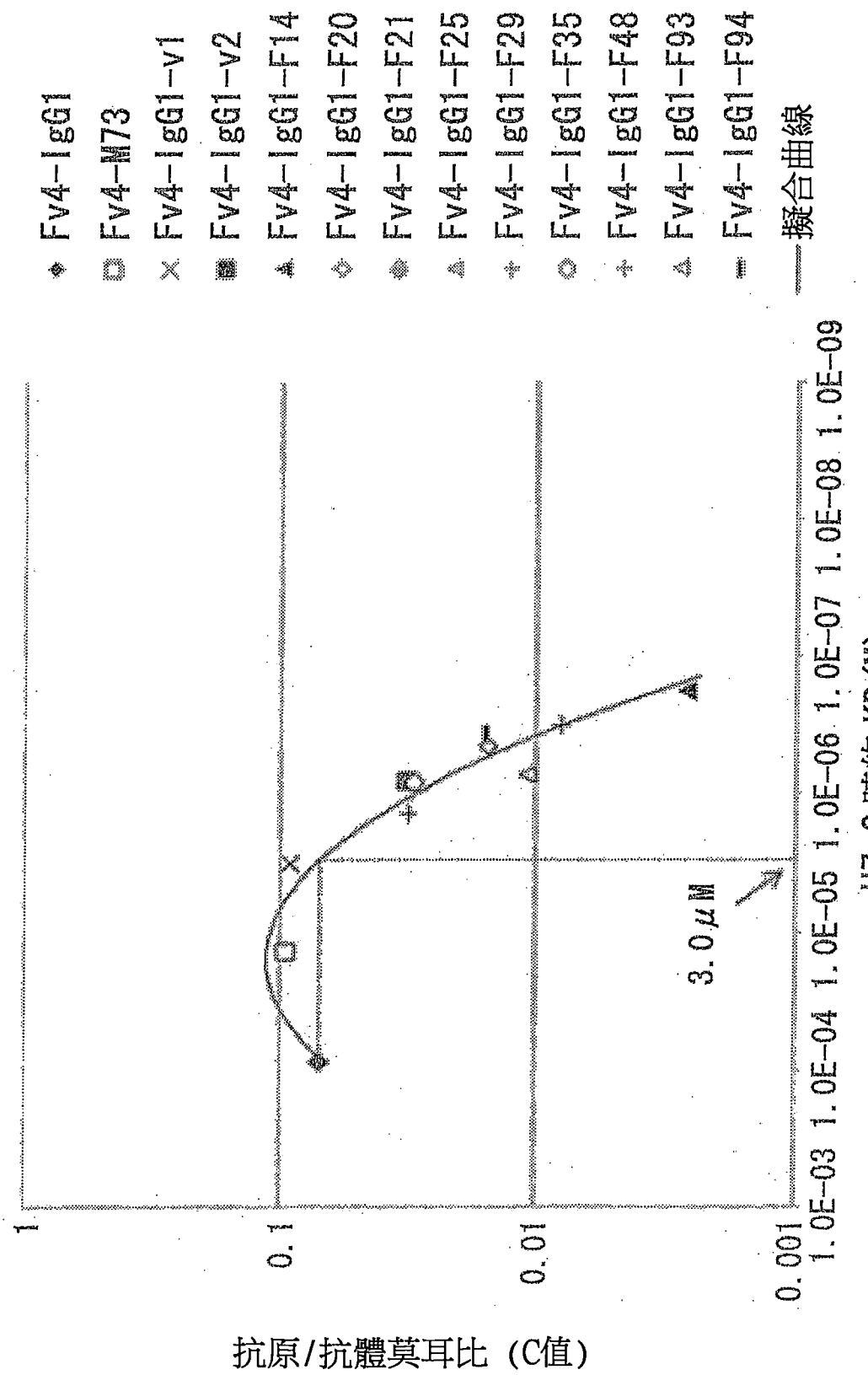
第14圖


◆ Fv4-IgG1
□ Fv4-M73
× Fv4-IgG1-v1
■ Fv4-IgG1-v2
▲ Fv4-IgG1-F14
◇ Fv4-IgG1-F20
● Fv4-IgG1-F21
◁ Fv4-IgG1-F25
✳ Fv4-IgG1-F29
○ Fv4-IgG1-F35
+ Fv4-IgG1-F48
△ Fv4-IgG1-F93
– Fv4-IgG1-F94
100
10
1
0.1
1.0E-03
1.0E-04
1.0E-05
1.0E-06
1.0E-07
1.0E-08
1.0E-09
0.2μM
pH7.0 時的 KD (M)
給予後1天的血漿抗體濃度 (μg/mL)

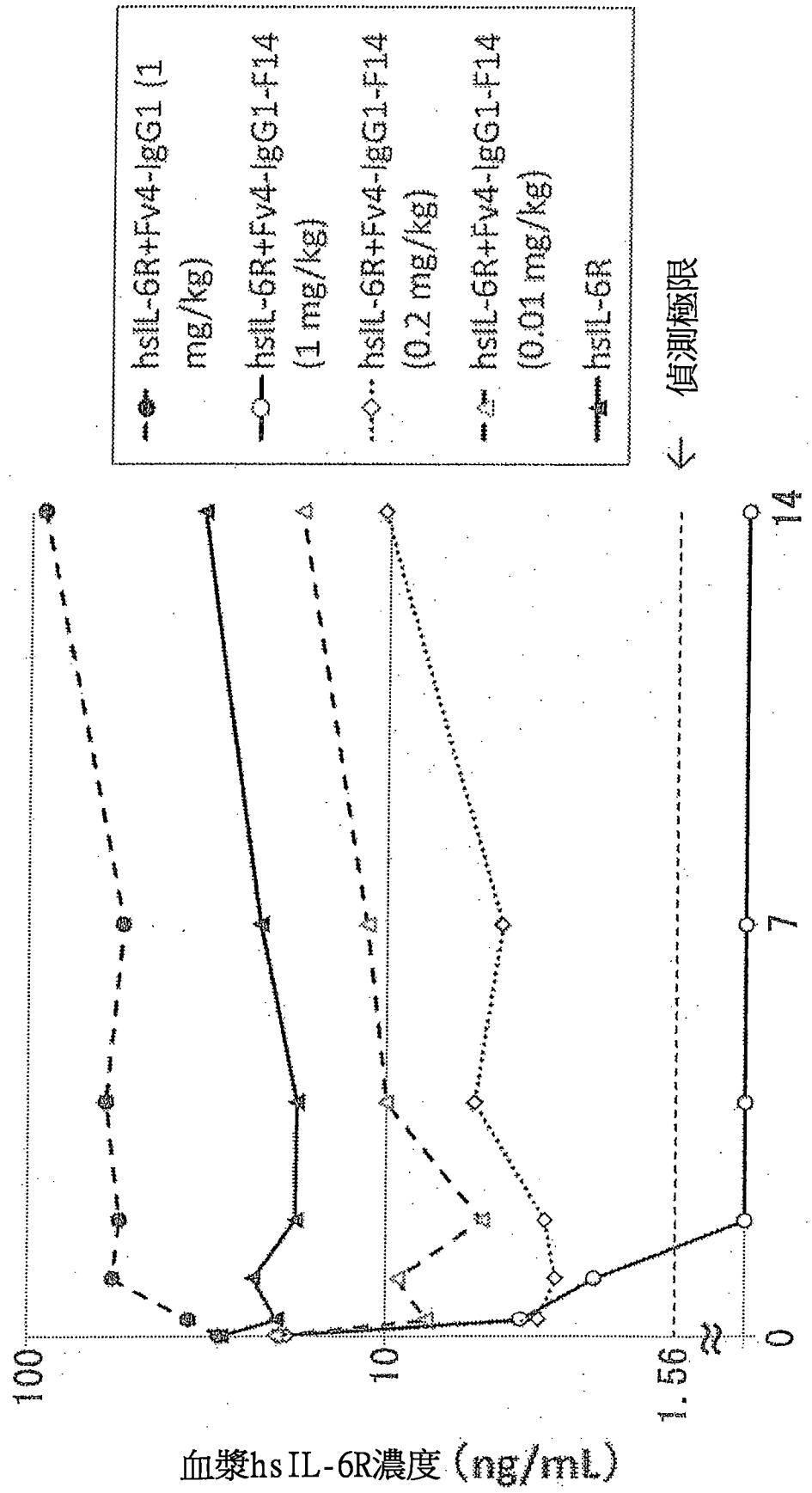
第15圖


Fv4-IgG1
Fv4-M73
Fv4-IgG1-v1
Fv4-IgG1-v2
Fv4-IgG1-F14
Fv4-IgG1-F20
Fv4-IgG1-F21
Fv4-IgG1-F25
Fv4-IgG1-F29
Fv4-IgG1-F35
Fv4-IgG1-F48
Fv4-IgG1-F93
Fv4-IgG1-F94
1
0.1
0.01
0.001
0
1
2
3
4
時間(天)
抗原/抗體莫耳比（C值）

