(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103958547 B
(45)授权公告日 2018.08.03

(21)申请号 201280058760.7

(22)申请日 2012.09.28

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103958547 A

(43)申请公布日 2014.07.30

(30)优先权数据
2011-218736 2011.09.30 JP (续)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.05.29

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2012/006218 2012.09.28

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2013/046704 EN 2013.04.04

(73)专利权人 中外制药株式会社
地址 日本东京都

(72)发明人 井川智之 前田敦彦 味元风太 仓持太一

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021
代理人 柳春琦

(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)

(56)对比文件
CN 1763097 A,2006.04.26,
CN 101098890 A,2008.01.02,
DALL"ACQUA W F ET AL.Properties of human IgG1s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc receptor (FcRn).《JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY》.2006,第281卷(第33期),23514-23524.
CARLOS VACCARO ET AL.Engineering the Fc region of immunoglobulin G to modulate in vivo antibody levels.《NATURE BIOTECHNOLOGY》.2005,第23卷(第10期),1283-1288.
PETKOVA STEFKA B ET AL.Enhanced half-life of genetically engineered human IgG1 antibodies in a humanized FcRn mouse model: potential application in humorally mediated autoimmune disease.《INTERNATIONAL IMMUNOLOGY》.2006,第18卷(第12期),1759-1769. (续)

审查员 王慧

权利要求书18页 说明书162页
序列表51页 附图111页

(54)发明名称

具有促进抗原清除的FcRn结合结构域的治疗性抗原结合分子

(57)摘要

本发明提供:在中性pH下对新生儿Fc受体(FcRn)的亲和力提高的修饰的FcRn结合结构域;包含所述FcRn结合结构域的抗原结合分子,其具有低免疫原性、高稳定性并且仅形成少数聚集体;在中性或酸性pH下具有提高的FcRn结合活性而在中性pH下对预存抗药抗体的结合活性又不提高的修饰抗原结合分子;抗原结合分子用于改进抗原结合分子介导的细胞对抗原的摄入的用途;抗原结合分子用于降低血浆特定抗原浓度的用途;修饰的FcRn结合结构域用于增加单个抗原结合分子在其降解前可结合的抗原的总数的用途;修饰的FcRn结合结构域用于改进抗原结合分子的药代动力学的用途;用于降低对预存抗药抗体的结合活性的方法;和用于产生所述抗原结合分子的方法。

CN 103958547 B

[转续页]

[接上页]

(30)优先权数据

PCT/JP2012/058603 2012.03.30 JP
2012-123781 2012.05.30 JP
2012-123782 2012.05.30 JP
2012-123773 2012.05.30 JP
2012-139211 2012.06.20 JP
2012-177311 2012.08.09 JP

(56)对比文件

SHIELDS R L ET AL.High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R.《JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY》.2001,第276卷(第9期),6591-6604.

ROOPENIAN DERRY C ET AL.FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age.《NATURE REVIEWS》.2007,第7卷(第9期),715-725.

1.一种包含修饰的人IgG Fc区的抗原结合分子，其中所述修饰的人IgG Fc区在EU440位置上包含用谷氨酸、天冬氨酸或谷氨酰胺的氨基酸取代，其中与包含完整人IgG Fc区的抗原结合分子的结合亲和力相比，所述抗原结合分子在中性pH下对预存抗药抗体(ADA)的结合亲和力不显著提高。

2.权利要求1的抗原结合分子，其中所述预存抗药抗体是类风湿因子。

3.权利要求1的抗原结合分子，其中所述修饰的人IgG Fc区包含氨基酸取代，其中所述氨基酸取代是以下组合之一：

1	EU438R/EU440E
2	EU438R/EU440D
3	EU438K/EU440E
4	EU438K/EU440D

。

4.权利要求1的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子另外在中性或酸性pH范围内对FcRn的结合亲和力提高。

5.权利要求4的抗原结合分子，其中所述修饰的人IgG Fc区包含以下氨基酸取代：

i)a)EU438R/EU440E和

ii)a)N434H;b)M252Y/S254T/T256E;c)M428L/N434S;或d)T250Q和M428L(EU编号)。

6.权利要求4的抗原结合分子，其中所述修饰的人IgG Fc区包含3个或更多个氨基酸取代，其中所述3个或更多个取代是以下组合之一

1	EU252Y/EU254T/EU256E/EU438R/EU440E
2	EU428L/EU434S/EU438R/EU440E
3	EU434H/EU438R/EU440E
4	N434Y/Y436V/Q438R/S440E
5	N434Y/Y436V/Q438R/S440D
6	N434Y/Y436V/Q438K/S440E

7	N434Y/Y436V/Q438K/S440D
8	H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
9	H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
10	H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
11	H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
12	N434Y/Y436T/Q438R/S440E
13	N434Y/Y436T/Q438R/S440D
14	N434Y/Y436T/Q438K/S440E
15	N434Y/Y436T/Q438K/S440D
16	H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
17	H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440D
18	H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
19	H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440D

。

7.权利要求4的抗原结合分子，其中所述修饰的人IgG Fc区包含三个或更多个氨基酸取代，其中所述三个或更多个氨基酸取代是以下组合之一：

1	M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
2	M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
3	M252Y/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
4	M252Y/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
5	M252Y/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
6	M252Y/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
7	M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
8	M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
9	M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
10	M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
11	M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
12	M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
13	M252Y/S254T/T256E/T307Q/Q311A/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
14	M252Y/S254T/T256EN308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
15	M252Y/H433D/N434W/Y436V/Q438R/S440E
16	M252Y/H433D/N434W/Y436V/Q438K/S440E
17	M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
18	M252Y/S254T/T256B/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
19	M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
20	M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
21	M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
22	M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
23	M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
24	M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
25	M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
26	M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
27	M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
28	M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
29	M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
30	M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
31	M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
32	M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
33	M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
34	M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D

35	M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
36	M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
37	M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
38	M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
39	M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
40	M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
41	M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
42	M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
43	M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
44	M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
45	M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
46	M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
47	M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
48	M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
49	M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
50	M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
51	M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
52	M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
53	M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
54	M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
55	M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
56	M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
57	L235R/G236R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
58	L235R/G236R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
59	EU238D/EU252Y/EU434Y/EU436V/EU440E
60	EU252Y/EU434Y/EU436V/EU440E
61	EU252Y/EU434Y/EU436V/EU438R/EU440E
62	EU252Y/EU434Y/EU436V/EU440D
63	EU252Y/EU434Y/EU436V/EU440Q
64	EU252Y/EU434Y/EU436V/EU438R/EU440D
65	EU252Y/EU434Y/EU436V/EU438K/EU440E
66	EU252Y/EU434Y/EU436V/EU438K/EU440D

。

8.权利要求4的抗原结合分子，其中所述修饰的人IgG Fc区包含3个或更多个氨基酸取代，其中所述3个或更多个取代是以下组合之一

1	L235R/S239K/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
2	L235R/S239K/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
3	L235R/S239K/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
4	L235R/S239K/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
5	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
6	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
7	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
8	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
9	L235R/S239K/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
10	L235R/S239K/N434Y/Y436T/Q438R/S440D
11	L235R/S239K/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
12	L235R/S239K/N434Y/Y436T/Q438K/S440D
13	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
14	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440D
15	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
16	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440D

。

9.权利要求4的抗原结合分子，其中所述修饰的人IgG Fc区包含3个或更多个氨基酸取代，其中所述3个或更多个氨基酸取代是以下组合之一

1	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
2	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
3	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
4	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
5	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
6	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
7	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
8	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
9	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
10	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
11	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
12	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
13	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/T307Q/Q311A/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
14	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
15	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434W/Y436V/Q438R/S440E
16	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434W/Y436V/Q438K/S440E
17	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
18	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
19	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
20	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
21	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
22	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E

23	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
24	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
25	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
26	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
27	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
28	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
29	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/P258D/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
30	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
31	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/P258D/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
32	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
33	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
34	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
35	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
36	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
37	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
38	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
39	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
40	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438R/S440E

41	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
42	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
43	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
44	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
45	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
46	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
47	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
48	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
49	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
50	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
51	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
52	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
53	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
54	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
55	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
56	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
57	L235R/G236R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
58	L235R/G236R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E

。

10.一种用于降低包含人IgG Fc区的抗原结合分子对预存ADA的结合活性的方法，所述IgG Fc区在中性或酸性pH下对FcRn的结合活性提高且在中性pH下对预存ADA的结合活性提高，所述方法包括以下步骤：

a)提供具有在中性或酸性pH下对人FcRn的结合活性提高且在中性pH下对预存ADA的结合活性提高的IgG Fc区的抗原结合分子；和

b)在EU440位置上用谷氨酸、天冬氨酸或谷氨酰胺取代人IgG Fc区中的氨基酸，得到具有修饰的人IgG Fc区的抗原结合分子。

11.权利要求10的方法,其中步骤b)包括将氨基酸取代引入人IgG Fc区中,所述氨基酸取代为以下组合之一

1	EU438R/EU440E
2	EU438R/EU440D
3	EU438K/EU440E
4	EU438K/EU440D

。

12.一种用于增加单个抗原结合分子可结合的抗原总数而与亲本抗体相比又不显著提高在中性pH下对预存ADA的结合活性的方法,所述方法包括以下步骤:

a)提供包含亲本人IgG Fc区的抗原结合分子,

b)通过引入以下取代或组合之一来改变步骤a)的亲本人IgG Fc区:

1	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU286
2	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU308
3	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU286/EU308
4	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU428
5	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU308/EU428
6	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU250/EU428
7	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU250/EU308
8	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU250/EU286/EU308
9	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU250/EU286/EU308/EU428
10	EU252/EU434/EU307/EU311/EU286
11	EU252/EU434/EU307/EU311/EU286/EU254
12	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436
13	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU254
14	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU250
15	EU252/EU434/EU308/EU250
16	EU252/EU434/EU308/EU250/EU436
17	EU252/EU434/EU308/EU250/EU307/EU311
18	EU252/EU315/EU434
19	EU252/EU434/EU436
20	EU252/EU254/EU434/EU436
21	EU307/EU311/EU434
22	EU307/EU309/EU311/EU434
23	EU307/EU309/EU311/EU434
24	EU250/EU252/EU434/EU436

;

和

c)通过引入以下取代或组合之一来改变步骤b)的修饰的人IgG Fc区:

1	EU438R/EU440E
2	EU438R/EU440D
3	EU438K/EU440E
4	EU438K/EU440D

。

13.一种用于促进以抗原结合的形式摄入细胞中的不含抗原的抗原结合分子在胞外释放而与亲本抗体相比又不显著提高所述抗原结合分子在中性pH下对预存ADA的结合活性的方法,所述方法包括以下步骤:

a)提供包含亲本人IgG Fc区的抗原结合分子,

b)通过引入以下取代或组合之一来改变步骤a)的亲本人IgG Fc区：

1	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU286
2	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU308
3	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU286/EU308
4	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU428
5	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU308/EU428
6	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU250/EU428
7	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU250/EU308
8	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU250/EU286/EU308
9	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU250/EU286/EU308/EU428
10	EU252/EU434/EU307/EU311/EU286
11	EU252/EU434/EU307/EU311/EU286/EU254
12	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436
13	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU254
14	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU250
15	EU252/EU434/EU308/EU250
16	EU252/EU434/EU308/EU250/EU436
17	EU252/EU434/EU308/EU250/EU307/EU311
18	EU252/EU315/EU434
19	EU252/EU434/EU436
20	EU252/EU254/EU434/EU436
21	EU307/EU311/EU434
22	EU307/EU309/EU311/EU434
23	EU307/EU309/EU311/EU434
24	EU250/EU252/EU434/EU436

；

和

c)通过引入以下取代或组合之一来改变步骤b)的修饰的人IgG Fc区：

1	EU438R/EU440E
2	EU438R/EU440D
3	EU438K/EU440E
4	EU438K/EU440D

。

14.一种用于提高抗原结合分子消除血浆抗原的能力而与亲本抗体相比又不显著提高在中性pH下对预存ADA的结合活性的方法，所述方法包括以下步骤：

a)提供包含亲本人IgG Fc区的抗原结合分子，

b)通过引入以下取代或组合之一来改变步骤a)的亲本人IgG Fc区：

1	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU286
2	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU308
3	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU286/EU308
4	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU428
5	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU308/EU428
6	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU250/EU428
7	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU250/EU308
8	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU250/EU286/EU308
9	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU250/EU286/EU308/EU428
10	EU252/EU434/EU307/EU311/EU286
11	EU252/EU434/EU307/EU311/EU286/EU254
12	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436
13	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU254
14	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU250
15	EU252/EU434/EU308/EU250
16	EU252/EU434/EU308/EU250/EU436
17	EU252/EU434/EU308/EU250/EU307/EU311
18	EU252/EU315/EU434
19	EU252/EU434/EU436
20	EU252/EU254/EU434/EU436
21	EU307/EU311/EU434
22	EU307/EU309/EU311/EU434
23	EU307/EU309/EU311/EU434
24	EU250/EU252/EU434/EU436

；

和

c)通过引入以下取代或组合之一来改变步骤b)的修饰的人IgG Fc区：

1	EU438R/EU440E
2	EU438R/EU440D
3	EU438K/EU440E
4	EU438K/EU440D

。

15.一种用于改进抗原结合分子的药代动力学而与亲本抗体相比又不显著提高在中性pH下对预存ADA的结合活性的方法，所述方法包括以下步骤：

a)提供包含亲本人IgG Fc区的抗原结合分子，

b)通过引入以下取代或组合之一来改变步骤a)的亲本人IgG Fc区：

1	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU286
2	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU308
3	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU286/EU308
4	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU428
5	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU308/EU428
6	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU250/EU428
7	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU250/EU308
8	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU250/EU286/EU308
9	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU250/EU286/EU308/EU428

10	EU252/EU434/EU307/EU311/EU286
11	EU252/EU434/EU307/EU311/EU286/EU254
12	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436
13	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU254
14	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU250
15	EU252/EU434/EU308/EU250
16	EU252/EU434/EU308/EU250/EU436
17	EU252/EU434/EU308/EU250/EU307/EU311
18	EU252/EU315/EU434
19	EU252/EU434/EU436
20	EU252/EU254/EU434/EU436
21	EU307/EU311/EU434
22	EU307/EU309/EU311/EU434
23	EU307/EU309/EU311/EU434
24	EU250/EU252/EU434/EU436

和

c)通过引入以下取代或组合之一来改变步骤b)的修饰的人IgG Fc区：

1	EU430R/EU440E
2	EU430R/EU440D
3	EU436K/EU440E
4	EU436K/EU440D

。

16.一种用于降低血浆总抗原浓度或血浆游离抗原浓度而与亲本抗体相比又不显著提高在中性pH下对预存ADA的结合活性的方法，所述方法包括以下步骤：

a)提供包含亲本人IgG Fc区的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子包含可结合所述抗原的抗原结合结构域，

b)通过引入以下取代或组合之一来改变步骤a)的亲本人IgG Fc区：

1	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU286
2	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU308
3	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU286/EU308
4	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU428
5	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU308/EU428
6	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU250/EU428
7	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU250/EU308
8	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU250/EU286/EU308
9	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU250/EU286/EU308/EU428
10	EU252/EU434/EU307/EU311/EU286
11	EU252/EU434/EU307/EU311/EU286/EU254
12	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436
13	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU254

14	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU250
15	EU252/EU434/EU308/EU250
16	EU252/EU434/EU308/EU250/EU436
17	EU252/EU434/EU308/EU250/EU307/EU311
18	EU252/EU315/EU434
19	EU252/EU434/EU436
20	EU252/EU254/EU434/EU436
21	EU307/EU311/EU434
22	EU307/EU309/EU311/EU434
23	EU307/EU309/EU311/EU434
24	EU250/EU252/EU434/EU436

和

c)通过引入以下取代或组合之一来改变步骤b)的修饰的人IgG Fc区：

1	EU438R/EU440E
2	EU438R/EU440D
3	EU438K/EU440E
4	EU438K/EU440D

。

17.一种包含修饰的人IgG Fc区的抗原结合分子，其中所述修饰的人IgG Fc区在EU440位置上包含谷氨酸、天冬氨酸或谷氨酰胺，其中与包含完整人IgG Fc区的抗原结合分子的结合亲和力相比，所述抗原结合分子在中性pH下对预存抗药抗体(ADA)的结合亲和力不显著提高。

18.权利要求17的抗原结合分子，其中所述修饰的人IgG Fc区包含以下氨基酸的组合的任一个

1	EU438R/EU440E
2	EU438R/EU440D
3	EU438K/EU440E
4	EU438K/EU440D

。

19.权利要求17的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子另外在中性或酸性pH范围内对FcRn的结合亲和力提高。

20.权利要求19的抗原结合分子，其中所述修饰的人IgG Fc区包含以下氨基酸：

i)a)EU438R/EU440E和

ii)a)EU434H;b)EU252Y/EU254T/EU256E;c)EU428L/EU434S;或d)EU250Q和EU428L。

21.权利要求19的抗原结合分子，其中所述修饰的人IgG Fc区包含以下氨基酸的组合的任一个：

1	EU252Y/EU254T/EU256E/EU438R/EU440E
2	EU428L/EU434S/EU438R/EU440E
3	EU434H/EU438R/EU440E
4	EU434Y/EU436V/EU438R/EU440E
5	EU434Y/EU436V/EU438R/EU440D
6	EU434Y/EU436V/EU438K/EU440E

7	EU434Y/EU436V/EU438K/EU440D
8	EU433D/EU434Y/EU436V/EU438R/EU440E
9	EU433D/EU434Y/EU436V/EU438R/EU440D
10	EU433D/EU434Y/EU436V/EU438K/EU440E
11	EU433D/EU434Y/EU436V/EU438K/EU440D
12	EU434Y/EU436T/EU438R/EU440E
13	EU434Y/EU436T/EU438R/EU440D
14	EU434Y/EU436T/EU438K/EU440E
15	EU434Y/EU436T/EU438K/EU440D
16	EU433D/EU434Y/EU436T/EU438R/EU440E
17	EU433D/EU434Y/EU436T/EU438R/EU440D
18	EU433D/EU434Y/EU436T/EU438K/EU440E
19	EU433D/EU434Y/EU436T/EU438K/EU440D

。

22.权利要求19的抗原结合分子，其中所述修饰的人IgG Fc区包含以下氨基酸的组合的任一个：

1	EU252Y/EU434Y/EU436V/EU438K/EU440E
2	EU252Y/EU434Y/EU436V/EU438R/EU440E
3	EU252Y/EU434Y/EU436T/EU438K/EU440E
4	EU252Y/EU434Y/EU436T/EU438R/EU440E
5	EU252Y/EU434Y/EU436F/EU438K/EU440E
6	EU252Y/EU434Y/EU436F/EU438R/EU440E
7	EU252Y/EU434Y/EU436V/EU438R/EU440D
8	EU252Y/EU434Y/EU436V/EU438K/EU440D
9	EU252Y/EU433D/EU434Y/EU436V/EU438R/EU440D
10	EU252Y/EU433D/EU434Y/EU436V/EU438K/EU440E
11	EU252Y/EU433D/EU434Y/EU436V/EU438R/EU440E
12	EU252Y/EU433D/EU434Y/EU436V/EU438K/EU440D
13	EU252Y/EU254T/EU256E/EU307Q/EU311A/EU433D/EU434Y/EU436V/EU438K/EU440E
14	EU252Y/EU254T/EU256E/EU308P/EU433D/EU434Y/EU436V/EU438K/EU440E
15	EU252Y/EU433D/EU434W/EU436V/EU438R/EU440E
16	EU252Y/EU433D/EU434W/EU436V/EU438K/EU440E
17	EU252Y/EU254T/EU256E/EU433D/EU434Y/EU436V/EU438K/EU440E
18	EU252Y/EU254T/EU256B/EU433D/EU434Y/EU436V/EU438R/EU440E
19	EU252Y/EU254T/EU256E/EU433D/EU434Y/EU436V/EU438K/EU440D
20	EU252Y/EU254T/EU256E/EU433D/EU434Y/EU436V/EU438R/EU440D
21	EU252Y/EU254T/EU256E/EU286E/EU433D/EU434Y/EU436V/EU438K/EU440E
22	EU252Y/EU254T/EU256E/EU286E/EU433D/EU434Y/EU436V/EU438R/EU440E
23	EU252Y/EU254T/EU256E/EU286E/EU433D/EU434Y/EU436V/EU438K/EU440D
24	EU252Y/EU254T/EU256E/EU286E/EU433D/EU434Y/EU436V/EU438R/EU440D
25	EU252Y/EU254T/EU255L/EU256E/EU433D/EU434Y/EU436V/EU438K/EU440E
26	EU252Y/EU254T/EU255L/EU256E/EU433D/EU434Y/EU436V/EU438R/EU440E

27	EU252Y/EU254T/EU255L/EU256E/EU433D/EU434Y/EU436V/EU438K/EU440D
28	EU252Y/EU254T/EU255L/EU256E/EU433D/EU434Y/EU436V/EU438R/EU440D
29	EU252Y/EU254T/EU255L/EU256E/EU258D/EU433D/EU434Y/EU436V/EU438R/EU440E
30	EU252Y/EU254T/EU255L/EU256E/EU258I/EU433D/EU434Y/EU436V/EU438R/EU440E
31	EU252Y/EU254T/EU255L/EU256E/EU258D/EU433D/EU434Y/EU436V/EU438K/EU440E
32	EU252Y/EU254T/EU255L/EU256E/EU258I/EU433D/EU434Y/EU436V/EU438K/EU440E
33	EU252Y/EU254T/EU255L/EU256E/EU258D/EU433D/EU434Y/EU436V/EU438K/EU440D
34	EU252Y/EU254T/EU255L/EU256E/EU258I/EU433D/EU434Y/EU436V/EU438K/EU440D
35	EU252Y/EU254T/EU255L/EU256E/EU258D/EU433D/EU434Y/EU436V/EU438R/EU440D
36	EU252Y/EU254T/EU255L/EU256E/EU258I/EU433D/EU434Y/EU436V/EU438R/EU440D
37	EU252Y/EU254T/EU256E/EU433A/EU434Y/EU436V/EU438R/EU440E
38	EU252Y/EU254T/EU256E/EU433K/EU434Y/EU436V/EU438R/EU440E
39	EU252Y/EU254T/EU256E/EU433P/EU434Y/EU436V/EU438R/EU440E
40	EU252Y/EU254T/EU256E/EU433R/EU434Y/EU436V/EU438R/EU440E
41	EU252Y/EU254T/EU256E/EU433S/EU434Y/EU436V/EU438R/EU440E
42	EU252Y/EU254T/EU256E/EU433A/EU434Y/EU436V/EU438K/EU440E
43	EU252Y/EU254T/EU256E/EU433A/EU434Y/EU436V/EU438R/EU440D
44	EU252Y/EU254T/EU256E/EU433A/EU434Y/EU436V/EU438K/EU440D
45	EU252Y/EU254T/EU256E/EU433K/EU434Y/EU436V/EU438K/EU440E
46	EU252Y/EU254T/EU256E/EU433K/EU434Y/EU436V/EU438R/EU440D
47	EU252Y/EU254T/EU256E/EU433K/EU434Y/EU436V/EU438K/EU440D
48	EU252Y/EU254T/EU256E/EU433P/EU434Y/EU436V/EU438K/EU440E
49	EU252Y/EU254T/EU256E/EU433P/EU434Y/EU436V/EU438R/EU440D
50	EU252Y/EU254T/EU256E/EU433P/EU434Y/EU436V/EU438K/EU440D
51	EU252Y/EU254T/EU256E/EU433R/EU434Y/EU436V/EU438K/EU440E
52	EU252Y/EU254T/EU256E/EU433R/EU434Y/EU436V/EU438R/EU440D
53	EU252Y/EU254T/EU256E/EU433R/EU434Y/EU436V/EU438K/EU440D
54	EU252Y/EU254T/EU256E/EU433S/EU434Y/EU436V/EU438K/EU440E
55	EU252Y/EU254T/EU256E/EU433S/EU434Y/EU436V/EU438R/EU440D
56	EU252Y/EU254T/EU256E/EU433S/EU434Y/EU436V/EU438K/EU440D
57	L235R/G236R/EU239K/EU252Y/EU254T/EU434Y/EU436V/EU438R/EU440E
58	L235R/G236R/EU239K/EU252Y/EU254T/EU256E/EU434Y/EU436V/EU438R/EU440E
59	EU238D/EU252Y/EU434Y/EU436V/EU440E
60	EU252Y/EU434Y/EU436V/EU440E
62	EU252Y/EU434Y/EU436V/EU440D
63	EU252Y/EU434Y/EU436V/EU440Q

。

23.权利要求19的抗原结合分子，其中所述修饰的人IgG Fc区包含以下氨基酸的组合的任一个：

1	EU235R/EU239K/EU434Y/EU436V/EU438R/EU440E
2	EU235R/EU239K/EU434Y/EU436V/EU438R/EU440D
3	EU235R/EU239K/EU434Y/EU436V/EU438K/EU440E
4	EU235R/EU239K/EU434Y/EU436V/EU438K/EU440D
5	EU235R/EU239K/EU433D/EU434Y/EU436V/EU438R/EU440E
6	EU235R/EU239K/EU433D/EU434Y/EU436V/EU438R/EU440D
7	EU235R/EU239K/EU433D/EU434Y/EU436V/EU438K/EU440E
8	EU235R/EU239K/EU433D/EU434Y/EU436V/EU438K/EU440D
9	EU235R/EU239K/EU434Y/EU436T/EU438R/EU440E
10	EU235R/EU239K/EU434Y/EU436T/EU438R/EU440D
11	EU235R/EU239K/EU434Y/EU436T/EU438K/EU440E
12	EU235R/EU239K/EU434Y/EU436T/EU438K/EU440D
13	EU235R/EU239K/EU433D/EU434Y/EU436T/EU438R/EU440E
14	EU235R/EU239K/EU433D/EU434Y/EU436T/EU438R/EU440D
15	EU235R/EU239K/EU433D/EU434Y/EU436T/EU438K/EU440E
16	EU235R/EU239K/EU433D/EU434Y/EU436T/EU438K/EU440D

。

24.权利要求19的抗原结合分子，其中所述修饰的人IgG Fc区包含以下氨基酸的组合的任一个：

1	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
2	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
3	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
4	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
5	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
6	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
7	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
8	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
9	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
10	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
11	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
12	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
13	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/T307Q/Q311A/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
14	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
15	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434W/Y436V/Q438R/S440E
16	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434W/Y436V/Q438K/S440E
17	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
18	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
19	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
20	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
21	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
22	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E

23	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
24	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
25	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
26	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
27	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
28	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
29	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
30	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
31	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
32	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
33	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
34	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
35	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
36	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
37	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
38	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
39	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
40	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438R/S440E

41	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
42	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
43	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
44	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
45	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
46	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
47	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
48	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
49	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
50	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
51	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
52	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
53	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
54	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
55	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
56	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
57	L235R/G236R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
58	L235R/G236R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E

。

25.权利要求19的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子包含pH依赖性抗原结合结构域或钙离子依赖性抗原结合结构域。

具有促进抗原清除的FcRn结合结构域的治疗性抗原结合分子

技术领域

[0001] 本发明涉及:在中性pH下对新生儿Fc受体(FcRn)的亲和力提高的修饰的FcRn结合结构域;包含所述FcRn结合结构域的抗原结合分子,其具有低免疫原性、高稳定性并且仅形成少数聚集体;在中性或酸性pH下FcRn结合活性提高而在中性pH下对预存抗药抗体的结合活性又不提高的修饰抗原结合分子;所述抗原结合分子用于改进抗原结合分子介导的细胞对抗原的摄入的用途;所述抗原结合分子用于降低血浆特定抗原浓度的用途;所述修饰的FcRn结合结构域用于增加单个抗原结合分子在其降解前可结合的抗原的总数的用途;所述修饰的FcRn结合结构域用于改进抗原结合分子的药代动力学的用途;用于降低对预存抗药抗体的结合活性的方法;和用于产生所述抗原结合分子的方法。

背景技术

[0002] 由于其在血浆中的高稳定性和很少副作用,越来越多的抗体被用作药物。靶向可溶性抗原的常规抗体在注射后结合患者血浆中的抗原,然后以抗体-抗原复合物的形式稳定地持续存在直到降解。虽然典型的抗体一般具有长的半衰期(1-3周),但是抗原具有少于一天的相对短的半衰期。与抗体的复合物中的抗原因此比仅抗原具有显著较长的半衰期。因此,在注射常规抗体后抗原浓度往往增加。已报告了靶向各种可溶性抗原的抗体的这种情况,例如IL-6(J Immunotoxicol.2005,3,131-9.(NPL1));β淀粉状蛋白(MAbs.20109-10月;2(5):576-88(NPL2));MCP-1(ARTHRITIS&RHEUMATISM2006,54,2387-92(NPL3));hepcidin(AAPS J.2010,12(4):646-57.(NPL4))和sIL-6受体(Blood.2008年11月15日;112(10):3959-64.(NPL5))。报告描述了在给予抗体 时血浆总抗原浓度从基线增加至约10-1000倍(取决于抗原)。

[0003] 由于不需要血浆总抗原浓度的这种增加,因此开发了通过治疗性抗体消除抗原的策略。这些策略之一是使用针对IgG的新生儿Fc受体(FcRn)的结合亲和力提高的pH依赖性抗原结合抗体来快速处理抗原(参见例如PCT申请号PCT/JP2011/001888(PTL1))。FcRn是存在于许多细胞的膜中的蛋白质。在中性pH下对FcRn的结合活性提高的抗体可结合细胞表面上的FcRn,籍此抗体与受体一起以小囊泡内化进入细胞。由于小囊泡内部的pH逐渐降低,因此抗原由于其在酸性pH下的低亲和力而自pH依赖性抗原结合抗体中解离。解离的抗原然后被降解,同时FcRn和结合的抗体在降解前再循环返回细胞表面。因此,在中性pH下对FcRn的结合活性提高的pH依赖性抗原结合抗体可用来从血浆中消除抗原并降低其血浆浓度。

[0004] 之前的研究也已表明提高在酸性pH下对FcRn的结合亲和力的Fc工程改造还可改进内体再循环效率和抗体的药代动力学。例如,M252Y/S254T/T256E(YTE)变体(J Biol Chem,2006,281:23514-23524.(NPL6))、M428L/N434S(LS)变体(Nat Biotechnol,201028:157-159.(NPL7))、T250Q/M428L(J Immunol.2006,176(1):346-56.(NPL8))和N434H变体(Clinical Pharmacology&Therapeutics(2011)89(2):283-290.(NPL9))显示相对于天然IgG1半衰期改进。

[0005] 然而,这类取代还具有改变抗体性质的风险,所述性质对治疗性抗体的研发是重

要的，例如抗体的稳定性、免疫原性、聚集行为和对预存抗体(例如类风湿因子)的结合亲和力。因此提供不仅仅提高抗体清除而且还满足开发治疗性抗原结合分子的标准的修饰FcRn结合结构域是本发明的主要目的。这些可开发性标准特别是高稳定性、低免疫原性、低聚集体百分比和低的对预存抗药抗体(ADA)的结合亲和力。

[0006] 下面显示与本发明有关的现有技术文件。本说明书中引用的所有文件均通过引用结合到本文中。

[0007] 引用列表

[0008] 专利文献

[0009] [PTL1]PCT/JP2011/00188(WO/2011/122011)，ANTIGEN-BINDING MOLECULES THAT PROMOTE ANTIGEN CLEARANCE(促进抗原清除的抗原结合分子)

[0010] 非专利文献

[0011] [NPL1]Martin PL,Cornacoff J,Prabhakar U,Lohr T,Treacy G,Sutherland JE,Hersey S,Martin E;Reviews Preclinical Safety and Immune-Modulating Effects of Therapeutic Monoclonal Antibodies to Interleukin-6and Tumor Necrosis Factor-alpha in Cynomolgus Macaques(食蟹弥猴中抗白介素-6和肿瘤坏死因子-α的治疗性单克隆抗体的临床前安全性和免疫调节作用综述)；J Immunotoxicol.2005,3,131-9。

[0012] [NPL2]Davda JP,Hansen RJ.;Properties of a general PK/PDmodel of antibody-ligand interactions for therapeutic antibodies that bind to soluble endogenous targets(与可溶性内源靶结合的治疗性抗体的抗体-配体相互作用的通用PK/PD模型的性质)；MAbs.2010年9-10月；2(5)：576-88。

[0013] [NPL3]Haringman JJ,Gerlag DM,Smeets TJ,Baeten D,van den Bosch F,Bresnihan B,Breedveld FC,Dinant HJ,Legay F,Gram H,Loetscher P,Schmouder R,Woodworth T,Tak PP.;A randomized controlled trial with an anti-CCL2(anti-monocyte chemotactic protein1)monoclonal antibody in patients with rheumatoid arthritis(类风湿性关节炎患者中用抗CCL2(抗单核细胞趋化蛋白1)单克隆抗体的随机对照试验)；ARTHRITIS and RHEUMATISM2006,54,2387-92。

[0014] [NPL4]Xiao JJ,Krzyzanski W,Wang YM,Li H,Rose MJ,Ma M,Wu Y,Hinkle B,Perez-Ruixo JJ.;Pharmacokinetics of anti-hepcidin monoclonal antibody Ab12B9m and hepcidin in cynomolgus monkeys(食蟹猴中抗hepcidin单克隆抗体Ab12B9m和hepcidin的药代动力学)；AAPSJ.2010,12(4),646-57)。

[0015] [NPL5]Nishimoto N,Terao K,Mima T,Nakahara H,Takagi N,Kakehi T.;Mechanisms and pathologic significances in increase in serum interleukin-6(IL-6)and soluble IL-6receptor after administration of an anti-IL-6receptor antibody,tocilizumab,in patients with rheumatoid arthritis and Castleman disease(类风湿性关节炎和巨大淋巴结增生症患者中在给予抗IL-6受体抗体托珠单抗后血清白介素-6(IL-6)和可溶性IL-6受体增加的机制和病理意义)；Blood.2008年11月15日；112(10)：3959-64。

[0016] [NPL6]J Biol Chem,2006,281:23514-23524

[0017] [NPL7]Nat Biotechnol,201028:157-159

[0018] [NPL8]J Immunol.2006,176(1):346-56

[0019] [NPL9]Clinical Pharmacology&Therapeutics(2011)89(2):283-290

[0020] 发明概述

[0021] 技术问题

[0022] 鉴于上述情况构思出本发明。本发明的一个目的是提供在中性pH下对FcRn的亲和力提高的修饰的FcRn结合结构域;包含所述FcRn结合结构域的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子具有低免疫原性、高稳定性并且只形成少数聚集体;在中性或酸性pH下FcRn结合活性提高而在中性pH下对预存抗药抗体的结合活性又不提高的修饰抗原结合分子;所述抗原结合分子用于改进抗原结合分子介导的细胞对抗原的摄入的用途;所述抗原结合分子用于降低血浆特定抗原浓度的用途;所述修饰的FcRn结合结构域用于增加单个抗原结合分子在其降解前可结合的抗原的总数的用途;所述修饰的FcRn结合结构域用于改进抗原结合分子的药代动力学的用途;和用于产生所述抗原结合分子的方法。

[0023] 解决问题的方案

[0024] 本发明人对以下进行了专心致志的研究:在中性pH下对FcRn的亲和力提高的修饰的FcRn结合结构域和具有低免疫原性、高稳定性并且只形成少数聚集体的包含所述FcRn结合结构域的抗原结合分子。结果,本发明人发现在FcRn结合结构域特定位置上的取代提高在中性pH下对FcRn的亲和力而又不显著提高免疫原性、不显著降低稳定性和/或不显著提高高分子量物类的比率。

[0025] 此外,本发明人对以下进行了专心致志的研究:在中性pH或酸性pH下对FcRn的亲和力提高但是又不显著提高对预存抗药抗体的结合活性的修饰的FcRn结合结构域和包含这类FcRn结合结构域的抗原结合分子。结果,本发明人发现在FcRn结合结构域特定位置上的取代降低在中性pH下对预存抗药抗体的亲和力而又不显著降低FcRn结合活性。

[0026] 具体地讲,本发明涉及:

[0027] [1]包含修饰的FcRn结合结构域的抗原结合分子,其中所述修饰的FcRn结合结构域在选自以下的一个或多个位置上包含氨基酸取代:EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436,其中数字表明按照EU编号的取代的位置。

[0028] [2][1]的抗原结合分子,其中FcRn结合结构域具有

[0029] a)在EU252和EU434位上的氨基酸的氨基酸取代;和

[0030] b)在选自以下一个或多个位置上的氨基酸取代:EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU256、EU258、EU286、EU387、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436。

[0031] [3][1]或[2]的抗原结合分子,其中所述修饰的FcRn结合结构域包含:

[0032] EU238位上的天冬氨酸,

[0033] EU250位上的缬氨酸,

[0034] EU252位上的酪氨酸,

[0035] EU254位上的苏氨酸,

[0036] EU255位上的亮氨酸,

[0037] EU256位上的谷氨酸,

[0038] EU258位上的天冬氨酸或异亮氨酸，

[0039] EU286位上的谷氨酸，

[0040] EU307位上的谷氨酰胺，

[0041] EU308位上的脯氨酸，

[0042] EU309位上的谷氨酸，

[0043] EU311位上的丙氨酸或组氨酸，

[0044] EU315位上的天冬氨酸，

[0045] EU428位上的异亮氨酸，

[0046] EU433位上的丙氨酸、赖氨酸、脯氨酸、精氨酸或丝氨酸，

[0047] EU434位上的酪氨酸或色氨酸，和/或

[0048] EU436位上的异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸、苏氨酸或苯丙氨酸。

[0049] [4][2]的抗原结合分子，其中FcRn结合结构域包含在选自以下一个或多个位置组合上的氨基酸的氨基酸取代：

[0050] a)EU252、EU434和EU436；

[0051] b)EU252、EU307、EU311和EU434；

[0052] c)EU252、EU315和EU434；

[0053] d)EU252、EU308和EU434；

[0054] e)EU238、EU252和EU434；

[0055] f)EU252、EU434、EU307、EU311和EU436；和

[0056] g)EU252、EU387和EU434。

[0057] [5][4]的抗原结合分子，其中FcRn结合结构域包含：

[0058] a)EU252位上的酪氨酸、EU315位上的天冬氨酸和EU434位上的酪氨酸；或

[0059] b)EU252位上的酪氨酸、EU434位上的酪氨酸和EU436位上的异亮氨酸；或

[0060] c)EU252位上的酪氨酸、EU434位上的酪氨酸和EU436位上的亮氨酸；或

[0061] d)EU252位上的酪氨酸、EU434位上的酪氨酸和EU436位上的缬氨酸；或

[0062] e)EU252位上的酪氨酸、EU254位上的苏氨酸、EU434位上的酪氨酸和EU436位上的异亮氨酸。

[0063] [6][2]的抗原结合分子，其中FcRn结合结构域在3个或更多个位置上包含氨基酸取代，其中所述3个或更多个位置是选自以下的组合之一：

[0064] a)EU252/EU434/EU307/EU311/EU286；

[0065] b)EU252/EU434/EU307/EU311/EU286/EU254；

[0066] c)EU252/EU434/EU307/EU311/EU436；

[0067] d)EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU254；

[0068] e)EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU250；

[0069] f)EU252/EU434/EU308/EU250；

[0070] g)EU252/EU434/EU308/EU250/EU436；和

[0071] h)EU252/EU434/EU308/EU250/EU307/EU311。

[0072] [7][6]的抗原结合分子，其中FcRn结合结构域包含：

[0073] a)EU252位上的酪氨酸、EU286位上的谷氨酸、EU307位上的谷氨酰胺、EU311位上的

丙氨酸和EU434位上的酪氨酸;或

[0074] b)EU252位上的酪氨酸、EU254位上的苏氨酸、EU286位上的谷氨酸、EU307位上的谷氨酰胺、EU311位上的丙氨酸和EU434位上的酪氨酸;或

[0075] c)EU252位上的酪氨酸、EU307位上的谷氨酰胺、EU311位上的丙氨酸、EU434位上的酪氨酸和436位上的异亮氨酸;或

[0076] d)EU252位上的酪氨酸、EU254位上的苏氨酸、EU286位上的谷氨酸、EU307位上的谷氨酰胺、EU311位上的丙氨酸、EU434位上的酪氨酸和EU436位上的异亮氨酸;或

[0077] e)EU250位上的缬氨酸、EU252位上的酪氨酸、EU254位上的苏氨酸、EU308位上的脯氨酸、EU434位上的酪氨酸和EU436位上的缬氨酸;或

[0078] f)EU250位上的缬氨酸、EU252位上的酪氨酸、EU307位上的谷 氨酰胺、EU311位上的丙氨酸、EU434位上的酪氨酸和EU436位上的缬氨酸;或

[0079] g)EU252位上的酪氨酸、EU307位上的谷氨酰胺、EU311位上的丙氨酸、EU434位上的酪氨酸和EU436位上的缬氨酸;或

[0080] h)EU250位上的缬氨酸、EU252位上的酪氨酸、EU308位上的脯氨酸和EU434上的酪氨酸;或

[0081] i)EU250位上的缬氨酸、EU252位上的酪氨酸、EU307位上的谷氨酰胺、EU308位上的脯氨酸、EU311位上的丙氨酸和EU434的酪氨酸。

[0082] [8][2]的抗原结合分子,其中FcRn结合结构域在3个或更多个位置上包含氨基酸取代,其中所述3个或更多个位置是选自以下的组合之一:

[0083] a)EU252和EU434和EU307和EU311和EU436和EU286;

[0084] b)EU252和EU434和EU307和EU311和EU436和EU250和EU308;

[0085] c)EU252和EU434和EU307和EU311和EU436和EU250和EU286和EU308;

[0086] d)EU252和EU434和EU307和EU311和EU436和EU250和EU286和EU308和EU428。

[0087] [9][8]的抗原结合分子,其中FcRn结合结构域包含:

[0088] a)EU252位上的酪氨酸、EU286位上的谷氨酸、EU307位上的谷氨酰胺、EU311位上的丙氨酸、EU434位上的酪氨酸和EU436位上的缬氨酸;或

[0089] b)EU250位上的缬氨酸、EU252位上的酪氨酸、EU307位上的谷氨酰胺、EU308位上的脯氨酸、EU311位上的丙氨酸、EU434位上的酪氨酸和EU436位上的缬氨酸;或

[0090] c)EU250位上的缬氨酸、EU252位上的酪氨酸、EU286位上的谷氨酸、EU307位上的谷氨酰胺、EU308位上的脯氨酸、EU311位上的 丙氨酸、EU434位上的酪氨酸和EU436位上的缬氨酸;或

[0091] d)EU250位上的缬氨酸、EU252位上的酪氨酸、EU286位上的谷氨酸、EU307位上的谷氨酰胺、EU308位上的脯氨酸、EU311位上的丙氨酸、EU434位上的酪氨酸和EU436位上的缬氨酸。

[0092] [10][2]的抗原结合分子,其中FcRn结合结构域在3个或更多个位置上包含氨基酸取代,其中所述3个或更多个位置是选自以下的组合之一:

[0093] a)EU434和EU307和EU311;

[0094] b)EU434和EU307和EU309和EU311;或

[0095] c)EU434和EU250和EU252和EU436。

[0096] [11][10]的抗原结合分子，其中FcRn结合结构域包含：

[0097] a)EU307位上的谷氨酰胺、EU311位上的组氨酸和EU434位上的酪氨酸；或

[0098] b)EU307位上的谷氨酰胺、EU309位上的谷氨酸、EU311位上的丙氨酸和EU434位上的酪氨酸；或

[0099] c)EU307位上的谷氨酰胺、EU309位上的谷氨酸、EU311位上的组氨酸和EU434位上的酪氨酸；或

[0100] d)EU250位上的缬氨酸、EU252位上的酪氨酸、EU434位上的酪氨酸和EU436位上的缬氨酸。

[0101] [12][1]-[11]中任一个的抗原结合分子，其中高分子量物类的比率小于2%。

[0102] [13][1]-[12]中任一个的抗原结合分子，其中抗原结合分子包含具有以下的抗原结合结构域：

[0103] a)在pH5.5-6.5下比在pH7-8下对抗原的结合活性低或

[0104] b)对抗原的“钙浓度依赖性结合”活性。

[0105] [14][1]-[5]中任一个的抗原结合分子，其中所述结合分子在pH7下对FcRn的结合活性为50-150nM，Tm高于63.0℃，Epibase评分小于250。

[0106] [15][1]-[3]和[6]-[7]中任一个的抗原结合分子，其中所述结合分子在pH7下对FcRn的结合活性为15-50nM，Tm高于60℃，Epibase评分小于500。

[0107] [16][1]-[3]和[8]-[9]中任一个的抗原结合分子，其中在pH7下所述结合分子对FcRn的结合活性强于15nM，Tm高于57.5℃，Epibase评分小于500。

[0108] [17][1]-[3]中任一个的抗原结合分子，其中FcRn结合结构域包含以下氨基酸取代：

[0109] a)在EU238、EU255和/或EU258位上的氨基酸取代，和

[0110] b)在3个或更多个位置上的氨基酸取代，其中所述3个或更多个位置是表4-7提供的组合之一。

[0111] [18][1]-[17]中任一个的抗原结合分子，其中

[0112] a)在FcRn结合结构域的EU257位上，氨基酸不是选自以下的氨基酸：丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸和苏氨酸，和/或

[0113] b)在FcRn结合结构域的EU252位上，氨基酸不是色氨酸。

[0114] [19][1]-[18]中任一个的抗原结合分子，其中抗原结合分子具有与包含完整FcRn结合结构域的对照抗体的结合亲和力相比不显著提高的对预存抗药抗体的结合活性。

[0115] [20][19]的抗原结合分子，其中FcRn结合结构域还在选自以下的一个或多个位置上包含氨基酸取代：EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438和EU440。

[0116] [21][20]的抗原结合分子，其中FcRn结合结构域包含一个或多个选自以下的氨基酸取代：

[0117] EU387位上的精氨酸，

[0118] EU422位上的谷氨酸、精氨酸或丝氨酸、天冬氨酸、赖氨酸、苏氨酸或谷氨酰胺；

[0119] EU424位上的谷氨酸或精氨酸、赖氨酸或天冬酰胺；

[0120] EU426位上的天冬氨酸、谷氨酰胺、丙氨酸或酪氨酸；

[0121] EU433位上的天冬氨酸；

[0122] EU436位上的苏氨酸；

[0123] EU438位上的谷氨酸、精氨酸、丝氨酸或赖氨酸；和

[0124] EU440位上的谷氨酸、天冬氨酸或谷氨酰胺。

[0125] [22][1]-[21]中任一个的抗原结合分子，其中所述修饰的FcRn结合结构域包含3个或更多个取代，其中所述3个或更多个取代是表12-13提供的组合之一。

[0126] [23][1]-[22]中任一个的抗原结合分子，其中所述修饰的FcRn结合结构域包含3个或更多个取代，其中所述3个或更多个取代是表14-15提供的组合之一。

[0127] [24][20]-[23]中任一个的抗原结合分子，其中FcRn结合结构域包含：

[0128] a)EU252位上的酪氨酸、EU387位上的精氨酸、EU434位上的酪氨酸和EU436位上的缬氨酸；或

[0129] b)EU252位上的酪氨酸、EU422位上的谷氨酸、EU434位上的酪氨酸和EU436位上的缬氨酸；或

[0130] c)EU252位上的酪氨酸、EU422位上的精氨酸、EU434位上的酪氨酸和EU436位上的缬氨酸；或

[0131] d)EU252位上的酪氨酸、EU422位上的丝氨酸、EU434位上的酪氨酸和EU436位上的缬氨酸；或

[0132] e)EU252位上的酪氨酸、EU424位上的谷氨酸、EU434位上的酪氨酸和EU436位上的缬氨酸；或

[0133] f)EU252位上的酪氨酸、EU424位上的精氨酸、EU434位上的酪氨酸和EU436位上的缬氨酸；或

[0134] g)EU252位上的酪氨酸、EU434位上的酪氨酸、EU436位上的缬氨酸和EU438位上的谷氨酸；或

[0135] h)EU252位上的酪氨酸、EU434位上的酪氨酸、EU436位上的缬氨酸和EU438位上的精氨酸；或

[0136] i)EU252位上的酪氨酸、EU434位上的酪氨酸、EU436位上的缬氨酸和EU438位上的丝氨酸；或

[0137] j)EU252位上的酪氨酸、EU434位上的酪氨酸、EU436位上的缬氨酸和EU440位上的谷氨酸。

[0138] [25][1]-[24]中任一个的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子是抗体。

[0139] [26][1]-[25]中任一个的抗原结合分子用于改进抗原结合分子介导的细胞对抗原的摄入的用途。

[0140] [27][1]-[25]中任一个的抗原结合分子用于降低血浆特定抗原浓度的用途，其中所述抗原结合分子包含可结合所述抗原的抗原结合结构域。

[0141] [28]一种用于改进抗原结合分子的药代动力学的方法，所述方法包括在选自以下的一个或多个位置上将氨基酸取代引入所述抗原结合分子的FcRn结合结构域中的步骤：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436。

[0142] [29]一种用于延迟消除受试者中的抗原结合分子的方法，所述方法包括在选自以下的一个或多个位置上将氨基酸取代引入所述抗原结合分子的FcRn结合结构域中的步骤：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、

EU428、EU433、EU434和EU436。

[0143] [30]一种延长抗原结合分子的血浆滞留时间的方法，所述方法包括在选自以下的一个或多个位置上将氨基酸取代引入所述抗原结合分子的FcRn结合结构域中的步骤：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436。

[0144] [31]一种用于提高抗原结合分子的血浆抗原消除速率的方法，所述方法包括在选自以下的一个或多个位置上将氨基酸取代引入所述 抗原结合分子的FcRn结合结构域中的步骤：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436。

[0145] [32]一种用于提高抗原结合分子消除血浆抗原的能力的方法，所述方法包括在选自以下的一个或多个位置上将氨基酸取代引入所述抗原结合分子的FcRn结合结构域中的步骤：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436。

[0146] [33][28]-[32]中任一个的方法，其中将另外的氨基酸取代在EU256位上引入FcRn结合结构域中。

[0147] [34][28]-[33]中任一个的方法，其中所述方法还包括在选自以下的一个或多个位置上将氨基酸取代引入FcRn结合结构域中的步骤：EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438和EU440。

[0148] [35]一种用于产生[1]-[25]中任一个的抗原结合分子的方法，所述方法包括以下步骤：

[0149] (a)选择亲本FcRn结合结构域并且通过在选自以下的一个或多个位置上引入氨基酸取代来改变所述亲本FcRn：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436；

[0150] (b)选择抗原结合分子的抗原结合结构域并且改变抗原结合结构域中的至少一个氨基酸以得到pH依赖性抗原结合结构域或钙离子依赖性抗原结合结构域；

[0151] (c)获得编码其中将(a)和(b)中制备的人FcRn结合结构域和抗原结合结构域连接的抗原结合分子的基因，和

[0152] (d)使用(c)中制备的基因产生抗原结合分子。

[0153] [36][35]的方法，其中在步骤a)中将另外的氨基酸取代在EU256位上引入FcRn结合结构域中。

[0154] [37][35]-[36]中任一个的方法，其中所述方法还包括在选自以下 的一个或多个位置上将氨基酸取代引入FcRn结合结构域中的步骤：EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438和EU440。

[0155] [38]一种包含修饰的FcRn结合结构域的抗原结合分子，其中所述修饰的FcRn结合结构域在选自以下的一个或多个位置上包含氨基酸取代：EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438和EU440，其中与包含完整FcRn结合结构域的抗原结合分子的结合亲和力相比所述抗原结合分子对预存抗药抗体(ADA)的结合亲和力在中性pH下不显著提高。

[0156] [39][38]的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子另外在中性或酸性pH范围内对FcRn的结合亲和力提高。

[0157] [40][38]或[39]的抗原结合分子，其中取代一个或多个选自EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438和EU440的位置的氨基酸选自

[0158] a)EU387位上的精氨酸；

[0159] b)EU422位上的谷氨酸、精氨酸、丝氨酸、天冬氨酸、赖氨酸、苏氨酸或谷氨酰胺；

[0160] c)EU424位上的谷氨酸、精氨酸、赖氨酸或天冬酰胺；

[0161] d)EU426位上的天冬氨酸、谷氨酰胺、丙氨酸或酪氨酸；

[0162] e)EU433位上的天冬氨酸

[0163] f)EU436位上的苏氨酸

[0164] g)EU438位上的谷氨酸、精氨酸、丝氨酸或赖氨酸；和

[0165] h)EU440位上的谷氨酸、天冬氨酸或谷氨酰胺。

[0166] [41][38]-[40]中任一个的抗原结合分子，其中所述修饰的FcRn结合结构域包含表10提供的一个或多个位置或组合之一的氨基酸取代。

[0167] [42][38]-[40]中任一个的抗原结合分子，其中所述修饰的FcRn结合结构域包含表11提供的氨基酸取代或取代组合的任一个。

[0168] [43][39]-[42]中任一个的抗原结合分子，其中所述修饰的FcRn 结合结构域还包含选自以下的FcRn结合结构域的一个或多个位置上的氨基酸取代：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU256、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU434和EU436，其中所述取代使得FcRn结合活性在中性pH或酸性pH范围内增加。

[0169] [44][39]-[43]中任一个的抗原结合分子，其中所述修饰的FcRn结合结构域在以下的FcRn结合结构域位置上包含氨基酸取代：

[0170] i)a)EU438/EU440或b)EU424；和

[0171] ii)a)EU434，b)EU252/EU254/EU256；c)EU428/EU434；或d)EU250/EU428。

[0172] [45][44]的抗原结合分子，其中所述修饰的FcRn结合结构域包含以下氨基酸取代：

[0173] i)a)EU438R/EU440E或b)EU424N；和

[0174] ii)a) N434H；b)M252Y/S254T/T256E；c)M428L/N434S；或d)T250Q和M428L(EU编号)。

[0175] [46][45]的抗原结合分子，其中所述修饰的FcRn结合结构域包含3个或更多个氨基酸取代，其中所述3个或更多个取代是表13和15中提供的组合之一。

[0176] [47][39]-[42]中任一个的抗原结合分子，其中所述修饰的FcRn结合结构域包含以下位置的取代：

[0177] a)在选自EU387、EU422、EU424、EU438、EU440、EU433的一个或多个位置上或其中两个位置是选自EU422/EU424和EU438/EU440的组合之一的两个或更多个位置；和

[0178] b)其中两个位置是表9提供的组合之一的两个或更多个位置。

[0179] [48][47]的抗原结合分子，其中所述修饰的FcRn结合结构域包含3个或更多个氨基酸取代，其中所述3个或更多个氨基酸取代是表12或14提供的组合之一。

[0180] [49][39]-[48]中任一个的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子 包含pH依赖性抗原结合结构域或钙离子依赖性抗原结合结构域。

[0181] [50]一种用于降低包含FcRn结合结构域的抗原结合分子对预存ADA的结合活性的方法，所述FcRn结合结构域在中性或酸性pH下对FcRn的结合活性提高且在中性pH下对预存ADA的结合活性提高，所述方法包括以下步骤：

[0182] a)提供具有在中性或酸性pH下对FcRn的结合活性提高且在中性pH下对预存ADA的结合活性提高的FcRn结合结构域的抗原结合分子;和

[0183] b)在选自EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438和EU440的一个或多个位置上取代FcRn结合结构域中的氨基酸,得到具有修饰的FcRn结合结构域的抗原结合分子。

[0184] [51][50]的方法,其中步骤b)包括在3个或更多个位置上取代氨基酸,其中所述3个或更多个位置为表10提供的组合之一。

[0185] [52][50]的方法,其中步骤b)包括将3个或更多个氨基酸取代引入FcRn结合结构域中,其中所述3个或更多个氨基酸取代为表11提供的组合之一。

[0186] [53]一种用于增加单个抗原结合分子可结合的抗原总数而与亲本抗体相比又不显著提高在中性pH下对预存ADA的结合活性的方法,所述方法包括以下步骤:

[0187] a)提供包含亲本FcRn结合结构域的抗原结合分子,

[0188] b)通过在选自以下的一个或多个位置上取代亲本FcRn结合结构域的氨基酸序列中的氨基酸来改变步骤a)的亲本FcRn结合结构域:EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU256、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436;和

[0189] c)通过在选自以下的一个或多个位置上取代亲本FcRn结合结构域的氨基酸序列中的氨基酸来改变步骤b)的修饰的FcRn结合结构域:EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438和EU440。

[0190] [54]一种用于促进以抗原结合的形式摄入细胞中的不含抗原的抗原结合分子在胞外释放而与亲本抗体相比又不显著提高所述抗原结合分子在中性pH下对预存ADA的结合活性的方法,所述方法包括以下步骤:

[0191] a)提供包含亲本FcRn结合结构域的抗原结合分子,

[0192] b)通过在选自以下的一个或多个位置上取代亲本FcRn结合结构域的氨基酸序列中的氨基酸来改变亲本FcRn结合结构域:EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU256、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436和EU428;和

[0193] c)通过在选自以下的一个或多个位置上取代亲本FcRn结合结构域的氨基酸序列中的氨基酸来改变步骤b)的修饰的FcRn结合结构域:EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438和EU440。

[0194] [55]一种用于提高抗原结合分子消除血浆抗原的能力而与亲本抗体相比又不显著提高在中性pH下对预存ADA的结合活性的方法,所述方法包括以下步骤:

[0195] a)提供包含亲本FcRn结合结构域的抗原结合分子,

[0196] b)通过在选自以下的一个或多个位置上取代亲本FcRn结合结构域的氨基酸序列中的氨基酸来改变亲本FcRn结合结构域:EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU256、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436和EU428;和

[0197] c)通过在选自以下的一个或多个位置上取代亲本FcRn结合结构域的氨基酸序列中的氨基酸来改变步骤b)的修饰的FcRn结合结构域:EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438和EU440。

[0198] [56]一种用于改进抗原结合分子的药代动力学而与亲本抗体相比又不显著提高在中性pH下对预存ADA的结合活性的方法,所述方法包括以下步骤:

[0199] a)提供包含亲本FcRn结合结构域的抗原结合分子,

[0200] b)通过在选自以下的一个或多个位置上取代亲本FcRn结合结构域的氨基酸序列中的氨基酸来改变亲本FcRn结合结构域:EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU256、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436;和

[0201] c)通过在选自以下的一个或多个位置上取代亲本FcRn结合结构域的氨基酸序列中的氨基酸来改变步骤b)的修饰的FcRn结合结构域:EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438和EU440。

[0202] [57]一种用于降低血浆总抗原浓度或血浆游离抗原浓度而与亲本抗体相比又不显著提高在中性pH下对预存ADA的结合活性的方法,所述方法包括以下步骤:

[0203] a)提供包含亲本FcRn结合结构域的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含可结合所述抗原的抗原结合结构域,

[0204] b)通过在选自以下的一个或多个位置上取代亲本FcRn结合结构域的氨基酸序列中的氨基酸来改变亲本FcRn结合结构域:EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU256、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436;和

[0205] c)通过在选自以下的一个或多个位置上取代亲本FcRn结合结构域的氨基酸序列中的氨基酸来改变步骤b)的修饰的FcRn结合结构域:EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438和EU440。

[0206] [58]一种用于产生包含在中性或酸性pH下对FcRn的结合活性提高且在中性pH下对预存ADA的结合活性降低的FcRn结合结构域的抗原结合分子的方法,所述方法包括以下步骤:

[0207] (a)提供在中性或酸性pH范围内对FcRn的结合活性提高且在中性pH范围内对预存ADA的结合活性提高的FcRn结合结构域,

[0208] (b)在选自以下的一个或多个位置上取代氨基酸:EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438和EU440,

[0209] (c)选择抗原结合分子的抗原结合结构域并且改变抗原结合结构域中的至少一个氨基酸以得到pH依赖性抗原结合结构域,或选择钙离子依赖性抗原结合结构域;

[0210] (d)获得编码其中将(a)和(b)中制备的人FcRn结合结构域和抗原结合结构域连接的抗原结合分子的基因,和

[0211] (e)使用(c)中制备的基因产生抗原结合分子,其中与具有完整FcRn结合结构域的亲本抗原结合结构域相比,所产生的所述抗原结合分子在中性或酸性pH下对FcRn的结合活性提高且在中性pH下对内源ADA的结合活性降低。

[0212] [59][58]的方法,其中在中性或酸性pH范围内对FcRn和预存ADA的结合活性提高且在中性pH范围内对预存ADA的结合活性提高的FcRn结合结构域在选自以下的一个或多个位置上包含氨基酸取代:EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU256、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436。

[0213] [60][53]-[57]中任一个的方法,其中在步骤a)中引入的氨基酸取代位于3个或更多个位置,其中所述3个或更多个位置是表4-7提供的组合之一。

[0214] [61][53]-[60]中任一个的方法,其中在步骤b)中引入的氨基酸取代位于3个或更多个位置,其中所述3个或更多个位置为表10提供的组合之一。

[0215] 附图简述

[0216] [图1A]图1A显示现有技术的抗体(“常规抗体”)与具有增强的FcRn的pH依赖性抗原结合抗体相比从血浆中消除抗原的示意图,所述两种抗体在中性pH下均结合可溶性抗原。常规抗体与血浆中的抗原结合,并且被细胞非特异性地摄入酸性内体。在内体的酸性条件下,常规抗体结合小囊泡内的FcRn,并转运回到细胞表面,抗体在此再次 释放。在整个内化和再循环过程期间抗原与抗原结合结构域结合。在中性pH下FcRn结合提高的pH依赖性抗原结合抗体与细胞表面上的FcRn结合,并快速内化到细胞内,因而以比常规抗体高的频率内化到细胞内。在内体的酸性条件下,抗原从修饰抗体上解离,并转运至溶酶体,在此被蛋白水解性降解。仍与FcRn结合的抗体再循环返回细胞表面。在此,再循环的游离抗体可再次与另一抗原结合。通过重复FcRn介导的摄取、抗原解离和降解及抗体再循环的这个循环,在中性pH下与FcRn的结合亲和力提高的这种pH依赖性抗原结合抗体可比常规抗体递送显著较多量的抗原至溶酶体,因此与常规抗体相比,可更显著地降低血浆总抗原浓度。

[0217] [图1B]图1B显示内体中可溶性抗原从具有pH依赖性抗原结合结构域的IgG抗体中解离的图示。这导致抗原消除增加,并允许抗体与血浆中的另一抗原结合。

[0218] [图2]图2显示包含Fc变体的抗体的hFcRn结合亲和力(x轴)和y轴上的Tm的示图(Fc变体F1-F599:空心正方形;Fc变体F600-F1052:实心正方形)。

[0219] [图3]图3显示包含Fc变体的抗体的hFcRn结合亲和力(x轴)和高分子量(HMW)部分(以%表示)(y轴)的示图(Fc变体F1-F599:空心正方形,Fc变体F600-F1050:实心正方形)。

[0220] [图4]图4显示包含Fc变体的抗体的hFcRn结合亲和力(x轴)和免疫原性评分(Epibase评分)的示图(Fc变体F1-F599:空心正方形,Fc变体F600-F1052:实心正方形)。

[0221] [图5]图5显示包含其hFcRn结合亲和力强于15nM的Fc变体的抗体的hFcRn结合亲和力(x轴)和熔解温度Tm(y轴)的示图(其Kd小于或等于15nM的F1-F599的Fc变体:空心正方形,其Kd小于或等于15nM的F600-F1052的Fc变体(第1组):实心正方形)。

[0222] [图6]图6显示包含其hFcRn结合亲和力强于15nM的Fc变体的抗体的hFcRn结合亲和力(x轴)和HMW(以%表示)(y轴)的示图(其 Kd小于或等于15nM的F1-F599的Fc变体:空心正方形;其Kd小于或等于15nM的F600-F1052的Fc变体(第1组):实心正方形)。

[0223] [图7]图7显示包含其hFcRn结合亲和力强于15nM的Fc变体的抗体的hFcRn结合亲和力和免疫原性评分的示图(其Kd小于或等于15nM的F1-F599的Fc变体:空心正方形;其Kd小于或等于15nM的F600-F1052的Fc变体(第1组):实心正方形)。

[0224] [图8]图8显示包含其hFcRn结合亲和力介于15nM和50nM之间的Fc变体的抗体的hFcRn结合亲和力和Tm的示图(其Kd=15-50nM的F1-F599的Fc变体,空心正方形;其Kd=15-50nM的F600-F1052的Fc变体(第2组):实心正方形)

[0225] [图9]图9显示包含其hFcRn结合亲和力介于15nM和50nM之间的Fc变体的抗体的hFcRn结合亲和力和HMW(%)的示图(其Kd=15-50nM的F1-F599的Fc变体,空心正方形;其Kd=15-50nM的F600-F1052的Fc变体(第2组):实心正方形)。

[0226] [图10]图10显示包含其hFcRn结合亲和力介于15nM和50nM之间的Fc变体的抗体的hFcRn结合亲和力和免疫原性评分的示图(其Kd=15-50nM的F1-F599的Fc变体,空心正方形;其Kd=15-50nM的F600-F1052的Fc变体(第2组):实心正方形)。

[0227] [图11]图11显示包含其hFcRn结合亲和力介于50nM和150nM之间的Fc变体的抗体的hFcRn结合亲和力和Tm的示图(其Kd=50-150nM的F1-F599的Fc变体,空心正方形;其Kd=

50-150nM的F600-F1052的Fc变体(第3组):实心正方形)。

[0228] [图12]图12显示包含其hFcRn结合亲和力介于50nM和150nM的Fc变体的抗体的hFcRn结合亲和力和HMW(%)的示图(其Kd=50-150nM的F1-F599的Fc变体,空心正方形;其Kd=50-150nM之间的F600-F1052的Fc变体(第3组):实心正方形)。

[0229] [图13]图13显示包含其hFcRn结合亲和力介于50nM和150nM之间的Fc变体的抗体的hFcRn结合亲和力和免疫原性评分的示图(其 Kd=50-150nM的F1-F599的Fc变体:空心正方形;其Kd=50-150nM的F600-F1052的Fc变体(第3组):实心正方形)。

[0230] [图14]图14显示包含其hFcRn结合亲和力介于150nM和700nM之间的Fc变体的抗体的hFcRn结合亲和力和Tm的示图(其Kd=150-700nM的F1-F599的Fc变体,空心正方形;其Kd=150-700nM的Fc变体F600-F1052(第4组):实心正方形)。

[0231] [图15]图15显示包含其hFcRn结合亲和力介于150nM和700nM之间的Fc变体的抗体的hFcRn结合亲和力和HMW(%)的示图(其Kd=150-700nM的F1-F599的Fc变体:空心正方形;其Kd=150-700nM的F600-F1052的Fc变体(第4组):实心正方形)。

[0232] [图16]图16显示包含其hFcRn结合亲和力介于150nM和700nM之间的Fc变体的抗体的hFcRn结合亲和力和免疫原性评分的示图(其Kd=150-700nM的F1-F599的Fc变体:空心正方形;其Kd=150-700nM的F600-F1052的Fc变体(第4组):实心正方形)。

[0233] [图17]图17显示在注射Fv4-IgG1、Fv4-F652、Fv4-F890和Fv4-F946后的人FcRn转基因小鼠中和在对照小鼠(无抗体注射)中随时间推移的血浆抗原(hsIL-6R)浓度的示图。

[0234] [图18]图18显示在注射Fv4-IgG1、Fv4-F652、Fv4-F890和Fv4-F946后在人FcRn转基因小鼠中随时间推移的血浆抗体浓度的示图。

[0235] [图19]图19显示在对照(无抗体注射)和在注射Fv4-IgG1、Fv4-F11和Fv4-F652后的人FcRn转基因小鼠中随时间推移的血浆抗原(hsIL-6R)浓度的示图。

[0236] [图20]图20显示在注射Fv4-IgG1、Fv4-F11和Fv4-F652后在人FcRn转基因小鼠中随时间推移的血浆抗体浓度的示图。

[0237] [图21]图21显示来自30名RA患者的血清针对人源化抗IL-6受体抗体Fv4-IgG1(图21-1)、其YTE变体(图21-2)和LS变体(图21-3)的电化学发光(ECL)反应的示图。

[0238] [图22]图22显示来自15名RA患者的血清针对人源化抗IL-6受体抗体Fv4-IgG1(图22-1)、Fv4-N434H(图22-2)、Fv4-F11(图22-3)、Fv4-F68(图22-4)、Fv4-890(图22-5)和Fv4-F947(图22-6)的电化学发光(ECL)反应的示图。

[0239] [图23]图23显示图22所示的来自15名RA患者的血清针对Fv4-IgG1、Fv4-F11、Fv4-F68、Fv4-F890和Fv4-F947的ECL反应的平均值(图23-1)、几何平均值(图23-2)和中位值(图23-3)。

[0240] [图24]图24显示来自15名RA患者的血清针对人源化抗IL-6受体抗体Fv4-IgG1(图24-1)和变体Fv4-F890、Fv4-F1058、Fv4-F1059、Fv4-F1060、Fv4-F1061、Fv4-F1062、Fv4-F1063、Fv4-F1064、Fv4-F1065、Fv4-F1066、Fv4-F1067、Fv4-F1068、Fv4-F1069、Fv4-F1070、Fv4-F1071、Fv4-F1072和Fv4-F1073(图24-2至图24-18)的电化学发光(ECL)反应的示图。

[0241] [图25]图25显示图24所示的来自15名RA患者的血清针对Fv4-IgG1、变体Fv4-F890、Fv4-F1058、Fv4-F1059、Fv4-F1060、Fv4-F1061、Fv4-F1062、Fv4-F1063、Fv4-F1064、Fv4-F1065、Fv4-F1066、Fv4-F1067、Fv4-F1068、Fv4-F1069、Fv4-F1070、Fv4-F1071、Fv4-

F1072和Fv4-F1073的ECL反应的平均值(图25-1)、几何平均值(图25-2)和中位值(图25-3)。

[0242] [图26]图26显示来自15名RA患者的血清针对变体Fv4-F1104、Fv4-F1105和Fv4-F1106的电化学发光(ECL)反应的示图。

[0243] [图27]图27显示来自15名RA患者的血清针对变体Fv4-F1107、Fv4-F1108、Fv4-F1109、Fv4-F1110、Fv4-F1111、Fv4-F1112、Fv4-F1113和Fv4-F1114(图27-1至图27-8)的电化学发光(ECL)反应的示图。

[0244] [图28]图28显示来自15名RA患者的血清针对变体Fv4-F1230(图28-1)、Fv4-F1231(图28-2)、Fv4-F1232(图28-3)的电化学发光(ECL)反应的示图。

[0245] [图29]图29显示来自15名RA患者的血清针对变体Fv4-F947、 Fv4-F1119、Fv4-F1120、Fv4-F1121、Fv4-F1122、Fv4-F1123和Fv4-F1124的电化学发光(ECL)反应的示图。

[0246] [图30]图30-1至图30-4显示来自15名RA患者的血清针对变体Fv4-F939、Fv4-F1291、Fv4-F1268和Fv4-F1269的电化学发光(ECL)反应的示图。图30-5至图30-9显示来自30名RA患者的血清针对变体Fv4-F1243、Fv4-F1245、Fv4-F1321、Fv4-F1340和Fv4-F1323的电化学发光(ECL)反应的示图。

[0247] [图31]图31显示来自15名RA患者的血清针对变体Fv4-F890(图31-1)和Fv4-F1115(=F890+S424N,图31-2)的电化学发光(ECL)反应的示图。

[0248] [图32]图32显示来自15或30名RA患者的血清针对变体Fv4-YTE(图32-1)、Fv4-F1166(=YTE+Q438R/S440E,图32-2)、Fv4-F1167(=YTE+S424N,图32-3)、Fv4-LS(图32-4)、Fv4-F1170(=LS+Q438R/S440E,图32-5)、Fv4-F1171(LS+S424N,图32-6)、Fv4-N434H(图32-7)、Fv4-F1172(=N434H+Q438R/S440E,图32-8)、Fv4-F1173(=N434H+S424N,图32-9)的电化学发光(ECL)反应的示图。

[0249] [图33]图33显示来自30名RA患者的血清针对变体Fv4-LS、Fv4-F1380(图33-2)、Fv4-F1384(图33-3)、Fv4-F1385(图33-4)、Fv4-F1386(LS+S426Y,图33-5)、Fv4-F1388(图33-6)和Fv4-F1389(LS+Y436T,图33-7)的电化学发光(ECL)反应的示图。