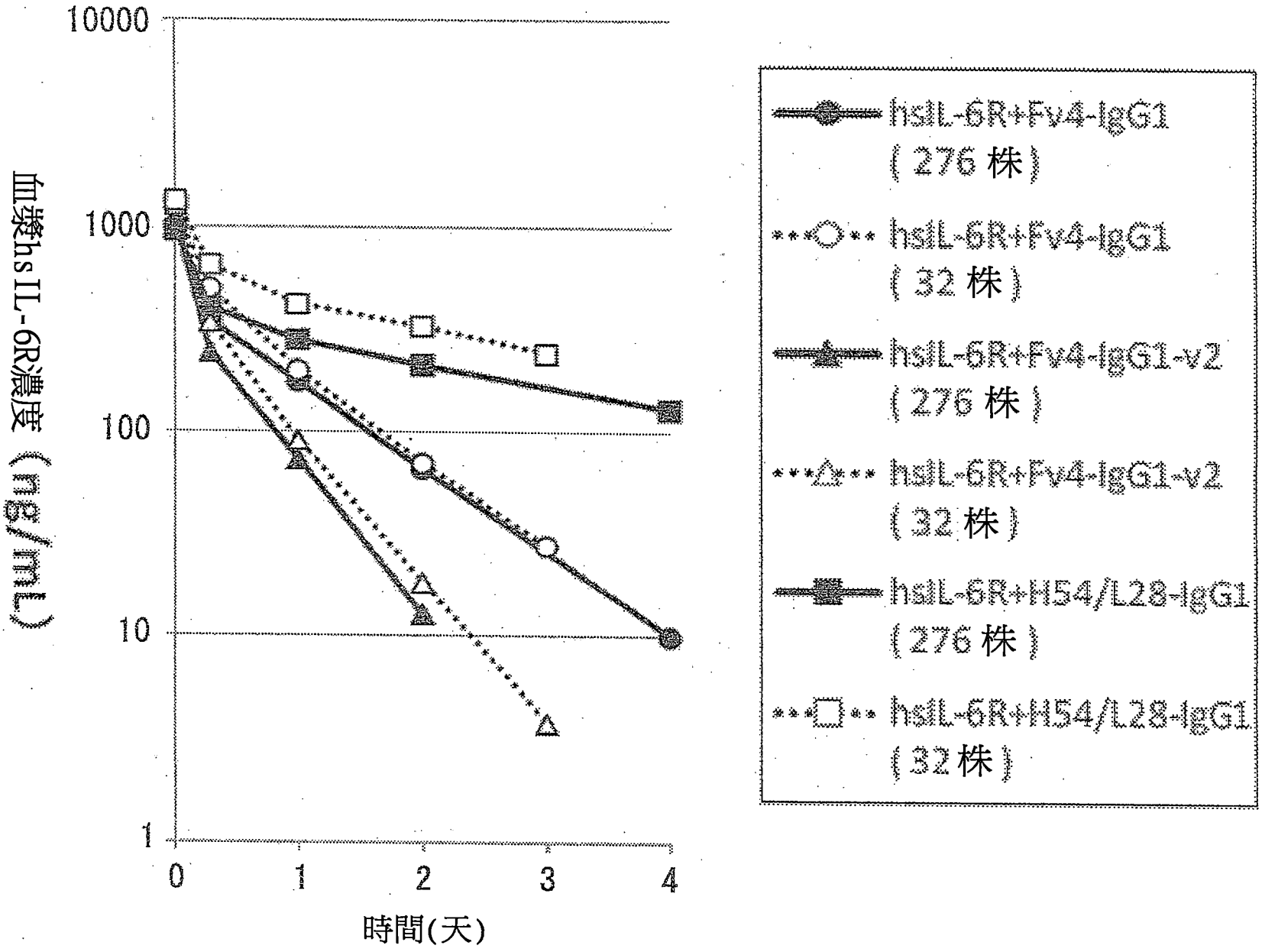
第16圖


Fv4-IgG1
Fv4-M73
Fv4-IgG1-v1
Fv4-IgG1-v2
Fv4-IgG1-F14
Fv4-IgG1-F20
Fv4-IgG1-F21
Fv4-IgG1-F25
Fv4-IgG1-F29
Fv4-IgG1-F35
Fv4-IgG1-F48
Fv4-IgG1-F93
Fv4-IgG1-F94
擬合曲線
1
0.1
0.01
0.001
1.0E-03 1.0E-04 1.0E-05 1.0E-06 1.0E-07 1.0E-08 1.0E-09
pH7.0 時的 KD (M)
3.0 μM
抗原/抗體莫耳比 (C值)

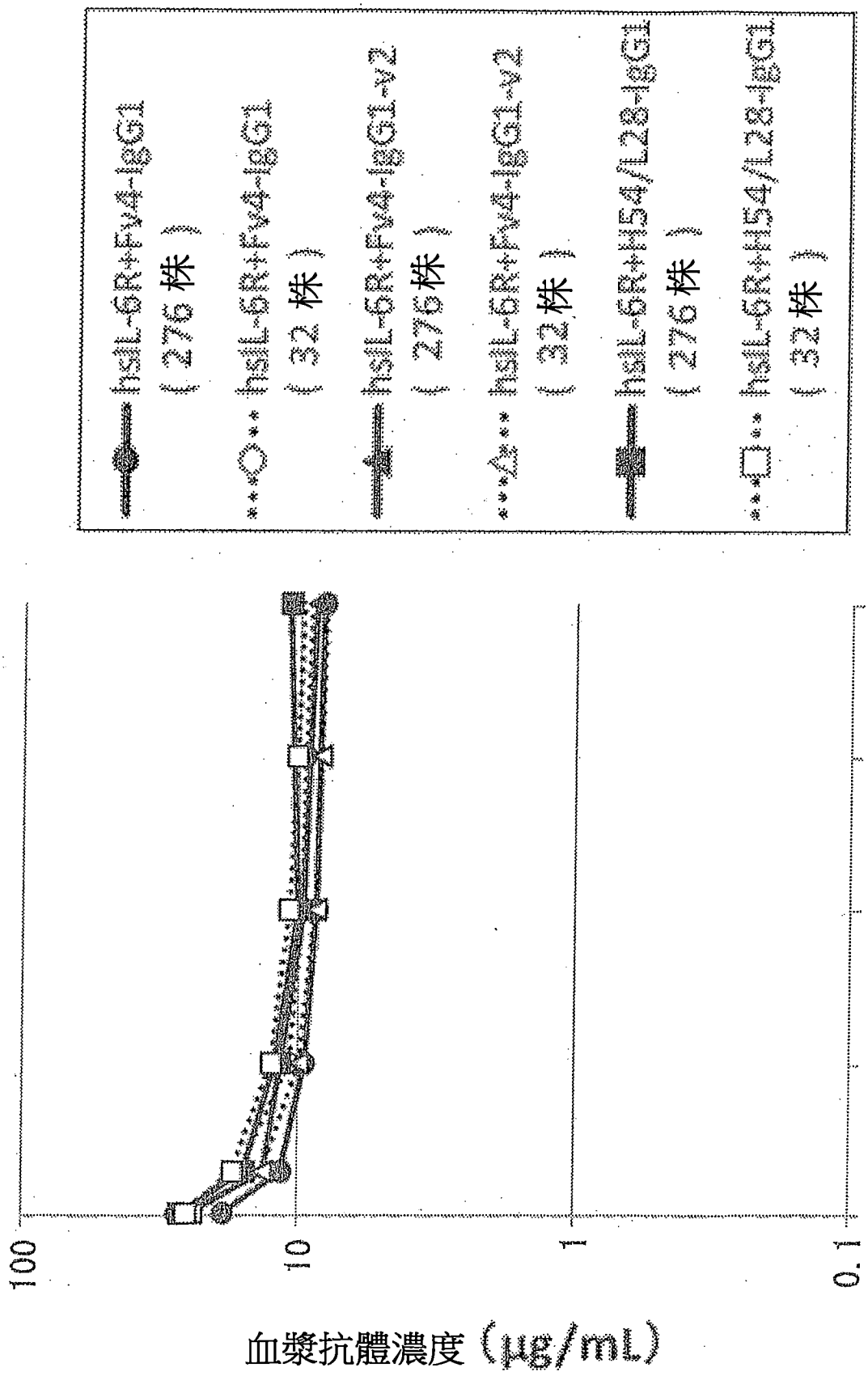
第17圖


hsIL-6R+Fv4-IgG1 (1 mg/kg)
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F14 (1 mg/kg)
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F14 (0.2 mg/kg)
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F14 (0.01 mg/kg)
hsIL-6R
偵測極限
100
10
1.56
0
7
14
時間(天)
血漿hsIL-6R濃度（ng/mL）