[0250] [图34]图34显示来自30名RA患者的血清针对变体F939的电化学发光(ECL)反应的示图。

[0251] [图35]图35显示来自30名RA患者的血清针对变体F1378的电化学发光(ECL)反应的示图。

[0252] [图36]图36显示来自30名RA患者的血清针对变体F1379的电化学发光(ECL)反应的示图。

[0253] [图37]图37显示来自30名RA患者的血清针对变体F1262的电 化学发光(ECL)反应的示图

[0254] [图38]图38显示来自30名RA患者的血清针对变体F1138的电化学发光(ECL)反应的示图

[0255] [图39]图39显示来自30名RA患者的血清针对变体F1344的电化学发光(ECL)反应的示图

[0256] [图40]图40显示来自30名RA患者的血清针对变体F1349的电化学发光(ECL)反应的示图

[0257] [图41]图41显示来自30名RA患者的血清针对变体F1350的电化学发光(ECL)反应

的示图

[0258] [图42]图42显示来自30名RA患者的血清针对变体F1351的电化学发光(ECL)反应的示图

[0259] [图43]图43显示来自30名RA患者的血清针对变体F1261的电化学发光(ECL)反应的示图

[0260] [图44]图44显示来自30名RA患者的血清针对变体F1263的电化学发光(ECL)反应的示图

[0261] [图45]图45显示来自30名RA患者的血清针对变体F1305的电化学发光(ECL)反应的示图

[0262] [图46]图46显示来自30名RA患者的血清针对变体F1306的电化学发光(ECL)反应的示图

[0263] [图47]图47显示来自30名RA患者的血清针对变体F1268的电化学发光(ECL)反应的示图

[0264] [图48]图48显示来自30名RA患者的血清针对变体F1269的电化学发光(ECL)反应的示图

[0265] [图49]图49显示来自30名RA患者的血清针对变体F1413的电化学发光(ECL)反应的示图

[0266] [图50]图50显示来自30名RA患者的血清针对变体F1416的电化学发光(ECL)反应的示图

[0267] [图51]图51显示来自30名RA患者的血清针对变体F1419的电 化学发光(ECL)反应的示图

[0268] [图52]图52显示来自30名RA患者的血清针对变体F1420的电化学发光(ECL)反应的示图

[0269] [图53]图53显示来自30名RA患者的血清针对变体F1370的电化学发光(ECL)反应的示图

[0270] [图54]图54显示来自30名RA患者的血清针对变体F1371的电化学发光(ECL)反应的示图

[0271] [图55]图55显示来自30名RA患者的血清针对变体F1599的电化学发光(ECL)反应的示图

[0272] [图56]图56显示来自30名RA患者的血清针对变体F1600的电化学发光(ECL)反应的示图

[0273] [图57]图57显示来自30名RA患者的血清针对变体F1566的电化学发光(ECL)反应的示图

[0274] [图58]图58显示来自30名RA患者的血清针对变体F1448的电化学发光(ECL)反应的示图

[0275] [图59]图59显示来自30名RA患者的血清针对变体F1601的电化学发光(ECL)反应的示图

[0276] [图60]图60显示来自30名RA患者的血清针对变体F1602的电化学发光(ECL)反应的示图

[0277] [图61]图61显示来自30名RA患者的血清针对变体F1603的电化学发光(ECL)反应的示图

[0278] [图62]图62显示来自30名RA患者的血清针对变体F1531的电化学发光(ECL)反应的示图

[0279] [图63]图63显示来自30名RA患者的血清针对变体F1604的电化学发光(ECL)反应的示图

[0280] [图64]图64显示来自30名RA患者的血清针对变体F1605的电化学发光(ECL)反应的示图

[0281] [图65]图65显示来自30名RA患者的血清针对变体F1586的电 化学发光(ECL)反应的示图

[0282] [图66]图66显示来自30名RA患者的血清针对变体F1592的电化学发光(ECL)反应的示图

[0283] [图67]图67显示来自30名RA患者的血清针对变体F1610的电化学发光(ECL)反应的示图

[0284] [图68]图68显示来自30名RA患者的血清针对变体F1611的电化学发光(ECL)反应的示图

[0285] [图69]图69显示来自30名RA患者的血清针对变体F1612的电化学发光(ECL)反应的示图

[0286] [图70]图70显示来自30名RA患者的血清针对变体F1613的电化学发光(ECL)反应的示图

[0287] [图71]图71显示来自30名RA患者的血清针对变体F1614的电化学发光(ECL)反应的示图

[0288] [图72]图72显示来自30名RA患者的血清针对变体F1615的电化学发光(ECL)反应的示图

[0289] [图73]图73显示来自30名RA患者的血清针对变体F1567的电化学发光(ECL)反应的示图

[0290] [图74]图74显示来自30名RA患者的血清针对变体F1572的电化学发光(ECL)反应的示图

[0291] [图75]图75显示来自30名RA患者的血清针对变体F1576的电化学发光(ECL)反应的示图

[0292] [图76]图76显示来自30名RA患者的血清针对变体F1578的电化学发光(ECL)反应的示图

[0293] [图77]图77显示来自30名RA患者的血清针对变体F1579的电化学发光(ECL)反应的示图

[0294] [图78]图78显示来自30名RA患者的血清针对变体F1641的电化学发光(ECL)反应的示图

[0295] [图79]图79显示来自30名RA患者的血清针对变体F1642的电 化学发光(ECL)反应的示图

[0296] [图80]图80显示来自30名RA患者的血清针对变体F1643的电化学发光(ECL)反应

的示图

[0297] [图81]图81显示来自30名RA患者的血清针对变体F1644的电化学发光(ECL)反应的示图

[0298] [图82]图82显示来自30名RA患者的血清针对变体F1645的电化学发光(ECL)反应的示图

[0299] [图83]图83显示来自30名RA患者的血清针对变体F1646的电化学发光(ECL)反应的示图

[0300] [图84]图84显示来自30名RA患者的血清针对变体F1647的电化学发光(ECL)反应的示图

[0301] [图85]图85显示来自30名RA患者的血清针对变体F1648的电化学发光(ECL)反应的示图

[0302] [图86]图86显示来自30名RA患者的血清针对变体F1649的电化学发光(ECL)反应的示图

[0303] [图87]图87显示来自30名RA患者的血清针对变体F1650的电化学发光(ECL)反应的示图

[0304] [图88]图88显示来自30名RA患者的血清针对变体F1651的电化学发光(ECL)反应的示图

[0305] [图89]图89显示来自30名RA患者的血清针对变体F1652的电化学发光(ECL)反应的示图

[0306] [图90]图90显示来自30名RA患者的血清针对变体F1653的电化学发光(ECL)反应的示图

[0307] [图91]图91显示来自30名RA患者的血清针对变体F1654的电化学发光(ECL)反应的示图

[0308] [图92]图92显示来自30名RA患者的血清针对变体F1655的电化学发光(ECL)反应的示图

[0309] [图93]图93显示来自30名RA患者的血清针对变体F1329的电 化学发光(ECL)反应的示图

[0310] [图94]图94显示来自30名RA患者的血清针对变体F1331的电化学发光(ECL)反应的示图

[0311] [图95]图95显示来自30名RA患者的血清针对变体F1718的电化学发光(ECL)反应的示图

[0312] [图96]图96显示来自30名RA患者的血清针对变体F1719的电化学发光(ECL)反应的示图

[0313] [图97]图97显示来自30名RA患者的血清针对变体F1720的电化学发光(ECL)反应的示图

[0314] [图98]图98显示来自30名RA患者的血清针对变体F1721的电化学发光(ECL)反应的示图

[0315] [图99]图99显示来自30名RA患者的血清针对变体F1671的电化学发光(ECL)反应的示图

[0316] [图100]图100显示来自30名RA患者的血清针对变体F1670的电化学发光(ECL)反应的示图

[0317] [图101]图101显示来自30名RA患者的血清针对变体F1711的电化学发光(ECL)反应的示图

[0318] [图102]图102显示来自30名RA患者的血清针对变体F1712的电化学发光(ECL)反应的示图

[0319] [图103]图103显示来自30名RA患者的血清针对变体F1713的电化学发光(ECL)反应的示图

[0320] [图104]图104显示来自30名RA患者的血清针对变体F1722的电化学发光(ECL)反应的示图

[0321] [图105]图105显示来自30名RA患者的血清针对变体F1723的电化学发光(ECL)反应的示图

[0322] [图106]图106显示来自30名RA患者的血清针对变体F1724的电化学发光(ECL)反应的示图

[0323] [图107]图107显示来自30名RA患者的血清针对变体F1725的 电化学发光(ECL)反应的示图

[0324] [图108]图108显示来自30名RA患者的血清针对变体F1675的电化学发光(ECL)反应的示图

[0325] [图109]图109显示来自30名RA患者的血清针对变体F1714的电化学发光(ECL)反应的示图

[0326] [图110]图110显示来自30名RA患者的血清针对变体F1715的电化学发光(ECL)反应的示图

[0327] [图111]图111显示来自30名RA患者的血清针对变体F1716的电化学发光(ECL)反应的示图

[0328] [图112]图112显示来自30名RA患者的血清针对变体F1717的电化学发光(ECL)反应的示图

[0329] [图113]图113显示来自30名RA患者的血清针对变体F1683的电化学发光(ECL)反应的示图

[0330] [图114]图114显示来自30名RA患者的血清针对变体F1756的电化学发光(ECL)反应的示图

[0331] [图115]图115显示来自30名RA患者的血清针对变体F1757的电化学发光(ECL)反应的示图

[0332] [图116]图116显示来自30名RA患者的血清针对变体F1758的电化学发光(ECL)反应的示图

[0333] [图117]图117显示来自30名RA患者的血清针对变体F1759的电化学发光(ECL)反应的示图

[0334] [图118]图118显示来自30名RA患者的血清针对变体F1681的电化学发光(ECL)反应的示图

[0335] [图119]图119显示来自30名RA患者的血清针对变体F1749的电化学发光(ECL)反

应的示图

[0336] [图120]图120显示来自30名RA患者的血清针对变体F1750的电化学发光(ECL)反应的示图

[0337] [图121]图121显示来自30名RA患者的血清针对变体F1751的 电化学发光(ECL)反应的示图

[0338] [图122]图122显示来自30名RA患者的血清针对变体F1760的电化学发光(ECL)反应的示图

[0339] [图123]图123显示来自30名RA患者的血清针对变体F1761的电化学发光(ECL)反应的示图

[0340] [图124]图124显示来自30名RA患者的血清针对变体F1762的电化学发光(ECL)反应的示图

[0341] [图125]图125显示来自30名RA患者的血清针对变体F1763的电化学发光(ECL)反应的示图

[0342] [图126]图126显示来自30名RA患者的血清针对变体F1752的电化学发光(ECL)反应的示图

[0343] [图127]图127显示来自30名RA患者的血清针对变体F1753的电化学发光(ECL)反应的示图

[0344] [图128]图128显示来自30名RA患者的血清针对变体F1754的电化学发光(ECL)反应的示图

[0345] [图129]图129显示来自30名RA患者的血清针对变体F1755的电化学发光(ECL)反应的示图

[0346] [图130]图130显示来自30名RA患者的血清针对变体F1685的电化学发光(ECL)反应的示图

[0347] [图131]图131显示在注射Fv4-IgG1、Fv4-F1243和Fv4-F1245后在人FcRn转基因小鼠中随时间推移的血浆抗体浓度的示图。

[0348] [图132]图132显示在注射Fv4-IgG1、Fv4-F1243和Fv4-F1245后的人FcRn转基因小鼠中和在对照小鼠(无抗体注射)中随时间推移的血浆抗原(hsIL-6R)浓度的示图。

[0349] [图133]图133显示在注射Fv4-IgG1、Fv4-F1389后在人FcRn转基因小鼠中随时间推移的血浆抗体浓度的示图。

[0350] [图134]图134显示SPR分析的传感图。在不同条件(pH、Ca浓度)下,对抗hIgA抗体的hIgA结合进行了分析。

[0351] [图135]图135显示在注射GA2-F760和GA2-F1331后在人FcRn转基因小鼠中随时间推移的血浆抗体浓度的示图。

[0352] [图136]图136显示在注射GA2-F760和GA2-F1331后在人FcRn转基因小鼠中随时间推移的血浆hIgA浓度的示图。

[0353] [图137]图137显示在注射278-F760和278-F1331后在人FcRn转基因小鼠中随时间推移的血浆抗体浓度的示图。

[0354] [图138]图138显示在注射278-F760和278-F1331后在人FcRn转基因小鼠中随时间推移的血浆hIgE(Asp6)浓度的示图。

[0355] 实施方案的描述

[0356] 发明详述

[0357] 在描述本发明的材料与方法之前，应了解这些描述只是说明性的，并无意是限制性的。还应了解本发明不限于本文描述的特定的大小、形状、尺寸、材料、方法、方案等，因为这些可按照例行实验和/或优化改变。本说明书中所用术语只用于描述具体形式或实施方案的目的，并无意限制仅受随附权利要求书限制的本发明的范围。除非另有说明，否则本文所用全部技术和科学术语具有本发明所属领域普通技术人员通常理解的相同含义。在有冲突的情况下，以本说明书(包括定义)为准。

[0358] 本说明书中提及的各出版物、专利或专利申请的公开内容通过引用以其整体明确结合到本文中。然而，本文无一内容应被解释为承认本发明无资格通过先前发明先于这类公开内容。

[0359] 本文所用措词“一个”、“一种”和“所述”意指“至少一个”，除非另有明确说明。

[0360] 描述于WO/2011/122011的研究表明在pH7.4下与FcRn的结合提高的抗原结合分子(例如抗IL6受体抗体)能够从血浆消除抗原，并降低血浆总抗原浓度。因此，可通过pH依赖性抗原结合(在pH7.4下与血浆中的抗原结合，在pH6.0下在酸性内体内解离抗原)或通过离子化钙浓度依赖性抗原结合(在高离子化钙浓度下与血浆内的抗原结合，在低离子化钙浓度下在内体内解离抗原)改进抗原消除的效率(参见图1B)。图1A中显示了通过与常规抗体相比在中性pH下与FcRn的结合亲和力改进的pH依赖性抗原结合抗体从血浆中消除抗原的机制。

[0361] 本发明提供FcRn结合结构域中的新的氨基酸取代，其提高抗原结合分子在酸性和中性pH范围内的FcRn结合活性，其中在中性pH范围内的FcRn结合活性强于完整IgG或包含完整FcRn结合结构域的抗原结合分子的FcRn结合活性(例如强于3200nM)。修饰的抗原结合分子在给予后可降低血浆总抗原浓度超过包含除完整人IgGFcRn结合结构域以外相同抗原结合结构域的对照抗原结合分子。

[0362] Fc受体是免疫细胞(例如天然杀伤细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞和肥大细胞)表面上的蛋白质。它们与抗体的Fc(可结晶片段)区结合，所述Fc区与被感染细胞或侵入性病原体连接，并通过抗体介导的吞噬作用或依赖抗体的细胞介导毒性，刺激吞噬细胞或细胞毒性细胞消灭微生物或感染细胞。

[0363] 有几种不同类型的Fc受体，根据它们识别的抗体的类型对其分类。本文的术语“FcRn”是指结合IgG的新生儿Fc受体，在构上与MHCI类蛋白类似，在人中由FCGRT基因编码。

[0364] 本文所用术语“FcRn结合结构域”是指直接或间接与FcRn结合的蛋白质结构域。优选FcRn为哺乳动物FcRn，更优选为人FcRn。与FcRn直接结合的FcRn结合结构域是抗体Fc区。同时，能够与具有人FcRn结合活性的多肽(例如白蛋白或IgG)结合的区域，可通过白蛋白、IgG等与人FcRn间接结合。因此，这类人FcRn结合区可以是与具有人FcRn结合活性的多肽结合的区域。

[0365] 本文所用术语“Fc区”或“抗原结合分子的Fc区”是指与FcRn、优选与哺乳动物FcRn、更优选与人FcRn直接结合的FcRn结合结构域。具体地讲，Fc区是抗体的Fc区。优选Fc区是哺乳动物Fc区，更优选是人Fc区。具体地讲，本发明的Fc区是包含人免疫球蛋白的第2和第3恒定结构域(CH2和CH3)，更优选包含铰链、CH2和CH3的 Fc区。优选免疫球蛋白是IgG。

优选Fc区是人IgG1的Fc区。

[0366] 本发明提供具有修饰的FcRn结合结构域的抗原结合分子，其中与具有完整FcRn结合结构域的抗原结合分子相比，所述抗原结合分子在中性pH范围内的FcRn结合活性提高。

[0367] 具体地讲，本发明提供具有修饰的FcRn结合结构域的抗原结合分子，所述修饰的FcRn结合结构域在选自以下的一个或多个位置上在FcRn结合结构域中具有氨基酸取代：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436。本发明的抗原结合分子还可在另外的位置上包含取代。例如，除上述提及的一个或多个位置上的取代以外，抗原结合分子可包含EU256位上的取代。优选EU256位上的氨基酸被谷氨酸取代。

[0368] 术语“结合亲和力”或“结合活性”是指两种物质间非共价相互作用的强度，通过两种物质所形成的复合物的解离常数(KD)测量，除非另有明确定义。对特定靶分子(例如FcRn)，结合蛋白(或“配体”)可具有例如小于10^{-5}、10^{-6}、10^{-7}或10^{-8}M的KD。在第一pH范围内结合靶的数值KD小于在第二pH范围内结合靶的数值KD可表明相对于在第二pH范围内配体与靶的结合，在第一pH范围内结合配体与靶的结合亲和力较高。结合亲和力的差异可为至少1.5、2、3、4、5、10、15、20、50、70、80、100、500或1000倍。结合亲和力可通过各种方法测定，包括表面等离子体共振、平衡透析、平衡结合、凝胶过滤、ELISA或光谱法(例如采用荧光测定法)。

[0369] 在某一pH范围内FcRn结合结构域对FcRn的结合亲和力提高相当于与针对完整FcRn结合结构域所测量的FcRn结合亲和力相比，所测量的FcRn结合亲和力提高。KD(完整)的结合亲和力/KD(变体)的结合亲和力的差异为至少1.5、2、3、4、5、10、15、20、50、70、80、100、500或1000倍。FcRn结合结构域对FcRn的结合亲和力的提高可在酸性或中性pH范围内。

[0370] 术语“包含完整FcRn结合结构域的抗原结合分子”是指包含未修饰的FcRn结合结构域的抗原结合分子。本文所用术语“完整IgGFcRn结合结构域”是指人IgG的未修饰的FcRn结合结构域。具体地讲，FcRn结合结构域是完整人IgG的FcRn结合结构域。优选完整FcRn结合结构域是完整Fc区。术语“包含完整Fc区的抗体”是指包含未修饰的Fc区的抗体。未修饰的Fc区来源于其中的抗体优选为IgG。更优选其为人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4，还更优选为人IgG1。在本发明的特别优选的实施方案中，包含完整Fc区的抗体是包含未修饰的Fc区的抗体。包含完整Fc区的抗体可以是完整人IgG。

[0371] 本文所用术语“完整IgG”是指未修饰的IgG，并且不限于IgG的特定类别。这意味着人IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或其同种异型变体可用作“完整人IgG”，只要它可在酸性pH范围内与人FcRn结合。优选“完整IgG”是人IgG1。优选完整IgG是包含野生型Fc区的IgG。

[0372] 在本发明的情况下，在中性pH范围内抗原结合分子提高的FcRn结合活性优选强于KD3.2微摩尔。优选在中性pH范围内提高的FcRn结合活性强于700纳摩尔，更优选强于500纳摩尔，最优选强于150纳摩尔。

[0373] 在酸性pH范围内提高的本发明抗原结合分子的FcRn结合活性一般是完整IgG的FcRn结合活性约2倍-约100倍范围的FcRn结合活性。优选在酸性pH范围内提高的抗原结合分子的FcRn结合活性为完整IgG的FcRn结合活性的至少10倍。更优选在酸性pH范围内提高的本发明抗原结合分子的FcRn结合活性是完整IgG的FcRn结合活性的至少20倍。

[0374] 本文所用术语“中性pH范围”和“中性pH”通常是指pH6.7-pH10.0，优选pH7.0-

pH8.0内的任何pH值，其实例包括pH7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9和8.0。特别优选的酸性pH值为pH7.4，其接近体内血浆(血液)pH。

[0375] 本文所用术语“酸性pH范围”和“酸性pH”通常是指pH4.0-pH 6.5，优选pH5.5-pH6.5内的任何pH值，其实例包括pH5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4和6.5。特别优选的酸性pH值的范围为pH5.8-pH6.0，其接近体内早期内体的pH。

[0376] 有关本申请的氨基酸位置例如“EU387”或“位置387”，除非另有说明，否则按照称为EU编号系统(Kabat,E.A.,T.T.Wu,H.M.Perry,K.S.Gottesman,C.Foeler.1991.Sequences of Proteins of Immunological Interest.No.91-3242U.S.Public Health Services,National Institutes of Health,Bethesda)的方案编号，并且是指FcRn结合结构域中，特别是Fc区中的位置。以类似方式，取代用例如“EU387R”或“EU440E”表示，其中在“EU”之后给出的数字表明按照EU编号的取代的位置，数字后的字母是以一字母代码给出的取代的氨基酸。取代也可写为(氨基酸1)-位置-(氨基酸2)，其中第一氨基酸是被取代的氨基酸，第二氨基酸是在规定位置上的取代氨基酸。

[0377] 本文所用术语“取代”和“氨基酸的取代”是指氨基酸序列中的氨基酸被另一个氨基酸置换，其中后者不同于被置换的氨基酸。用于置换氨基酸的方法为本领域技术人员所熟知，包括但不限于编码氨基酸序列的核苷酸序列的突变。

[0378] 更具体地讲，FcRn结合结构域中氨基酸的取代是指关于亲本FcRn结合结构域的氨基酸序列的氨基酸置换。本发明的FcRn结合结构域还包括已具有所需取代的修饰的FcRn结合结构域。

[0379] 亲本FcRn结合结构域是具有以下位置的氨基酸和在中性pH下对FcRn无亲和力或亲和力低(弱于3200nM)的FcRn结合结构域：EU238位上的脯氨酸、EU250位上的苏氨酸、EU252位上的甲硫氨酸、EU254位上的丝氨酸、EU255位上的精氨酸、EU256位上的苏氨酸、EU258位上的谷氨酸、EU286位上的天冬酰胺、EU307位上的苏氨酸、EU308位上的缬氨酸、EU309位上的亮氨酸、EU311位上的谷氨酰胺、EU315位上的天冬酰胺、EU387位上脯氨酸、EU422位上的缬氨酸、EU424位上的丝氨酸、EU426位上的丝氨酸、EU428位上的甲硫氨酸、EU433位上的组氨酸、EU434位上的天冬酰胺、EU436位上的酪氨酸、EU438位上的谷氨酰胺和EU440位上的丝氨酸。亲本FcRn结合结构域可包含其它位置的取代，但优选亲本FcRn结合结构域是未修饰的。优选亲本FcRn结合结构域是Fc区(亲本Fc区)。优选亲本Fc区来源于哺乳动物抗体；更优选亲本Fc区是人抗体的Fc区。人抗体的Fc区在本文称为人Fc区。

[0380] 亲本Fc区优选为完整Fc区，更优选人完整Fc区。优选亲本Fc区为IgG的Fc区，更优选为人IgG的Fc区。甚至更优选亲本Fc区为包含野生型铰链、野生型CH2和野生型CH3结构域的人Fc区。在本发明的情况下，术语亲本抗体是指包含亲本Fc区的抗体。

[0381] 亲本抗原结合分子包括但不限于受体蛋白(膜结合受体和可溶性受体)、识别膜抗原(例如细胞表面标志物)的抗体和识别可溶性抗原(例如细胞因子)的抗体。

[0382] 本文所用术语“亲本抗原结合分子”是指具有亲本FcRn结合结构域的抗原结合分子。“亲本抗原结合分子”的来源不受限制，可获自非人动物或人的任何生物。优选生物选自小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、沙鼠(gerbil)、猫、兔、狗、山羊、绵羊、牛、马、骆驼和非人灵长类动物。在另一个实施方案中，“亲本抗原结合分子”也可获自食蟹猴(cynomologus monkey)、狨猴、猕猴、黑猩猩或人。亲本IgG可以是天然存在的IgG或天然存在的IgG的变体或工程改造

形式。亲本IgG可指多肽本身、包含亲本IgG的组合物或编码亲本IgG的氨基酸序列。要注意，“亲本IgG”包括下文概述的已知市售的重组产生的IgG。优选“亲本IgG”获自人IgG1，但不限于IgG的具体亚类。这意味着人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4可适当地用作“亲本IgG”。类似地，上述任何生物的IgG的任何亚类可优选用作“亲本IgG”。天然存在的IgG的变体或工程改造形式的实例描述于Curr Opin Biotechnol.2009年12月;20(6):685-91;Curr Opin Immunol.2008年8月;20(4):460-70;Protein Eng Des Sel.2010年4月;23(4):195-202;WO2009/086320、WO2008/092117、WO2007/041635和WO2006/105338，但不限于这些。

[0383] 本发明的FcRn结合结构域或Fc区可在两个或更多个位置包含取代，这在本文称为取代的“组合”。例如由组合“EU424/EU434/EU436”限定的Fc区是包含在EU424、EU434和EU436位上的取代的Fc区。

[0384] 取代氨基酸(亲本FcRn结合结构域中的氨基酸被该氨基酸取代)可以是任何氨基酸，除非文中明确说明，包括但不限于：丙氨酸(Ala,A)、精氨酸(arg,R)、天冬酰胺(asn,N)、天冬氨酸(asp,D)、半胱氨酸(cys,C)、谷氨酸(glu,E)、谷氨酰胺(gln,Q)、甘氨酸(gly,G)、组氨酸(his,H)、异亮氨酸(ile,I)、亮氨酸(leu,L)、赖氨酸(lys,K)、甲硫氨酸(met,M)、苯丙氨酸(phe,F)、脯氨酸(pro,P)、丝氨酸(ser,S)、苏氨酸(thr,T)、色氨酸(trp,W)、酪氨酸(tyr,Y)和缬氨酸(val,V)。优选EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438和EU440位中的任一个处的取代氨基酸选自：丙氨酸(Ala,A)、精氨酸(arg,R)、谷氨酸(glu,E)、谷氨酰胺(gln,Q)、天冬氨酸(asp,D)、丝氨酸(ser,S)、苏氨酸(thr,T)、酪氨酸(tyr,Y)和赖氨酸(lys,K)。

[0385] 本发明的一个优选的实施方案中，本发明的抗原结合分子具有修饰的FcRn结合结构域，所述修饰的FcRn结合结构域包含在以下位置上用不同于被取代氨基酸的氨基酸的氨基酸取代：

[0386] a)在EU252和EU434位上，和

[0387] b)在选自以下的一个或多个位置上：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU256、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436。

[0388] 取代氨基酸可以是任何氨基酸，除非文中明确说明。EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436位上的优选的取代氨基酸见表1。

[0389] [表1]

[0390] 优选的取代氨基酸

[0391]

位置(按照 EU 编号系统)	取代氨基酸
EU238	天冬氨酸
EU250	缬氨酸
EU252	酪氨酸
EU254	苏氨酸
EU255	亮氨酸
EU256	谷氨酸
EU258	天冬氨酸或异亮氨酸
EU286	谷氨酸
EU307	谷氨酰胺
EU308	脯氨酸
EU309	谷氨酸
EU311	丙氨酸或组氨酸
EU315	天冬氨酸
EU428	异亮氨酸
EU433	丙氨酸、赖氨酸、脯氨酸、精氨酸或丝氨酸
EU434	酪氨酸或色氨酸
EU436	异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸、苏氨酸或苯丙氨酸

[0392] 优选本发明的修饰的FcRn结合结构域包含表1提供的至少一个氨基酸取代。可使用FcRn结合结构域而无任何改动，只要它们在规定位置上具有上文给出的氨基酸的至少一个，且所述FcRn结合结构域在酸性和中性pH范围内具有人FcRn结合活性，而在中性pH范围内的FcRn结合活性提高。

[0393] 在一个优选的实施方案中，本发明的修饰的抗原结合分子在FcRn结合结构域中在3个或更多个位置上包含修饰，其中所述3个或更多个位置是表2、4-7给出的组合之一。

[0394] [表2]

[0395] FcRn结合结构域中取代位置的优选组合

[0396]

a)	EU252/EU434/EU436，
b)	EU252/EU434/EU307/EU311，
c)	EU252/EU434/EU315，
d)	EU252/EU434/EU308，
e)	EU252/EU434/EU238，
f)	EU252/EU434/EU436/EU307/EU311，
g)	EU252/EU434/EU255
h)	EU252/EU434/EU258

i)	EU252/EU434/EU255/EU258
j)	EU252/EU434/EU255/EU258

[0397] 在更优选的实施方案中，本发明的抗原结合分子在FcRn结合结构域中包含3个或更多个氨基酸取代，其中所述3个或更多个取代是表3、12、14和17-20给出的组合之一。

[0398] [表3]

[0399] FcRn结合结构域中优选的取代组合

[0400]

1	M252Y/N434Y/Y436V
2	M252Y/N434Y/Y436T
3	M252Y/N434Y/Y436F
4	M252Y/N434Y/Y436V
5	M252Y/N434Y/Y436V
6	M252Y/N434Y/Y436T
7	M252Y/N434Y/Y436T
8	M252Y/N434Y/Y436F
9	M252Y/N434Y/Y436F
10	M252Y/N434Y/Y436V
11	M252Y/N434Y/Y436V
12	M252Y/H433D/N434Y/Y436V
13	M252Y/H433D/N434Y/Y436V
14	M252Y/H433D/N434Y/Y436V
15	M252Y/H433D/N434Y/Y436V
16	M252Y/S254T/T256E/T307Q/Q311A/H433D/N434Y/Y436V
17	M252Y/S254T/T256E/V308P/H433D/N434Y/Y436V
18	M252Y/H433D/N434W/Y436V
19	M252Y/H433D/N434W/Y436V
20	M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V
21	M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V
22	M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V
23	M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V
24	M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V
25	M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V
26	M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V
27	M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V
28	M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V
29	M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V
30	M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V
31	M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V
32	M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V

33	M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V

[0401]

34	M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V
35	M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V
36	M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V
37	M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V
38	M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V
39	M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V
40	M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V
41	M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V
42	M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V
43	M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V
44	M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V
45	M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V
46	M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V
47	M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V
48	M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V
49	M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V
50	M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V
51	M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V
52	M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V
53	M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V
54	M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V
55	M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V
56	M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V
57	M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V
58	M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V
59	M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V
60	L235R/G236R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V
61	L235R/G236R/S239K/M252Y/S254T/T256F/N434Y/Y436V
62	P238D/M252Y/V308P/N434Y
63	P238D/M252W/N434Y
64	P238D/M252Y/M428F/N434Y

[0402] 稳定性、免疫原性和聚集体形成

[0403] 通过引入取代对FcRn结合结构域进行改造可能降低抗原结合分子的稳定性(WO/2007/092772)。药物蛋白质的稳定性对于制备药物至关重要,因为稳定性差的蛋白质在储存期间往往容易聚集。因此Fc 区中因取代引起的稳定性降低会使得难以开发稳定的制剂(WO2007/092772)。

[0404] 另外,就单体物类和高分子量物类而言,药物蛋白质的纯度对药物开发也很重要。

在蛋白质A纯化后野生型IgG1不含大量的高分子量物类，但通过引入取代对FcRn结合结构域进行改造可导致较大量的高分子量物类。在这种情况下，需要通过纯化过程从主体药物物质中除去高分子量物类，这在纯化过程的开发中可能是困难的。

[0405] 此外，蛋白质药物的免疫原性在人中是重要的，因为抗药抗体的存在可导致药物从机体中清除，因此丧失治疗功效(IDrugs2009;12:233-7)。当将取代引入野生型Fc结构域(例如IgG1Fc结构域)中时，修饰的序列变成非人序列。这类修饰的序列可被MHC II类呈递，因此在人患者中可能是免疫原性的。

[0406] 如果蛋白质包含显示稳定性和纯度差的Fc变体，则它们将无法作为药物开发，并且免疫原性差将阻碍临床开发。因此本发明的一个目的是改进在pH7.4下的FcRn结合亲和力而又不：

[0407] 丧失重大稳定性；

[0408] 提高高分子量物类比率的量，和

[0409] 提高免疫原性的风险(抗药抗体形成的风险)

[0410] (第1组)

[0411] 因此，本发明还提供这样的抗原结合分子，所述抗原结合分子包含在FcRn结合结构域中在EU252、EU434、EU307和EU311位上的氨基酸取代、在pH7下对FcRn的结合活性超过15nM、熔解温度Tm为57.5℃或更高、HMW小于2%，且免疫原性低，其中用Epibase(Lonza)测定，免疫原性低相当于小于500的评分。

[0412] 优选抗原结合分子在FcRn结合结构域中在4个或更多个位置上包含氨基酸取代，其中所述4个或更多个位置是选自以下的组合之一：

[0413] a)EU252/EU434/EU307/EU311/EU436，和

[0414] b)EU252/EU434/EU307/EU311/EU436与选自EU286、EU308 和EU428的一个或多个位置的组合。

[0415] 表4中提供了优选的组合。

[0416] [表4]

[0417]

a)	EU252 和 EU434 和 EU307 和 EU311 和 EU436 和 EU286;
b)	EU252 和 EU434 和 EU307 和 EU311 和 EU436 和 EU308
c)	EU252 和 EU434 和 EU307 和 EU311 和 EU436 和 EU286 和 EU308
d)	EU252 和 EU434 和 EU307 和 EU311 和 EU436 和 EU428
e)	EU252 和 EU434 和 EU307 和 EU311 和 EU436 和 EU308 和 EU428
f)	EU252 和 EU434 和 EU307 和 EU311 和 EU436 和 EU250 和 EU428
g)	EU252 和 EU434 和 EU307 和 EU311 和 EU436 和 EU250 和 EU308
h)	EU252 和 EU434 和 EU307 和 EU311 和 EU436 和 EU250 和 EU286 和 EU308
i)	EU252 和 EU434 和 EU307 和 EU311 和 EU436 和 EU250 和 EU286 和 EU308 和 EU428

[0418] 特别优选的为表4的组合a)、g)、h)和i)。

[0419] 在甚至更优选的实施方案中，修饰的FcRn结合结构域包含：

[0420] a)EU252位上的酪氨酸、EU286位上的谷氨酸、EU307位上的谷氨酰胺、EU311位上的

丙氨酸、EU434位上的酪氨酸和EU436位上的缬氨酸；或

[0421] b)EU250位上的缬氨酸、EU252位上的酪氨酸、EU307位上的谷氨酰胺、EU308位上的脯氨酸、EU311位上的丙氨酸、EU434位上的酪氨酸和EU436位上的缬氨酸；或

[0422] c)EU250位上的缬氨酸、EU252位上的酪氨酸、EU286位上的谷氨酸、EU307位上的谷氨酰胺、EU308位上的脯氨酸、EU311位上的丙氨酸、EU434位上的酪氨酸和EU436位上的缬氨酸；或

[0423] d)EU250位上的缬氨酸、EU252位上的酪氨酸、EU286位上的谷氨酸、EU307位上的谷氨酰胺、EU308位上的脯氨酸、EU311位上的丙氨酸、EU434位上的酪氨酸和EU436位上的缬氨酸。

[0424] (第2组)

[0425] 本发明还提供在FcRn结合结构域中在3个或更多个位置上包含氨基酸取代的抗原结合分子，其中所述3个或更多个位置是选自以下 的组合之一：a)EU252/EU434/EU307/EU311；和b)EU252/EU434/EU308；其中所述抗原结合分子的FcRn结合活性在中性pH下为15-50nM，Tm高于60℃，HMW小于2％，且其中所述抗原结合分子的免疫原性低，其中免疫原性低相当于用Epibase(Lonza)测定的小于500的评分。

[0426] 在优选的实施方案中，氨基酸取代位于4个或更多个位置上，其中所述4个或更多个位置是表5提供的组合之一。

[0427] [表5]

[0428] 优选的组合

[0429]

a)	EU252/EU434/EU307/EU311/EU286
b)	EU252/EU434/EU307/EU311/EU286/EU254
c)	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436
d)	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU254
e)	EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU250
f)	EU252/EU434/EU308/EU250
g)	EU252/EU434/EU308/EU250/EU436/
h)	EU252/EU434/EU308/EU250/EU307/EU311

[0430] 更优选的是包含4个或更多个氨基酸取代的抗原结合分子，其中所述4个或更多个取代是选自以下的组合之一：

[0431] a)EU252位上的酪氨酸、EU286位上的谷氨酸、EU307位上的谷氨酰胺、EU311位上的丙氨酸和EU434位上的酪氨酸；

[0432] b)EU252位上的酪氨酸、EU254位上的苏氨酸、EU286位上的谷氨酸、EU307位上的谷氨酰胺、EU311位上的丙氨酸和EU434位上的酪氨酸；

[0433] c)EU252位上的酪氨酸、EU307位上的谷氨酰胺、EU311位上的丙氨酸、EU434位上的酪氨酸和436位上的异亮氨酸；

[0434] d)EU252位上的酪氨酸、EU254位上的苏氨酸、EU286位上的谷氨酸、EU307位上的谷氨酰胺、EU311位上的丙氨酸、EU434位上的酪氨酸和EU436位上的异亮氨酸；

[0435] e)EU250位上的缬氨酸、EU252位上的酪氨酸、EU254位上的苏 氨酸、EU308位上的

脯氨酸、EU434位上的酪氨酸和EU436位上的缬氨酸；

[0436] f)EU250位上的缬氨酸、EU252位上的酪氨酸、EU307位上的谷氨酰胺、EU311位上的丙氨酸、EU434位上的酪氨酸和EU436位上的缬氨酸；

[0437] g)EU252位上的酪氨酸、EU307位上的谷氨酰胺、EU311位上的丙氨酸、EU434位上的酪氨酸和EU436位上的缬氨酸；

[0438] h)EU250位上的缬氨酸、EU252位上的酪氨酸、EU308位上的脯氨酸和EU434的酪氨酸；和

[0439] i)EU250位上的缬氨酸、EU252位上的酪氨酸、307位上的谷氨酰胺、EU308位上的脯氨酸、EU311位上的丙氨酸和EU434位上的酪氨酸。

[0440] (第3组)

[0441] 本发明还提供在FcRn结合结构域中包含以下氨基酸取代的抗原结合分子：

[0442] a)在EU252/EU434位上；和

[0443] b)在EU436位上和/或在EU254位上和/或在EU315位上；

[0444] 且在pH7下FcRn结合活性为50-150nM，Tm高于63℃，HMW小于2%，且免疫原性极低，其中免疫原性极低定义为用Epibase(Lonza)测定的小于250的评分。

[0445] 优选，氨基酸取代在3个或更多个位置上，其中所述3个或更多个位置为表6提供的组合之一。

[0446] [表6]

[0447] 优选的组合

[0448]

a)	EU252/EU315/EU434；
b)	EU252/EU434/EU436
c)	EU252/EU254/EU434/EU436

[0449] 在更优选的实施方案中，修饰的抗原结合分子包含3个或更多个氨基酸取代，其中所述3个或更多个取代是选自以下的组合之一：

[0450] a)EU252位上的酪氨酸、EU315位上的天冬氨酸和EU434位上的酪氨酸；

[0451] b)EU252位上的酪氨酸、EU434位上的酪氨酸和EU436位上的异亮氨酸；

[0452] c)EU252位上的酪氨酸、EU434位上的酪氨酸和EU436位上的亮氨酸；

[0453] d)EU252位上的酪氨酸、EU434位上的酪氨酸和EU436位上的缬氨酸；和

[0454] e)EU252位上的酪氨酸、EU254位上的苏氨酸、EU434位上的酪氨酸和EU436位上的异亮氨酸。

[0455] (第4组)

[0456] 本发明还提供在FcRn结合结构域中在3个或更多个位置上包含氨基酸取代的抗原结合分子，其中3个或更多个位置是表7提供的组合之一。所述修饰的抗原结合分子在pH7下对FcRn的结合活性为150-700nM，Tm高于66.5℃，HMW小于2%，且免疫原性极低，其中免疫原性极低定义为用Epibase(Lonza)测定的小于250的评分。

[0457] [表7]

[0458]

a)	EU307/EU311/EU434

b)	EU307/EU309/EU311/EU434
c)	EU307/EU309/EU311/EU434
d)	EU250/EU252/EU434/EU436

[0459] 优选修饰的抗原结合分子包含3个或更多个取代，其中所述3个或更多个取代是选自以下的组合之一：

[0460] a)EU307位上的谷氨酰胺、EU311位上的组氨酸和EU434的酪氨酸；

[0461] b)EU307位上的谷氨酰胺、EU309位上的谷氨酸、EU311位上的丙氨酸、EU434位上的酪氨酸；

[0462] c)EU307位上的谷氨酰胺、EU309位上的谷氨酸、EU311位上的组氨酸、EU434位上的酪氨酸；或

[0463] d)EU250位上的缬氨酸、EU252位上的酪氨酸、EU434位上的酪氨酸、EU436位上的缬氨酸。

[0464] 预存抗药抗体

[0465] 抗体中氨基酸的取代可产生负面结果，例如治疗性抗体的免疫原性提高，这进而可导致细胞因子风暴和/或产生抗药抗体(ADA)。由于ADA可影响治疗性抗体的功效和药代动力学，有时导致严重的副作用，因此可能限制治疗性抗体的临床效用和功效。许多因素影响治疗性抗体的免疫原性，效应T细胞表位的存在是因素之一。同样地，针对治疗性抗体的预存抗体的存在也可能是成问题的。这类预存抗体的实例是类风湿因子(RF)、针对抗体(即IgG)的Fc部分的自身抗体(针对自身蛋白质的抗体)。类风湿因子特别存在于患有系统性红斑狼疮(SLE)或类风湿性关节炎的患者中。在关节炎患者中，RF和IgG连在一起形成对疾病过程起作用的免疫复合物。最近，报道了具有诱导显著类风湿因子结合的Asn434His突变的人源化抗CD4IgG1抗体(Clin Pharmacol Ther.2011年2月;89(2):283-90(NPL9))。详细研究证实，与亲本人IgG1相比，人IgG1中的Asn434His突变增加类风湿因子与抗体的Fc区的结合。

[0466] RF是针对人IgG的多克隆自身抗体，人IgG序列中RF的表位在克隆间不同，但是RF表位似乎位于CH2/CH3界面区以及可能与FcRn结合表位重叠的CH3结构域。因此，提高在中性pH下对FcRn的结合亲和力的突变还可能提高与RF的特定克隆的结合亲和力。

[0467] 因此，优选提高在中性和/或酸性pH下的FcRn结合亲和力而又不同时提高治疗性抗体在中性pH下对血浆中的预存抗体的结合亲和力。

[0468] 因此，本发明还提供包含修饰的FcRn结合结构域(优选修饰的Fc区)的抗原结合分子，与包含野生型Fc区的抗原结合分子的结合亲和力相比，其在中性pH下对预存ADA的结合活性不显著提高。修饰的FcRn结合结构域(修饰的Fc区)优选在选自以下的一个或多个位置上 包含氨基酸取代：EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438和EU440。

[0469] 优选将上述取代引入在中性或酸性pH下对FcRn的亲和力提高的抗原结合分子的FcRn结合结构域或Fc区中，籍此所述修饰的FcRn结合结构域或Fc区在中性pH下对预存ADA的结合活性提高。取代的作用是降低对预存ADA的结合活性。因此，在优选的实施方案中，与在中性或酸性pH下对FcRn的结合活性提高且在中性pH范围内对预存抗药抗体的结合活性提高的FcRn结合结构域或Fc区相比，本发明的修饰的FcRn结合结构域或修饰的Fc区对预存ADA的结合活性降低。优选在中性pH下对FcRn和预存ADA的结合活性提高的抗原结合分子是

在选自以下的一个或多个位置上包含氨基酸取代的抗原结合分子：上述EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436。除上述一个或多个位置上的取代以外，还可在EU256位上包含取代。优选EU256位上的氨基酸被谷氨酸取代。

[0470] 因此，本发明还提供与包含野生型Fc区的抗原结合分子的结合亲和力相比，包含在中性或酸性pH下对FcRn的亲和力提高而在中性pH下对预存抗药抗体(ADA)的亲和力不显著提高的修饰的Fc区的抗原结合分子。在优选的实施方案中，本发明提供包含在中性或酸性pH下对FcRn的亲和力提高的修饰的Fc区的抗原结合分子，其在选自以下的一个或多个位置上包含氨基酸取代：EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438和EU440。

[0471] 优选包含与对照抗原结合分子相比，在中性或酸性pH下对FcRn的亲和力提高而在中性pH下对预存ADA的结合活性不显著提高的修饰Fc区的抗原结合分子，其中修饰的Fc区包含选自表8所示取代的在一个或多个位置上的氨基酸取代。

[0472] [表8]

[0473] 取代氨基酸：

[0474]

位置	被以下取代						
EU387	R						
EU422	E	R	S	D	K	T	Q
EU424	E	R	K	N			
EU426	D	Q	A	Y			
EU433	D						
EU436	T						
EU438	E	R	S	K			
EU440	E	D	Q				

[0475] 本文所用术语“抗药抗体”和“ADA”是指对位于治疗性抗体上的表位具有结合亲和力并因此能够结合所述治疗性抗体的内源抗体。本文所用术语“预存抗药抗体”和“预存ADA”是指在将治疗性抗体给予患者前在患者血液中存在和可检出的抗药抗体。优选预存ADA是人抗体。在特别优选的实施方案中，预存ADA是类风湿因子，一种针对人IgG抗体的Fc区的多克隆或单克隆自身抗体。类风湿因子的表位位于CH2/CH3界面区以及CH3结构域，但在克隆间可变化。

[0476] 包含在中性或酸性pH下对FcRn的亲和力提高且在中性pH下对预存抗药抗体的亲和力提高的FcRn结合结构域区(或Fc区)的抗原结合分子是这样的抗原结合分子，其包含与包含完整FcRn结合结构域(或完整Fc区)的抗体相比，经修饰以提高抗原结合分子的FcRn结合结构域(或Fc区)对FcRn的结合亲和力的FcRn结合结构域(或Fc区)。预期的修饰包括但不限于抗原结合结构域的Fc部分的氨基酸序列中的氨基酸取代。包含在中性pH范围内对预存ADA的结合活性提高且在中性(FcRn结合活性在中性pH下提高的目标抗原结合分子的情况下)或酸性pH(FcRn结合活性在酸性pH下提高的目标抗原结合分子的情况下)下对FcRn的结合活性提高的FcRn结合结构域或Fc区的抗原结合分子在本文称为“参比抗体”。“参比抗体”优选为在取代选自以下的一个或多个位置上的氨基酸之前的修饰抗原结合分子：EU387、

EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438和EU440，更优选 在引入表8提供的任一个取代之前的修饰的抗原结合分子。“参比抗体”可以是在FcRn结合结构域中在选自以下的一个或多个位置上包含氨基酸取代的抗原结合分子：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU256、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436。

[0477] 在中性pH范围内FcRn结合活性提高的“参比抗体”的实例是包含在中性pH范围内对FcRn的亲和力提高且在中性pH下对预存ADA的亲和力提高的Fc区的抗原结合分子，其在Fc区中在以下位置上包含氨基酸取代：

[0478] a)在EU252和EU434位上；和

[0479] b)选自EU238、EU250、EU254、EU255、EU256、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433和EU436的一个或多个位置。

[0480] 更优选包含在中性pH范围内对FcRn的亲和力提高且在中性pH范围内对预存ADA的亲和力的提高的Fc区的抗原结合分子，包含表9中提供的组合之一。

[0481] [表9]

[0482] 在中性pH范围内FcRn结合活性提高的参比抗体的取代的优选组合

[0483]

1	M252Y/N434Y/
2	M252Y/N434Y/Y436V
3	M252Y/N434Y/Y436F
4	M252Y/N434Y/Y436V
5	M252Y/S254T/T256E/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
6	M252Y/S254T/T256E/V308P/N434Y/Y436V
7	M252Y/N434W/Y436V
8	M252Y/S254T/T256F/N434Y/Y436V
9	M252Y/S254T/T256E/N286E/N434Y/Y436V
10	M252Y/S254T/R255L/T256E/N434Y/Y436V
11	M252Y/S254T/R255L/T256E/N434Y/Y436V
12	M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/N434Y/Y436V
13	M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/N434Y/Y436V
14	M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V
15	M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V
16	M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V
17	M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V
18	M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V
19	M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V
20	L235R/G236R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V
21	L235R/G236R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V
22	EU238D/EU252Y/EU434Y/EU436V
23	EU252Y/EU434Y/EU436V
24	EU250V/EU252Y/EU434Y/EU436V/EU3070/EU308P/EU311A

25	EU252Y/EU434Y/EU436V/EU235R/EU239K
26	EU252Y/EU434Y
27	EU252Y/EU434Y/EU436V

[0484] 在酸性pH范围内FcRn结合活性提高的“参比抗体”的实例是包含在酸性pH范围内对FcRn的亲和力提高且在中性pH范围内对预存ADA的亲和力提高的Fc区的抗原结合分子，其优选包含以下取代

[0485] i)在EU434上，或

[0486] ii)在两个或更多个位置上，其中所述两个或更多个位置是选自以下的组合之一：a)EU252/EU254/EU256；b)EU428/EU434；和c) EU250/EU428。

[0487] 优选包含在酸性pH范围内亲和力提高且在中性pH下对预存ADA的亲和力提高的Fc区抗原结合分子包含

[0488] i)取代N434H；或

[0489] ii)以下组合之一：a)M252Y/S254T/T256E；b)M428L/N434S；和c)T250Q和M428L(EU编号)。

[0490] 优选包含含有下列取代或组合之一的Fc区的抗原结合分子：a)M252Y/S254T/T256E，b)M428L/N434S或c)T250Q和M428L或d) N434H (EU编号)在酸性pH下对FcRn的结合活性提高而又不提高在中性pH范围内的结合活性。

[0491] 抗原结合分子的Fc区对预存抗药抗体的结合活性在本申请中用在中性pH下的电化学发光(ECL)反应表示；然而，存在本领域技术人员已知的其它适合的测定对预存ADA的结合活性的方法。ECL测定法描述于例如Moxness等(Clin Chem，2005，51:1983-85)和本发明的实施例。本领域技术人员可适当选择用于测定对预存ADA的结合活性的测定法的条件，因此该条件无特殊限制。

[0492] 提高或更高的对预存ADA的结合亲和力是与对照抗原结合分子对预存ADA的结合亲和力相比提高的。

[0493] 本文所用术语“对照抗原结合分子”是指包含完整人Fc区的抗原结合分子，优选包含完整人Fc区的抗体或抗体衍生物。

[0494] 可在自10℃到50℃的任何温度下评价对预存ADA的结合亲和力。优选采用自15℃至40℃的温度以测定人Fc区和人预存ADA间的结合亲和力。更优选采用自20℃到35℃的任何温度，像20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34和35℃的任何温度以测定人Fc区和人预存ADA间的结合亲和力。优选温度介于20和25℃之间，更优选在25℃下。在优选的实施方案中，人预存ADA和人Fc区间的相互作用在pH7.4(或pH7.0)下和在25℃下测量。

[0495] 在本发明的情况下，术语“对预存ADA的结合亲和力提高”是指 与所测量的对照抗原结合分子对预存ADA的结合亲和力相比，所测量的本发明的抗原结合分子对预存ADA的结合亲和力(即KD)提高。可在各个患者中或在患者组中观察到对预存ADA的结合亲和力的这种提高。

[0496] 本文所用术语“多名患者”和“患者”没有特别限制，包括患有疾病并在治疗期间向其给予治疗性抗原结合分子的所有人类。优选患者是患有自身免疫病的人。更优选患者是患有关节炎性疾病或系统性红斑狼疮(SLE)的人。关节炎性疾病特别包括类风湿性关节炎。

[0497] 在本发明的情况下，个体患者中对预存ADA的结合活性的显著提高相当于与对照

抗原结合分子对预存ADA的结合亲和力相比，在患者中所测量的包含修饰的Fc区的治疗性抗原结合分子(即治疗性抗体)对预存ADA的结合活性提高至少10％、至少20％、至少30％、至少40％、至少50％、至少60％。与对照抗原结合分子对预存ADA的结合亲和力相比，优选包含修饰的Fc区的抗原结合分子的结合活性的提高为至少20％，更优选提高为至少30％，甚至更优选为至少40％，最优选提高为至少50％。或者，患者中抗原结合分子对预存ADA的结合活性的显著提高优选为对抗原结合分子的ECL反应超过250、优选到至少500的ECL、更优选对至少1000的ECL、最优选到至少2000的ECL。更优选提高是与对照抗原结合分子的小于500(优选小于250)的ECL反应相比的提高。对照抗原结合分子对预存ADA的结合活性与具有修饰的Fc区的抗原结合分子对预存ADA的结合活性之间的优选范围特别为小于250-至少250、小于250-至少500、小于500-500或更高、小于500-1000或更高和小于500-至少2000的ECL反应。

[0498] 对预存ADA的结合活性的提高还可相当于与在中性pH下对对照抗原结合分子的ECL反应为至少500(优选至少250)的患者部分相比，对具有提高的a)在中性或酸性pH下对FcRn和b)在中性pH下对预存ADA的结合活性的抗原结合分子的ECL反应为至少500(优选至少250)的患者群中的患者部分所测量的增加。患者群中的患者部分“显 著”增加优选为与对对照抗原结合分子具有ECL反应的患者部分相比，对具有包含修饰的Fc区的治疗性抗原结合分子在中性pH下对类风湿因子的ECL反应为500或更低(优选250或更高)的患者增加至少10％、至少20％、至少30％、至少40％、至少50％。优选提高至少20％、更优选至少30％，甚至更优选为至少40％，最优选为50％或更多。

[0499] 在本发明的情况下，对预存ADA的结合亲和力降低是指与针对参比抗体测量的结合活性相比，所测量的结合活性(即KD或ECL反应)降低。可在个体患者中或在患者组中观察到对预存ADA的结合亲和力的这种降低。个体患者中在中性pH下治疗性抗原结合分子对预存ADA的亲和力的降低是指与所述患者中针对参比抗体所测量的在中性pH下对预存ADA的结合活性相比，所测量的在中性pH下的结合活性降低。优选个体患者中的显著降低是与在中性pH下参比抗体对预存ADA的结合活性相比，所测量的在中性pH下修饰的抗原结合分子对预存ADA的结合活性降低至少10％、至少20％、至少30％、至少40％、至少50％。更优选与参比抗体相比降低为至少30％，甚至更优选为40％，最优选为50％或更高。

[0500] 或者，个体患者中修饰的抗原结合分子对预存ADA的结合活性的显著降低可测量为：与参比抗体的ECL反应相比，所述抗原结合分子的ECL反应自500或更大的ECL反应(优选1000或更大的ECL、最优选2000或更大的ECL)降低至小于500、优选小于250。优选的降低为从500或更大的ECL反应到小于500的ECL反应、更优选从至少250到小于250、甚至更优选从至少500到小于250。优选的范围特别为从至少250到小于250、从至少500到小于250、从至少1000到小于250、从至少2000到小于250、从至少500到小于500、从至少1000到小于500和从至少2000到小于500。

[0501] 降低还可以是具有增加的在中性pH范围内其预存ADA与修饰的抗原结合分子的结合的患者群中患者百分比的降低。换句话说，降低可测量为与参比抗体的ECL反应相比，具有其预存ADA对修饰的 抗原结合分子的ECL反应的人的百分比的降低。优选降低可以是与参比抗体对预存ADA的结合活性提高的患者的部分相比，其中治疗性抗原结合分子对预存ADA的结合活性提高的患者群中的患者部分降低至少10％、至少20％、至少30％、至少40％、

至少50％，其中结合增加表示为500或更大、优选250或更大的ECL反应。优选降低为至少20％，更优选降低为至少30％，甚至更优选为40％，最优选为50％或更大。

[0502] 在优选的实施方案中，本发明的治疗性抗原结合分子在中性pH下对预存ADA具有低结合活性。具体地讲，与在中性pH下参比抗体对预存ADA的结合活性相比，在中性pH下本发明的修饰抗原结合分子对预存ADA的结合活性优选显著降低。更优选与对照抗原结合分子的结合亲和力相比，在中性pH下本发明的修饰抗原结合分子对预存ADA的结合活性不显著提高(对预存ADA的结合活性与对照抗原结合分子的大致相同)。对预存ADA的低结合活性或基线亲和力优选为各个患者中小于500的ECL反应。优选ECL反应小于250。在患者群中，对预存ADA的低结合活性是患者群中90％的患者、更优选95％的患者中、最优选98％的患者中的ECL反应小于500。

[0503] 在更优选的实施方案中，抗原结合分子包含在中性或酸性pH下对FcRn的亲和力提高的修饰的FcRn结合结构域，其中与对照抗原结合分子相比，在中性pH下对预存ADA的结合活性不显著提高，藉此本发明的修饰的FcRn结合结构域包含在表10提供的一个或多个位置或组合上的取代。

[0504] [表10]

[0505] FcRn结合结构域中取代的位置和位置组合

[0506]

1)	EU387
2)	EU422
3)	EU424
4)	EU426
5)	EU436
6)	EU438
7)	EU440
8)	EU438和EU440
9)	EU422和EU424
10)	EU433

[0507] 在更优选的实施方案中，本发明的抗原结合分子包含具有表11提供的一个或多个取代或组合的修饰的FcRn结合结构域。

[0508] [表11]

[0509] FcRn结合结构域中的取代和取代组合

[0510]

1	EU387R
2	EU422E
3	EU422R
4	EU422S
5	EU424E
6	EU424R
7	EU438E

8	EU438R
9	EU438S
10	EU440E
11	EU422E/EU424R
12	EU422S/FU424R
13	EU438R/EU440E
14	EU422D
1 5	EU422K
16	EU422T
17	EU422Q
18	EU438K
19	EU440D
20	EU440Q
21	EU438R/EU440D
22	EU438K/EU440E
23	EU438K/FU440D
24	EU424N
25	EU426D
26	EU426A
27	EU426Q
28	EU426Y
29	EU436F
30	EU436T
31	EU433D

[0511] 在优选的实施方案中，抗原结合分子包含与对照抗原结合分子相比a)在中性或酸性pH下对FcRn的亲和力提高，b)在中性pH下对预存ADA的结合亲和力不显著提高的修饰的FcRn结合结构域，所述抗原结合分子包含表12提供的任一个取代组合。

[0512] 还优选与包含野生型Fc区的抗原结合分子相比，在中性pH范围内FcRn结合活性提高且在中性pH下对预存ADA的结合亲和力不显著提高的抗原结合分子在FcRn结合结构域中在以下位置上包含氨基酸取代：a)选自以下的一个或多个位置：EU387、EU422、EU424、EU438、EU440、EU433，或b)在两个或更多个位置上，其中所述两个或更多个位置是组合EU422/EU424或EU438/EU440。更优选取代选自表11提供的取代。

[0513] 甚至更优选与包含野生型Fc区的抗原结合分子相比，在中性pH范围内对FcRn的结合活性提高且在中性pH下对预存ADA的结合亲和力不显著提高的抗原结合分子的FcRn结合结构域包含表12提供的任一个取代组合。具体来说，在在中性pH范围内FcRn结合活性提高而在中性pH下对预存ADA的结合亲和力不显著提高的优选的修饰抗原结合分子在FcRn结合结构域中包含3个或更多个取代，其中所述3个或更多个取代是表12提供的组合编号(2)-(26)和(28)-(59)的任一个。

[0514] [表12]

[0515] 提高在中性pH范围内的FcRn结合活性而又不显著提高对预存ADA的结合活性的Fc区中的取代组合(按照EU编号系统给出位置)。

[0516]

1	M252Y/N434Y/Y436T
2	M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
3	M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
4	M252Y/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
5	M252Y/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
6	M252Y/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
7	M252Y/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
8	M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
9	M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
10	M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
11	M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
12	M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
13	M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
14	M252Y/S254T/T256E/T307Q/Q311A/H433D/N434Y/Y436V/ Q438K/S440E
15	M252Y/S254T/T256E/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
16	M252Y/H433D/N434W/Y436V/Q438R/S440E
17	M252Y/H433D/N434W/Y436V/Q438K/S440E
18	M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
19	M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
20	M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
21	M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
22	M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
23	M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
24	M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/ S440D
25	M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/ S440D
26	M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/ S440E
27	M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/ S440E
28	M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/ S440D
29	M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/ S440D
30	M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V/ Q438R/S440E
31	M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V/ Q438R/S440E

[0517]

32	M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V/ Q438K/S440E
33	M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V/ Q438K/S440E
34	M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V/ Q438K/S440D
35	M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V/ Q438K/S440D
36	M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V/ Q438R/S440D
37	M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V/ Q438R/S440D
38	M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
39	M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
40	M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
41	M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
42	M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
43	M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
44	M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
45	M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
46	M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
47	M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
48	M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
49	M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
50	M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
51	M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
52	M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
53	M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
54	M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
55	M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
56	M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
57	M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
58	L235R/G236R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
59	L235R/G236R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
60	EU238D / EU252Y / EU434Y / EU436V / EU387R
61	EU238D / EU252Y / EU434Y / EU436V / EU422E
62	EU238D / EU252Y / EU434Y / EU436V / EU422R
63	EU238D / EU252Y / EU434Y / EU436V / EU422S
64	EU238D / EU252Y / EU434Y / EU436V / EU424E,
65	EU238D / EU252Y / EU434Y / EU436V / EU424R

[0518]

66	EU238D / EU252Y / EU434Y / EU436V / EU438E
67	EU238D / EU252Y / EU434Y / EU436V / EU438R
68	EU238D / EU252Y / EU434Y / EU436V / EU438S,
69	EU238D / EU252Y / EU434Y / EU436V / EU440E
70	EU252Y / EU387R / EU434Y / EU436V
71	EU252Y / EU422E / EU434Y / EU436V
72	EU252Y / EU422R / EU434Y / EU436V
73	EU252Y / EU422S / EU434Y / EU436V
74	EU252Y / EU424E / EU434Y / EU436V
75	EU252Y / EU424R / EU434Y / EU436V
76	EU252Y / EU434Y / EU436V / EU438E
77	EU252Y / EU434Y / EU436V / EU438R
78	EU252Y / EU434Y / EU436V / EU438S
79	EU252Y / EU434Y / EU436V / EU440E
80	EU252Y / EU422E / EU424R / EU434Y / EU436V
81	EU252Y / EU422S / EU424R / EU434Y / EU436V
82	EU252Y / EU434Y / EU436V / EU438R / EU440E
83	EU252Y / EU422D / EU434Y / EU436V
84	EU252Y / EU422K / EU434Y / EU436V
85	EU252Y / EU422T / EU434Y / EU436V
86	EU252Y / EU422Q / EU434Y / EU436V
87	EU252Y / EU434Y / EU436V / EU438K
88	EU252Y / EU434Y / EU436V / EU440D
89	EU252Y / EU434Y / EU436V / EU440Q
90	EU252Y / EU434Y / EU436V / EU438R / EU440D
91	EU252Y / EU434Y / EU436V / EU438K / EU440E
92	EU252Y / EU434Y / EU436V / EU438K / EU440D
93	EU250V / EU252Y / EU422E / EU434Y / EU436V / EU307Q / EU308P / EU311A
94	EU250V / EU252Y / EU424R / EU434Y / EU436V / EU307Q / EU308P / EU311A
95	EU250V / EU252Y / EU422E / EU424R / EU434Y / EU436V / EU307Q / EU308P / EU311A
96	EU250V / EU252Y / EU434Y / EU436V / EU438R / EU307Q / EU308P / EU311A

[0519]

97	EU250V / EU252Y / EU434Y / EU436V / EU440E / EU307Q / EU308P / EU311A
98	EU250V /EU252Y / EU434Y / EU436V / EU438R / EU440E / EU307Q / EU308P / EU311A
99	EU252Y / EU433D / EU434Y / EU436V / EU438R / EU440E / EU235R / EU239K
100	EU252Y / EU433D / EU434Y / EU436V / EU438K / EU440D / EU235R / EU239K
101	EU252Y / EU434Y / EU436V / EU438R / EU440E / EU235R / EU239K
102	EU252Y / EU434Y / EU436V / EU438K / EU440E / EU235R / EU239K
103	EU252Y / EU433D / EU434Y / EU436V / EU438K / EU440E / EU235R / EU239K
104	EU252Y / EU424N / EU434Y
105	EU252Y / EU424N / EU434Y / EU436V

[0520] 本发明还提供与对照抗原结合分子相比在酸性pH范围内对FcRn的结合活性提高且在中性pH下对预存ADA的结合亲和力不显著提高的抗原结合分子，其包含在a)EU424位或b)EU438/EU440上的氨基酸取代。

[0521] 更优选取代选自a)EU424N和EU438R/EU440E。

[0522] 优选与对照抗原结合分子相比在酸性pH范围内对FcRn的结合活性提高且在中性pH下对预存ADA的结合亲和力不显著提高的抗原结合分子的FcRn结合结构域，包含表13提供的取代组合之一。更优选与对照抗原结合分子相比在酸性pH范围内FcRn结合活性提高而在中性pH下对预存ADA的结合亲和力不显著提高的抗原结合分子包含表13提供的取代组合编号(13)-(28)的任一个。

[0523] [表13]

[0524] 提高在酸性pH范围内的FcRn结合活性而又不显著提高对预存ADA的结合活性的Fc区中的取代组合(按照EU编号系统给出位置)。

[0525]

1	EU252Y/EU254T/EU256E/EU438R/EU440E
2	EU252Y/EU254T/EU256E/EU424N
3	EU428L/EU434S/EU438R/EU440E
4	EU424N/EU428L/EU434S
5	EU426D/EU428L/EU434S
6	EU426A/EU428L/EU434S
7	EU426Q/EU428L/EU434S
8	EU426Y/EU428L/EU434S
9	EU428L/EU434S/EU436F
10	EU428L/EU434S/EU436T
11	EU434H/FU438R/FU440E
12	EU424N/EU434H

13	N434Y/Y436V/Q438R/S440E
14	N434Y/Y436V/Q438R/S440D
15	N434Y/Y436V/Q438K/S440E
16	N434Y/Y436V/Q438K/S440D
17	H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
18	H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
19	H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
20	H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
21	N434Y/Y436T/Q438R/S440E
22	N434Y/Y436T/Q438R/S440D
23	N434Y/Y436T/Q438K/S440E
24	N434Y/Y436T/Q438K/S440D
25	H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
26	H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440D
27	H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
28	H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440D

[0526] 除了在EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438和EU440位这的任一个处的取代以外，本发明的Fc区还可包含在一个或多个下列位置上的进一步氨基酸取代：

[0527] EU248、EU249、EU250、EU251、EU252、EU253、EU254、EU255、EU256、EU257、EU305、EU306、EU307、EU308、EU309、EU310、EU311、EU312、EU313、EU314、EU342、EU343、EU344、EU345、 EU346、EU347、EU348、EU349、EU350、EU351、EU352、EU380、EU381、EU382、EU383、EU384、EU385、EU386、EU388、EU414、EU415、EU416、EU417、EU418、EU419、EU420、EU421、EU423、EU425、EU427、EU428、EU429、EU430、EU431、EU432、EU433、EU434、EU435、EU436、EU437、EU441、EU442、EU443和EU444。

[0528] 在这些位置的任一个上取代Fc区可降低对预存ADA(特别是对类风湿因子)的结合亲和力，而又不负面影响对FcRn的结合亲和力。

[0529] 此外，本发明的方法还可包括如上所述在一个或多个下列位置上取代抗原结合分子的Fc区的步骤：

[0530] EU248、EU249、EU250、EU251、EU252、EU253、EU254、EU255、EU256、EU257、EU305、EU306、EU307、EU308、EU309、EU310、EU311、EU312、EU313、EU314、EU342、EU343、EU344、EU345、EU346、EU347、EU348、EU349、EU350、EU351、EU352、EU380、EU381、EU382、EU383、EU384、EU385、EU386、EU388、EU414、EU415、EU416、EU417、EU418、EU419、EU420、EU421、EU423、EU425、EU427、EU428、EU429、EU430、EU431、EU432、EU433、EU434、EU435、EU436、EU437、EU441、EU442、EU443和EU444。

[0531] 对效应受体或补体蛋白的弱或无结合活性

[0532] 与Fcγ受体或补体蛋白结合还可能引起非期望的作用(例如不当的血小板活化)。不与效应受体(例如FcγRIIa受体)结合的修饰的抗原结合分子更安全和/或更有效。因此，在优选的实施方案中，本发明的修饰的抗原结合分子对效应受体还具有弱的结合活性或不与效应受体结合。效应受体的实例包括但不限于激活Fcγ受体，特别是Fcγ受体I、Fcγ受

体II和Fcγ受体III。Fcγ受体I包括Fcγ受体Ia、Fcγ受体Ib和Fcγ受体Ic及其亚型。Fcγ受体II包括Fcγ受体IIa(其具有两种同种异型R131和H131)和Fcγ受体IIb。Fcγ受体III包括Fcγ受体IIIa(其具有两种同种异型:V158和F158)和Fcγ受体IIIb(其具有两种同种异型:FcγIIIb-NA1和FcγIIIb-NA2)。对效应受体具有 弱结合活性或不与之结合的抗体为例如包含沉默Fc区的抗体或无Fc区的抗体(例如Fab、F(ab)'2、scFv、sc(Fv)2、双抗体)。

[0533] 对效应受体的结合活性弱或无结合活性的Fc区的实例例如描述于Strohl等(Current Opinion in Biotechnology(2009)20(6),685-691)。具体来说,它描述了例如去糖基化Fc区(N297A、N297Q)、沉默Fc区(其是经工程改造使效应子功能性沉默(或免疫抑制)的Fc区)的实例(IgG1-L234A/L235A、IgG1-H268Q/A330S/P331S、IgG1-C226S/C229S、IgG1-C226S/C229S/E233P/L234V/L235A、IgG1-L234F/L235E/P331S、IgG2-V234A/G237A、IgG2-H268Q/V309L/A330S/A331S、IgG4-L235A/G237A/E318A、IgG4-L236E)。WO2008/092117公开了包含沉默Fc区的抗体,所述沉默Fc区包含取代G236R/L328R、L235G/G236R、N325A/L328R或N325L/L328R(按照EU编号系统的位置)。此外,WO2000/042072公开了包含沉默Fc区的抗体,所述沉默Fc区包含在EU233、EU234、EU235和EU237位置的一个或多个上的取代。WO2009/011941公开了包含沉默Fc区的抗体,所述沉默Fc区包含自EU231到EU238的残基缺失。Davis等(Journal of Rheumatology(2007)34(11):2204-2210)公开了包含沉默Fc区的抗体,所述沉默Fc区包含取代C220S/C226S/C229S/P238S。Shields等(Journal of Biological Chemistry(2001)276(9),6591-6604)公开了包含沉默Fc区的抗体,所述沉默Fc区包含取代D265A。

[0534] 术语"对效应受体的弱结合"是指是完整IgG(或包含完整Fc区的抗体)对效应受体的结合活性的95%或更低、优选90%或更低、85%或更低、80%或更低、75%或更低、更优选70%或更低、65%或更低、60%或更低、55%或更低、50%或更低、45%或更低、40%或更低、35%或更低、30%或更低、25%或更低、20%或更低、15%或更低、10%或更低、9%或更低、8%或更低、7%或更低、6%或更低、5%或更低、4%或更低、3%或更低、2%或更低、1%或更低的结合活性。FcγR的结合活性优选降低至完整IgG(或包含完整Fc区的抗体)对效应受体的 结合活性的至多少约1/10或更少、约1/50或更少、约1/100倍或更少。

[0535] 沉默Fc区是包含与完整Fc区相比降低对效应受体的结合的一个或多个氨基酸取代、插入、添加和/或缺失的修饰的Fc区。对效应受体的结合活性可极大程度的降低,使得Fc区不再结合效应受体。沉默Fc区的实例包括但不限于在选自以下的一个或多个位置上包含氨基酸取代的Fc区:EU234、EU235、EU236、EU237、EU238、EU239、EU265、EU266、EU267、EU269、EU270、EU271、EU295、EU296、EU297、EU298、EU300、EU324、EU325、EU327、EU328、EU329、EU331和EU332。

[0536] 具体来说,沉默Fc区在选自EU234、EU235、EU236、EU237、EU238、EU239、EU265、EU266、EU267、EU269、EU270、EU271、EU295、EU296、EU297、EU298、EU300、EU324、EU325、EU327、EU328、EU329、EU331和EU332的一个或多个位置具有被选自以下列表中的氨基酸的取代。优选沉默Fc区在选自EU235、EU237、EU238、EU239、EU270、EU298、EU325和EU329的一个或多个位置上具有被选自以下列表中的氨基酸的取代。

[0537] EU234位上的氨基酸优选被选自以下的氨基酸之一置换:Ala、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Lys、Met、Phe、Pro、Ser和Thr。

[0538] EU235位上的氨基酸优选被选自以下的氨基酸之一置换:Ala、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Met、Pro、Ser、Thr、Val和Arg。

[0539] EU236位上的氨基酸优选被选自以下的氨基酸之一置换:Arg、Asn、Gln、His、Leu、Lys、Met、Phe、Pro和Tyr。

[0540] EU237位上的氨基酸优选被选自以下的氨基酸之一置换:Ala、Asn、Asp、Gln、Glu、His、Ile、Leu、Lys、Met、Pro、Ser、Thr、Val、Tyr和Arg。

[0541] EU238位上的氨基酸优选被选自以下的氨基酸之一置换:Ala、 Asn、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Thr、Trp和Arg。

[0542] EU239位上的氨基酸优选被选自以下的氨基酸之一置换:Gln、His、Lys、Phe、Pro、Trp、Tyr和Arg。

[0543] EU265位上的氨基酸优选被选自以下的氨基酸之一置换:Ala、Arg、Asn、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr和Val。

[0544] EU266位上的氨基酸优选被选自以下的氨基酸之一置换:Ala、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp和Tyr。

[0545] EU267位上的氨基酸优选被选自以下的氨基酸之一置换:Arg、His、Lys、Phe、Pro、Trp和Tyr。

[0546] EU269位上的氨基酸优选被选自以下的氨基酸之一置换:Ala、Arg、Asn、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr和Val。

[0547] EU270位上的氨基酸优选被选自以下的氨基酸之一置换:Ala、Arg、Asn、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr和Val。

[0548] EU271位上的氨基酸优选被选自以下的氨基酸之一置换:Arg、His、Phe、Ser、Thr、Trp和Tyr。

[0549] EU295位上的氨基酸优选被选自以下的氨基酸之一置换:Arg、Asn、Asp、Gly、His、Phe、Ser、Trp和Tyr。

[0550] EU296位上的氨基酸优选被选自以下的氨基酸之一置换:Arg、Gly、Lys和Pro。

[0551] EU297位上的氨基酸优选被Ala置换。

[0552] EU298位上的氨基酸优选被选自以下的氨基酸之一置换:Arg、Gly、Lys、Pro、Trp和Tyr。

[0553] EU300位上的氨基酸优选被选自以下的氨基酸之一置换:Arg、Lys和Pro。

[0554] EU324位上的氨基酸优选被Lys或Pro置换。

[0555] EU325位上的氨基酸优选被选自以下的氨基酸之一置换:Ala、Arg、Gly、His、Ile、Lys、Phe、Pro、Thr、Trp、Tyr和Val。

[0556] EU327位上的氨基酸优选被选自以下的氨基酸之一置换:Arg、Gln、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr和Val。

[0557] EU328位上的氨基酸优选被选自以下的氨基酸之一置换:Arg、Asn、Gly、His、Lys和Pro。

[0558] EU329位上的氨基酸优选被选自以下的氨基酸之一置换:Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、Val和Arg。

[0559] EU330位上的氨基酸优选被Pro或Ser置换。

[0560] EU331位上的氨基酸优选被选自以下的氨基酸之一置换:Arg、Gly和Lys。

[0561] EU332位上的氨基酸优选被选自以下的氨基酸之一置换:Arg、Lys和Pro。

[0562] 优选沉默Fc区包含在EU235位上被Lys或Arg的取代、EU237被Lys或Arg的取代、EU238被Lys或Arg的取代、EU239被Lys或Arg的取代、EU270被Phe的取代、EU298被Gly的取代、EU325被Gly的取代或EU329被Lys或Arg的取代。更优选沉默Fc区包含在EU235位上被精氨酸的取代和在EU239位上被赖氨酸的取代。更优选其包含取代L235R/S239K。