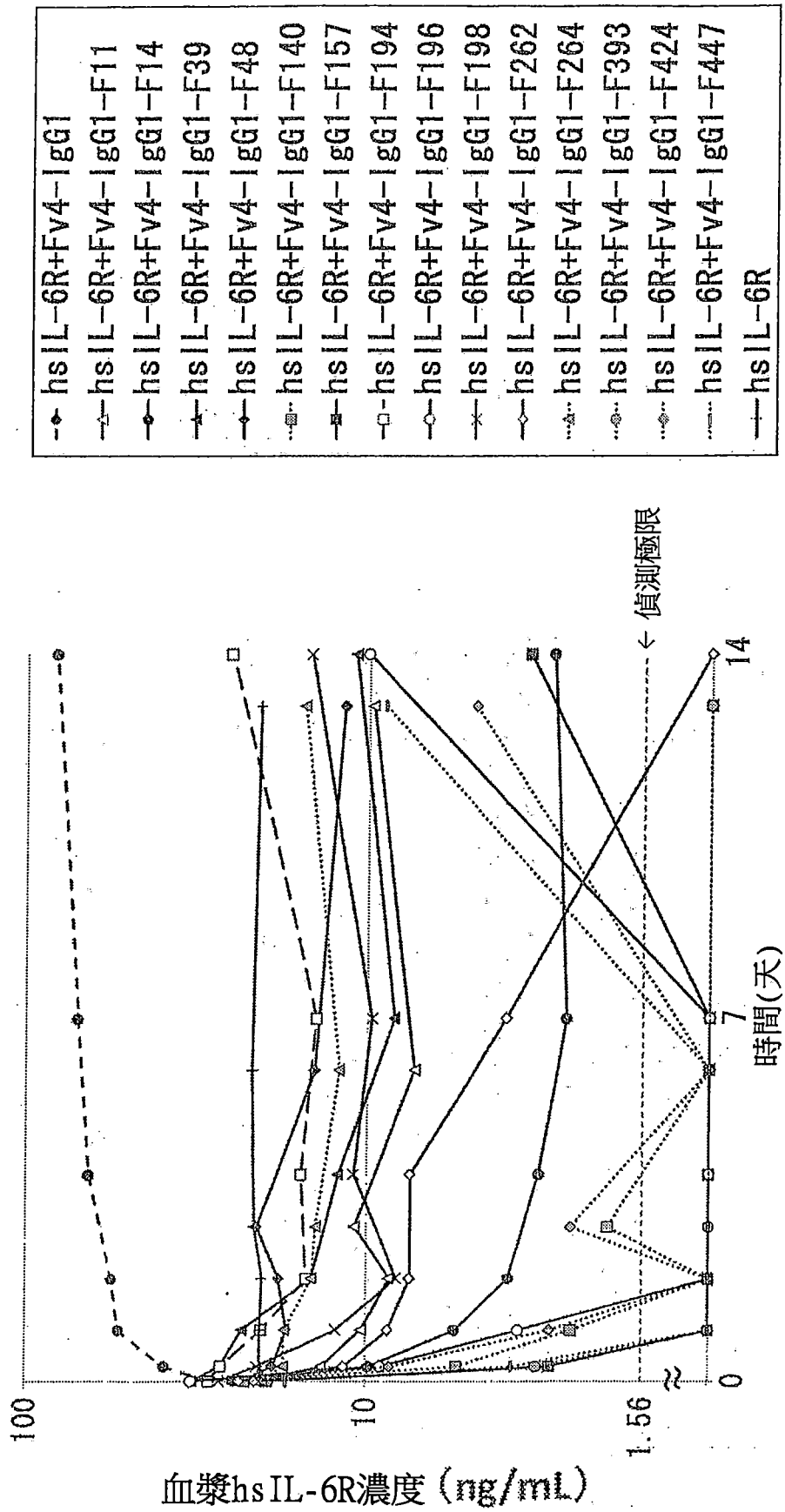
第18圖


10000
1000
100
10
1
0
1
2
3
4
血漿hsIL-6R濃度（ng/mL）
時間(天)
hsIL-6R+Fv4-IgG1
（276株）
hsIL-6R+Fv4-IgG1
（32株）
hsIL-6R+Fv4-IgG1-v2
（276株）
hsIL-6R+Fv4-IgG1-v2
（32株）
hsIL-6R+H54/L28-IgG1
（276株）
hsIL-6R+H54/L28-IgG1
（32株）

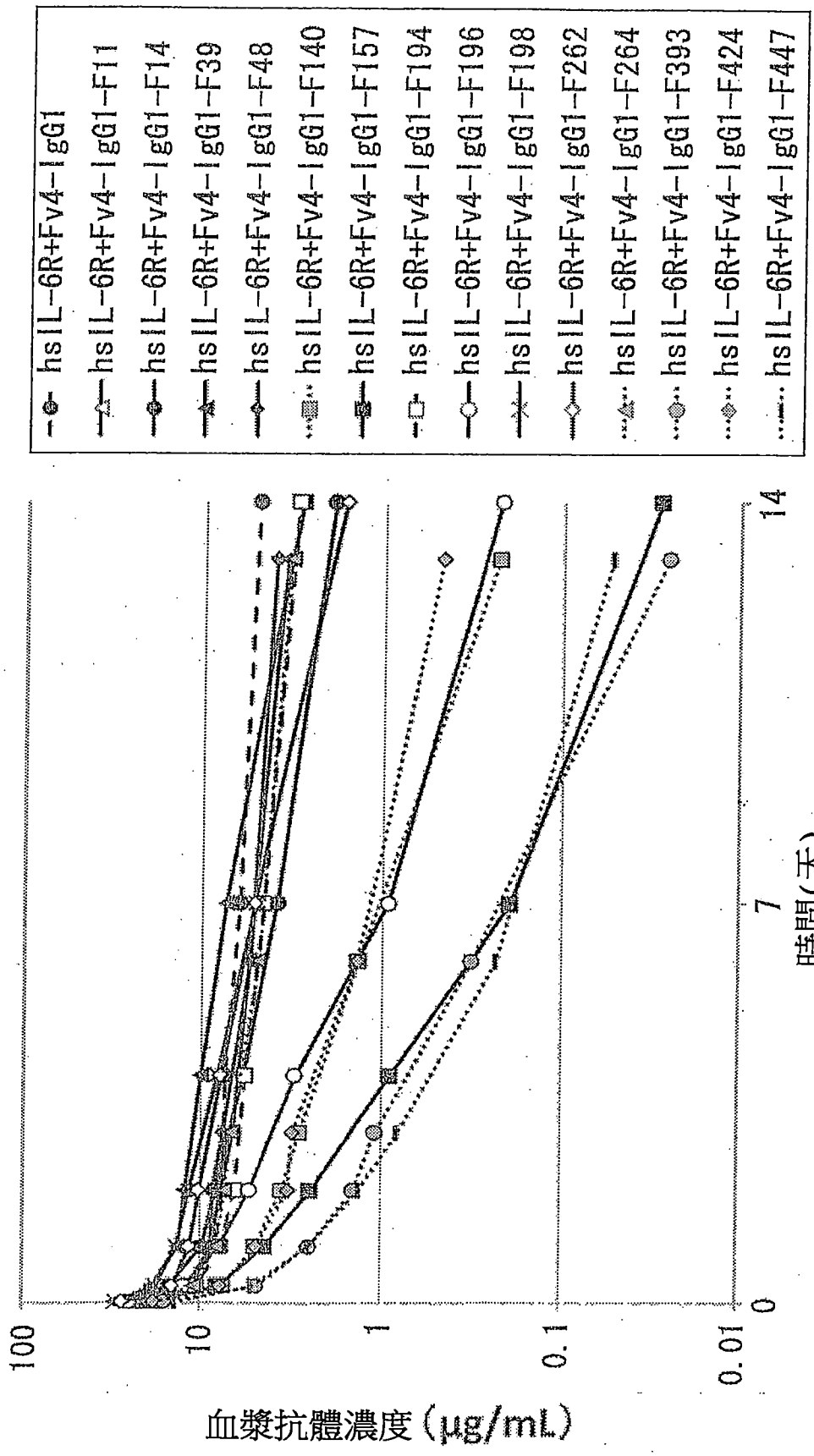
第19圖


hsIL-6R+Fv4-IgG1
(276 株)
hsIL-6R+Fv4-IgG1
(32 株)
hsIL-6R+Fv4-IgG1-v2
(276 株)
hsIL-6R+Fv4-IgG1-v2
(32 株)
hsIL-6R+H54/L28-IgG1
(276 株)
hsIL-6R+H54/L28-IgG1
(32 株)
100
10
1
0.1
0
1
2
3
4
血漿抗體濃度 (μg/mL)
時間(天)

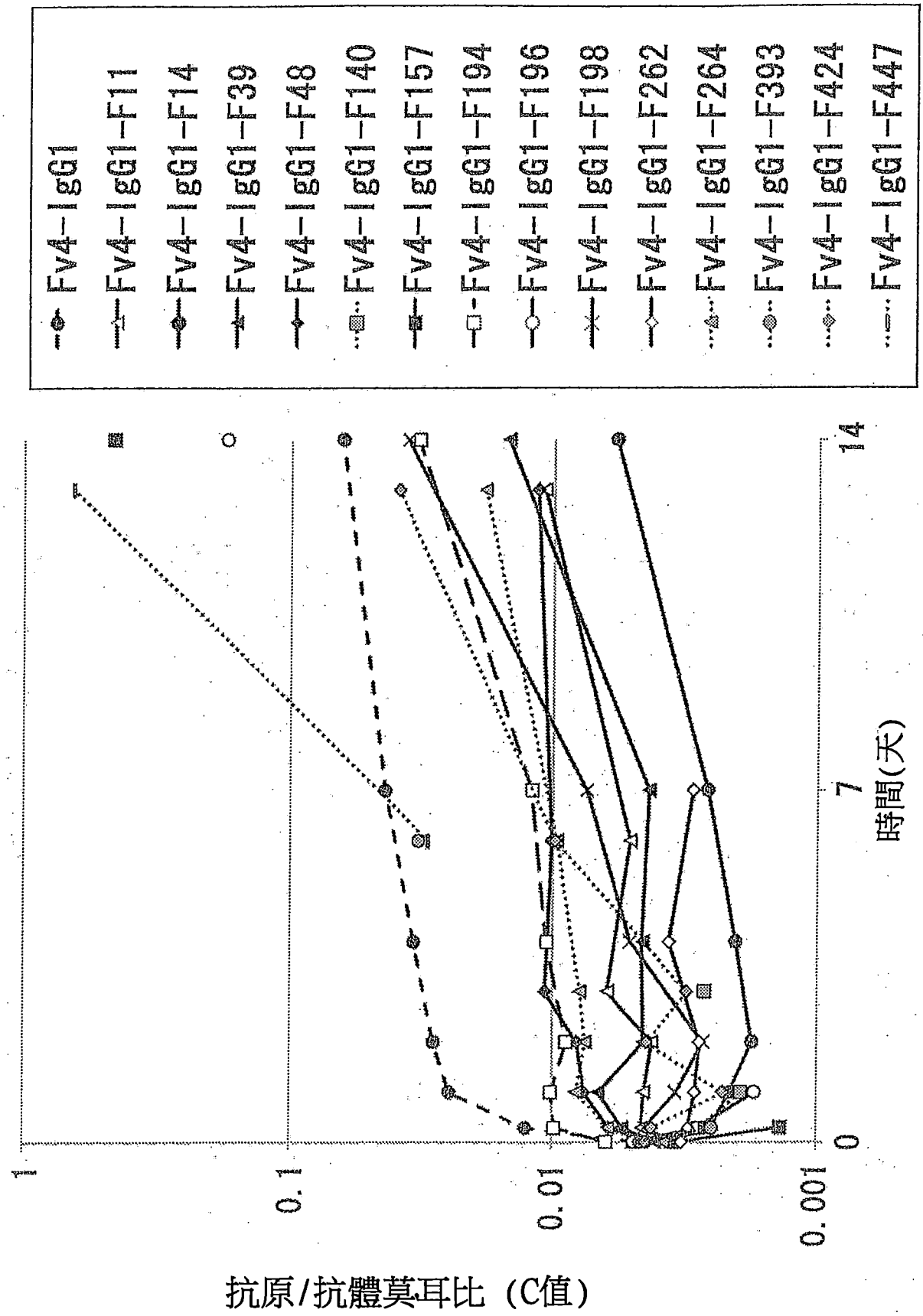
第20圖


hsIL-6R+Fv4-IgG1
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F11
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F14
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F39
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F48
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F140
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F157
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F194
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F196
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F198
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F262
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F264
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F393
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F424
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F447
hsIL-6R
偵測極限
血漿hsIL-6R濃度（ng/mL）
100
10
1.56
0
7
14
時間(天)