[0563] 此外,本发明的修饰的抗原结合分子优选为去糖基化的。更优选本发明的修饰的抗原结合分子在重链糖基化位点包含突变以防止在该位点的糖基化,例如描述于WO2005/03175。因此,在本发明优选的实施方案中,修饰的无糖基抗原结合分子通过对重链糖基化位点进行修饰,即引入取代N297Q或N297A(按照EU编号系统的位置),并使蛋白质在合适的宿主细胞中表达来制备。对于引入取代,可采用实 施例中描述的方法。

[0564] 在本发明的具体实施方案中,本发明的修饰的抗原结合分子具有对补体蛋白的弱的结合活性或不与补体蛋白结合。优选补体蛋白为C1q。对补体蛋白的弱的结合活性优选为与完整IgG或包含完整Fc区的抗体对补体蛋白的结合活性相比降低达约10倍或更多倍、约50倍或更多倍、约100倍或更多倍的对补体蛋白的结合活性。Fc区对补体蛋白的结合活性可通过氨基酸序列的修饰例如氨基酸取代、插入、添加和/或缺失来降低。

[0565] 在本发明的优选实施方案中,抗原结合分子在酸性或中性pH中的FcRn结合亲和力增加,并且对效应受体和/或补体蛋白的结合活性弱或无结合活性。优选这类抗原结合分子在FcRn结合结构域中在以下位置上包含取代:

[0566] a)选自EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU256、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436的一个或多个位置,和

[0567] b)选自以下的一个或多个位置:EU234、EU235、EU236、EU237、EU238、EU239、EU265、EU266、EU267、EU269、EU270、EU271、EU295、EU296、EU297、EU298、EU300、EU324、EU325、EU327、EU328、EU329、EU331和EU332(按照EU编号系统)。更优选对效应受体和/或补体蛋白的结合活性降低或无结合活性的本发明的修饰抗原结合分子在Fc区包含选自以下的一个或多个取代:在EU235位上被Lys或Arg取代、在EU237位上被Lys或Arg取代、在EU238位上被Lys或Arg取代、在EU239位上被Lys或Arg取代、在EU270位上被Phe取代、在EU298位上被Gly取代、在EU325位上被Gly取代和在EU329位上被Lys或Arg取代。甚至更优选其在Fc区中包含在EU235位上被Arg的取代和在EU239位上被Lys的取代。甚至更优选其在Fc区中包含取代组合L235R/S239K。

[0568] 优选这类抗原结合分子对预存ADA的结合活性也不显著提高。因此,对效应受体和/或补体蛋白的结合活性降低或无结合活性的本发明的抗原结合分子还包含在c)选自EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438和EU440的一个或多个位置上的氨基酸取代。在本发明的一个更优选的实施方案中,修饰的抗原结合分子在FcRn结合结构域中包含3个或更多个氨基酸取代,其中所述3个或更多个取代是表14和15提供的组合之一。

[0569] [表14]

[0570] 提高在中性pH下的FcRn结合活性而又不显著提高对预存ADA的结合活性,且降低对效应受体和/或补体蛋白的结合活性的取代组合

[0571]

1	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436T
2	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
3	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
4	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
5	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
6	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
7	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
8	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
9	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
10	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
11	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
12	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
13	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
14	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/T307Q/Q311A/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
15	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
16	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434W/Y436V/Q438R/S440E
17	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434W/Y436V/Q438K/S440E
18	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
19	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
20	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
21	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
22	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
23	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E

[0572]

24	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256F/N286F/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
25	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
26	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
27	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
28	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
29	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
30	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
31	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
32	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
33	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
34	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
35	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
36	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
37	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
38	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
39	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
40	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
41	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438R/S440E

[0573]

42	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
43	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
44	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
45	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
46	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
47	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
48	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
49	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
50	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
51	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
52	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
53	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
54	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
55	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
56	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
57	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
58	L235R/G236R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
59	L235R/G236R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E

[0574] [表15]

[0575] 提高在酸性pH下的FcRn结合活性而又不显著提高对预存ADA的结合活性，且降低对效应受体和/或补体蛋白的结合活性的取代组合

[0576]

1	L235R/S239K/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
2	L235R/S239K/N434Y/Y436V/Q438R/S440D

3	L235R/S239K/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
4	L235R/S239K/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
5	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
6	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
7	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
8	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
9	L235R/S239K/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
10	L235R/S239K/N434Y/Y436T/Q438R/S440D
11	L235R/S239K/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
12	L235R/S239K/N434Y/Y436T/Q438K/S440D
13	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
14	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440D
15	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
16	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440D

[0577] 其它修饰

[0578] 此外，除上述修饰以外，本发明的抗原结合分子在FcRn结合结构域的EU257位上不包含选自以下的氨基酸：丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸和苏氨酸，

[0579] 和/或在FcRn结合结构域的EU252位上不包含色氨酸。换句话说，除上述任何修饰以外，本发明优选的抗原结合分子包含在EU257位上的丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苏氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、色氨酸或酪氨酸，和在EU252位上的精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸或酪氨酸。

[0580] 还优选的是修饰的FcRn结合结构域，其除本文提及的位置或位置组合中的任一个的取代以外，还包含在EU239位上的赖氨酸和/或 在EU270位上的苯丙氨酸。

[0581] 抗原结合分子

[0582] 本发明的抗原结合分子不受特别限制，只要它们包括具有对靶抗原有特异性的结合活性的抗原结合结构域和本发明的FcRn结合结构域。优选的抗原结合结构域包括例如具有抗体的抗原结合区的结构域。抗体的抗原结合区包含例如CDR。抗体的抗原结合区可含有完整抗体的所有6个CDR，或1、2或更多个CDR。抗体的抗原结合区包含氨基酸缺失、取代、添加和/或插入，或可包含CDR的部分。

[0583] 另一方面，本发明的抗原结合分子包括具有拮抗活性的抗原结合分子(拮抗性抗原结合分子)、具有激动活性的抗原结合分子(激动抗原结合分子)和具有细胞毒性的分子。在优选的实施方案中，抗原结合分子是拮抗性抗原结合分子，特别是识别抗原(例如受体或细胞因子)的拮抗性抗原结合分子。

[0584] 本发明的抗原结合分子优选为抗体。在本发明的情况下，优选的抗体包括例如IgG抗体。当要使用的抗体是IgG抗体时，IgG的类型不受特别限制；因此，IgG可属于任何同种型(亚类)例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。对于人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4恒定区，基因多态性(同种异型)描述于“Sequences of proteins of immunological interest,NIH Publication

No.91-3242”。在本申请中，这些同种异型还可用于恒定区。尤其对于人IgG1，氨基酸Asp-Glu-Leu(DEL)和Glu-Glu-Met(EEM)两者可用于EU编号的356-358中的残基。类似地，对于人免疫球蛋白κ恒定区，基因多态性(同种异型)描述于“Sequences of proteins of immunological interest,NIH Publication No.91-3242”。在本申请中，这些同种异型还可用于恒定区。此外，本发明的抗原结合分子可包括抗体恒定区，可将氨基酸突变引入恒定区中。待引入的氨基酸突变包括例如加强或减弱与Fcγ受体结合的氨基酸突变(Proc Natl Acad Sci U S A.2006年3月14日;103(11):4005-10)，但不限于这些实例。或者，还可能通过选择合适的恒定区例如IgG2的恒定区以改变pH依赖 性结合(WO09125825)。

[0585] 当本发明的抗原结合分子是抗体时，抗体可来源于任何动物，例如小鼠、人、大鼠、兔、山羊或骆驼。优选抗体是人抗体。此外，抗体可为经改变的抗体，例如嵌合抗体，并且特别是在人源化抗体的序列中包括氨基酸取代的经改变的抗体等。本发明考虑的抗体的类别还包括双特异性抗体、与多种分子连接的抗体修饰产物和包含抗体片段(特别是免疫原性和/或免疫反应性抗体片段)的多肽。在优选的实施方案中，抗原结合分子是单克隆抗体。

[0586] “嵌合抗体”是通过将来源于不同动物的序列组合起来而制备的抗体。具体而言，嵌合抗体包括例如具有来自小鼠抗体的重链和轻链可变(V)区及来自人抗体的重链和轻链恒定(C)区的抗体。用于产生嵌合抗体的方法是已知的。例如，在人-小鼠嵌合抗体的情况下，编码抗体V区的DNA可与编码人抗体C区的DNA连接;这可被插入表达载体中，并引入宿主中以产生嵌合抗体。

[0587] “人源化抗体”，亦称为重构的人抗体，在本领域中已知为其中将来源于非人哺乳动物(例如小鼠)的抗体的互补决定区(CDR)移植入人抗体的CDR中的抗体。用于鉴定CDR的方法是已知的(Kabat等,Sequence of Proteins of Immunological Interest(1987),National Institute of Health,Bethesda,Md.;Chothia等,Nature(1989)342:877)。适于该目的的通用遗传重组技术也是已知的(参见欧洲专利申请EP125023和WO96/02576)。人源化抗体可通过已知方法产生，例如，可确定小鼠抗体的CDR，并且获得编码其中CDR与人抗体的构架区(FR)连接的抗体的DNA。然后可利用使用常规表达载体的系统产生人源化抗体。可使用所制备的具有与CDR和FR两者的末端区域重叠的部分的几个寡核苷酸作为引物，通过PCR合成这类DNA(参见描述于WO98/13388的方法)。选择通过CDR连接的人抗体FR，使得CDR形成合适的抗原结合部位。如有需要，可以改变抗体可变区FR的氨基酸，使得重构的人抗体的CDR可形成合适的抗原结合部位(Sato等, CancerRes.(1993)53:10.01-6)。可改变的FR中的氨基酸残基包括通过非共价键与抗原直接结合的部分(Amit等,Science(1986)233:747-53)、影响CDR结构或对CDR结构有影响的部分(Chothia等,J.Mol.Biol.(1987)196:901-17)和参与VH-VL相互作用的部分(EP239400)。

[0588] 当本发明的抗原结合分子为嵌合抗体或人源化抗体，这些抗体的恒定区优选来源于人抗体。例如C-γ1、C-γ2、C-γ3和C-γ4可用于H链，而C-κ和C-λ可用于L链。此外，如有需要，可将氨基酸突变引入人抗体C区中以提高或降低与Fc-γ受体的结合或改进抗体稳定性或产率。本发明的嵌合抗体优选包括来源于非人哺乳动物抗体的可变区和来源于人抗体的恒定区。同时，人源化抗体优选包括来源于非人哺乳动物抗体的CDR和来源于人抗体的FR和C区。来源于人抗体的恒定区优选包括人FcRn结合区。这类抗体包括例如IgG(IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)。用于本发明的人源化抗体的恒定区可以是任何同种型的抗体的恒定区。优选

使用来源于人IgG1的恒定区，但不限于此。来源于人抗体的FR(其用于人源化抗体)没有特别限制，并且可来源于任何同种型的抗体。

[0589] 本文所用术语“双特异性抗体”是指在同一抗体分子中具有识别不同表位的可变区的抗体。双特异性抗体可以是识别两个或更多个不同抗原的抗体，或识别同一抗原上的两个或更多个不同表位的抗体。

[0590] 此外，包括抗体片段的多肽可以是例如scFv-Fc(WO2005/037989)、dAb-Fc和Fc融合蛋白。这种多肽中的抗体片段可以是例如Fab片段、F(ab')2片段、scFvs(NatBiotechnol.2005年9月;23(9):1126-36)、结构域抗体(dAbs)(WO2004/058821、WO2003/002609)，当分子包括Fc区时，Fc区可用作人FcRn结合结构域。或者，FcRn结合结构域可与这些分子融合。

[0591] 此外，适用于本发明的抗原结合分子可以是或可包含抗体样分子(例如本发明的Fc区与抗体样分子的融合蛋白)。抗体样分子(支架分子、肽分子)是可通过与靶分子结合而显示功能的分子(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)，并包括例如DARPin(WO2002/020565)、亲和体(Affibody)(WO1995/001937)、Avimer(WO2004/044011;WO2005/040229)和Adnectin(WO2002/032925)。如果这些抗体样分子可以pH依赖性或钙依赖性方式与靶分子结合和/或在中性pH范围内具有人FcRn结合活性，则有可能通过抗原结合分子促进细胞对抗原的摄入、通过给予抗原结合分子促进血浆抗原浓度的降低和改进抗原结合分子的药代动力学并增加单个抗原结合分子可结合的抗原的数目。

[0592] 此外，抗原结合分子可以是因本发明的FcRn结合结构域和与靶(包括配体)结合的受体蛋白之间融合产生的蛋白质，包括例如TNFR-Fc融合蛋白、IL1R-Fc融合蛋白、VEGFR-Fc融合蛋白和CTLA4-Fc融合蛋白(NatMed.2003年1月;9(1):47-52;BioDrugs.(2006)20(3):151-60)。如果这些受体-FcRn结合结构域融合蛋白除在中性pH范围内具有FcRn结合活性以外，还以pH依赖性或钙依赖性方式与靶子(包括配体)结合，则有可能通过抗原结合分子促进细胞对抗原的摄入，通过给予抗原结合分子促进血浆抗原浓度的降低，改进抗原结合分子的药代动力学并增加单个抗原结合分子可结合的抗原的数目。受体蛋白经适当设计和修饰，使得包括受体蛋白与靶(包括配体)结合的结构域。如上文实例(即TNFR-Fc融合蛋白、IL1R-Fc融合蛋白、VEGFR-Fc融合蛋白和CTLA4-Fc融合蛋白)中提及的，特别优选这样的可溶性受体分子，其包含与所述靶(包括配体)结合所需要的这些受体蛋白的胞外结构域。这些经设计和修饰的受体分子在本发明中称为人工受体。用设计和修饰受体分子以构建人工受体分子的方法是本领域已知的并且甚至是常规的。

[0593] 此外，本发明的抗体可具有修饰糖链。具有修饰糖链的抗体包括例如具有修饰的糖基化的抗体(WO99/54342)、缺乏加至糖链的岩藻糖 的抗体(WO00/61739、WO02/31140、WO2006/067847、WO2006/067913)和具有带二等分GlcNAc的糖链的抗体(WO02/79255)。

[0594] 按照Journal of Immunology(2009)182:7663-7671，在酸性pH范围内(pH6.0)，完整人IgG1的人FcRn结合活性为KD1.7微摩尔(μM)，而在中性pH范围内，几乎检测不到活性。因此，在优选的实施方案中，本发明的抗原结合分子包括这样的抗原结合分子，其在酸性pH范围内的人FcRn结合活性为强于KD1.7微摩尔，而在中性pH范围内与完整人IgG的人FcRn结

合活性相同或比完整人IgG的人FcRn结合活性更强。在更优选的实施方案中，在中性pH范围内其对预存ADA的结合活性与完整IgG1相比不显著提高。上述KD值通过描述于以下文献的方法确定：Journal of Immunology (2009) 182:7663-7671 (通过将抗原结合分子固定在芯片上，并加载人FcRn作为分析物)。

[0595] 解离常数(KD)可用作人FcRn结合活性的值。然而，完整人IgG的人FcRn结合活性在中性pH范围(pH7.4)内几乎没有人FcRn结合活性。因此常难以计算作为KD的活性。用于评价在pH7.4下人FcRn结合活性是否高于完整人IgG的人FcRn结合活性的方法包括以相同浓度加载分析物后，比较Biacore反应的强度的评价方法。具体而言，当在将人FcRn加载到固定有抗原结合分子的芯片后在pH7.4下的反应强于将人FcRn加载到固定有完整人IgG的芯片后在pH7.4下的反应时，将抗原结合分子的人FcRn结合活性认定为在pH7.4下高于完整人IgG的人FcRn结合活性。

[0596] 在本发明的情况下，pH7.0也可用作中性pH范围。使用pH7.0作为中性pH可促进人FcRn与FcRn结合结构域之间的弱相互反应。至于用于测定条件的温度，可在10℃-50℃的任何温度下评价结合亲和力。优选采用15℃-40℃的温度以测定人FcRn结合结构域与人FcRn之间的结合亲和力。更优选亦采用20℃-35℃的任何温度，比如20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34和35 ℃中的任一个，以测定人FcRn结合结构域与人FcRn之间的结合亲和力。WO2011/122011的实施例5中所述的25℃温度是本发明实施方案的一个实例。在优选的实施方案中，可按WO2011/122011的实施例5所述，在pH7.0和在25℃下，测量人FcRn与FcRn结合结构域之间的相互作用。可通过如WO2011/122011的实施例5所述的Biacore，测量抗原结合分子与人FcRn的结合亲和力。

[0597] 优选在pH7.4(其接近体内血浆(血液)pH)下测量在中性pH范围内的结合亲和力。当由于其在pH7.4下的低亲和力所致难以评价人FcRn结合结构域和人FcRn之间的结合亲和力时，可将pH7.0用作pH7.4的备选。优选在pH6.0(其接近体内早期内体的pH)下测量在酸性pH范围内的结合亲和力。至于用于测定条件的温度，可在10℃-50℃的任何温度下评价人FcRn结合结构域与人FcRn间的结合亲和力。优选采用15℃-40℃的温度以测定人FcRn结合结构域与人FcRn之间的结合亲和力。更优选亦采用20℃-35℃的任何温度，比如20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34和35℃中的任一个，以测定人FcRn结合结构域与人FcRn间的结合亲和力。25℃下的温度描述于例如WO2011/122011的实施例5和本发明的实施例。

[0598] 优选使用完整人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4作为参比完整人IgG，以针对其人FcRn结合活性或体内活性与抗原结合分子进行比较。优选使用包含与目标抗原结合分子相同的抗原结合结构域和完整人IgGFc结构域作为人FcRn结合结构域的抗原结合分子作为参比。更优选使用完整人IgG1作为参比完整人IgG，以将其人FcRn结合活性或体内活性与本发明的抗原结合分子的人FcRn结合活性或体内活性进行比较。

[0599] 本领域技术人员可适当地选择用于抗原结合或人FcRn结合活性测定法的pH以外的条件，所述条件不受特别限制。例如，可按WO2009/125825所述，采用在37℃下使用MES缓冲液的条件来测定活性。在另一个实施方案中，可按WO2011/122011的实施例4或5所述，在25℃下使用磷酸钠缓冲液来测定活性。同时，可通过本领域技术人员已知方法，例如采用Biacore(GE Healthcare)等，来测定抗原结合分子的抗原结合活性和人FcRn结合活性。当

抗原是可溶性抗原时，可通过将抗原作为分析物加至固定有抗原结合分子的芯片上，来测定抗原结合分子与可溶性抗原结合的活性。或者，当抗原是膜型抗原时，可通过将抗原结合分子作为分析物加至抗原固定化芯片上，来测定抗原结合分子与膜型抗原结合的活性。可通过分别将人FcRn或抗原结合分子作为分析物加至固定有抗原结合分子或人FcRn的芯片上，来测定抗原结合分子的人FcRn结合活性。

[0600] 本发明提供本发明的抗原结合分子，其包含抗原结合结构域和在中性pH范围内FcRn结合活性提高的人Fc区。优选在中性pH范围内其对预存ADA的结合活性不显著提高。在中性pH范围内这类抗原结合分子的FcRn结合活性优选强于KD3.2微摩尔。更优选在中性pH范围内的FcRn结合活性强于700纳摩尔，甚至更优选强于500纳摩尔，最优选强于150纳摩尔。优选抗原结合分子具有在中性pH范围内提高的人FcRn结合活性和在酸性pH范围内比在中性pH范围内低或在低钙浓度下比在高钙浓度条件下低的抗原结合活性。优选在中性pH范围内这类抗原结合分子对预存ADA的结合活性不显著提高。本发明还提供包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域的本发明的抗原结合分子，其中在中性pH范围内其人FcRn结合活性提高，此外其中在中性pH范围内人FcRn结合活性是完整人IgG的人FcRn结合活性的28倍，更优选在中性pH范围内人FcRn结合活性是完整人IgG的人FcRn结合活性的38倍。优选在中性pH范围内这类抗原结合分子对预存ADA的结合活性不显著提高。本发明的抗原结合分子具有在中性pH范围内提高的FcRn结合活性。优选在中性pH范围内不显著提高的对预存ADA的结合活性优选具有在pH7.0下和在25℃下是完整人IgG的人FcRn结合活性的28倍、优选38倍的人FcRn结合活 性。或者，在pH7.0下和在25℃下FcRn结合活性提高的抗原结合分子的人FcRn结合活性优选强于KD3.2微摩尔。更优选在pH7.0下和在25℃下FcRn结合活性强于700纳摩尔、更优选强于500纳摩尔和最优选强于150纳摩尔。

[0601] 本发明提供本发明的抗原结合分子，其包含抗原结合结构域和本发明的人Fc区，其具有在酸性pH范围内提高的FcRn结合活性且在中性pH范围内不显著提高的对预存ADA的结合活性。本发明还提供包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域的本发明的抗原结合分子，与完整IgG对预存ADA的结合活性相比，其具有在酸性pH范围内提高的人FcRn结合活性且在中性pH范围内不显著提高的对预存ADA的结合活性，其中在酸性pH范围内人FcRn结合活性是完整人IgG的人FcRn结合活性的约2倍-约100倍的范围。优选在酸性pH范围内本发明的抗原结合分子的人FcRn结合活性是完整人IgG的FcRn结合活性的至少10倍，更优选在酸性pH范围内人FcRn结合活性是完整人IgG的人FcRn结合活性的至少20倍。在酸性pH范围内FcRn结合活性提高而在中性pH范围内其对预存ADA的结合活性不显著提高的本发明的抗原结合分子在pH6.0下和在25℃下的人FcRn结合活性是完整人IgG的10倍，优选20倍。

[0602] 本发明的抗原结合分子可具有在中性pH范围内提高的FcRn结合活性，以及低于在中性pH范围内的抗原结合活性的在酸性pH范围内的抗原结合活性或低于在高钙浓度条件下的抗原结合活性的在低钙浓度下的抗原结合活性。这类抗原结合分子的具体实例包括在pH7.4下对人FcRn的结合活性比完整Ig的高，且其抗原结合活性在pH5.8下比在pH7.4下低的抗原结合分子，pH5.8和pH7.4被假定分别是体内早期内体和血浆的pH。其抗原结合活性在pH5.8下比在pH7.4下低的抗原结合分子亦可称为其抗原结合活性在pH7.4下比在pH5.8下强的抗原结合分子。KD(pH5.8)/KD(pH7.4)的值(其是在pH5.8和pH7.4下针对抗原的解离常数(KD)的比率)为1.5、2、3、4、5、10、 15、20、50、70、80、100、500、1000或10,000，优选2或

更大，更优选10或更大，还更优选40或更大。KD(pH5.8)/KD(pH7.4)值的上限不受特别限制，可以是任何值，例如400、1,000或10,000，只要采用本领域技术人员的技术有可能产生即可。

[0603] 还优选的是在酸性pH范围内的FcRn结合活性提高以及在酸性pH范围内的抗原结合活性比在中性pH范围内的抗原结合活性低或在低钙浓度下的抗原结合活性比在高钙浓度下的抗原结合活性低的本发明的抗原结合分子。优选在中性pH范围内这类抗原结合分子对预存ADA的结合活性不显著提高。这类抗原结合分子的具体实例包括在pH5.8-pH6.0(所述pH被认为是体内早期内体的pH)下对人FcRn的结合活性比IgG的高，且其抗原结合活性在pH5.8下比在pH7.4下低的抗原结合分子。其抗原结合活性在pH5.8下比在pH7.4下低的抗原结合分子亦可称为其抗原结合活性在pH5.8下比在pH7.4下弱的抗原结合分子。优选在酸性pH范围内对FcRn的结合活性提高的抗原结合分子具有在中性pH范围内比完整人IgG强的FcRn结合活性。

[0604] 本发明的修饰的FcRn结合结构域适用于任何抗原结合分子，不论靶抗原的类型。

[0605] 本发明的抗原结合分子可具有其它性质。例如其可以是激动性或拮抗性抗原结合分子，只要其a)具有在中性pH范围必要提高的人FcRn结合活性，或b)具有在酸性范围内提高的人FcRn结合活性且其对预存ADA的结合活性不显著提高。优选这类抗原结合分子的抗原结合活性在酸性pH范围内比在中性pH范围内低。本发明优选的抗原结合分子包括例如拮抗性抗原结合分子。这类拮抗性抗原结合分子通常为通过阻断配体(激动剂)和受体之间的结合而抑制受体介导的胞内信号转导的抗原结合分子。

[0606] 同时，本发明的抗原结合分子可识别任何抗原。被本发明的抗原结合分子识别的特定抗原包括例如上述受体蛋白(膜结合受体和可溶性受体)、膜抗原(例如细胞表面标志物)和可溶性抗原(例如细胞因子)。这类抗原包括例如下述抗原。

[0607] 包含抗原结合结构域的本发明的抗原结合分子可利用pH差异作为血浆和内体间的环境差异用于抗原结合分子对血浆和内体中的抗原的差异结合亲和力(在血浆中强结合而在内体中弱结合)。因为血浆和内体间的环境差异不限于pH的差异，因此可通过利用其浓度在血浆和内体内不同的其它因素(例如离子化钙浓度)，替代关于抗原结合分子与抗原的结合的pH依赖性结合性质。这类因素也可用于产生在血浆中与抗原结合但在内体中解离出抗原的抗体。因此，本发明还包括包含人FcRn结合结构域的抗原结合分子，其人FcRn结合活性在中性pH范围内提高且其抗原结合活性在内体中比血浆低。优选这些抗原结合分子在中性pH范围内对预存ADA的结合活性不显著提高。这类抗原结合分子的人FcRn结合活性在血浆中强于完整人IgG的人FcRn结合活性，此外这类抗原结合分子的抗原结合结构域在内体内对抗原的亲和力低于在血浆中的亲和力。优选抗原结合结构域是其抗原结合活性在酸性pH范围内低于在中性pH范围内的抗原结合活性的抗原结合结构域(pH依赖性抗原结合结构域)或其抗原结合活性在低钙浓度下比在高钙浓度条件下低的抗原结合结构域(钙浓度依赖性抗原结合结构域)。本发明还包括具有人FcRn结合结构域的抗原结合分子，其在酸性pH范围内具有提高的人FcRn结合活性，且所述抗原结合分子还包含对抗原的亲和力在内体内比在血浆中低的抗原结合结构域，使得在内体中抗原结合分子的人FcRn结合活性强于完整人IgG的人FcRn结合活性，且抗原结合分子的抗原结合活性在内体中强于在血浆中。优选这些抗原结合分子在中性pH范围内对预存ADA的结合活性不显著提高。优选抗原结合结构域

是其抗原结合活性在酸性pH范围内低于在中性pH范围内的抗原结合结构域(pH依赖性抗原结合结构域)或其抗原结合活性在低钙浓度下低于在高钙浓度条件下的抗原结合结构域(钙浓度依赖性抗原结合结构域)。

[0608] 特别是当本发明的抗原结合分子包含作为pH依赖性抗原结合结 构域或钙浓度依赖性抗原结合结构域的抗原结合结构域时,本发明的抗原结合分子促进细胞对抗原的摄入。抗原结合分子在内体中容易从抗原中解离,然后通过与人FcRn结合而释放到细胞以外。假定本发明的抗原结合分子容易与血浆中的抗原再次结合。因此,例如当本发明的抗原结合分子中和抗原结合分子时,可通过给予所述分子促进血浆抗原浓度的降低。

[0609] 抗原结合结构域

[0610] 优选抗原结合分子的抗原结合结构域在酸性pH下或在钙离子浓度下亲和力对抗原的亲和力降低。更优选抗原结合结构域是本文描述的pH依赖性抗原结合结构域或离子化钙浓度依赖性抗原结合结构域。

[0611] A)pH依赖性抗原结合结构域,

[0612] 此外,本发明的抗原结合分子优选包含其在酸性pH范围内的抗原结合活性低于在中性pH范围内的抗原结合活性的pH依赖性抗原结合结构域。所述抗原结合分子优选具有在酸性pH范围内比在中性pH范围内低的抗原结合活性。结合活性比率不受限制,只要抗原结合活性在酸性pH范围内低于在中性pH范围内。在优选的实施方案中,本发明的抗原结合分子包括其抗原结合活性在pH7.4下是在pH5.8下的2倍或更高倍的抗原结合分子,优选抗原结合活性在pH7.4下是在pH5.8下的10倍或更高倍。在还更优选的实施方案中,本发明的抗原结合分子包括其抗原结合活性在pH7.4下是在pH5.8下的40倍或更高倍的抗原结合分子。

[0613] 本发明的抗原结合分子的具体实例包括WO2009/125825所述实施方案。在优选的实施方案中,包含pH依赖性抗原结合结构域的本发明的抗原结合分子具有在pH5.8下低于在pH7.4下的抗原结合活性,其中KD(pH5.8)/KD(pH7.4)值(其是在pH5.8下针对抗原的KD与在pH7.4下针对抗原的KD的比率)优选为2或更大、更优选为10或更大,还更优选40或更大。KD(pH5.8)/KD(pH7.4)值的上限不受特 别限制,并且可以是任何值,例如400、1,000或10,000,只要有可能采用本领域技术人员的技术产生。

[0614] 在另一个优选的实施方案中,其在pH5.8下低于在pH7.4下的抗原结合活性的本发明的抗原结合分子的KD(pH5.8)/KD(pH7.4)值(其是在pH5.8下针对抗原KD的和在pH7.4下针对抗原的KD的比率)为2或更大,更优选5或更大,甚至更优选10或更大,还更优选30或更大。KD(pH5.8)/KD(pH7.4)值的上限不受特别限制,并可以是任何值,例如50、100或200,只要有可能采用本领域技术人员的技术产生。

[0615] 本领域技术人员可适当选择在其中测量抗原结合活性、对预存ADA的结合活性和人FcRn结合活性的pH以外的条件,这些条件不受特别限制;然而,例如可按实施例中所述,在MES缓冲液和在37℃下的条件下进行测量。此外,可通过本领域技术人员已知方法,例如按实施例中所述采用BiacoreT100(GE Healthcare)等,来测定抗原结合分子的抗原结合活性。

[0616] 用于降低(减弱)抗原结合分子在酸性pH范围内的抗原结合活性至小于在中性pH范围内的抗原结合活性的方法(用于赋予pH依赖性结合能力的方法)不受特别限制,适合的方法为本领域技术人员所知。例如,WO2009/125825描述了,用于通过用组氨酸取代抗原结

合结构域中的氨基酸或将组氨酸插入抗原结合结构域中来降低(减弱)在酸性pH范围内的抗原结合活性至小于在中性pH范围内的抗原结合活性的方法。亦已知可通过用组氨酸取代抗体的氨基酸赋予抗体pH依赖性抗原结合活性(FEBS Letter(1992)309(1):85-88)。其它合适的方法包括用于用非天然氨基酸取代抗原结合结构域中的氨基酸或将非天然氨基酸插入抗原结合结构域中的方法。已知可通过使用非天然氨基酸对pKa进行人工调节(Angew.Chem.Int.Ed.2005,44,34;Chem Soc Rev.2004年9月,33(7):422-30;Amino Acids.(1999)16(3-4):345-79)。在本发明的情况下,可使用任何非天然氨基酸。实际上,有可能使用 本领域技术人员已知的非天然氨基酸。

[0617] 在优选的实施方案中,包含具有在酸性pH范围内比在中性pH范围内低的抗原结合活性的抗原结合结构域的本发明的抗原结合分子包括这样的抗原结合分子,其中抗原结合分子的至少一个氨基酸被组氨酸或非天然氨基酸置换和/或其中插入了至少一个组氨酸或非天然氨基酸。向其中引入组氨酸或非天然氨基酸突变的位点不受特别限制,可以是本领域技术人员认为适合的任何位点,只要与取代前相比,所得抗原结合活性在酸性pH范围内弱于在中性pH范围内的抗原结合活性(KD(在酸性pH范围内)/KD(在中性pH范围内)值较大或kd(在酸性pH范围内)/kd(在中性pH范围内)值较大)。在所述抗原结合分子是抗体的情况下,实例包括抗体的可变区和CDR。本领域技术人员可适当地确定待被组氨酸或非天然氨基酸置换的氨基酸的数目和待插入的氨基酸的数目。一个氨基酸可被组氨酸或非天然氨基酸置换,或可插入一个氨基酸,或者两个或更多个氨基酸可被组氨酸或非天然氨基酸置换,或可插入两个或更多个氨基酸。此外,除组氨酸或非天然氨基酸的取代或组氨酸或非天然氨基酸的插入以外,还可同时进行其它氨基酸的缺失、添加、插入和/或取代等。组氨酸或非天然氨基酸的取代或组氨酸或非天然氨基酸的插入可采用例如组氨酸扫描等方法随机进行,所述扫描使用组氨酸而非是本领域技术人员已知的丙氨酸扫描中的丙氨酸。可从组氨酸或非天然氨基酸突变已随机引入其中的抗原结合分子中选出与突变前相比其KD(pH5.8)/KD(pH7.4)或kd(pH5.8)/kd(pH7.4)提高的抗原结合分子。

[0618] 优选保持抗原结合结构域在中性pH(即pH7.4)下的结合活性。当将在组氨酸或非天然氨基酸突变前抗原结合分子的抗原结合活性设为100%时,在组氨酸或非天然氨基酸突变后抗原结合分子的抗原结合活性在pH7.4下为至少10%或更大,优选50%或更大,更优选80%或更大,还更优选90%或更大。在组氨酸或非天然氨基酸突变后在pH7.4下的抗原结合活性可强于在组氨酸或非天然氨基酸突变前在pH 7.4下的抗原结合活性。当抗原结合分子的抗原结合活性因组氨酸或非天然氨基酸的取代或插入所致降低时,可通过将一个或多个氨基酸的取代、缺失、添加和/或插入等引入抗原结合分子中来调节抗原结合活性,使得抗原结合活性等于组氨酸取代或插入前的抗原结合活性。

[0619] 在本发明的情况下,当所述抗原结合分子是抗体时,组氨酸或非天然氨基酸取代的可能位点包括例如抗体的CDR序列和负责CDR结构的序列,包括例如WO2009/125825中描述的位点。

[0620] 此外,本发明提供用组氨酸或非天然氨基酸在下列位点之一取代至少一个氨基酸的抗原结合分子:

[0621] 重链:H27、H31、H32、H33、H35、H50、H58、H59、H61、H62、H63、H64、H65、H99、H100b和H102

[0622] 轻链:L24、L27、L28、L32、L53、L54、L56、L90、L92和L94

[0623] 这些改变位点的H32、H61、L53、L90和L94假定为高度通用的改变位点。氨基酸位置按照Kabat编号(Kabat等,Sequences of Immunological Interest.第5版.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991))表示。当提及可变结构域(大致为轻链的残基1-107和重链的残基1-113)的残基时,一般使用Kabat编号系统。组氨酸或非天然氨基酸取代位点的特别优选组合包括例如H27、H31和H35的组合;H27、H31、H32、H35、H58、H62和H102的组合,L32和L53的组合;和L28、L32和L53的组合。此外,重链和轻链中取代位点的优选组合包括例如H27、H31、L32和L53的组合。

[0624] 当抗原是IL-6受体(例如人IL-6受体)时,优选的改变位点包括但不特别限于:

[0625] 重链:H27、H31、H32、H35、H50、H58、H61、H62、H63、H64、H65、H100b和H102

[0626] 轻链:L24、L27、L28、L32、L53、L56、L90、L92和L94

[0627] 用于组氨酸或非天然氨基酸取代的位点的特别优选组合包括例 如H27、H31和H35的组合;H27、H31、H32、H35、H58、H62和H102的组合;L32和L53的组合;和L28、L32和L53的组合。此外,重链和轻链中取代位点的优选组合包括例如H27、H31、L32和L53的组合。

[0628] 可在上述位置的一个或多个上进行组氨酸或非天然氨基酸取代。

[0629] 或者,本发明的抗原结合分子可包含经改变使得在pH5.8下的抗原结合活性低于pH7.4下的抗原结合活性的抗体恒定区。用于改变抗原结合分子所含的抗体恒定区的方法对于本领域技术人员而言是已知的并且实际上是常规的。改变后的抗体恒定区的具体实例包括WO2009/125825实施例中描述的恒定区(SEQ ID NO:11、12、13和14)。

[0630] 同时,已知用于改变抗体恒定区的方法,包括例如用于评价各种恒定区同种型(IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)和选择降低在酸性pH范围内的抗原结合活性(提高在酸性pH范围内的解离速率)的同种型的方法。所述方法还包括通过将氨基酸取代引入野生型同种型的氨基酸序列(野生型IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的氨基酸序列)中来降低在酸性pH范围内的抗原合结活性(提高在酸性pH范围内的解离速率)的方法。抗体恒定区中的铰链区序列在同种型(IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)中颇不相同,且铰链区氨基酸序列中的差异对抗原结合活性有极大影响。因此,有可能选择适合的同种型以降低在酸性pH范围内的抗原结合活性(提高在酸性pH范围内的解离速率),这取决于抗原或表位的类型。此外,由于铰链区氨基酸序列的差异对抗原结合活性有极大影响,因此假定野生型同种型氨基酸序列中的优选的氨基酸取代位点在铰链区内。

[0631] 可采用上述方法,以通过氨基酸取代或插入从不具有所述性质抗原结合分子产生其抗原结合活性在酸性pH范围内降低(减弱)至小于在中性pH范围内的抗原结合活性的抗原结合分子(以pH依赖性方式结合的抗原结合分子)。其它方法包括用于直接获得具有上述性质的抗原结合分子的方法。例如,可采用pH依赖性抗原结合作为从通过用 抗原免疫动物(小鼠、大鼠、仓鼠、兔、人免疫球蛋白转基因小鼠、人免疫球蛋白转基因大鼠、人免疫球蛋白转基因兔、美洲驼、骆驼等)获得的抗体的指示物,通过筛选直接选择具有所需目标性质的抗体。抗体可通过杂交瘤技术或B细胞克隆技术产生(Bernasconi等,Science(2002)298,2199-2202;WO2008/081008),该技术是本领域技术人员已知的方法,但不限于这些。或者,可使用pH依赖性抗原结合作为指示物,在体外通过筛选从提供抗原结合结构域的文库直接选出具有目标性质的抗体。这类文库包括人幼稚文库、来自非人动物和人的免疫文库、半合

成文库和合成文库，这些是本领域的技术人员已知的文库(Methods Mol Biol.2002;178:87-100;J Immunol Methods.2004年6月;289(1-2):65-80;以及Expert Opin Biol Ther.2007年5月;7(5):763-79)，但不限于这些。然而，方法并非特别限于这些实例。

[0632] B)离子化钙依赖性抗原结合结构域

[0633] 在另一个优选的实施方案中，本发明的抗原结合分子包含钙离子依赖性抗原结合结构域。这类抗原结合分子的抗原结合活性取决于钙浓度，藉此在低钙浓度下的抗原结合活性低于在高钙浓度下的抗原结合活性。

[0634] 优选抗原结合活性包括在0.5-10微摩尔的离子化钙浓度下的抗原结合活性。更优选离子化钙浓度包括体内早期内体的离子化钙浓度。具体而言，抗原结合活性包括在1-5微摩尔下的活性。同时，在高钙浓度下抗原结合分子的抗原结合活性不受特别限制，只要其是在100微摩尔-10mM的离子化钙浓度下的抗原结合活性。优选抗原结合活性包括在200微摩尔-5mM的离子化钙浓度下的抗原结合活性。优选低钙浓度是0.1-30微摩尔的离子化钙浓度，高钙浓度是100微摩尔-10mM的离子化钙浓度。

[0635] 优选低钙浓度是内体内离子化钙的浓度，高钙浓度是血浆离子化钙的浓度。更具体地讲，包含所述钙依赖性抗原结合结构域的抗原结合分子包括这样的抗原结合分子，其在体内早期内体中的离子化钙浓 度(例如1-5微摩尔的低钙浓度)下的抗原结合活性低于在体内血浆中的离子化钙浓度(例如0.5-2.5mM的高钙浓度)下的抗原结合活性。

[0636] 至于其在低钙浓度下的抗原结合活性低于在高钙浓度下的抗原结合活性的抗原结合分子的抗原结合活性，在抗原结合活性的这种差异中没有限制，只要在低钙浓度下的抗原结合活性低于在高钙浓度下的抗原结合活性。甚至可接受抗原结合分子的抗原结合活性仅在低钙浓度条件下略低。

[0637] 在优选的实施方案中，对于其在低钙浓度(低Ca)下的抗原结合活性低于在高钙浓度(高Ca)下的抗原结合活性的本发明的抗原结合分子，KD(低Ca)/KD(高Ca)的值(其是低和高钙浓度之间的KD比率)为2或更大，优选KD(低Ca)/KD(高Ca)的值为10或更大，更优选KD(低Ca)/KD(高Ca)的值为40或更大。KD(低Ca)/KD(高Ca)值的上限不受特别限制，可以是任何值，例如400、1,000和10,000，只要其可通过本领域技术人员已知技术产生。

[0638] 在另一个优选的实施方案中，对于包含其在低钙浓度下的抗原结合活性低于在高钙浓度下的抗原结合活性的钙依赖性抗原结合结构域的抗原结合分子，kd(低Ca)/kd(高Ca)的值(其是低钙浓度条件和pH7.4间抗原kd的比率)为2或更大，优选kd(低Ca)/kd(高Ca)的值为5或更大，更优选kd(低Ca)/kd(高Ca)的值为10或更大，还更优选kd(低Ca)/kd(高Ca)的值为30或更大。kd(低Ca)/kd(高Ca)值的上限不受特别限制，可以是任何值，例如50、100和200，只要其可通过本领域技术人员已知技术产生。

[0639] 可通过本领域技术人员已知方法测定抗原结合分子的抗原结合活性。本领域技术人员可选择离子化钙浓度以外的合适条件。可通过使用KD(解离常数)、表观KD(表观解离常数)、解离速率kd(解离速率)、表观kd(表观解离:表观解离速率)等，评价抗原结合分子的抗原结合活性。它们可通过本领域技术人员已知方法，例如采用Biacore(GE Healthcare)、Scatchard图、FACS等进行测定。

[0640] 待通过本发明的筛选方法筛选的抗原结合分子可以是任何抗原结合分子。例如，可筛选具有天然序列的抗原结合分子或具有带取代的氨基酸序列的抗原结合分子。待通过

本发明的筛选方法筛选的包含钙离子依赖性抗原结合结构域的抗原结合分子可通过任何方法制备。可使用例如预存抗体、预存文库(噬菌体文库等)和自免疫动物的B细胞或通过免疫动物制备的杂交瘤制备的抗体和文库、通过将能够螯合钙的氨基酸(例如天冬氨酸或谷氨酸)或将非天然氨基酸突变引入这类抗体或文库获得的抗体或文库(具有高含量的非天然氨基酸或能够螯合钙的氨基酸(例如天冬氨酸或谷氨酸)的文库、在特定位点引入非天然氨基酸突变或能够螯合钙的氨基酸(例如天冬氨酸或谷氨酸)的突变的文库等)等。

[0641] 可采用本领域的常规方法,容易地筛选、鉴定和分离其在低钙浓度条件下的抗原结合活性低于在高钙浓度条件下的抗原结合活性的抗原结合分子(参见例如PCT申请号PCT/JP2011/077619)。这类筛选方法的实例包括测定具有选自以下的至少一个功能的抗原结合分子的步骤:

[0642] (i)促进细胞对抗原的摄入的功能;

[0643] (ii)与抗原结合两次或更多次的功能;

[0644] (iii)促进血浆抗原浓度降低的功能;和

[0645] (iv)优异的血浆滞留功能。

[0646] 具体而言,本发明提供筛选包含钙离子依赖性抗原结合结构域的抗原结合分子的方法,所述方法包括以下步骤:

[0647] (a)测定抗原结合分子在低钙浓度条件下的抗原结合活性;

[0648] b)测定抗原结合分子在高钙浓度条件下的抗原结合活性;和

[0649] (c)选择其在低钙浓度条件下的抗原结合活性低于在高钙浓度条件下的抗原结合活性的抗原结合分子。

[0650] 用于产生具有钙离子依赖性抗原结合结构域的抗原结合分子的方法是例如包括以下步骤的方法:

[0651] (a)测定抗原结合分子在低钙浓度条件下的抗原结合活性;

[0652] (b)测定抗原结合分子在高钙浓度条件下的抗原结合活性;和

[0653] (c)选择其在低钙浓度条件下的抗原结合活性低于在高钙浓度条件下的抗原结合活性的抗原结合分子。

[0654] 产生具有钙离子依赖性抗原结合结构域的抗原结合分子的另一方法是包括以下步骤的方法:

[0655] (a)使抗原与抗原结合分子或抗原结合分子的文库在高钙浓度条件下接触;

[0656] (b)获得与步骤(a)中的抗原结合的抗原结合分子;

[0657] (c)使步骤(b)获得的抗原结合分子放置在低钙浓度条件下;

[0658] (d)获得其在步骤(c)中的抗原结合活性低于在步骤(b)中选择的活性的抗原结合分子;

[0659] (e)获得编码步骤(d)中获得的抗原结合分子的基因;和

[0660] (f)使用步骤(e)中获得的基因产生抗原结合分子。

[0661] 步骤(a)-(e)可重复两次或更多次。因此,本发明提供还包括重复在上述方法中的步骤(a)-(e)两次或更多次的步骤的方法。重复步骤(a)-(e)的次数不受特别限制;然而,次数一般为10次或更少。

[0662] 用于本发明生产方法的抗原结合分子可通过任何常规方法制备。例如,可使用预

存抗体、预存文库(噬菌体文库等)、自通过免疫动物获得的杂交瘤或自免疫动物的B细胞制备的抗体和文库、通过将组氨酸或非天然氨基酸突变引入上述抗体和文库中而制备的抗体和文库(具有高含量的组氨酸或非天然氨基酸的文库、在特定位点引入组氨酸或非天然氨基酸的文库等)等。

[0663] 筛选这类钙离子依赖性抗原结合分子或钙离子依赖性抗原结合结构域的其它方法描述于PCT申请号PCT/JP2011/077619。

[0664] 抗原

[0665] 本发明的抗原结合分子例如本发明的抗体识别的抗原,没有特别限制。本发明的这类抗原结合分子可识别任何抗原。由本发明的抗原 结合分子识别的抗原的具体实例包括但不限于:17-IA、4-1BB、4Dc、6-keto-PGF1a、8-iso-PGF2a、8-oxo-dG、A1腺苷受体、A33、ACE、ACE-2、激活素、激活素A、激活素AB、激活素B、激活素C、激活素RIA、激活素RIAALK-2、激活素RIBALK-4、激活素RIIA、激活素RIIB、ADAM、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17/TACE、ADAM8、ADAM9、ADAMTS、ADAMTS4、ADAMTS5、地址素、脂连蛋白、ADP核糖基环化酶-1、aFGF、AGE、ALCAM、ALK、ALK-1、ALK-7、变应原、α1-抗胰凝乳蛋白酶(antichemotrypsin)、α1-抗胰蛋白酶、α-突触核蛋白、α-V/β-1拮抗剂、aminin、胰淀粉样肽、淀粉状蛋白β、淀粉状蛋白免疫球蛋白重链可变区、淀粉状蛋白免疫球蛋白轻链可变区、雄激素、ANG、血管紧张素原、促血管生成素配体-2、抗Id、抗凝血酶III、炭疽、APAF-1、APE、APJ、apoA1、apo血清淀粉状蛋白A、Apo-SAA、APP、APRIL、AR、ARC、ART、Artemin、ASPARTIC、心房钠尿因子、心房钠尿肽、心房钠尿肽A、心房钠尿肽B、心房钠尿肽C、av/b3整联蛋白、Ax1、B7-1、B7-2、B7-H、BACE、BACE-1、炭疽芽孢杆菌(Bacillus anthracis)保护性抗原、Bad、BAFF、BAFF-R、Bag-1、BAK、Bax、BCA-1、BCAM、Bc1、BCMA、BDNF、b-ECGF、β-2-微球蛋白、β内酰胺酶、bFGF、BID、Bik、BIM、BLC、BL-CAM、BLK、B-淋巴细胞刺激因子(BIyS)、BMP、BMP-2(BMP-2a)、BMP-3(成骨蛋白)、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、铃蟾肽、骨衍生神经营养因子、牛生长激素、BPDE、BPDE-DNA、BRK-2、BTC、B淋巴细胞细胞粘附分子、C10、C1-抑制剂、C1q、C3、C3a、C4、C5、C5a(补体5a)、CA125、CAD-8、钙黏着蛋白-3、降钙素、cAMP、碳酸酐酶-IX、癌胚抗原(CEA)、癌相关抗原、心肌营养蛋白-1、组织蛋白酶A、组织蛋白酶B、组织蛋白酶C/DPPI、组织蛋白酶D、组织蛋白酶E、组织蛋白酶H、组织蛋白酶L、组织蛋白酶O、组织蛋白酶S、组织 蛋白酶V、组织蛋白酶X/Z/P、CBL、CCI、CCK2、CCL、CCL1/I-309、CCL11/嗜酸性细胞选择性趋化因子(Eotaxin)、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/嗜酸性细胞选择性趋化因子-2、CCL25/TECK、CCL26/嗜酸性细胞选择性趋化因子-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受体、CINC、CKb8-1、密蛋白18、CLC、肉毒梭菌(Clostridium botulinum)毒素、艰难梭菌(Clostridium difficile)毒素、产气荚膜梭菌(Clostridium perfringens)毒素、c-Met、CMV、CMVUL、CNTF、CNTN-1、补体因子3(C3)、补体因子D、皮质甾类结合球蛋白、集落刺激因子-1受体、COX、C-Ret、CRG-2、CRTH2、CT-1、CTACK、CTGF、CTLA-4、CX3CL1/分形趋化因子(Fractalkine)、CX3CR1、CXCL、CXCL1/Gro-α、CXCL10、CXCL11/I-TAC、CXCL12/SDF-1-α/β、CXCL13/BCA-1、CXCL14/BRAK、CXCL15/Lungkine、CXCL16、CXCL16、CXCL2/Gro-βCXCL3/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剂C、细胞角蛋白肿瘤相关抗原、DAN、DCC、DcR3、DC-SIGN、衰变加速因子、δ样蛋白质配体4、脱(1-3)-IGF-1(脑IGF-1)、Dhh、DHICA氧化酶、Dickkopf-1、地高辛、二肽基肽酶IV、DK1、DNAM-1、DNA酶、Dpp、DPPIV/CD26、Dtk、ECAD、EDA、EDA-A1、EDA-A2、EDAR、EGF、EGFR(ErbB-1)、含有EGF样结构域的蛋白质7、弹性蛋白酶、弹性蛋白、EMA、EMMPRIN、ENA、ENA-78、内皮唾酸蛋白、内皮素受体、内毒素、脑啡肽酶、eNOS、Eot、嗜酸性细胞选择性趋化因子、嗜酸性细胞选择性趋化因子-2、eotaxini、EpCAM、EphrinB2/EphB4、Epha2酪氨酸激酶受体、表皮生长因子受体(EGFR)、ErbB2受体、ErbB3酪氨酸激酶受体、ERCC、红细胞生成素(EPO)、红细胞生成素受体、E-选择蛋白、ET-1、Exodus-2、RSV的F蛋白、F10、F11、F12、F13、F5、F9、因子Ia、因子IX、因子Xa、因子VII、因子VIII、因子VIIIc、Fas、FcαR、FcεRI、FcγIIb、FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIIa、FcγRIIIb、FcRn、FEN-1、铁蛋白、FGF、FGF-19、FGF-2、FGF-2受体、FGF-3、FGF-8、FGF-酸性、FGF-碱性、FGFR、FGFR-3、血纤蛋白、成纤维细胞活化蛋白(FAP)、成纤维细胞生长因子、成纤维细胞生长因子-10、纤连蛋白、FL、FLIP、Flt-3、FLT3配体、叶酸盐受体、促卵泡激素(FSH)、分形趋化因子(CX3C)、游离重链、游离轻链、FZD1、FZD10、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、G250、Gas6、GCP-2、GCSF、G-CSF、G-CSF受体、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(肌肉生长抑制素(Myostatin))、GDF-9、GDNF、凝溶胶蛋白、GFAP、GF-CSF、GFR-α1、GFR-α2、GFR-α3、GF-β1、gH包膜糖蛋白、GITR、胰高血糖素、胰高血糖素受体、胰高血糖素样肽1受体、Glut4、谷氨酸羧肽酶II、糖蛋白激素受体、糖蛋 白IIb/IIIa(GPIIb/IIIa)、磷脂酰肌醇聚糖-3、GM-CSF、GM-CSF受体、gp130、gp140、gp72、粒细胞-CSF(G-CSF)、GRO/MGSA、生长激素释放因子、GRO-β、GRO-γ、幽门螺杆菌(H.pylori)半抗原(NP-cap或NIP-cap)、HB-EGF、HCC、HCC1、HCMVgB包膜糖蛋白、HCMVUL、造血生长因子(HGF)、HepBgp120、肝素酶、肝素辅因子II、肝生长因子、炭疽芽孢杆菌保护性抗原、丙型肝炎病毒E2糖蛋白、戊型肝炎、Hepcidin、Her1、Her2/neu(ErbB-2)、Her3(ErbB-3)、Her4(ErbB-4)、单纯疱疹病毒(HSV)gB糖蛋白、HGF、HGFA、高分子量黑素瘤相关抗原(HMW-MAA)、HIV包膜蛋白例如GP120、HIVMIBgp120V3环、HLA、HLA-DR、HM1.24、HMFGPEM、HMGB-1、HRG、Hrk、HSP47、Hsp90、HSVgD糖蛋白、人心肌球蛋白、人巨细胞病毒(HCMV)、人生长激素(hGH)、人血清白蛋白、人组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)、亨廷顿蛋白(Huntingtin)、HVEM、IAP、ICAM、ICAM-1、ICAM-3、ICE、ICOS、IFN-α、IFN-β、IFN-γ、IgA、IgA受体、IgE、IGF、IGF结合蛋白、IGF-1、IGF-1R、IGF-2、IGFBP、IGFR、IL、IL-1、IL-10、IL-10受体、IL-11、IL-11受体、IL-12、IL-12受体、IL-13、IL-13受体、IL-15、IL-15受体、IL-16、IL-16受体、IL-17、IL-17受体、IL-18(IGIF)、IL-18受体、

IL-1α、IL-1β、IL-1受体、IL-2、IL-2受体、IL-20、IL-20受体、IL-21、IL-21受体、IL-23、IL-23受体、IL-2受体、IL-3、IL-3受体、IL-31、IL-31受体、IL-3受体、IL-4、IL-4受体IL-5、IL-5受体、IL-6、IL-6受体、IL-7、IL-7受体、IL-8、IL-8受体、IL-9、IL-9受体、免疫球蛋白免疫复合物、免疫球蛋白、INF-α、INF-α受体、INF-β、INF-β受体、INF-γ、INF-γ受体、IFNI型、IFNI型受体、流感病毒(influenza)、抑制素、抑制素α、抑制素β、iNOS、胰岛素、胰岛素A-链、胰岛素B-链、胰岛素样生长因子1、胰岛素样生长因子2、胰岛素样生长因子结合蛋白、整联蛋白、整联蛋白α2、整联蛋白α3、整联蛋白α4、整联蛋白α4/β1、整联蛋白α-V/β-3、整联蛋白α-V/β-6、整联蛋白α4/β7、整联蛋白α5/β1、整联蛋白α5/β3、 整联蛋白α5/β6、整联蛋白α-δ(αV)、整联蛋白α-θ、整联蛋白β1、整联蛋白β2、整联蛋白β3(GPIIb-IIIa)、IP-10、I-TAC、JE、kalliklein、激肽释放酶11、激肽释放酶12、激肽释放酶14、激肽释放酶15、激肽释放酶2、激肽释放酶5、激肽释放酶6、激肽释放酶L1、激肽释放酶L2、激肽释放酶L3、激肽释放酶L4、kallistatin、KC、KDR、角质形成细胞生长因子(KGF)、角质形成细胞生长因子-2(KGF-2)、KGF、杀伤细胞免疫球蛋白样受体、kit配体(KL)、Kit酪氨酸激酶、层粘连蛋白5、LAMP、LAPP(胰淀粉样肽、胰岛淀粉样多肽)、LAP(TGF-1)、潜伏期相关肽、潜伏TGF-1、潜伏TGF-1bp1、LBP、LDGF、LDL、LDL受体、LECT2、Lefty、瘦蛋白、促黄体激素(leutinizing hormone)(LH)、路易斯-Y抗原(Lewis-Yantigen)、路易斯-Y相关抗原、LFA-1、LFA-3、LFA-3受体、Lfo、LIF、LIGHT、脂蛋白、LIX、LKN、Lptn、L-选择蛋白、LT-a、LT-b、LTB4、LTBP-1、肺表面活性剂、促黄体激素、淋巴细胞趋化肽、淋巴毒素β受体、溶性鞘脂受体(Lysosphingolipid receptor)、Mac-1、巨噬细胞-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(67a.a.)、MDC(69a.a.)、megsin、Mer、MET酪氨酸激酶受体家族、金属蛋白酶、膜糖蛋白OX2、Mesothelin、MGDF受体、MGMT、MHC(HLA-DR)、微生物蛋白质、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、单核细胞趋化蛋白(monocyte attractant protein)、单核细胞集落抑制因子、小鼠促性腺激素相关肽、MPIF、Mpo、MSK、MSP、MUC-16、MUC18、粘蛋白(Mud)、Muellerian抑制性物质、Mug、MuSK、髓鞘相关糖蛋白、骨髓祖代抑制因子-1(MPIF-I)、NAIP、纳米体(Nanobody)、NAP、NAP-2、NCA90、NCAD、N-钙黏着蛋白、NCAM、脑啡肽酶(Neprilysin)、神经细胞粘附分子、 神经丝氨酸蛋白酶抑制剂(neroserpin)、神经元生长因子(NGF)、神经营养蛋白-3、神经营养蛋白-4、神经营养蛋白-6、神经毡蛋白1、神养蛋白、NGF-β、NGFR、NKG20、N-甲硫氨酰人生长激素、nNOS、NO、Nogo-A、Nogo受体、丙型肝炎病毒的非结构蛋白3型(NS3)、NOS、Npn、NRG-3、NT、NT-3、NT-4、NTN、OB、OGG1、制癌蛋白M、OP-2、OPG、OPN、OSM、OSM受体、骨诱导因子、骨桥蛋白、OX40L、OX40R、氧化型LDL、p150、p95、PADPr、甲状旁腺激素、PARC、PARP、PBR、PBSF、PCAD、P-钙黏着蛋白、PCNA、PCSK9、PDGF、PDGF受体、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、PDGF-D、PDK-1、PECAM、PEDF、PEM、PF-4、PGE、PGF、PGI2、PGJ2、PIGF、PIN、PLA2、胎盘生长因子、胎盘碱性磷酸酶(PLAP)、胎盘催乳激素、纤溶酶原激活物抑制剂-1、血小板生长因子、plgR、PLP、不同大小的聚乙二醇链(例如PEG-20、PEG-30、PEG40)、PP14、前激肽释放酶、朊病毒蛋白质、降钙素原、程序性细胞死亡蛋白1、胰岛素原、催乳素、蛋白质原转化酶PC9、松弛素原、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、蛋白质A、蛋白质C、蛋白质D、蛋白质S、蛋白质Z、PS、PSA、PSCA、PsmAr、PTEN、PTHrp、Ptk、PTN、P-选择蛋白糖蛋白配体-1、R51、RAGE、RANK、

RANKL、RANTES、松弛素、松弛素A链、松弛素B链、肾素、呼吸道合胞体病毒(RSV)F、Ret、reticulon4、类风湿因子、RLIP76、RPA2、RPK-1、RSK、RSVFgp、S100、RON-8、SCF/KL、SCGF、壳硬蛋白(Sclerostin)、SDF-1、SDF1α、SDF1β、SERINE、血清淀粉状蛋白P、血清白蛋白、sFRP-3、Shh、志贺样毒素II、SIGIRR、SK-1、SLAM、SLPI、SMAC、SMDF、SMOH、SOD、SPARC、鞘氨醇1-磷酸受体1、葡萄球菌脂磷壁酸、Stat、STEAP、STEAP-II、干细胞因子(SCF)、链激酶、过氧化物歧化酶、黏结蛋白聚糖-1、TACE、TACI、TAG-72(肿瘤相关糖蛋白-72)、TARC、TB、TCA-3、T-细胞受体α/β、TdT、TECK、TEM1、TEM5、TEM7、TEM8、生腱蛋白、TERT、睾丸PLAP样碱性磷酸酶、TfR、TGF、TGF-α、 TGF-β、TGF-βPan特异性、TGF-βRII、TGF-βRIIb、TGF-βRIII、TGF-βR1(ALK-5)、TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3、TGF-β4、TGF-β5、TGF-I、凝血酶、血小板生成素(TPO)、胸腺基质淋巴细胞生成素(lymphoprotein)受体、胸腺Ck-1、促甲状腺激素(TSH)、甲状腺素、甲状腺素结合球蛋白、Tie、TIMP、TIQ、组织因子、组织因子蛋白酶抑制剂、组织因子蛋白、TMEFF2、Tmpo、TMPRSS2、TNF受体I、TNF受体II、TNF-α、TNF-β、TNF-β2、TNFc、TNF-RI、TNF-RII、TNFRSF10A(TRAILR1Apo-2/DR4)、TNFRSF10B(TRAILR2DR5/KILLER/TRICK-2A/TRICK-B)、TNFRSF10C(TRAIL R3DcR1/LIT/TRID)、TNFRSF10D(TRAIL R4DcR2/TRUNDD)、TNFRSF11A(RANK ODF R/TRANCE R)、TNFRSF11B(OPG OCIF/TR1)、TNFRSF12(TWEAKRFN14)、TNFRSF12A、TNFRSF13B(TACI)、TNFRSF13C(BAFF R)、TNFRSF14(HVEM ATAR/HveA/LIGHTR/TR2)、TNFRSF16(NGFR p75NTR)、TNFRSF17(BCMA)、TNFRSF18(GITRAITR)、TNFRSF19(TROYTAJ/TRADE)、TNFRSF19L(RELT)、TNFRSF1A(TNF Rl CD120a/p55-60)、TNFRSF1B(TNF RII CD120b/p75-80)、TNFRSF21(DR6)、TNFRSF22(DcTRAILR2TNFRH2)、TNFRSF25(DR3Apo-3/LARD/TR-3/TRAMP/WSL-1)、TNFRSF26(TNFRH3)、TNFRSF3(LTbR TNF RIII/TNFC R)、TNFRSF4(OX40ACT35/TXGP1R)、TNFRSF5(CD40p50)、TNFRSF6(Fas Apo-1/APT1/CD95)、TNFRSF6B(DcR3M68/TR6)、TNFRSF7(CD27)、TNFRSF8(CD30)、TNFRSF9(4-1BB CD137/ILA)、TNFRST23(DcTRAIL R1TNFRH1)、TNFSF10(TRAIL Apo-2配体/TL2)、TNFSF11(TRANCE/RANK配体ODF/OPG配体)、TNFSF12(TWEAKApo-3配体/DR3配体)、TNFSF13(APRIL TALL2)、TNFSF13B(BAFF BLYS/TALL1/THANK/TNFSF20)、TNFSF14(LIGHT HVEM配体/LTg)、TNFSF15(TL1A/VEGI)、TNFSF18(GITR配体AITR配体/TL6)、TNFSF1A(TNF-a Conectin/DIF/TNFSF2)、TNFSF1B(TNF-b LTa/TNFSF1)、TNFSF3(LTb TNFC/p33)、TNFSF4(OX40配体gp34/TXGP1)、TNFSF5(CD40配体CD154/gp39/HIGM1/IMD3/TRAP)、TNFSF6(Fas配体Apo-1配体/APT1配体)、TNFSF7(CD27配体CD70)、TNFSF8(CD30配体CD153)、TNFSF9(4-1BB配体CD137配体)、TNF-α、TNF-β、TNIL-I、毒素代谢物、TP-1、t-PA、Tpo、TRAIL、TRAIL R、TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRANCE、运铁蛋白受体、转化生长因子(TGF)例如TGF-α和TGF-β、跨膜糖蛋白NMB、运甲状腺素蛋白、TRF、Trk、TROP-2、滋养层糖蛋白、TSG、TSLP、肿瘤坏死因子(TNF)、肿瘤相关抗原CA125、肿瘤相关抗原表达路易斯Y相关糖、TWEAK、TXB2、Ung、uPAR、uPAR-1、尿激酶、VAP-1、血管内皮生长因子(VEGF)、vaspin、VCAM、VCAM-1、VECAD、VE-钙黏着蛋白、VE-钙黏着蛋白-2、VEFGR-1(flt-1)、VEFGR-2、VEGF受体(VEGFR)、VEGFR-3(flt-4)、VEGI、VIM、病毒抗原、VitB12受体、玻连蛋白受体、VLA、VLA-1、VLA-4、VNR整联蛋白、冯维勒布兰德因子(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/淋巴细胞趋化肽、XCR1、XEDAR、XIAP、XPD、HMGB1、IgA、Aa、CD81、CD97、CD98、DDR1、DKK1、EREG、Hsp90、IL-17/IL-17R、IL-20/IL-20R、氧

化型LDL、PCSK9、前激肽释放酶、RON、TMEM16F、SOD1、嗜铬粒蛋白A、嗜铬粒蛋白B、tau、VAP1、高分子量激肽原、IL-31、IL-31R、Nav1.1、Nav1.2、Nav1.3、Nav1.4、Nav1.5、Nav1.6、Nav1.7、Nav1.8、Nav1.9、EPCR、C1、C1q、C1r、C1s、C2、C2a、C2b、C3、C3a、C3b、C4、C4a、C4b、C5、C5a、C5b、C6、C7、C8、C9、因子B、因子D、因子H、备解素、壳硬蛋白、血纤蛋白原、血纤蛋白、凝血酶原、凝血酶、组织因子、因子V、因子Va、因子VII、因子VIIa、因子VIII、因子VIIIa、因子IX、因子IXa、因子X、 因子Xa、因子XI、因子XIa、因子XII、因子XIIa、因子XIII、因子XIIIa、TFPI、抗凝血酶III、EPCR、凝血调节蛋白、TAPI、tPA、纤溶酶原、纤维蛋白溶酶、PAI-1、PAI-2、GPC3、黏结蛋白聚糖-1、黏结蛋白聚糖-2、黏结蛋白聚糖-3、黏结蛋白聚糖-4、LPA、S1P。

[0666] 本发明所述抗原结合分子能够降低上述抗原的血浆总抗原浓度。本发明所述抗原结合分子还能够通过与病毒、细菌和真菌的结构组分结合而从血浆消除病毒、细菌和真菌。特别可使用RSV的F蛋白、葡萄球菌脂磷壁酸、艰难梭菌毒素、志贺样毒素II、炭疽芽孢杆菌保护性抗原和丙型肝炎病毒E2糖蛋白作为病毒、细菌和真菌的结构组分。

[0667] 用途

[0668] 本发明还提供上述本发明的抗原结合分子的许多用途。

[0669] 因此，本发明提供本发明的修饰的抗原结合分子用于改进抗原结合分子介导的细胞对抗原的摄入的用途。此外，本发明还提供用于改进抗原结合分子介导的细胞对抗原的摄入的方法，所述方法包括通过在亲本FcRn结合结构域中在选自以下的一个或多个位置上取代氨基酸，从而提高与具有完整FcRn结合结构域的抗原结合分子相比在中性pH下的FcRn结合活性，来改变包含亲本FcRn结合结构域的抗原结合分子：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436。

[0670] 本文的术语由抗原结合分子介导的“细胞对抗原的摄入”意指通过胞吞将抗原摄入细胞。同时，本文的术语“促进摄入细胞”意指提高与血浆中抗原结合的抗原结合分子的胞内摄取速率，和/或降低所摄取的抗原重新循环至血浆的量。这意味着与FcRn结合结构域修饰之前以及因此在提高在中性pH范围内抗原结合分子的人FcRn结合活性之前，或在提高人FcRn结合活性和降低在酸性pH范围内抗原结合分子的抗原结合活性(结合能力)至小于其在中性pH范围内的抗原结合活 性之前的抗原结合分子相比，摄入细胞的速率得到促进。优选与完整IgG相比，更优选与完整人IgG相比，该速率得到改进。因此，在本发明中，可根据细胞对抗原摄入的速率的增加，来评价抗原结合分子是否促进细胞对抗原的摄入。可通过例如在将抗原和抗原结合分子加入培养基中后，监测含有表达人FcRn的细胞的培养基中抗原浓度随时间的降低，或监测摄入表达人FcRn的细胞的随时间推移的抗原量，来计算细胞对抗原摄入的速率。例如，可采用促进抗原结合分子介导的细胞对抗原摄入的速率的本发明方法，通过给予本发明抗原结合分子，提高抗原从血浆中消除的速率。因此，可通过例如经由给予本发明抗原结合分子，测试抗原从血浆中消除的速率是否加快或血浆总抗原浓度是否降低，来评价是否促进抗原结合分子介导的细胞对抗原的摄入。

[0671] 本文的术语“血浆总抗原浓度”意指抗原结合分子结合的抗原浓度与未结合的抗原浓度或“血浆游离抗原浓度”的总和，所述血浆游离抗原浓度是抗原结合分子未结合的抗原浓度。测量“血浆总抗原浓度”和“血浆游离抗原浓度”的各种方法如下所述是本领域众所周知的。

[0672] 本发明还提供本发明的抗原结合分子用于增加单个抗原结合分子在其降解前可

结合的抗原的总数的用途。本发明还提供用于通过使用本发明的抗原结合分子来增加单个抗原结合分子可结合的抗原的数目的方法。具体而言，本发明提供用于通过在所述抗原结合分子的亲本FcRn结合结构域中在选自以下的一个或多个位置上取代氨基酸，从而提高与具有完整FcRn结合结构域的抗原结合分子相比在中性pH下的FcRn结合活性，来增加单个抗原结合分子可结合的抗原总数的方法：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436。

[0673] “常规抗体”在其在内体中降解之前通常仅可与一个或两个抗原结合。本发明的抗原结合分子可增加直至抗原结合分子降解前所实现 的循环数，其中每个循环由以下组成：抗原与血浆中的抗原结合分子结合，胞内摄取与抗原结合的抗原结合分子，在内体中与抗原解离，接着抗原结合分子返回到血浆中。这意味着与在FcRn结合结构域修饰之前并因此在提高在中性pH或酸性范围内抗原结合分子的人FcRn结合活性之前，或在提高人FcRn结合活性和降低在酸性pH范围内抗原结合分子的抗原结合活性(结合能力)至小于其在中性pH范围内的抗原结合活性之前的抗原结合分子相比，循环数增加。因此，可通过测试上述“胞内摄取是否得到促进”或下述“药代动力学是否改进”，来评价循环数是否增加。

[0674] 本发明还提供本发明的抗原结合分子用于改进抗原从哺乳动物(即人)血液中消除的用途。具体地讲，本发明提供本发明的抗原结合分子用于降低血浆特定抗原浓度的用途，其中所述抗原结合分子包含可结合所述抗原的抗原结合结构域。本发明还提供用于降低血浆特定抗原浓度的方法，其中所述抗原结合分子包含可结合所述抗原的抗原结合结构域，其通过在亲本FcRn结合结构域中在选自以下的一个或多个位置上取代氨基酸因此与具有完整FcRn结合结构域的抗原结合分子相比提高在中性pH下的FcRn结合活性：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436。

[0675] 本发明还提供本发明的抗原结合分子用于促进以抗原结合的形式摄入细胞中的不含抗原的抗原结合分子在胞外释放的用途。更具体地讲，本发明提供用于通过在亲本FcRn结合结构域中在选自以下的一个或多个位置上取代氨基酸，因此提高与具有完整FcRn结合结构域的抗原结合分子相比在中性pH下的FcRn结合活性，来促进以抗原结合的形式摄入细胞中的不含抗原的抗原结合分子在胞外释放而与亲本抗体相比又不显著提高在中性pH下对预存ADA的结合活性的方法：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436。

[0676] 在本文中，“以抗原结合的形式摄入细胞中的不含抗原的抗原结合分子在胞外释放”不一定意味着所有摄入细胞中的与抗原结合的抗原结合分子均以不含抗原的形式释放到细胞之外。与在FcRn结合结构域修饰之前并因此在降低在酸性pH范围内抗原结合分子的抗原结合活性至小于在中性pH范围内的抗原结合活性并提高在中性pH范围内的人FcRn结合活性之前相比，以不含抗原的形式释放到细胞外部的抗原结合分子的比例增加是可接受的。释放到细胞外部的抗原结合分子优选保持抗原结合活性。

[0677] 本发明还提供本发明的FcRn结合结构域用于提高抗原结合分子消除血浆抗原的能力的用途。在本发明中，“用于提高消除血浆抗原的能力的方法”与“用于提高抗原结合分子从血浆中消除抗原的能力的方法”同义。更具体地讲，本发明提供用于通过在亲本FcRn结合结构域中在选自以下的一个或多个位置上取代氨基酸，从而与具有完整FcRn结合结构域

的抗原结合分子相比提高在中性和/或酸性pH下的FcRn结合活性，来提高抗原结合分子清除血浆抗原的能力的方法：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436。

[0678] 本文的术语“消除血浆抗原的能力”意指当给予或体内分泌抗原结合分子时从血浆消除抗原的能力。因此，“提高抗原结合分子消除血浆抗原的能力”在本文意指与在FcRn结合结构域修饰之前从而在提高在中性pH范围内抗原结合分子的人FcRn结合活性之前或在提高人FcRn结合活性并同时降低其在酸性pH范围内的抗原结合活性至小于在中性pH范围内的抗原结合活性之前相比，在给予抗原结合分子时加快抗原从血浆消除的速率。可通过例如体内给予可溶性抗原和抗原结合分子，测量给予后血浆可溶性抗原的浓度，来评价抗原结合分子从血浆中消除抗原的活性的提高。当给予可溶性抗原和修饰的抗原结合分子后血浆可溶性抗原的浓度降低时，可认定抗原结合分子消除血浆抗原的能力提高。可溶性抗原的形式可为抗原结合分子结合的抗原 或抗原结合分子未结合的抗原，其浓度可分别测定为“血浆中抗原结合分子结合的抗原浓度”和“血浆中抗原结合分子未结合的抗原浓度”(后者与“血浆游离抗原浓度”同义)。因为“血浆总抗原浓度”意指抗原结合分子结合的抗原浓度和未结合的抗原浓度或“血浆游离抗原浓度”的总和，后者是抗原结合分子未结合的抗原浓度，因此可溶性抗原的浓度可测定为“血浆总抗原浓度”。用于测量“血浆总抗原浓度”或“血浆游离抗原浓度”的各种方法如下所述是本领域众所周知的。