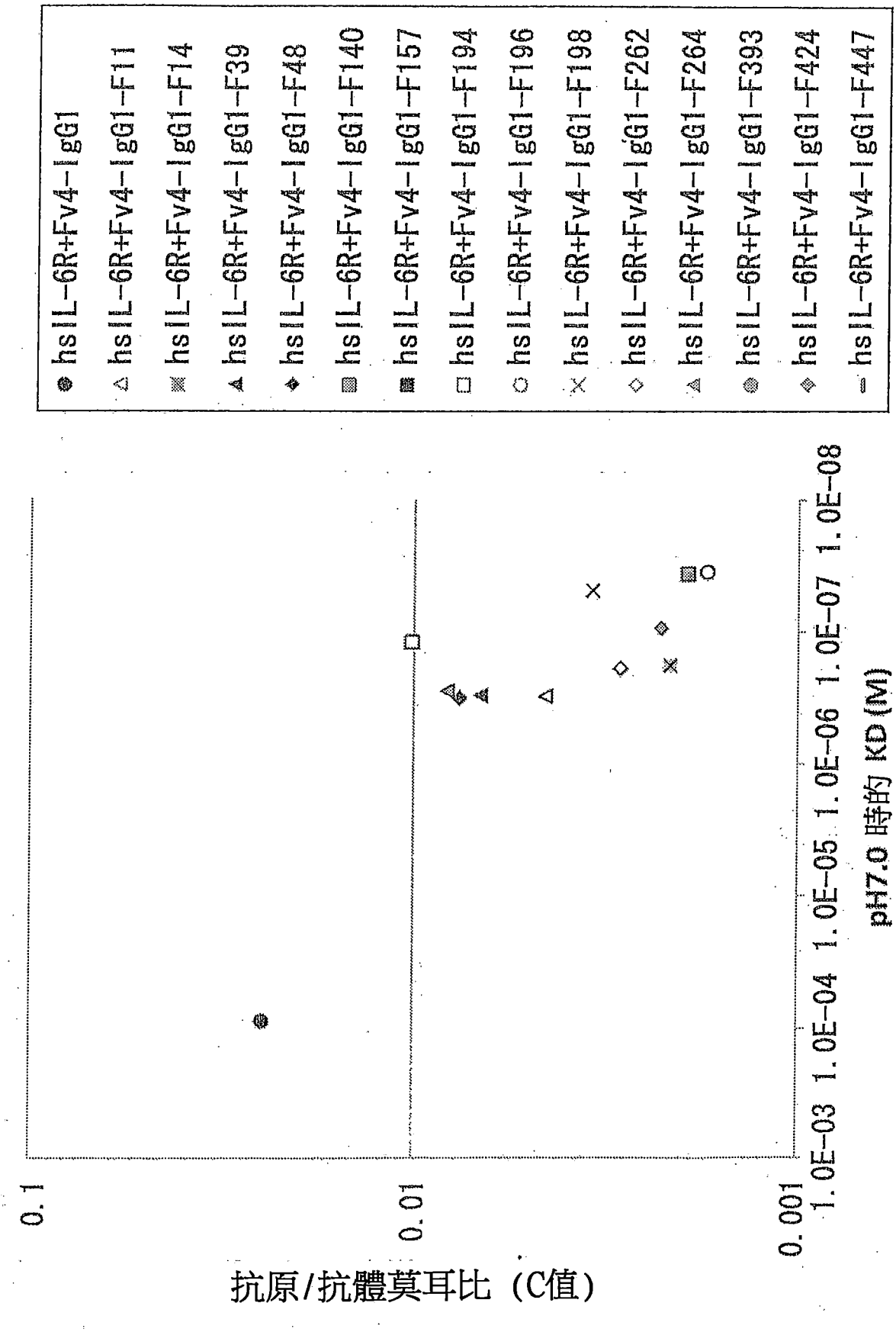
第21圖


hsIL-6R+Fv4-IgG1
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F11
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F14
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F39
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F48
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F140
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F157
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F194
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F196
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F198
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F262
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F264
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F393
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F424
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F447
100
10
1
0.1
0.01
0
7
14
時間(天)
血漿抗體濃度（μg/mL）

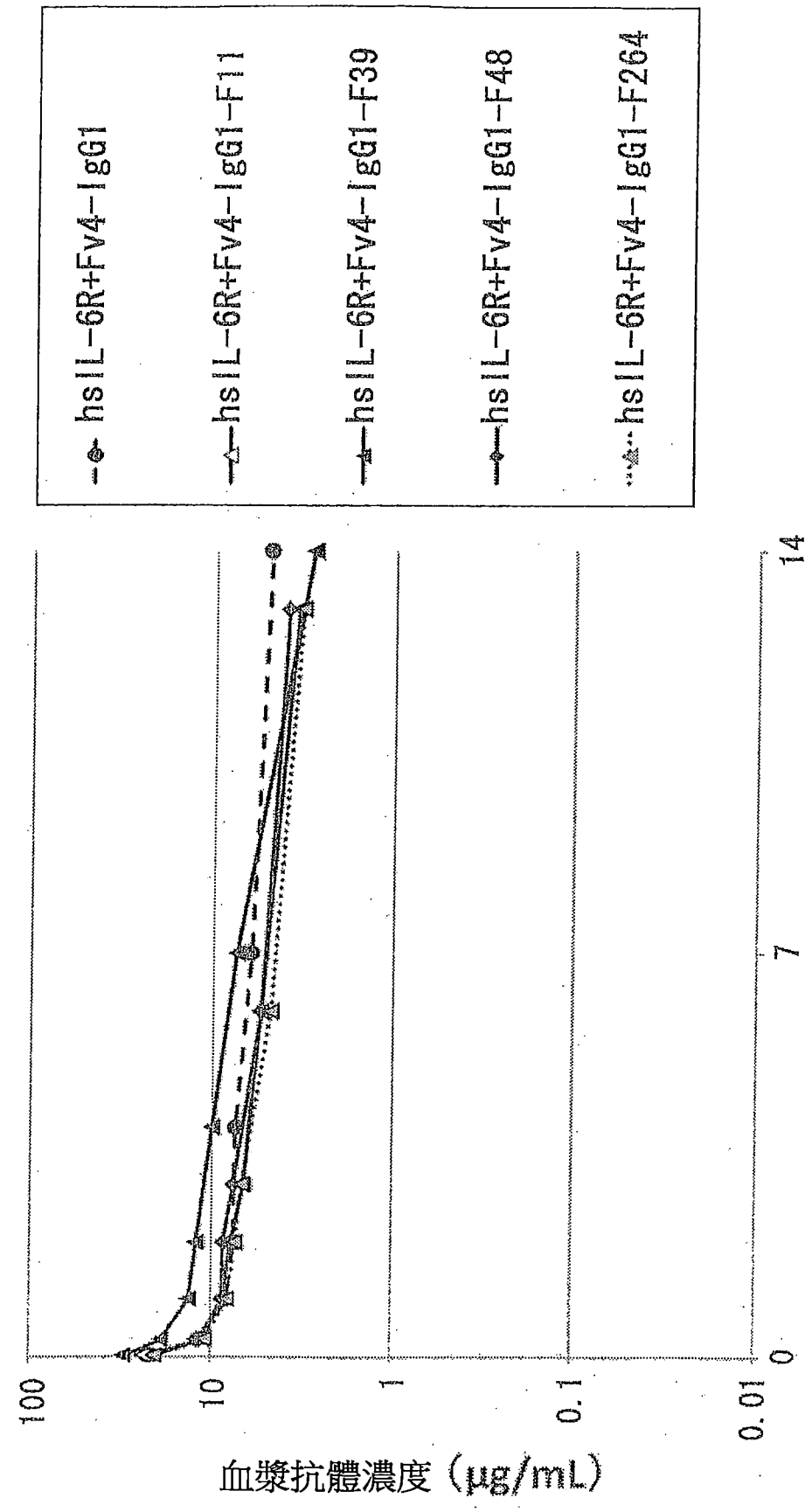
第22圖


Fv4-IgG1
Fv4-IgG1-F11
Fv4-IgG1-F14
Fv4-IgG1-F39
Fv4-IgG1-F48
Fv4-IgG1-F140
Fv4-IgG1-F157
Fv4-IgG1-F194
Fv4-IgG1-F196
Fv4-IgG1-F198
Fv4-IgG1-F262
Fv4-IgG1-F264
Fv4-IgG1-F393
Fv4-IgG1-F424
Fv4-IgG1-F447
1
0.1
0.01
0.001
0
7
14
時間(天)
抗原/抗體莫耳比（C值）

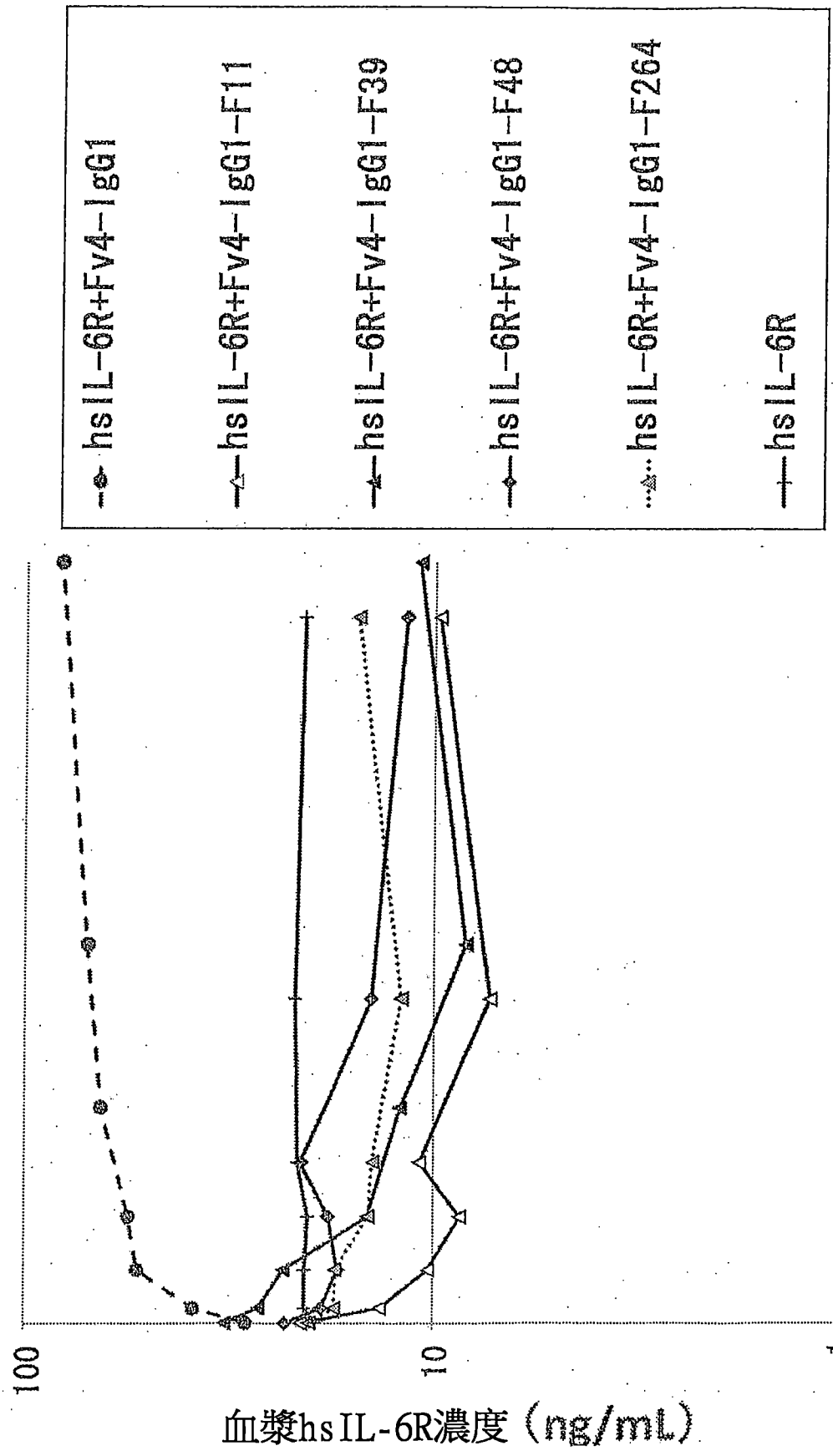
第23圖


hsIL-6R+Fv4-IgG1
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F11
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F14
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F39
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F48
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F140
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F157
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F194
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F196
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F198
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F262
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F264
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F393
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F424
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F447
0.1
0.01
0.001
抗原/抗體莫耳比（C值）
1.0E-03
1.0E-04
1.0E-05
1.0E-06
1.0E-07
1.0E-08
pH7.0 時的 KD (M)

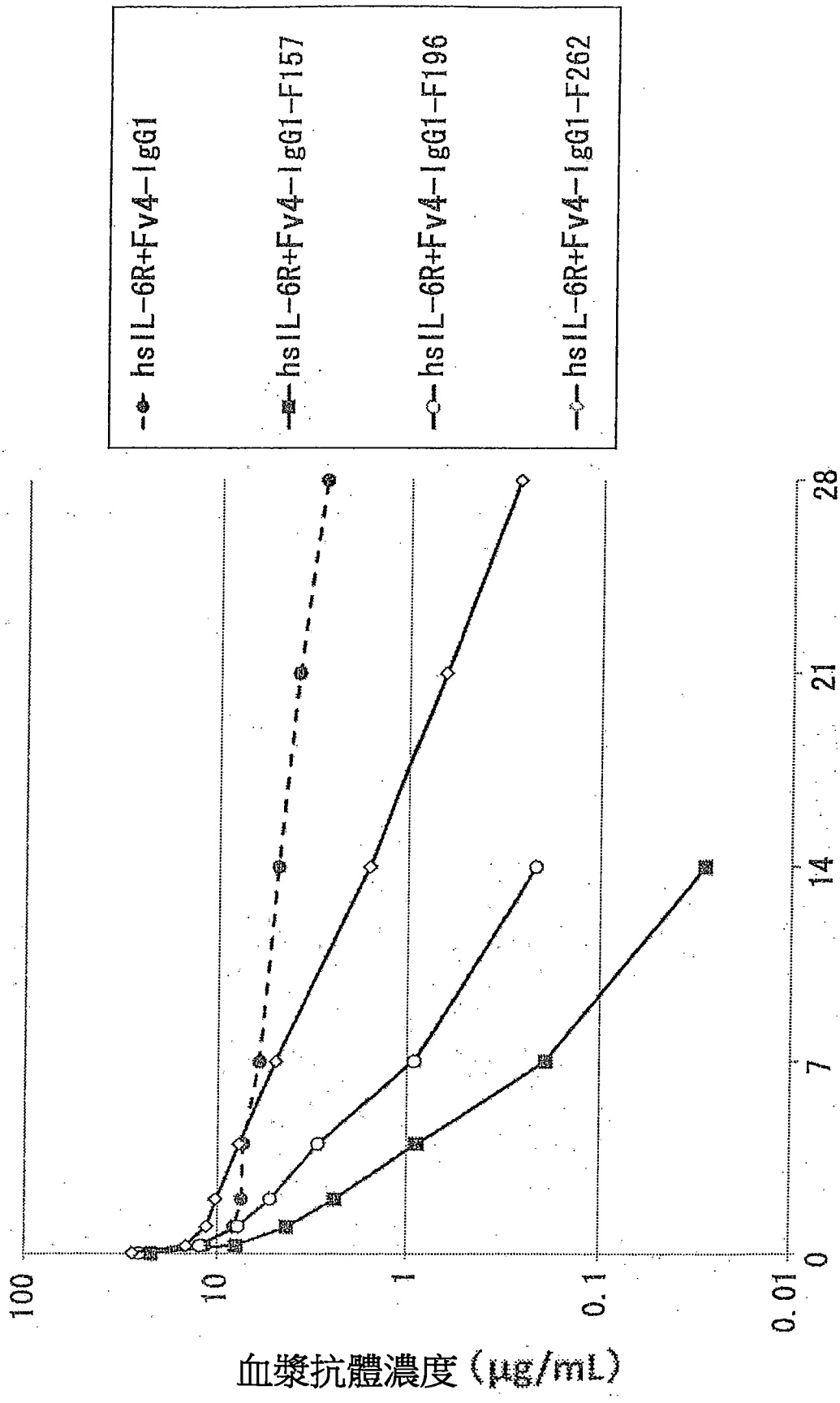
第24圖


hsIL-6R+Fv4-IgG1
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F11
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F39
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F48
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F264
100
10
1
0.1
0.01
0
7
14
時間(天)
血漿抗體濃度（μg/mL）