[0679] 本发明还提供本发明的FcRn结合结构域用于改进抗原结合分子的药代动力学的用途。更具体地讲，本发明提供用于通过在亲本FcRn结合结构域中在选自以下的一个或多个位置上取代氨基酸，从而与具有完整FcRn结合结构域的抗原结合分子相比提高在中性和/或酸性pH下的FcRn结合活性，来改进抗原结合分子的药代动力学的方法：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436。

[0680] 在本文中，“药代动力学的提高”、“药代动力学的改进”和“优良的药代动力学”可以以另一方式描述为“血浆(血液)滞留的提高”、“血浆(血液)滞留的改进”、“优良的血浆(血液)滞留”和“延长的血浆(血液)滞留”。这些术语在本文作为同义词使用。

[0681] 改进药代动力学特别包括：

[0682] (1)与对照抗原结合分子(例如具有完整FcRn结合结构域的抗原结合分子)相比，延迟消除：延长给予与抗原结合分子从血浆消除之间的时间；和/或

[0683] (2)与对照抗原结合分子(例如具有完整FcRn结合结构域的抗原结合分子)的血浆滞留时间相比，延长抗原结合分子(优选呈其中抗体或抗体衍生物在给予抗原结合分子后能与其抗原结合的形式)的血浆滞留时间；和/或

[0684] (3)与对照抗原结合分子相比，缩短在给予和消除抗原结合分子之间抗原是游离的(在体内不与抗原结合分子结合)的时间(与对照抗 原结合分子(例如具有完整FcRn结合结构域的抗原结合分子)相比，延长在给予和消除之间抗原结合分子在受试者体内与其抗原结合的时间)；和/或

[0685] (4)在抗体降解前与同对照抗原结合分子(例如具有完整FcRn结合结构域的抗原结合分子)结合的抗原的比率相比，增加与抗原结合分子结合的抗原与体内总抗原的比率(与在给予和降解之间对照抗原结合分子结合事件的数目相比，增加在抗体或抗体衍生物

的给予和降解之间抗原结合分子与其抗原的结合事件的数目)。

[0686] (5)与在给予对照抗原结合分子(例如具有完整FcRn结合结构域的抗原结合分子)之后的血浆总抗原浓度或血浆游离抗原浓度相比,降低在给予抗原结合分子后的血浆总抗原浓度或血浆游离抗原浓度。

[0687] 本发明还提供一种用于延迟消除受试者中的抗原结合分子的方法,所述方法包括在选自以下的一个或多个的位置上将修饰引入所述抗原结合分子的FcRn结合结构域中的步骤:EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436。

[0688] 本文所用术语"药代动力学的改进"不仅仅是指在将抗原结合分子给予受试者(人或非人动物例如小鼠、大鼠、猴、兔和狗)到从血浆中消除(例如直到抗原结合分子在胞内降解等,且不能返回到血浆中)间的时间延长,而且还指从给予直到抗原结合分子降解期间,以允许抗原结合的形式(例如以抗原结合分子的无抗原形式)的抗原结合分子的血浆滞留延长。

[0689] 因此,本发明还提供一种延长抗原结合分子的血浆滞留时间的方法,所述方法包括在选自以下一个或多个的位置上将修饰引入所述抗原结合分子的FcRn结合结构域中的步骤:EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436。完整人IgG可与非人动物的FcRn结合。例如,优选使用小鼠对其给药,以证实本发明的抗 原结合分子的性质,因为与人FcRn相比,完整人IgG可更牢地与小鼠FcRn结合(Int Immunol.2001年12月;13(12):1551-9)。作为另一个实例,还可优选使用小鼠,其中其天然FcRn基因被破坏且带有待表达的人FcRn基因这一转基因(Methods Mol Biol.2010;602:93-104),对该小鼠进行给药以证实下文描述的本发明的抗原结合分子的性质。

[0690] 具体而言,"药代动力学的改进"还包括在给予与期间未与抗原结合的抗原结合分子(抗原结合分子的无抗原形式)降解之间的时间延长。如果抗原结合分子已经与抗原结合,则血浆中的抗原结合分子不能与新的抗原结合。因此,期间抗原结合分子未与抗原结合的时间越长,期间具有与新抗原结合的潜力的时间越长(与另一抗原结合的机会越高)。换句话说,在较短的时间内结合更多的抗原。因此,可通过给予修饰的抗原结合分子加快抗原从血浆中消除,而增加抗原结合分子的无抗原形式的血浆浓度,且延长抗原与抗原结合分子结合的总时间。

[0691] 具体而言,本文中,"抗原结合分子的药代动力学的改进"包括抗原结合分子的无抗原形式的药代动力学参数改进(血浆半衰期延长、血浆平均滞留时间延长和血浆清除减弱中的任一个)、在给予修饰的抗原结合分子后抗原与抗原结合分子结合的时间延长以及抗原结合分子介导的抗原自血浆中的消除加快。

[0692] 可通过测定以下参数的任一个,来评价抗原结合分子的药代动力学的改进:血浆半衰期、平均血浆滞留时间和抗原结合分子或其无抗原形式的血浆清除("Pharmacokinetics:Enshu-niyoru Rikai(Understanding through practice)" Nanzando)。例如,在将抗原结合分子给予小鼠、大鼠、猴、兔、狗或人后,测定抗原结合分子或其无抗原形式的血浆浓度。然后,测定各参数。当血浆半衰期或平均血浆滞留时间延长时,可认定抗原结合分子的药代动力学得到改进。可通过本领域技术人员已知方法测定参

数。可按照随附说明手册，应用药代动力学分析软件WinNonlin(Pharsight)，通过例如非区室分析来对参数进 行恰当评价。可通过本领域技术人员已知方法，例如采用Clin Pharmacol.2008年4月;48(4):406-17中所描述的测定方法，测定无抗原的抗原结合分子的血浆浓度。

[0693] 本文的术语“药代动力学的改进”还包括在给予抗原结合分子后，抗原与抗原结合分子结合的时间延长。可通过测定游离抗原的血浆浓度，来评价在给予抗原结合分子后抗原与抗原结合分子结合的时间是否延长。可根据所测定的游离抗原的血浆浓度或提高游离抗原浓度与总抗原深度的比率所需的时间，来认定延长。

[0694] 本发明还提供本发明的抗原结合分子用于降低特定抗原的血浆总抗原浓度或血浆游离抗原浓度的用途，其中所述抗原结合分子包含可结合所述抗原的抗原结合结构域。更具体地讲，本发明提供用于降低血浆总抗原浓度或血浆游离抗原浓度的方法，所述方法包括以下步骤：

[0695] a)提供包含亲本FcRn结合结构域的抗原结合分子，其中所述抗原结合分子包含可结合所述抗原的抗原结合结构域，

[0696] b)在选自EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436的一个或多个位置上在亲本FcRn结合结构域中取代氨基酸，从而与具有完整FcRn结合结构域的抗原结合分子相比提高在中性pH下的FcRn结合活性。

[0697] 此外，本发明提供一种方法，所述方法包括在选自以下的一个或多个的位置上将修饰引入所述抗原结合分子的FcRn结合结构域中的步骤：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436。本文所用术语“抗原消除率”是指在抗体或抗体衍生物的给予和消除(即降解)之间的时间内抗原结合分子可从血浆除去的抗原的数目。

[0698] 可通过本领域技术人员已知方法，例如通过Pharm Res.2006年1 月;23(1):95-103中描述的方法，来测定未与抗原结合分子结合的游离抗原的血浆浓度或游离抗原浓度与总浓度的比率。或者，当抗原在体内具有特定功能时，可通过测试抗原功能是否被中和，来评价抗原是否与中和抗原功能的抗原结合分子(拮抗性分子)结合。可通过测定反映抗原功能的体内标志物，来评价抗原功能是否被中和。可通过测定反映抗原功能的体内标志物，来评价抗原是否与激活抗原功能的抗原结合分子(激动性分子)结合。

[0699] 游离抗原的血浆浓度和血浆游离抗原的量与血浆中的抗原总量的比率的测定、体内标志物测定等这类测量不受特别限制;然而，优选在给予抗原结合分子后过一定时间后实施测定。在本发明中，在给予抗原结合分子后的时间不受特别限制;本领域的技术人员可根据所给予的抗原结合分子的性质等，来确定合适的时间。这类时间包括例如给予抗原结合分子后1天、给予抗原结合分子后3天、给予抗原结合分子后7天、给予抗原结合分子后14天和给予抗原结合分子后28天。在本文中，术语“血浆抗原浓度”意指“血浆总抗原浓度”，其是抗原结合分子结合的抗原和未结合的抗原浓度的总和;或意指“血浆游离抗原浓度”，其是抗原结合分子未结合的抗原浓度。

[0700] 与给予包含完整人IgG Fc区作为人FcRn结合结构域的参比抗原结合分子相比，或与当不给予本发明的抗原结合结构域分子时相比，通过给予本发明的抗原结合分子，可降

低血浆总抗原浓度达2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、200倍、500倍、1,000倍或甚至更高倍。

[0701] 可如下计算抗原/抗原结合分子的摩尔比率：

[0702] A值：各时间点的抗原摩尔浓度

[0703] B值：各时间点的抗原结合分子摩尔浓度

[0704] C值：各时间点抗原摩尔浓度/抗原结合分子摩尔浓度(抗原/抗原结合分子摩尔比率)

[0705] C＝A/B。

[0706] C值越小，表明每抗原结合分子的抗原消除效率越高，而C值越高，则表明每抗原结合分子的抗原消除效率越低。

[0707] 与给予包含完整人IgGFc区作为人FcRn结合结构域的参比抗原结合分子相比，可通过给予本发明的抗原结合分子，降低抗原/抗原结合分子摩尔比率达2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、200倍、500倍、1,000倍或甚至更高倍。

[0708] 在本文中，完整人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4优选用作完整人IgG，目的在于针对其人FcRn结合活性或体内活性对参比完整人IgG与抗原结合分子进行比较。优选可适当使用参比抗原结合分子，其包含与目标抗原结合分子相同的抗原结合结构域和作为人FcRn结合结构域的完整人IgGFc区。更优选使用完整人IgG1，目的在于针对其人FcRn结合活性或体内活性对参比完整人IgG与抗原结合分子进行比较。

[0709] 可按WO2011/122011的实施例6、8和13中所述，评价血浆总抗原浓度或抗原/抗体摩尔比率的降低。更具体地讲，当目的抗原结合分子不与小鼠对应抗原交叉反应时，使用人FcRn转基因小鼠品系32或品系276(Jackson Laboratories,Methods Mol Biol.2010;602:93-104)，可通过抗原-抗体共注射模型或稳态抗原输注模型对其进行评价。当抗原结合分子与小鼠对应物交叉反应时，仅仅将抗原结合分子注射给人FcRn转基因小鼠品系32或品系276(Jackson Laboratories)，便可对其进行评价。在共注射模型中，将抗原结合分子和抗原的混合物给予小鼠。在稳态抗原输注模型，将装有抗原溶液的输注泵植入小鼠中以实现恒定的血浆抗原浓度，然后给小鼠注射抗原结合分子。对于所有给予的试验抗原结合分子，使用相同的剂量。采用本领域技术人员已知方法，在适当的时间点测量血浆总抗原浓度、血浆游离抗原浓度和血浆抗原结合分子浓度。

[0710] 可在给予后2、4、7、14、28、56或84天测量血浆总抗原浓度或游离抗原浓度及抗原/抗原结合分子摩尔比率以评价本发明的长期作用。换句话说，在给予抗原结合分子后2、4、7、14、28、56或84 天，通过测量血浆总抗原浓度或游离抗原浓度和抗原/抗原结合分子摩尔比率来测定长期血浆抗原浓度，以评价本发明的抗原结合分子的性质。可通过评价任一个或多个上述时间点的降低来确定本发明所述抗原结合分子是否实现血浆抗原浓度或抗原/抗原结合分子摩尔比率的降低。

[0711] 可在给予后15分钟、1、2、4、8、12或24小时测量血浆总抗原浓度或游离抗原浓度和抗原/抗原结合分子摩尔比率，以评价本发明的短期作用。换句话说，通过在给予抗原结合分子后15分钟、1、2、4、8、12或24小时测量血浆总抗原浓度或游离抗原浓度和抗原/抗原结合分子摩尔比率，来测定短期血浆抗原浓度，以评价本发明的抗原结合分子的性质。

[0712] 更具体地讲，本发明描述的对消除血浆抗原的活性具有长期作用的抗原结合分子

在pH7.0和在25℃下具有人FcRn结合活性，其范围为完整人IgG1的28倍-440倍或KD的范围为3.0微摩尔-0.2微摩尔。优选KD的范围为700纳摩尔-0.2纳摩尔，更优选KD在范围为500纳摩尔-3.5纳摩尔，更优选范围为150纳摩尔-3.5纳摩尔。通过在给予抗原结合分子后2、4、7、14、28、56或84天，测量血浆总抗原浓度或游离抗原浓度和抗原/抗原结合分子摩尔比率来测定长期血浆抗原浓度，以评价本发明的抗原结合分子对消除血浆抗原的活性的长期作用。可通过评价任一个或多个上述时间点的降低来确定通过本发明所述抗原结合分子是否实现血浆抗原浓度或抗原/抗原结合分子摩尔比率的降低。

[0713] 再更具体地讲，本发明所述的对消除血浆抗原的活性具有短期作用的抗原结合分子在pH7.0下和在25℃下具有人FcRn结合活性，其是完整人IgG的440倍或KD强于0.2微摩尔，优选强于700纳摩尔，更优选强于500纳摩尔，最优选强于150纳摩尔。通过在给予抗原结合分子后15分钟、1、2、4、8、12或24小时，测量血浆总抗原浓度或游离抗原浓度和抗原/抗原结合分子摩尔比率，来测定短期血浆抗原 浓度，以评价本发明的抗原结合分子对消除血浆抗原的活性的短期作用。

[0714] 本发明的抗原结合分子的给药途径可选自皮内、静脉内、玻璃体内、皮下、腹膜内、胃肠外和肌内注射。

[0715] 在本发明的情况下，优选在人中的药代动力学的改进。当难以测定人的血浆滞留时，可根据小鼠(例如正常小鼠、表达人抗原的转基因小鼠、表达人FcRn的转基因小鼠)或猴(例如食蟹猴)中的血浆滞留，对其进行预测。

[0716] 在本文中，术语“降低在酸性pH范围内抗原结合分子的抗原结合活性至小于在中性pH范围内的抗原结合活性”意指与其在pH6.7-pH10.0下的抗原结合活性相比，抗原结合分子在pH4.0-pH6.5下的抗原结合活性减弱。优选上述表述意指与在pH7.0-pH8.0下的抗原结合活性相比，抗原结合分子在pH5.5-pH6.5下的抗原结合活性减弱，更优选意指与其在体内血浆pH下的抗原结合活性相比，其在早期内体pH下的抗原结合活性减弱。具体而言，与在pH7.4下抗原结合分子的抗原结合活性相比，在pH5.8-pH6.0下抗原结合分子的抗原结合活性减弱。

[0717] 在本文中，术语“降低在中性pH范围内抗原结合分子的抗原结合活性至小于在酸性pH范围内的抗原结合活性”意指与其在pH4.0-pH6.5下的抗原结合活性相比，抗原结合分子在pH6.7-pH10.0下的抗原结合活性减弱。优选上述表述意指与在pH5.5-pH6.5下的抗原结合活性相比，抗原结合分子在pH7.0-pH8.0下的抗原结合活性减弱，更优选意指与其在早期内体pH下的抗原结合活性相比，其在体内血浆pH下的抗原结合活性减弱。具体而言，与抗原结合分子在pH5.8-pH6.0下的抗原结合活性相比，抗原结合分子在pH7.4下的抗原结合活性减弱。

[0718] 同时，在本文中，表述“降低在酸性pH范围内抗原结合分子的抗原结合活性至小于在中性pH范围内的抗原结合活性”亦表述为“提高 在中性pH范围内抗原结合分子的抗原结合活性至大于在酸性pH范围内的抗原结合活性”。具体而言，在本发明中，可提高抗原结合分子的抗原结合活性在酸性和中性pH范围之间的比率。例如，在下述实施方案中，KD(pH5.8)/KD(pH7.4)的值增加。可通过例如降低其在酸性pH范围内的抗原结合活性、提高其在中性pH范围内的抗原结合活性或两者，来提高抗原结合分子的抗原结合活性在酸性和中性pH范围之间的比率。

[0719] 表述“降低在中性pH范围内抗原结合分子的抗原结合活性至小于在酸性pH范围内的抗原结合活性”亦表示为“提高在酸性pH范围内抗原结合分子的抗原结合活性至大于在中性pH范围内的抗原结合活性”。具体而言，在本发明中，可提高抗原结合分子的抗原结合活性在酸性和中性pH范围之间的比率。例如，在下述实施方案中，KD(pH7.4)/KD(pH5.8)的值增加。可通过例如降低其在中性pH范围内的抗原结合活性，提高其在酸性pH范围内的抗原结合活性或两者，来提高抗原结合分子的抗原结合活性在酸性和中性pH范围之间的比率。

[0720] 本文所用术语“降低在低钙离子浓度下的抗原结合活性(结合能力)至小于其在高钙离子浓度下的抗原结合活性”是指与在高钙离子浓度下抗原结合结构域对抗原的结合亲和力相比，降低在低钙离子浓度下所述抗原结合结构域对抗原的结合亲和力。低钙浓度优选为0.5-10微摩尔、更优选0.1-30微摩尔的离子化钙，高钙浓度为100微摩尔-10mM、更优选200微摩尔-5mM的离子化钙。

[0721] 在本文中，表述“与在中性pH范围内的抗原结合活性相比，在酸性pH范围内的抗原结合活性减弱”有时用“降低在酸性pH范围内的抗原结合活性至小于在中性pH范围内的抗原结合活性”代替。

[0722] 在本文中，在酸性pH范围内的人FcRn结合活性意指在pH4.0-pH6.5下的人FcRn结合活性，优选在pH5.5-pH6.5下的人FcRn结合活性，特别优选在pH5.8-pH6.0下的人FcRn结合活性，pH5.8-pH6.0 与体内早期内体pH相当。同时，本文中，在中性pH范围内的人FcRn结合活性意指在pH6.7-pH10.0下的人FcRn结合活性，优选在pH7.0-pH8.0下的人FcRn结合活性，特别优选在pH7.4下的人FcRn结合活性，pH7.4与体内血浆pH相当。

[0723] 虽然本发明的抗原结合分子和用途不限于任何特定理论，但由于促进抗原结合分子摄入细胞中并增加抗原从血浆中消除所致，因此，可如下解释降低(减弱)在酸性pH范围内抗原结合分子的抗原结合能力至小于在中性pH范围内的抗原结合能力和/或提高(增加)中性pH范围内的人FcRn结合活性与增加单个抗原结合分子可结合的抗原数目之间的关系。

[0724] 例如，如果抗原结合分子是与膜抗原结合的抗体，则给予机体的抗体与抗原结合，然后与抗原一起通过内化被摄入细胞的内体中，期间抗体与抗原保持结合。然后，抗体转移至溶酶体，期间抗体与抗原保持结合，抗体与抗原一起被溶酶体降解。内化介导的自血浆消除称为抗原依赖性消除，在众多抗体分子中已报道了这类消除(Drug Discov Today.2006年1月;11(1-2):81-8)。当IgG抗体的单个分子以二价方式与抗原结合时，单个抗体分子被内化，期间抗体与两个抗原分子保持结合，并在溶酶体中降解。因此，在典型抗体的情况下，一个IgG抗体分子无法与3个或更多个抗原分子结合。例如具有中和活性的单一IgG抗体分子不能中和3个或更多个抗原分子。

[0725] 血浆中IgG分子相对延长的滞留(缓慢消除)是由称为IgG分子的补救受体(salvage receptor)的人FcRn的功能所致。当通过胞饮作用被摄入内体时，IgG分子在内体的酸性条件下与内体中表达的人FcRn结合。虽然不与人FcRn结合的IgG分子转移到溶酶体中，在其中降解，但与人FcRn结合的IgG分子转移至细胞表面上，通过在血浆的中性条件下，自人FcRn上解离而再次返回到血浆。

[0726] 或者，当抗原结合分子是与可溶性抗原结合的抗体时，则给予机体的抗体与抗原结合，然后被摄入细胞中，期间抗体与抗原保持结合。被摄入细胞的许多抗体通过FcRn释

放到细胞外。然而，由于抗体释放到细胞外，且抗体与抗原保持结合，抗体不能再与抗原结合。因此，与结合膜抗原的抗体类似，在典型抗体的情况下，一个IgG抗体分子无法与3个或更多个抗原分子结合。

[0727] 在血浆的中性条件下与抗原强结合但在内体的酸性条件下从抗原上解离的pH依赖性抗原结合抗体(即在中性条件下结合但在酸性条件下解离的抗体)可在内体中从抗原上解离。当在抗原解离后通过FcRn再循环至血浆时，这类pH依赖性抗原结合抗体可再与抗原结合；因此，每个抗体可与许多抗原重复结合。此外，与抗原结合分子结合的抗原在内体中解离，不再循环至血浆中。这促进抗原结合分子介导的细胞对抗原的摄入。因此，给予抗原结合分子可促进抗原消除，因此降低血浆抗原浓度。

[0728] 钙浓度依赖性抗原结合抗体在血浆的高钙浓度条件下与抗原强结合且在内体的低钙浓度条件下从抗原上解离，可在内体中从抗原上解离。当在抗原解离后通过FcRn再循环至血浆时，钙浓度依赖性抗原结合抗体可再与抗原结合。因此，这种单个抗体可与多个抗原重复结合。同时，因为抗原在内体中解离，因此与抗原结合分子结合的抗原不再循环至血浆中，从而，抗原结合分子促进细胞对抗原的摄入。给予抗原结合分子促进抗原消除，这使得血浆抗原浓度降低。

[0729] 可通过使以pH依赖性方式(在中性条件下结合但在酸性条件下解离)与抗原结合的抗体在中性条件(pH7.4)下具有人FcRn结合活性，而进一步促进抗原结合分子介导的细胞对抗原的摄入。因此，给予抗原结合分子可促进抗原消除，因此降低血浆抗原浓度。通常，抗体和抗原-抗体复合体两者通过非特异性胞吞被摄入细胞中，然后通过在内体的酸性条件下与FcRn结合而转运至细胞表面。抗体和抗原-抗体复合体通过在细胞表面上的中性条件下自FcRn解离而再循环至血浆。因此，当在抗原结合中显示出充分pH依赖性(在中性条件下结合但在酸性条件下解离)的抗体与血浆中的抗原结合，然后在内体中自结合的抗 原上解离时，假定抗原消除速率等于抗原通过非特异性胞吞被摄入细胞的速率。另一方面，当pH依赖性不足时，在内体中不解离的抗原也再循环至血浆中。同时，当pH依赖性充分时，抗原消除中的决速步骤是通过非特异性胞吞摄入细胞。假设一些FcRn位于细胞表面，因为FcRn将抗体从内体转运至细胞表面。

[0730] 本发明人假定，IgG型免疫球蛋白，其是抗原结合分子之一，通常在中性pH范围内几乎没有FcRn结合能力，但在中性pH范围内显示出FcRn结合能力的那些可与细胞表面上的FcRn结合，因此通过与细胞表面FcRn结合以FcRn依赖性方式被摄入细胞中。FcRn介导的摄入细胞的速率比通过非特异性胞吞摄入细胞的速率更快。因此，可通过赋予在中性pH范围内的FcRn结合能力而进一步加快抗原消除的速率。具体而言，在中性pH范围内具有FcRn结合能力的抗原结合分子比典型的(完整人)IgG型免疫球蛋白更快地将抗原转运至细胞，然后抗原结合分子在内体中自抗原上解离。抗原结合分子再循环至细胞表面或血浆中，再与另一抗原结合，并通过FcRn摄入细胞。可通过改进在中性pH范围内的FcRn结合能力而进一步加快该循环的速率，从而加快抗原从血浆消除的速率。此外，可通过降低在酸性pH范围内抗原结合分子的抗原结合活性至小于中性pH范围内的结合活性进一步提高效率。此外，假定单个抗原结合分子可结合的抗原的数目随单个抗原结合分子所达到的循环次数的增加而增加。本发明的抗原结合分子包含抗原结合结构域和FcRn结合结构域。因为FcRn结合结构域不影响抗原结合，或鉴于上述机制，可预期不论抗原类型如何都促进抗原结合分子介

导的细胞对抗原的摄入，因此通过降低在酸性pH范围内抗原结合分子的抗原结合活性(结合能力)至小于在中性pH范围内的抗原结合活性和/或增加其在血浆pH下的FcRn结合活性来增加抗原消除速率。

[0731] 在所有上述用途中，除上述一个或多个位置上的取代以外，本发明的抗原结合分子还可包含EU256位上的取代。优选EU256位上的 氨基酸被谷氨酸取代。此外，除在选自EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436的一个或多个位置的取代以外，所有的上述应用方法还可包含EU256位上的取代，其中EU256位上的氨基酸优选被谷氨酸取代。

[0732] 在所有上述用途和方法的优选实施方案中，FcRn结合区是Fc区，更优选为人Fc区。

[0733] 此外，用于提高在中性或酸性pH下的FcRn结合活性的亲本FcRn结合结构域的氨基酸序列中的取代优选位于EU252和EU434位上和位于选自以下的一个或多个位置的位置上：EU238、EU250、EU254、EU255、EU256、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433和EU436。更优选取代位于3个或更多个位置，其中所述3个或更多个位置是表2和4-7提供的组合之一。甚至更优选取代是表3提供的组合之一。

[0734] 此外，上述应用方法还可包括在选自以下的一个或多个位置上引入氨基酸取代的步骤：EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438和EU440，从而降低所提高的对预存ADA的结合活性。优选取代是选自表11的组合。

[0735] 另外，上述应用方法还可包括在FcRn结合结构域中在选自以下的一个或多个位置上引入氨基酸取代的其它步骤：EU234、EU235、EU236、EU237、EU238、EU239、EU265、EU266、EU267、EU269、EU270、EU271、EU295、EU296、EU297、EU298、EU300、EU324、EU325、EU327、EU328、EU329、EU331和EU332(按照EU编号系统)。优选引入取代L235R/S239K。优选取代是选自表14的组合。

[0736] 所有上述用途和应用方法的抗原结合分子可包含pH依赖性抗原结合结构域或钙离子依赖性抗原结合结构域。通过降低在酸性pH范围内上述抗原结合分子的抗原结合活性(结合能力)至小于其在中性pH范围内的抗原结合活性，进一步促进由本发明的抗原结合分子介 导的细胞对抗原的摄入。还优选通过降低在低钙离子浓度下(即在0.5-10微摩尔下)本发明的抗原结合分子的抗原结合活性(结合能力)至小于其在高钙离子浓度(即100微摩尔-10mM)下的抗原结合活性，例如通过用离子化钙浓度依赖性抗原结合结构域置换抗原结合分子的抗原结合结构域，进一步促进细胞对抗原的摄入。或者，亲本抗原结合分子已包含离子化钙浓度依赖性抗原结合结构域。上文描述了用于通过改变上述抗原结合分子的抗原结合结构域中的至少一个氨基酸来降低在酸性pH范围内的抗原结合活性(结合能力)的方法。优选通过用组氨酸取代至少一个氨基酸或将至少一个组氨酸引入上述抗原结合分子的抗原结合结构域中改变来抗原结合结构域，这促进细胞对抗原的摄入。

[0737] 当这些修饰提高抗原结合分子对预存ADA(例如类风湿因子)的亲和力时，可降低在中性或酸性pH下FcRn结合活性提高的修饰的抗原结合分子的清除。这是指通过进一步修饰这类抗体从而降低对预存ADA的亲和力，与在第二修饰前并因此在对预存ADA的亲和力降低前的抗原结合分子相比，可增加循环数。

[0738] 与野生型Fc区相比、特别与在FcRn结合结构域中在选自EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438和EU440的一个或多个位置上包含氨基酸取代的那些相比，对预

存抗药抗体的亲和力在中性pH下不显著提高的本发明的这些抗原结合分子特别可用作用于治疗患有自身免疫病、移植排斥(移植物抗宿主病)、其它炎性疾病和变应性疾病的人患者的治疗性抗体。

[0739] 自身免疫病是当机体组织受其自身免疫系统攻击时发生的疾病。本文考虑的自身免疫病的实例包括系统性红斑狼疮、狼疮肾炎、类天疱疮、天疱疮、皮肌炎、自身免疫性肝炎、斯耶格伦综合征(Sjogren syndrome)、桥本甲状腺炎、类风湿性关节炎、青少年(1型)糖尿病、多肌炎、硬皮病、艾迪生病(Addison disease)、乳糜泄、格-巴综合征(Guillain-Barre syndrome)、扩张型心肌病、混合型结缔组织病、韦格 纳肉芽肿病(Wegener's granulomatosis)、抗磷脂抗体综合征、白癜风、恶性贫血、肾小球性肾炎和肺纤维化、重症肌无力、格雷夫斯病(Graves'disease)、特发性血小板减少性紫癜、溶血性贫血、糖尿病、炎性肠病、克罗恩病(Crohn's disease)、溃疡性结肠炎、多发性硬化、银屑病和药物诱发性自身免疫病,例如药物诱发性狼疮。优选自身免疫病是系统性红斑狼疮或狼疮肾炎。移植排斥包括移植物抗宿主病,是其中移植接受者的免疫系统攻击移植的器官或组织的过程。其它炎性疾病和变应性疾病包括动脉粥样硬化和枯草热。

[0740] 对预存ADA的结合亲和力提高会降低治疗性抗体的临床效用和功效。因此治疗性抗体的效用可受预存ADA的限制,因为这些ADA可影响其功效和药代动力学(例如降解速率)。有时这种结合会导致严重的副作用。此外,本发明提供用于降低包含Fc区(其在中性或酸性pH下对FcRn的结合活性提高且在中性pH下对预存ADA的结合活性提高)的抗原结合结构域在中性pH下对预存ADA的结合活性的方法。

[0741] 本发明还提供包含修饰的FcRn结合结构域的本发明的抗原结合分子用于降低在中性或酸性pH下对FcRn的亲和力提高且对预存ADA的结合活性提高的抗原结合分子在中性pH下对预存ADA的结合活性的用途。

[0742] 具体地讲,本发明提供用于降低在中性或酸性pH下对FcRn的结合活性提高的抗原结合分子的Fc区在中性pH下对预存ADA的结合活性的方法,所述方法包括

[0743] a)提供在中性或酸性pH下对FcRn的结合活性提高和在中性pH下对预存ADA的结合活性提高的Fc区,和

[0744] b)在选自以下的一个或多个位置取代氨基酸:EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438和EU440。

[0745] 步骤a)中的优选Fc区是人Fc区。优选在中性或酸性pH范围内对FcRn的结合活性提高且在中性pH范围内对预存ADA的结合活性 提高的Fc区包含在选自以下的一个或多个位置上的氨基酸取代:EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU256、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436。更优选其在选自表2和4-7的位置组合的任一个的位置上包含取代。甚至更优选其包含表3和17-20中的任一个提供的取代或取代组合的任一个。

[0746] 优选步骤b)包括在表8中的任一位置上取代氨基酸。更优选步骤b)包括引入选自表11的取代或组合之一。

[0747] 还优选抗原结合分子还包含pH依赖性抗原结合结构域或钙离子依赖性抗原结合结构域。

[0748] 此外,本发明提供用于降低包含在中性pH下对FcRn的结合活性提高的Fc区的抗原

结合分子对预存ADA的结合活性的方法，所述方法包括以下步骤：

[0749] a)提供包含在酸性pH下对FcRn的结合活性提高和在中性pH下对预存ADA的结合活性提高的Fc区的抗原结合分子，和

[0750] b)在Fc区中在选自以下的一个或多个位置上取代氨基酸：EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438和EU440。

[0751] 步骤a)中的优选Fc区是人Fc区。优选在中性pH范围内对FcRn的结合活性提高和在中性pH范围内对预存ADA的结合活性提高的Fc区包含在选自以下的一个或多个位置上的氨基酸的取代：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436。除上述一个或多个位置上的取代以外，还可在EU256位上包含取代，其中EU256位上的氨基酸优选被谷氨酸取代。更优选在选自表2和4-7的位置组合的任一个的位置上包含取代。甚至更优选包含选自表3和17-20任一个的取代或取代组合的任一个。

[0752] 优选步骤b)包括在表10中的任一位置上取代氨基酸。更优选位置选自a)EU387，b)EU422，c)EU424，d)EU438，e)EU440，f) EU422/EU424和g)EU438/EU440。甚至更优选步骤b)包括引入选自表11的取代或组合之一。

[0753] 此外，本发明提供用于降低包含在酸性pH下对FcRn的结合活性提高的Fc区的抗原结合分子对预存ADA的结合活性的方法，所述方法包括以下步骤：

[0754] a)提供包含在酸性pH下对FcRn的结合活性提高和在中性pH下对预存ADA的结合活性提高的Fc区的抗原结合分子，和

[0755] b)在Fc区中在选自以下的一个或多个位置上取代氨基酸：EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438和EU440。

[0756] 步骤a)中的优选Fc区是人Fc区。优选在酸性pH下对FcRn的结合活性提高和在中性pH范围内对预存ADA的结合活性提高的Fc区包含以下氨基酸取代：

[0757] i)在EU434位上，或

[0758] ii)在两个或更多个位置上，其中所述两个或更多个位置是选自以下的组合之一：a)EU252/EU254/EU256；b)EU428/EU434；和c)EU250/EU428。优选Fc区包含i)取代N434H；或ii)以下组合之一：a)M252Y/S254T/T256E；b)M428L/N434S；和c)T250Q和M428L(EU编号)。

[0759] 在优选的实施方案中，在步骤b)中，氨基酸在以下位置上被取代：a)EU424位，或b)EU438/EU440位。更优选取代为a)EU424N或b)组合EU438R/EU440E。

[0760] 在又一个优选的实施方案中，用于降低对预存ADA的结合活性的方法还包括步骤c)：证实与步骤a)所述的包含完整Fc结构域的原始抗原结合分子的结合活性相比，具有修饰的Fc结构域的所述抗原结合分子对内源ADA的结合活性降低。

[0761] 还优选抗原结合分子还包含pH依赖性抗原结合结构域或钙离子依赖性抗原结合结构域。

[0762] 本发明提供本发明的抗原结合分子用于增加从哺乳动物优选患 有自身免疫病的人患者的血液中消除抗原的用途。

[0763] 本发明还提供一种用于增加单个抗原结合分子可结合的抗原总数而与亲本抗体相比又不显著提高在中性pH下对预存ADA的结合活性的方法，所述方法包括以下步骤：

[0764] a)提供包含亲本FcRn结合结构域的抗原结合分子，

[0765] b)通过在选自以下的一个或多个位置上取代亲本FcRn结合结构域的氨基酸序列中的氨基酸来改变步骤a)的亲本FcRn结合结构域:EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU256、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436;和

[0766] c)通过在选自以下的一个或多个位置上取代亲本FcRn结合结构域的氨基酸序列中的氨基酸来改变步骤b)的修饰的FcRn结合结构域:EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438和EU440。

[0767] 本发明还提供用于促进以抗原结合的形式摄入细胞中的不含抗原的抗原结合分子在胞外释放而与亲本抗体相比又不显著提高所述抗原结合分子在中性pH下对预存ADA的结合活性的方法,所述方法包括以下步骤:

[0768] a)提供包含亲本FcRn结合结构域的抗原结合分子,

[0769] b)通过在选自以下的一个或多个位置上取代亲本FcRn结合结构域的氨基酸序列中的氨基酸来改变亲本FcRn结合结构域:EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU256、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436和EU428;和

[0770] c)通过在选自以下的一个或多个位置上取代亲本FcRn结合结构域的氨基酸序列中的氨基酸来改变步骤b)的修饰的FcRn结合结构域:EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438和EU440。

[0771] 本发明还提供一种用于提高抗原结合分子消除血浆抗原的能力而与亲本抗体相比又不显著提高在中性pH下对预存ADA的结合活性 的方法,所述方法包括以下步骤:

[0772] a)提供包含亲本FcRn结合结构域的抗原结合分子,

[0773] b)通过在选自以下的一个或多个位置上取代亲本FcRn结合结构域的氨基酸序列中的氨基酸来改变亲本FcRn结合结构域:EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU256、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436和EU428;和

[0774] c)通过在选自以下的一个或多个位置上取代亲本FcRn结合结构域的氨基酸序列中的氨基酸来改变步骤b)的修饰的FcRn结合结构域:EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438和EU440。

[0775] 本发明还提供一种用于改进抗原结合分子的药代动力学而与亲本抗体相比又不显著提高在中性pH下对预存ADA的结合活性的方法,所述方法包括以下步骤:

[0776] a)提供包含亲本FcRn结合结构域的抗原结合分子,

[0777] b)通过在选自以下的一个或多个位置上取代亲本FcRn结合结构域的氨基酸序列中的氨基酸来改变亲本FcRn结合结构域:EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU256、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436;和

[0778] c)通过在选自以下的一个或多个位置上取代亲本FcRn结合结构域的氨基酸序列中的氨基酸来改变步骤b)的修饰的FcRn结合结构域:EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438和EU440。

[0779] 本发明还提供用于降低血浆总抗原浓度或血浆游离抗原浓度而与亲本抗体相比又不显著提高在中性pH下对预存ADA的结合活性的方法,所述方法包括以下步骤:

[0780] a)提供包含亲本FcRn结合结构域的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含可结合所述抗原的抗原结合结构域,

[0781] b)通过在选自以下的一个或多个位置上取代亲本FcRn结合结构 域的氨基酸序列

中的氨基酸来改变亲本FcRn结合结构域:EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU256、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436;和