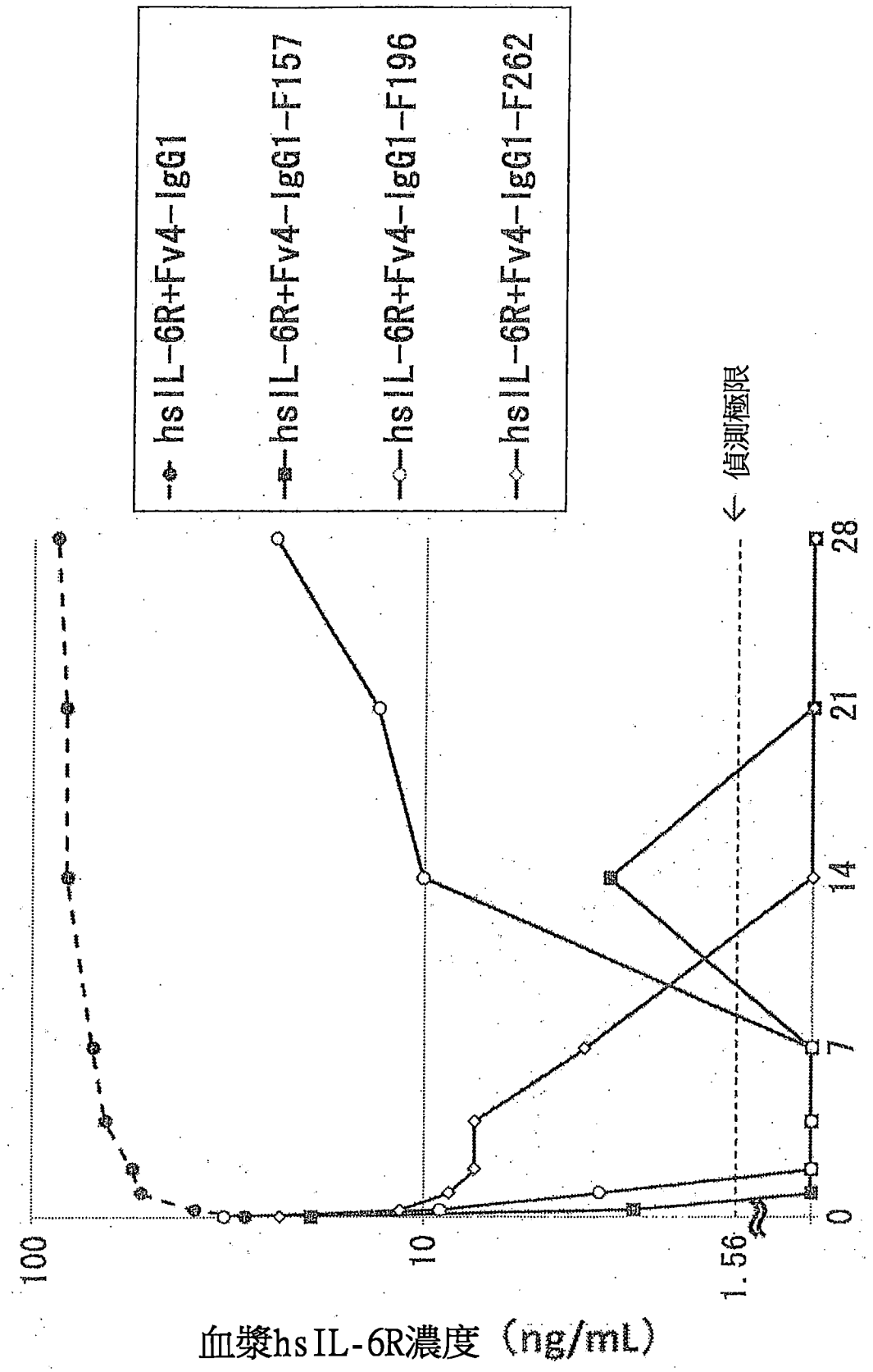
第25圖


hsIL-6R+Fv4-IgG1
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F11
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F39
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F48
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F264
hsIL-6R
血漿hsIL-6R濃度（ng/mL）
100
10
1
0
7
14
時間(天)

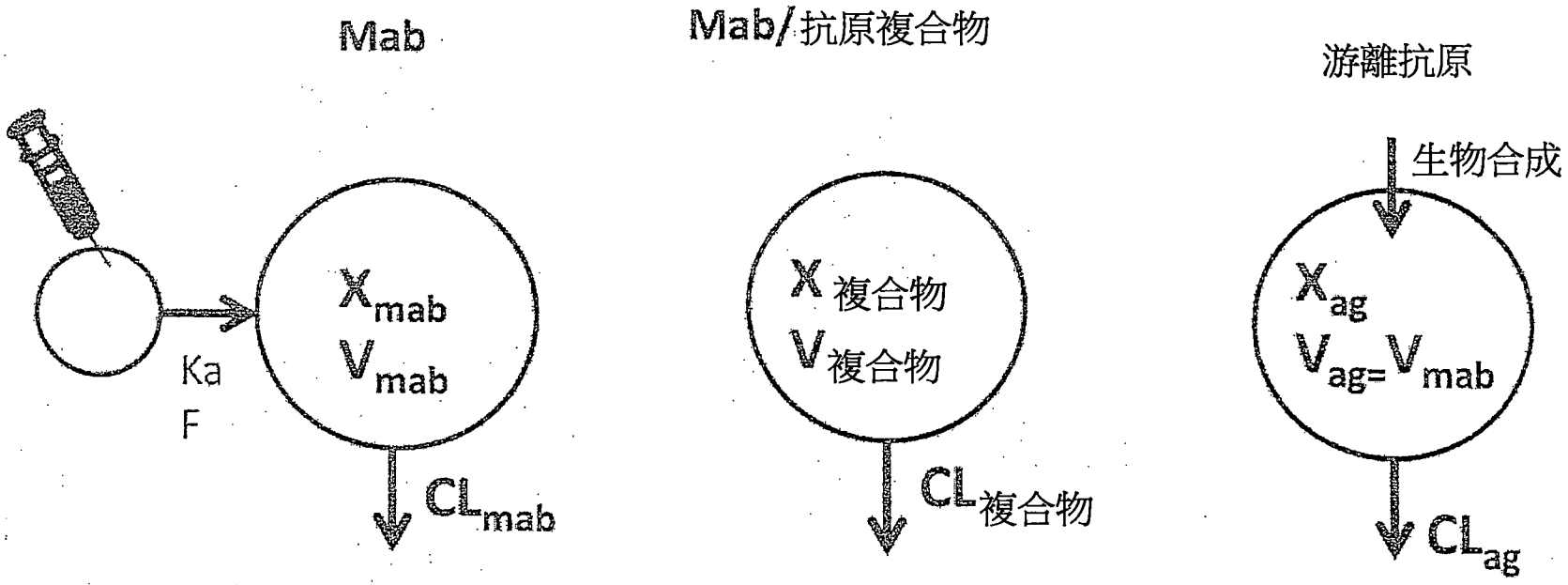
第26圖


hsIL-6R+Fv4-IgG1
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F157
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F196
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F262
100
10
1
0.1
0.01
0
7
14
21
28
時間(天)
血漿抗體濃度（μg/mL）

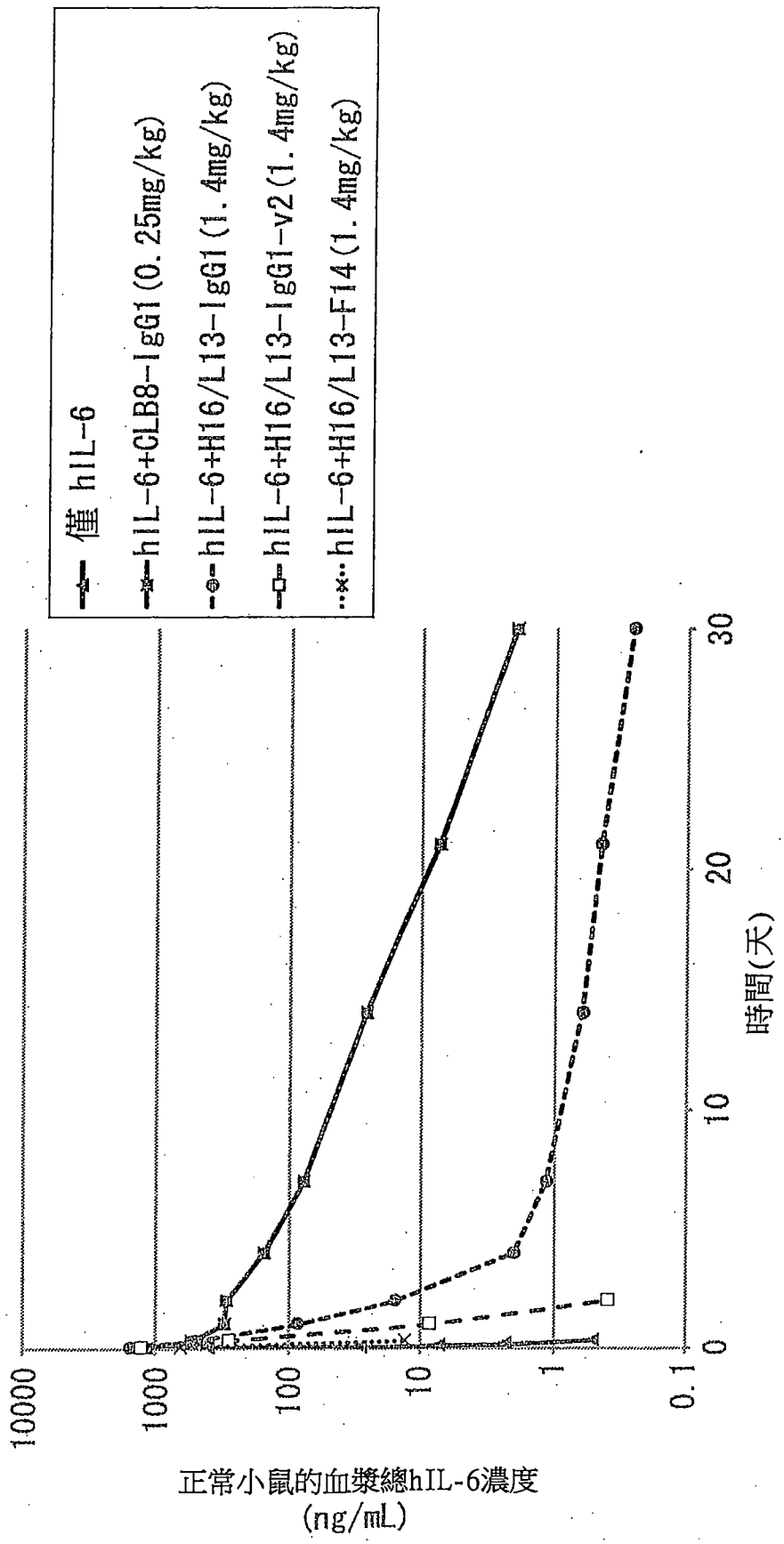
第27圖


hsIL-6R+Fv4-IgG1
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F157
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F196
hsIL-6R+Fv4-IgG1-F262
← 偵測極限
100
10
1.56
0
7
14
21
28
血漿hsIL-6R濃度（ng/mL）
時間(天)

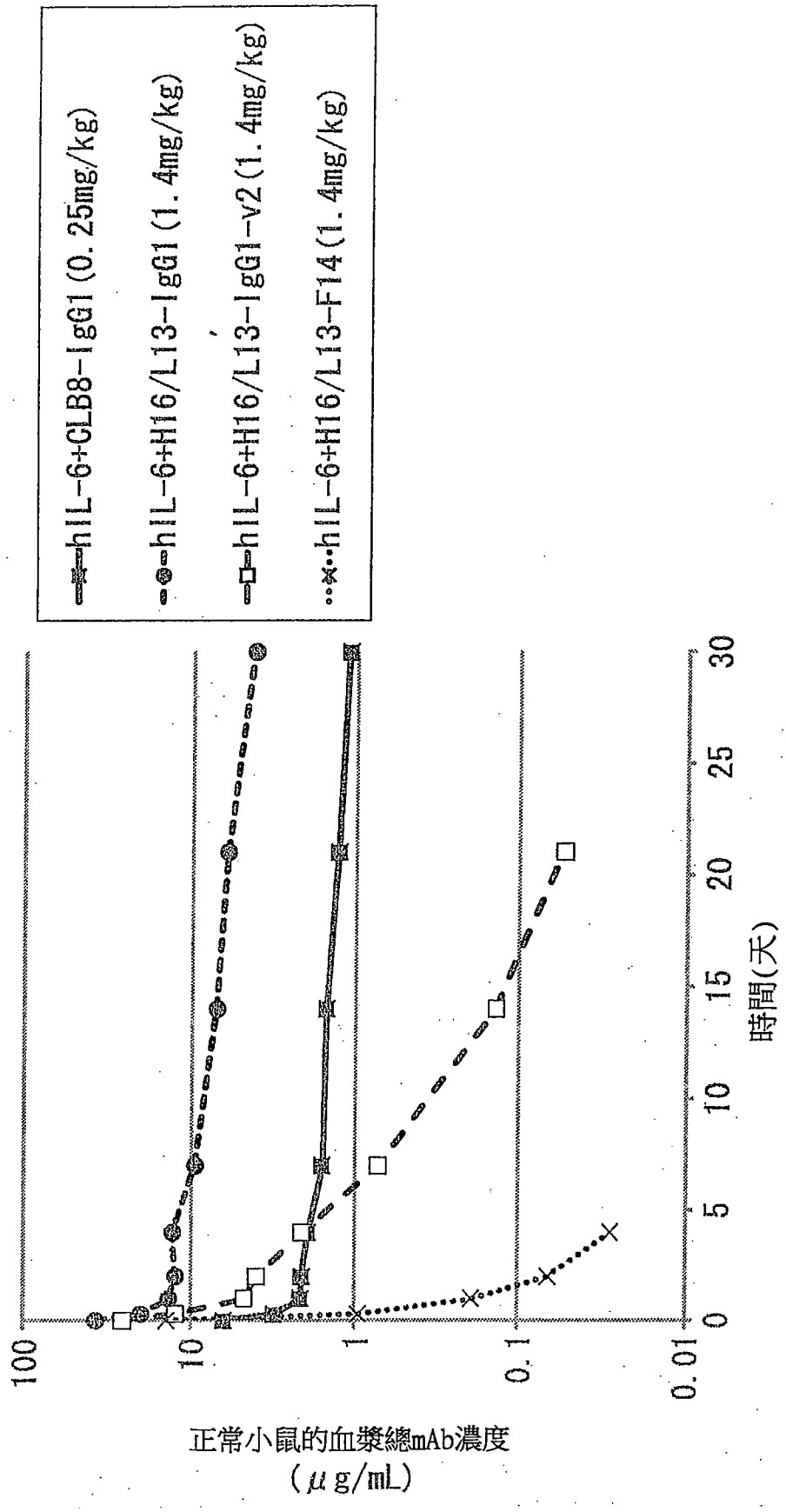
第28圖


Mab
Mab/抗原複合物
游離抗原
Ka
F
X_{mab}
V_{mab}
CL_{mab}
$X_{複合物}$
$V_{複合物}$
$CL_{複合物}$
生物合成
X_{ag}
$V_{ag}=V_{mab}$
CL_{ag}

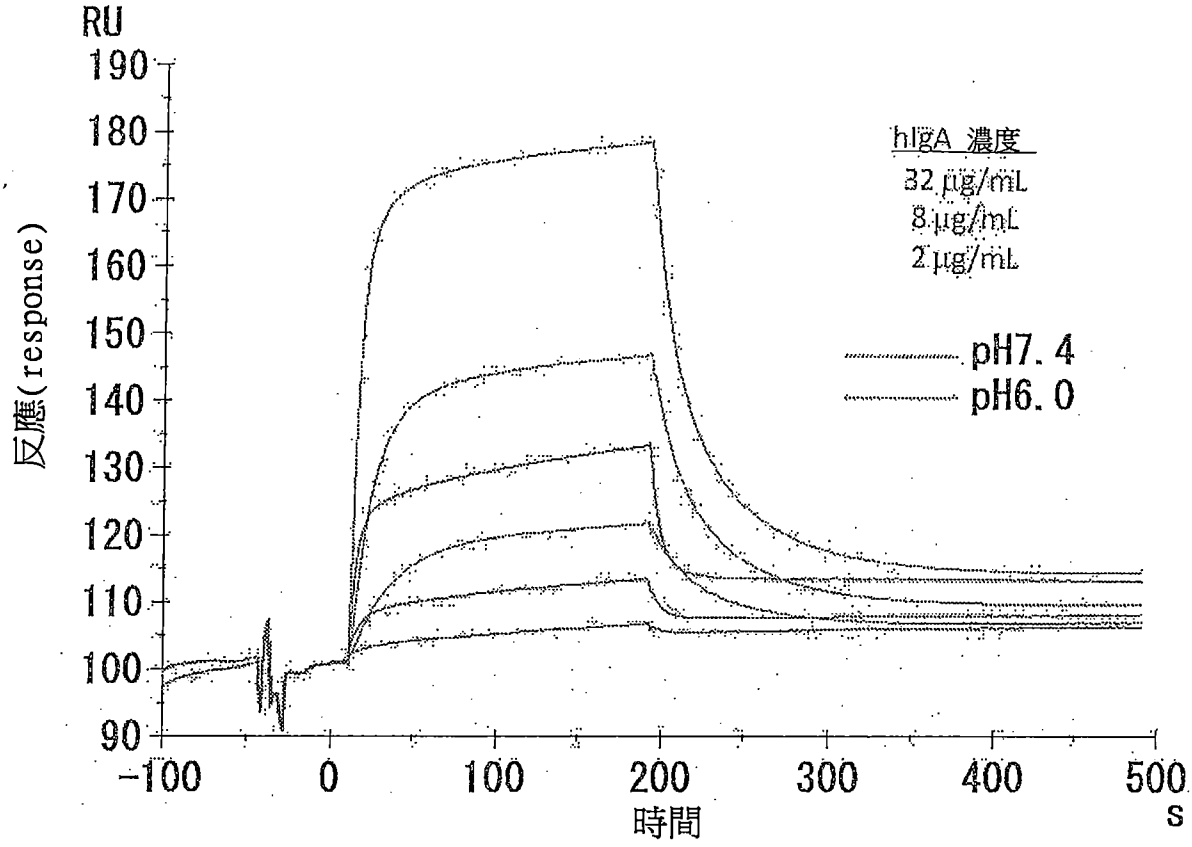
第29圖


僅 hIL-6
hIL-6+CLB8-IgG1(0.25mg/kg)
hIL-6+H16/L13-IgG1(1.4mg/kg)
hIL-6+H16/L13-IgG1-v2(1.4mg/kg)
hIL-6+H16/L13-F14(1.4mg/kg)
10000
1000
100
10
1
0.1
0
10
20
30
時間(天)
正常小鼠的血漿總hIL-6濃度
(ng/mL)

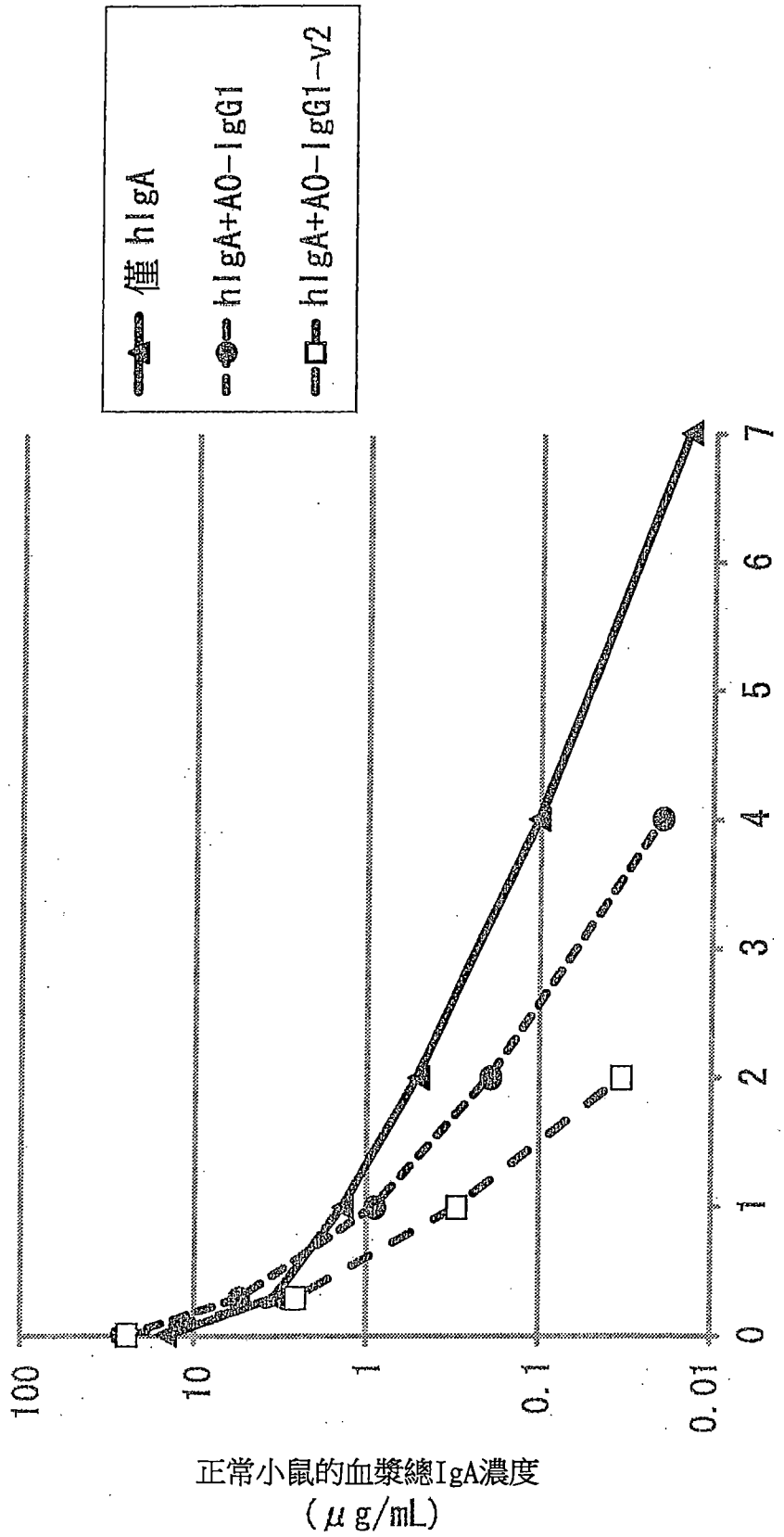
第30圖


hIL-6+CLB8-IgG1 (0.25mg/kg)
hIL-6+H16/L13-IgG1 (1.4mg/kg)
hIL-6+H16/L13-IgG1-v2 (1.4mg/kg)
hIL-6+H16/L13-F14 (1.4mg/kg)
100
10
1
0.1
0.01
0
5
10
15
20
25
30
時間(天)
正常小鼠的血漿總mAb濃度
(μg/mL)

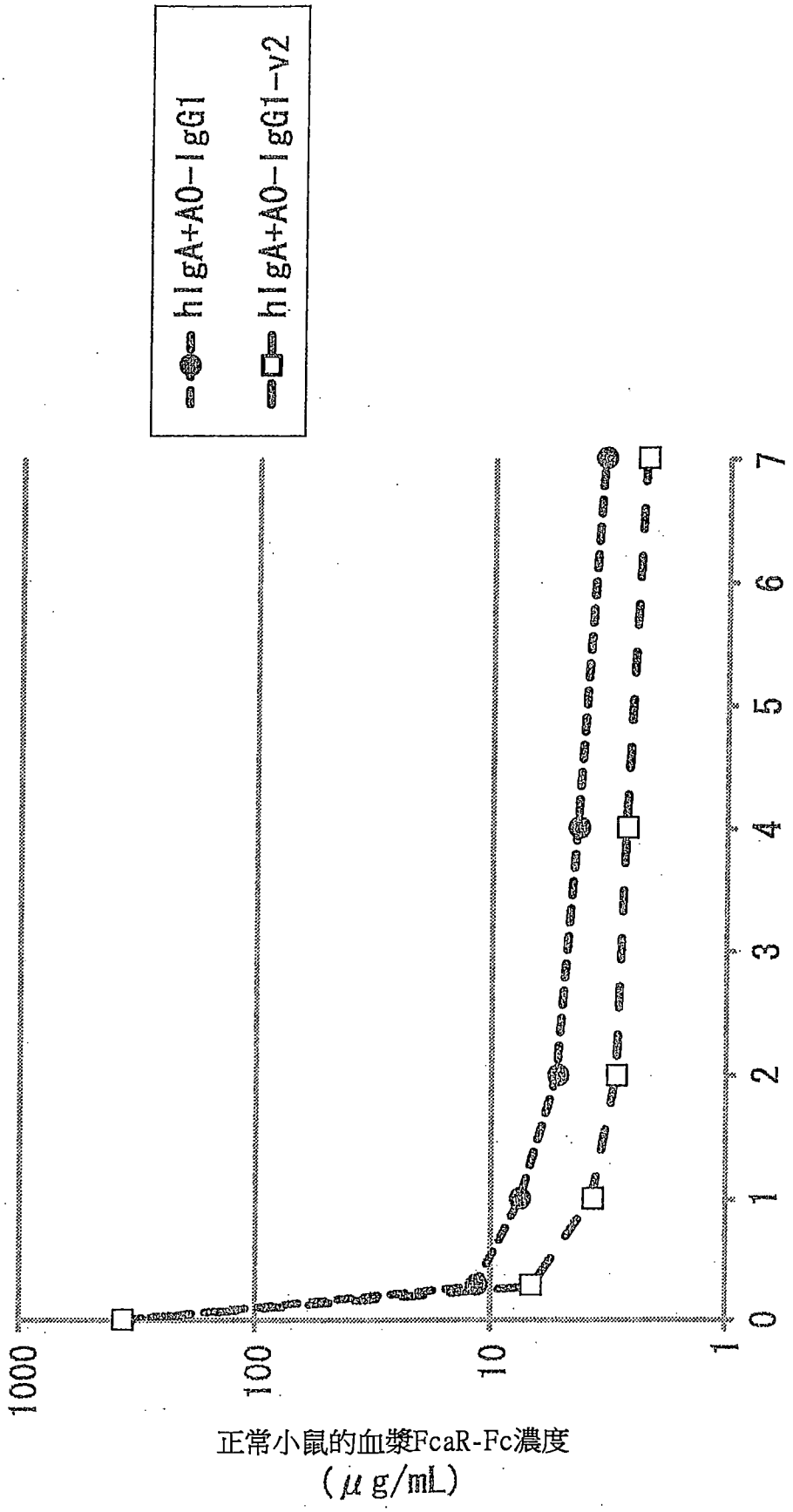
第31圖


RU
190
180
170
160
150
140
130
120
110
100
90
反應(response)
-100
0
100
200
300
400
500
時間
s
hIgA 濃度
32 μg/mL
8 μg/mL
2 μg/mL
pH7.4
pH6.0

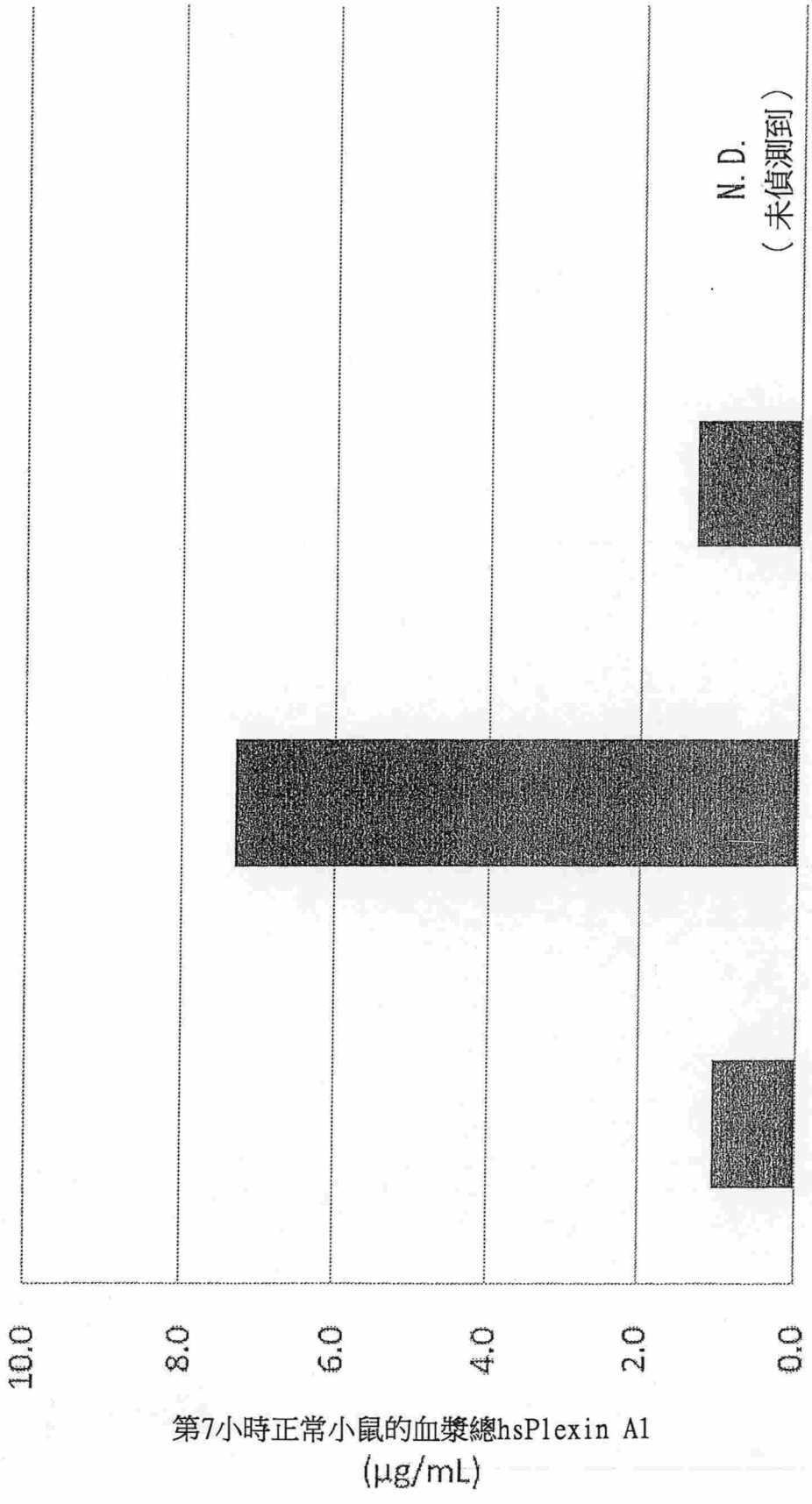
第32圖


僅 hIgA
hIgA+AO-IgG1
hIgA+AO-IgG1-v2
100
10
1
0.1
0.01
0
1
2
3
4
5
6
7
時間(天)
正常小鼠的血漿總IgA濃度
(μg/mL)

第33圖


hIgA+AO-IgG1
hIgA+AO-IgG1-v2
1000
100
10
1
0
1
2
3
4
5
6
7
時間(天)
正常小鼠的血漿FcaR-Fc濃度
(μg/mL)

第34圖


10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
第7小時正常小鼠的血漿總hsPlexin A1
(μg/mL)
hsPlexin A1
hsPlexin A1+PX268-lgG1
hsPlexin A1+PX141-lgG1
N. D.
（未偵測到）
hsPlexin A1+PX141-lgG1-v2

第35圖