[0782] c)通过在选自以下的一个或多个位置上取代亲本FcRn结合结构域的氨基酸序列中的氨基酸来改变步骤b)的修饰的FcRn结合结构域:EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438和EU440。

[0783] 上述应用方法中步骤a)中的优选的Fc区是人Fc区。在优选的实施方案中,在步骤b)中的一个或多个位置的氨基酸取代是在选自以下的一个或多个位置上的取代:EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436,籍此步骤b)的Fc区在中性pH范围内对FcRn和预存ADA的结合活性提高。除上述一个或多个位置上的取代以外,还可在EU256位上包含取代,其中EU256位上的氨基酸优选被谷氨酸取代。更优选在选自表2和4-7的位置组合的任一个的位置上包含取代。甚至更优选包含选自表3和17-20任一个的取代或取代组合的任一个。

[0784] 优选步骤c)包括在表10中的任一位置上取代氨基酸。更优选位置选自:a)EU387、b)EU422、c)EU424、d)EU438、e)EU440、f)EU422/EU424和g)EU438/EU440。甚至更优选步骤c)包括引入选自表11的取代或组合之一。

[0785] 在另一个优选的实施方案中,在步骤b)中的一个或多个位置的氨基酸取代是以下取代:

[0786] i)在EU434位上,或

[0787] ii)在两个或更多个位置上,其中所述两个或更多个位置是选自以下的组合之一:a)EU252/EU254/EU256;b)EU428/EU434;和c)EU250/EU428,其中步骤b)的Fc区在酸性范围内的FcRn结合活性提高和在中性pH范围内对预存ADA的结合活性提高。优选Fc区包 含i)取代N434H;或ii)以下组合之一:a)M252Y/S254T/T256E;b)M428L/N434S;和c)T250Q和M428L(EU编号)。在优选的实施方案中,在步骤c)中,氨基酸在a)EU424位上或b)EU438/EU440位上被取代。更优选取代为a)EU424N或b)组合EU438R/EU440E。

[0788] 药物组合物

[0789] 本发明还涉及包括本发明抗原结合分子或由本发明的生产方法产生的抗原结合分子的药物组合物。与典型的抗原结合分子相比,本发明的抗原结合分子和由本发明的生产方法产生的抗原结合分子通过给药而具有降低血浆抗原浓度的较大活性,因此可用作药物组合物。本发明的药物组合物可包括药学上可接受的载体。在本发明中,药物组合物通常是指用于治疗或预防、或者检测和诊断疾病的药剂。

[0790] 本发明的药物组合物可通过本领域技术人员已知的方法配制。例如,它们可以胃肠外使用,呈包括水或其它药学上可接受的液体的无菌溶液剂或混悬剂的注射形式。例如,这类组合物可如下配制:通过与药学上可接受的载体或介质、尤其与无菌水、生理盐水、植物油、乳化剂、混悬剂、表面活性剂、稳定剂、矫味剂、赋形剂、溶媒、防腐剂、粘合剂等一起适当组合,以普遍公认的药物制造实践中所需要的单位剂量形式混合。在这类制剂中,可按常规容易地调节活性成分的量以得到预定范围的合适量。

[0791] 可按照标准配制实践,使用溶媒例如注射用蒸馏水,来配制用于注射的无菌组合物。注射用水溶液包括例如生理盐水和含有葡萄糖或其它佐剂(例如D-山梨糖醇、D-甘露糖、D-甘露醇和氯化钠)的等渗溶液。还可与以下合适的增溶剂联用,例如醇(乙醇等)、多元

醇(丙二醇、聚乙二醇等)、非离子型表面活性剂(聚山梨醇酯80(TM)、HCO-50等)。

[0792] 油包括芝麻油和大豆油。苯甲酸苄酯和/或苯甲醇可联用作为增溶剂。还可将缓冲剂(例如磷酸盐缓冲剂和乙酸钠缓冲剂)、缓和剂(例如盐酸普鲁卡因)、稳定剂(例如苯甲醇和苯酚)和/或抗氧化剂组合。将合适的安瓿装满所制备的注射剂。

[0793] 优选胃肠外给予本发明的药物组合物。例如,组合物可呈用于注射、经鼻给药、经肺给药或透皮给药的剂型。这类组合物可通过静脉内注射、肌内注射、腹膜内注射、皮下注射等全身给予或局部给予。

[0794] 可考虑患者的年龄和症状,适当地选择给药方法。对于每次给药,含有抗原结合分子的药物组合物的剂量可为例如0.0001-1,000mg/kg。或者,剂量可为例如0.001-100,000mg/患者。然而,本发明不受上述数值的限制。剂量和给药方法可根据患者的体重、年龄、症状等而变化。考虑到上述因素,本领域的技术人员可设定合适的剂量和给药方法。

[0795] 可对本发明的氨基酸序列所包含的氨基酸进行翻译后修饰。例如,通过焦谷氨酰化将N端谷氨酰胺修饰为焦谷氨酸是本领域技术人员所熟知的。无疑,这类翻译后修饰的氨基酸包括在本发明的氨基酸序列中。

[0796] 生产方法

[0797] 本发明提供用于产生本发明的抗原结合分子的方法。具体地讲,本发明提供用于产生具有与包含野生型Fc区的抗原结合分子相比在中性pH下对FcRn的结合活性提高的FcRn结合结构域的抗原结合分子的方法。

[0798] 本发明提供用于产生抗原结合分子的方法,所述方法包括以下步骤:

[0799] (a)选择亲本FcRn结合结构域,并在选自以下的一个或多个位置上用另一个氨基酸对氨基酸序列中的氨基酸进行取代来改变亲本FcRn:EU252、EU434、EU436、EU315、EU311、EU308、EU307、EU286、EU254、EU250、EU238、EU387、EU422、EU424、EU428、EU438和EU440;

[0800] (b)选择抗原结合分子的抗原结合结构域,并且改变抗原结合结构域中的至少一个氨基酸以得到pH依赖性抗原结合结构域或钙离子依赖性抗原结合结构域;

[0801] (c)获得编码其中将(a)和(b)中制备的人FcRn结合结构域和抗原结合结构域连接的抗原结合分子的基因;和

[0802] (d)使用(c)中制备的基因产生抗原结合分子。

[0803] 优选所选的抗原结合分子包含对抗原的结合活性在pH5.5-6.5下比在pH7-8下低或具有钙依赖性抗原结合活性的抗原结合结构域。优选步骤a)的FcRn结合结构域是本发明的FcRn结合结构域。更优选FcRn结合结构域在3个或更多个位置上包含氨基酸取代,其中所述3个或更多个位置是表2和4-7提供的组合之一。甚至更优选FcRn结合结构域包含3个或更多个取代,其中所述3个或更多个取代是表3、17-20提供的组合之一。

[0804] 步骤(a)可包括在选自以下的一个或多个位置上进行氨基酸取代:EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436,并选择在中性pH范围内的人FcRn结合活性强于KD3.2微摩尔的FcRn结合结构域。

[0805] 步骤(b)可包括选择抗原结合结构域,并且如上所述改变抗原结合结构域中的至少一个氨基酸以得到pH依赖性抗原结合结构域,或选择钙离子依赖性抗原结合结构域。改变氨基酸优选为用组氨酸取代至少一个氨基酸或插入至少一个组氨酸。同时,其中引入至少一个组氨酸突变的位点不受特别限制,因此它可在任何位置上引入,只要组氨酸突变降

低在酸性pH范围内的抗原结合活性至小于在中性pH范围内的抗原结合活性。可在单个位点或者两个或更多个位点引入这类组氨酸突变。可重复步骤a)和b)两次或更多次。重复步骤a)和b)的次数不受特别限制;然而,次数通常为10次或更少次。

[0806] 有效连接(a)和(b)中制备的FcRn结合结构域和抗原结合结构域的接头不限于任何形式。人FcRn结合结构域和抗原结合结构域可通过共价力或非共价力连接。具体地讲,接头可以是肽接头或化学接头或结合对,比如生物素和链霉抗生物素的组合。包括人FcRn结合结构 域和抗原结合结构域的多肽的修饰是本领域已知的。在另一个实施方案中,可通过在人FcRn结合结构域与抗原结合结构域之间形成融合蛋白,使本发明的人FcRn结合结构域与抗原结合结构域连接。为了构建人FcRn结合结构域与抗原结合结构域之间的融合蛋白,可操作性连接编码人FcRn结合结构域和抗原结合结构域的基因,使得形成符合读框的融合多肽。可适当地将包含由几个氨基酸组成的肽的接头插入人FcRn结合结构域与抗原结合结构域之间。各种柔性接头,比如其序列由$(GGGGS)_n$(SEQ ID NO:11)组成的接头是本领域已知的。

[0807] 本发明还提供用于产生抗原结合分子的方法,所述抗原结合分子包含与包含野生型Fc区的抗原结合分子相比,在中性或酸性pH下对FcRn的结合活性提高而在中性pH下对预存ADA的结合活性不显著提高的FcRn结合结构域。

[0808] 优选用于产生包含在中性或酸性pH下对FcRn的结合活性提高且在中性pH下对预存ADA的结合活性降低的Fc区的抗原结合分子的方法,包括以下步骤:

[0809] (a)提供在中性或酸性pH范围内对FcRn的结合活性提高且在中性pH范围内对预存ADA的结合活性提高的Fc区,

[0810] b)在Fc区的氨基酸序列中在选自以下的一个或多个位置上取代氨基酸:EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438和EU440。

[0811] (c)改变抗原结合分子的抗原结合结构域中的至少一个氨基酸,并且选择在中性pH范围内的抗原结合活性强于在酸性pH范围的抗原结合活性的抗原结合分子;

[0812] (d)获得编码其中将在(b)中制备的人FcRn结合结构域与在(c)中制备的抗原结合结构域连接的抗原结合分子的基因,和

[0813] (e)使用(d)中制备的基因产生抗原结合分子。

[0814] 步骤a)中的优选Fc区是人Fc区。优选在中性或酸性pH范围内对FcRn和预存ADA的结合活性提高及在中性pH范围内对预存ADA 的结合活性提高的Fc区包含在选自以下的一个或多个位置上的氨基酸的取代:EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436。更优选在选自表2和4-7的位置组合的任一个的位置上包含取代。甚至更优选包含表3和17-20任一个提供的取代或取代组合的任一个。优选步骤a)包括提供编码在中性或酸性pH范围内对FcRn和预存ADA的结合活性提高的Fc区的核苷酸序列。

[0815] 优选步骤b)中的取代是表10提供的一个或多个位置或位置组合的氨基酸取代。更优选步骤b)的取代是表11提供的取代组合之一。优选通过置换核苷酸序列中的一个或多个核苷酸,在步骤b)中取代选自以下的一个或多个位置上的氨基酸:EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438和EU440。

[0816] 步骤(b)和(c)可按任一顺序进行。此外,步骤c)可包括如上所述改变抗原结合结

构域中的至少一个氨基酸以得到pH依赖性抗原结合结构域，或选择钙离子依赖性抗原结合结构域。在步骤(c)中，改变氨基酸优选为用组氨酸取代至少一个氨基酸或插入至少一个组氨酸。同时，其中引入至少一个组氨酸突变的位点不受特别限制，因此可在任何位置上引入，只要组氨酸突变降低在酸性pH范围内的抗原结合活性至小于在中性pH范围内的抗原结合活性。可在单个位点或者两个或更多个位点引入这类组氨酸突变。步骤b)和c)可重复两次或更多次。重复步骤(b)和(c)的次数不受特别限制；然而，次数通常为10次或更少次。

[0817] 有效连接在(b)和(c)中制备的FcRn结合结构域与抗原结合结构域的接头不限于任何形式。人FcRn结合结构域和抗原结合结构域可通过共价力或非共价力连接。具体地讲，接头可以是肽接头或化学接头或结合对，比如生物素和链霉抗生物素的组合。包括人FcRn结合结构域和抗原结合结构域的多肽的修饰是本领域已知的。在另一个实施方案中，可通过在人FcRn结合结构域与抗原结合结构域之间形成融 合蛋白，使本发明的人FcRn结合结构域与抗原结合结构域连接。为了构建人FcRn结合结构域与抗原结合结构域之间的融合蛋白，可操作性连接编码人FcRn结合结构域和抗原结合结构域的基因，使得形成符合读框的融合多肽。可适当地将包含由几个氨基酸组成的肽的接头插入人FcRn结合结构域与抗原结合结构域之间。各种柔性接头，比如其序列由$(GGGGS)_n$(SEQ ID NO:11)组成的接头是本领域已知的。

[0818] 因此，本发明的生产方法还可包括改变上述氨基酸和取代或插入组氨酸的步骤。在本发明的生产方法中，可使用非天然氨基酸替代组氨酸。因此，本发明还可理解为用非天然氨基酸置换上述组氨酸。

[0819] 除上述一个或多个位置上的取代以外，本发明的生产方法的步骤a)还可包含EU256位上的取代，其中EU256位上的氨基酸优选被谷氨酸取代。

[0820] 此外，本发明的生产方法还可包括这样的步骤，其包括在Fc区的氨基酸序列中在选自以下一个或多个的位置上取代氨基酸：EU234、EU235、EU236、EU237、EU238、EU239、EU265、EU266、EU267、EU269、EU270、EU271、EU295、EU296、EU297、EU298、EU300、EU324、EU325、EU327、EU328、EU329、EU331和EU332(按照EU编号系统)。优选引入取代L235R/S239K。

[0821] 用于本发明的生产方法的亲本FcRn结合结构域和包含所述亲本FcRn结合结构域的抗原结合分子可通过任何方法制备。例如，可使用预存抗体、预存文库(噬菌体文库等)、自通过免疫动物获得的杂交瘤或自免疫动物的B细胞制备的抗体和文库、通过将随机氨基酸改变引入上述抗体和文库中所制备的抗体和文库、通过将组氨酸或非天然氨基酸突变引入上述抗体和文库中所制备的抗体和文库(具有高含量的组氨酸或非天然氨基酸的文库、在特定位点引入组氨酸或非天然氨基酸的文库等)，等等。

[0822] 抗原结合分子的抗原结合活性和人FcRn结合活性可通过本领域 技术人员已知方法测定。本领域技术人员可适当地确定pH以外的条件。

[0823] 在上述生产方法中，抗原和抗原结合分子可以任何状态彼此结合，人FcRn和抗原结合分子可以任何状态彼此结合。所述状态不受特别限制；例如，可使抗原或人FcRn与固定化抗原结合分子接触以结合抗原结合分子。或者，可使抗原结合分子与固定化抗原或人FcRn接触以结合抗原结合分子。或者，可使抗原结合分子与溶液中的抗原或人FcRn接触以结合抗原结合分子。

[0824] 通过上述方法产生的抗原结合分子可以是本发明的任何抗原结合分子；优选的抗

原结合分子包括例如具有这样的抗原结合结构域的那些抗原结合分子，所述抗原结合结构域是离子化钙浓度依赖性抗原结合结构域或用组氨酸取代氨基酸或插入至少一个组氨酸的抗原结合结构域，所述抗原结合分子还包含人FcRn结合结构域，所述人FcRn结合结构域在选自以下的一个或多个位置上包含氨基酸取代：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436(EU编号)。除上述一个或多个位置上的取代以外，本发明的抗原结合分子还可包含EU256位上的取代。优选EU256位上的氨基酸被谷氨酸取代。更优选FcRn结合结构域在3个或更多个位置上包含氨基酸取代，其中所述3个或更多个位置是表2和4-7提供的组合之一。甚至更优选FcRn结合结构域包含3个或更多个取代，其中所述3个或更多个取代是表3、17-20提供的组合之一。

[0825] 此外优选的抗原结合分子包括例如具有这样的抗原结合结构域的那些抗原结合分子，所述抗原结合结构域是离子化钙浓度依赖性抗原结合结构域或用组氨酸取代氨基酸或插入至少一个组氨酸的抗原结合结构域，并且所述抗原结合分子还包含在选自以下的一个或多个位置上具有氨基酸取代的人Fc区：EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438和EU440。更优选FcRn结合结构域在人FcRn 结合结构域中在3个或更多个位置上含有氨基酸取代，其中所述3个或更多个位置是表9和10提供的组合之一。

[0826] 更优选的抗原结合分子包括具有这样的抗原结合结构域的那些抗原结合分子，所述抗原结合结构域是离子化钙浓度依赖性抗原结合结构域或用组氨酸取代氨基酸或插入至少一个组氨酸的抗原结合结构域，且所述抗原结合分子还包含具有以下氨基酸取代的人Fc区：

[0827] a)在选自以下的一个或多个位置上：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU256、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434和EU436，和

[0828] b)在选自以下的一个或多个位置上：EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438和EU440(EU编号)。

[0829] 优选EU256位上的氨基酸被谷氨酸取代。

[0830] 更优选抗原结合分子包含表11-13提供的取代组合。

[0831] 具有所需活性的抗体可通过自由下述抗体文库或杂交瘤获得的多种抗体中筛选而选择出。

[0832] 当改变抗原结合分子中的氨基酸时，可能使用在改变之前的抗原结合分子的氨基酸序列的已知序列或通过本领域技术人员已知方法新鉴定出的抗原结合分子的氨基酸序列。例如，如果抗原结合分子是抗体，则它可获自抗体文库或通过克隆来自产生单克隆抗体的杂交瘤的抗体编码基因而获得。

[0833] 至于抗体文库，许多抗体文库是已知的，并且用于产生抗体文库的方法也是已知的；因此，本领域的技术人员可适当地获得抗体文库。例如，有关噬菌体文库，可参考文献例如Clackson等，Nature(1991)352:624-8；Marks等，J.Mol.Biol.(1991)222:581-97；Waterhouses等，Nucleic Acids Res.(1993)21:2265-6；Griffiths等，EMBOJ.(1994)13:324.0-60；Vaughan等，Nature Biotechnology(1996)14:309-14；以及日本专利Kohyo公布号(JP-A)H20-504970(对应于非日本国际公布的未审查日本国家阶段公布号)。此外，可能使用已知方法，例如使用真核 细胞作为文库的方法(WO95/15393)和核糖体展示方法。此外，使用人抗体文库通过淘选获得人抗体的技术也是已知的。例如，人抗体的可变区可使用

噬菌体展示方法，在噬菌体表面上表达为单链抗体(scFv)，并可选择与抗原结合的噬菌体。选出的噬菌体的遗传分析可测定编码与抗原结合的人抗体的可变区的DNA序列。一旦测出与抗原结合的scFv的DNA序列，可根据这些序列产生合适的表达载体得到人抗体。这些方法已众所周知，可参见WO92/01047、WO92/20791、WO93/06213、WO93/11236、WO93/19172、WO95/01438和WO95/15388。

[0834] 至于用于自杂交瘤获得编码抗体的基因的方法，基本上可采用已知技术，其包括使用所需抗原或表达所需抗原的细胞作为致敏性抗原，按照常规免疫方法使用这些进行免疫，通过常规细胞融合方法使所得免疫细胞与已知的亲本细胞融合，通过常规筛选方法筛选产生单克隆抗体的细胞(杂交瘤)，使用反转录酶由所得杂交瘤的mRNA合成抗体可变区(V区)的cDNA，并将其与编码所需抗体恒定区(C区)的DNA连接。

[0835] 更具体地讲，获得编码H链和L链的上述抗原结合分子基因的致敏性抗原可包括例如具有免疫原性的完全抗原和无免疫原性的不完全抗原(包括半抗原等)两者；然而它们不限于这些实例。例如，可能使用全蛋白质和目标蛋白质的部分肽。此外，已知包括多糖、核酸、脂质等在内的物质可以是抗原。因此，本发明的抗原结合分子的抗原不受特别限制。可通过本领域技术人员已知方法，例如通过基于杆状病毒的方法(例如WO98/46777)等制备抗原。可通过例如Milstein等人的方法(G.Kohler和C.Milstein,Methods Enzymol.(1981)73:3-46)等来产生杂交瘤。如果抗原的免疫原性低，则可在将抗原与具有免疫原性的大分子(例如白蛋白)连接后进行免疫。或者，如有必要，可通过将抗原与其它分子连接，将抗原转化成可溶性抗原。如果跨膜分子例如膜抗原(例如受体)用作抗原，则膜抗原胞外区的部分可用作片段，或者在其细胞表面上表达跨膜分子的细胞可用作免疫原。

[0836] 可使用上述合适的致敏性抗原，通过免疫动物，而获得产生抗原结合分子的细胞。或者，可通过体外免疫可产生抗原结合分子的淋巴细胞，来制备产生抗原结合分子的细胞。各种哺乳动物可用于免疫；这类常用的动物包括啮齿动物、兔类动物和灵长类动物。这类动物包括例如啮齿动物，例如小鼠、大鼠和仓鼠；兔类动物，例如兔；和灵长类动物，包括猴例如食蟹猴、猕猴、狒狒和黑猩猩。此外，携带人抗体基因库的转基因动物也是已知的，并且可使用这些动物获得人抗体(参见WO96/34096;Mendez等,Nat.Genet.(1997)15:146-56)。作为使用这类转基因动物的替代，例如，可通过用所需抗原或表达所需抗原的细胞对人淋巴细胞进行体外敏化，然后使敏化的淋巴细胞与人骨髓瘤细胞(例如U266)融合，来获得具有针对抗原的结合活性的所需人抗体(参见日本专利申请Kokoku公布号(JP-B)H01-59878(公布用于异议的已审查批准的日本专利申请))。此外，可通过用所需抗原免疫携带完全人抗体基因库的转基因动物，来获得所需的人抗体(参见WO93/12227、WO92/03918、WO94/02602、WO96/34096和WO96/33735)。

[0837] 对动物进行免疫可如下进行：将致敏性抗原适当稀释和悬浮于磷酸缓冲盐水(PBS)、生理盐水等中，如有必要，将其与佐剂混合以乳化。然后将其腹膜内或皮下注射给动物。然后，优选每4-21天给予数次与弗氏不完全佐剂混合的致敏性抗原。可采用常规方法，通过测量动物血清中目标抗体的效价，来证实抗体产生。

[0838] 可使用常规融合剂(例如聚乙二醇)，使获自用所需抗原免疫的淋巴细胞或动物的产生抗原结合分子的细胞与骨髓瘤细胞融合以产生杂交瘤(Goding,Monoclonal Antibodies:Principles and Practice,Academic Press,(1986)59-103)。必要时，可培养

杂交瘤细胞并使之生长，并可采用已知分析方法，例如免疫沉淀法、放射免疫测定法(RIA)和酶联免疫吸附测定法(ELISA)，来测量自这些杂交瘤产生的抗原结合分子的结合特异性。此后，如有必要，可通过例如有限稀释等方法，亚克隆产生目标抗原结合分子(已测定其特异性、亲和力或活性)的杂交瘤。

[0839] 接下来，可使用可与抗原结合分子特异性结合的探针(例如与编码抗体恒定区的序列互补的寡核苷酸)，自杂交瘤或产生抗原结合分子的细胞(敏化淋巴细胞等)克隆编码所选抗原结合分子的基因。还可采用RT-PCR自mRNA克隆该基因。将免疫球蛋白分成5个不同的类别，IgA、IgD、IgE、IgG和IgM。将这些类别进一步分成几个亚类(同种型)(例如IgG-1、IgG-2、IgG-3和IgG-4；IgA-1和IgA-2等)。用于本发明产生抗原结合分子的H链和L链不受特别限制，并且可源自属于任何这些类别或亚类的抗体；然而，IgG是特别优选的。

[0840] 在本文中，可采用遗传工程技术改变H链编码基因和L链编码基因。对于抗体例如小鼠抗体、大鼠抗体、兔抗体、仓鼠抗体、绵羊抗体和骆驼抗体，可适当地产生遗传上经改变的抗体，例如嵌合抗体和人源化抗体，其为了降低针对人的异源免疫原性等目的而经人工改变。嵌合抗体是包括非人哺乳动物抗体(例如小鼠抗体)的H链和L链可变区及人抗体的H链和L链恒定区的抗体。可通过将编码小鼠抗体可变区的DNA与编码人抗体恒定区的DNA连接，将其插入表达载体，并将该载体导入产生抗体的宿主中，来获得嵌合抗体。可使用产生使得它们在设计成连接非人哺乳动物(例如小鼠)的抗体互补决定区(CDR)的DNA序列末端具有重叠部分的若干个寡核苷酸，通过PCR合成人源化抗体，其亦称重构人抗体。所得DNA可与编码人抗体恒定区的DNA连接。可将连接的DNA插入表达载体，并可将该载体导入宿主以产生抗体(参见EP239400和WO96/02576)。当CDR形成有利的抗原结合部位时，选择通过CDR连接的人抗体FR。如有必要，可置换抗体可变区构架区中的氨基酸，使得重构人抗体的CDR形成合适的抗原结合部位(K.Sato等，Cancer Res.(1993)53:10.01-10.06)。

[0841] 除上述人源化以外，可改变抗体以改进其生物学性质，例如与抗原的结合。在本发明中，可通过例如位点定向诱变(参见例如Kunkel (1910.0)Proc.Natl.Acad.Sci.USA82:488)、PCR诱变和盒式诱变等方法，来实现这类改变。总的说来，当与原始抗体可变区的氨基酸序列相比时，其生物学性质已改进的突变型抗体显示氨基酸序列同源性和/或相似性为70％或更高，更优选80％或更高，甚至更优选90％或更高(例如95％或更高、97％、98％或99％)。在本文中，序列同源性和/或相似性定义为通过序列比对和空位引入(如有必要)使序列同源性值最大化后，与原始抗体残基同源(相同残基)或相似(根据氨基酸侧链的总体性质归在同一组的氨基酸残基)的氨基酸残基的比率。总的说来，如下根据其侧链的性质，将天然氨基酸残基归类为以下组别：

[0842] (1)疏水性：丙氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸和亮氨酸；

[0843] (2)中性亲水性：天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、苏氨酸和丝氨酸；

[0844] (3)酸性：天冬氨酸和谷氨酸；

[0845] (4)碱性：精氨酸、组氨酸和赖氨酸；

[0846] (5)影响链的取向的残基：甘氨酸和脯氨酸；和

[0847] (6)芳族：酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸。

[0848] 此外，本发明提供编码本发明的FcRn结合结构域和本发明的抗原结合分子的基因。编码本发明的抗原结合分子的基因可以是任何基因，并可以是DNA、RNA、核酸类似物等。

[0849] 此外，本发明还提供携带上述基因的宿主细胞。宿主细胞不受特别限制，包括例如大肠杆菌(E.coli)和各种动物细胞。可使用宿主细胞，例如作为产生和表达本发明的抗体的生产系统。体外和体内生产系统可用于多肽生产系统。这类体外生产系统包括例如使用真核细胞或原核细胞的生产系统。

[0850] 可用作宿主细胞的真核细胞包括例如动物细胞、植物细胞和真菌细胞。动物细胞包括：哺乳动物细胞，例如CHO(中国仓鼠卵巢细胞系)、COS(猴肾细胞系)、骨髓瘤(Sp2/0、NS0等)、BHK(幼仓鼠肾细胞系)Hela、Vero、HEK293(具有剪切的腺病毒的人胚肾细胞系(Ad)5 DNA)、PER.C6细胞(用腺病毒5型(Ad5)E1A和E1B基因转化的人胚视网膜细胞系)293等(参见Current Protocols in Protein Science(2001年5月，单元5.9，表5.9.1))；两栖动物细胞例如非洲爪蟾(Xenopus laevis)卵母细胞(Valle等，Nature(1981)291:338-340)；和昆虫细胞例如Sf9、Sf21和Tn5。优选使用CHO-DG44、CHO-DX11B、COS7细胞、HEK293细胞和BHK细胞来表达本发明的抗体。动物细胞中，CHO细胞对于大规模表达是特别优选的。可通过例如磷酸钙方法、DEAE-葡聚糖方法、使用阳离子脂质体DOTAP(Boehringer-Mannheim)的方法、电穿孔方法和脂转染方法，将载体导入宿主细胞中。

[0851] 至于植物细胞，例如，烟草(Nicotiana tabacum)来源的细胞和浮萍(Lemna minor)是已知的蛋白质生产系统。可由这些细胞培养愈伤组织以产生本发明的抗原结合分子。至于真菌细胞，已知的蛋白质表达系统是使用酵母细胞的系统，例如酵母属(Saccharomyces)(例如酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)和裂殖酵母(Saccharomyces pombe))的细胞；和丝状真菌例如曲霉属(Aspergillus)(例如黑曲霉)的细胞。这些细胞可用作宿主以产生本发明的抗原结合分子。

[0852] 细菌细胞可用于原核生产系统。至于细菌细胞，除使用上述大肠杆菌的生产系统以外，已知使用枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)的生产系统。这类系统可用于生产本发明的抗原结合分子。

[0853] 通过本发明的生产方法获得的基因通常由合适的载体携带(插入合适的载体)，然后导入宿主细胞中。所述载体不受特别限制，只要它们稳定地保留插入的核酸。例如，当大肠杆菌用作宿主时，优选的克隆载体包括pBluescript载体(Stratagene)；然而，可使用各种市售可获得的载体。当使用载体产生本发明的抗原结合分子时，表达载体特别有用。表达载体不受特别限制，只要载体在体外、在大肠杆菌中、在培养细胞中或在生物体内表达抗原结合分子。例如，pBEST载体(Promega)优选用于体外表达；pET载体(Invitrogen)优选用于大肠杆菌；pME18S-FL3载体(GenBank登录号AB009864)优选用于培养细胞； pME18S载体(Mol Cell Biol.(1988)8:466-472)优选用于生物体内。另外，EBNA1蛋白质可共表达以增加目标基因的拷贝数。在这种情况下，使用包括OriP作为复制起始位点的载体(Biotechnol Bioeng.2001年10月20;75(2):197-203，Biotechnol Bioeng.2005年9月20;91(6):670-7)。可通过常规方法，例如通过使用限制性内切酶位点连接，将本发明的DNA插入载体(Current protocols in Molecular Biology，主编Ausubel等(1987)，Publish.John Wiley&Sons，第11.4-11.11节)。

[0854] 上述宿主细胞不受特别限制，可根据目的使用各种宿主细胞。用于表达抗原结合分子的细胞的实例包括细菌细胞(例如链球菌属(Streptococcus)、葡萄球菌属(Staphylococcus)、大肠杆菌、链霉菌属(Streptomyces)和枯草芽孢杆菌的细胞)、真核细

胞(例如酵母和曲霉属(Aspergillus)的细胞)、昆虫细胞(例如果蝇S2和SpodopteraSF9)、动物细胞(例如CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293和Bowes黑素瘤细胞)和植物细胞。可通过已知方法,例如磷酸钙沉淀方法、电穿孔方法(Current protocols in Molecular Biology主编Ausubel等(1987),Publish.John Wiley&Sons,第9.1-9.9节)、脂转染方法和显微注射方法,将载体导入宿主细胞中。

[0855] 宿主细胞可通过已知方法培养。例如,当使用动物细胞作为宿主时,可使用DMEM、MEM、RPMI1640或IMDM为培养基。它们可与血清补充物例如FBS或胎牛血清(FCS)一起使用。可在无血清培养物中培养细胞。在培养过程中,优选的pH为约6-8。孵育通常在30-40℃下进行达约15-200小时。必需时,更换培养基、充气或搅拌。

[0856] 可将合适的分泌信号掺入目标多肽,使得在宿主细胞表达的抗原结合分子分泌到内质网腔、周质间隙或胞外环境中。这些信号对于目标抗原结合分子可为内源的,或可为异源信号。

[0857] 另一方面,例如,使用动物或植物的生产系统可用作体内产生多肽的系统。将目标多核苷酸引入动物或植物中,在动物或植物体内产生多肽,然后收集。本发明的"宿主"包括这类动物和植物。

[0858] 使用动物的生产系统包括使用哺乳动物或昆虫的系统。可使用哺乳动物,例如山羊、猪、绵羊、小鼠和牛(Vicki Glaser SPECTRUM Biotechnology Applications(1993))。哺乳动物可以是转基因动物。

[0859] 例如,制备编码本发明的抗原结合分子的多核苷酸,作为与编码特别产生于乳中的多肽(例如山羊β-酪蛋白)的基因的融合基因。接下来,用含有融合基因的多核苷酸片段注射山羊胚胎,然后植入雌性山羊。所需的抗原结合分子可自转基因山羊(其出生自接收所述胚胎的山羊)或其后代产生的乳中获得。适当时,可给予激素以提高由转基因山羊产生的含抗原结合分子的乳量(Ebert等,Bio/Technology(1994)12:699-702)。

[0860] 可使用昆虫(例如蚕)来产生本发明的抗原结合分子。当使用蚕时,可使用携带编码目标抗原结合分子的多核苷酸的杆状病毒感染蚕,并从其体液中获得目标抗原结合分子。

[0861] 此外,例如,当使用植物产生本发明的抗原结合分子时,可使用烟草。当使用烟草时,将编码目标抗原结合分子的多核苷酸插入植物表达载体,例如pMON530,然后将载体引入细菌,例如根癌土壤杆菌(Agrobacterium tumefaciens)。然后使细菌感染烟草例如烟草(Nicotiana tabacum),可从其叶中收集所需抗原结合分子(Ma等,Eur.J.Immunol.(1994)24:131-138)。或者,可用类似细菌感染浮萍(Lemna minor)。克隆后,可从浮萍细胞获得所需的抗原结合分子(Cox KM等,Nat.Biotechnol.2006年12月;24(12):1591-1597)。

[0862] 可从宿主细胞内外(例如培养基和乳)分离由此获得的抗原结合分子,并纯化成基本纯的和均质的抗原结合分子。用于分离和纯化抗原结合分子的方法不受特别限制,可采用常用于多肽纯化的分离和纯化方法。可通过适当地选择和组合,例如层析柱、过滤、超滤、盐析、溶剂沉淀、溶剂萃取、蒸馏、免疫沉淀、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电聚焦、透析和重结晶,来分离和纯化抗原结合分子。

[0863] 层析技术的实例包括但不限于亲和层析法、离子交换层析法、疏 水层析法、凝胶过滤、反向层析法和吸附层析法(Strategies for Protein Purification and

Characterization:A Laboratory Course Manual.主编Daniel R.Marshak等(1996)Cold Spring Harbor Laboratory Press)。这类层析方法可采用液相层析法例如HPLC和FPLC进行。用于亲和层析法的柱包括A蛋白柱和G蛋白柱。使用A蛋白的柱包括例如Hyper D、POROS和SepharoseF.F.(Pharmacia)。

[0864] 如有需要,可任意修饰抗原结合分子,并且可通过在抗原结合分子纯化前或纯化后让合适的蛋白质修饰酶起作用,使肽部分缺失。这类蛋白质修饰酶包括例如胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、赖氨酰内肽酶、蛋白质激酶和葡糖苷酶。

实施例

[0865] 虽然在本文中参照其具体的实施方案详细地描述了本发明,但要了解,上述描述的性质是示例性和说明性的,旨在说明本发明及其优选的实施方案。通过例行实验,本领域的技术人员应容易识别可在不偏离本发明的精神和范围、随附权利要求书限定的界限的情况下在其中进行各种变化和修改。

[0866] [实施例1]新的中性pHFcRn结合亲和力改进的Fc变体的构建

[0867] 对与FcRn相互作用的抗原结合分子(抗体)的Fc区(Nat Rev Immunol.2007年9月;7(9):715-25)进行改造以使得在中性pH下与FcRn的结合亲和力得到改进以提高抗原从血浆中消除。图1A显示了与常规抗体相比通过在中性pH下与FcRn的结合亲和力改进的pH依赖性抗原结合抗体从血浆中消除抗原的机制。

[0868] WO2011/122011的实施例1-17公开了改进在中性pH下对FcRn的结合亲和力的突变(氨基酸取代),并且描述了产生重点在于改进在中性pH下抗体对FcRn的结合亲和力的Fc变体F1-F599(表16)。然而,对于包含这类Fc变体的抗体的药物开发,不仅仅应考虑其药理学性质(即改进的FcRn结合),而且还应考虑稳定性、纯度和免疫原性。显示稳定性和纯度差的抗体不适于用作药物,且免疫原性差可能妨碍 其临床开发。

[0869] 1-1.在中性pH下对hFcRn的结合亲和力改进的Fc变体的设计和产生

[0870] 设计了在中性pH下对hFcRn的结合亲和力得到改进同时保持高稳定性、高纯度和低免疫原性风险的各种Fc变体。表16显示了对于各种Fc变体引入野生型IgG1的Fc区中的突变(氨基酸取代)(IgG1-F1-F1434)。通过WO2011/122011的参比实施例1中描述的本领域技术人员已知的方法,将氨基酸取代引入VH3-IgG1(SEQ ID NO:1)以产生Fc变体。

[0871] [表16]

[0872] Fc变体

[0873]

变体名称	hFcRn KD (M)	Tm (℃)	HMW (%)	免疫原性评分	突变
IgG	8.8E-5	nd	nd	nd	无
M73	1.4E-05	nd	nd	nd	**(参见 WO209/125825)**
F1	8.1E-07	67.6	12.64	91	N434W
F2	3.2E-06	64.7	2.96	39	M252Y / S254T/T256E
F3	2.5E-06	68.5	1.43	112	N434Y
F4	5.8E-06	68.5	0.58	38	N434S
F5	6.8E-06	69.2	0.29	16	N434A
F7	5.6E-06	65.5	0.60	131	M252Y
F8	4.2E-06	64.3	0.97	84	M252W
F9	1.4E-07	62.6	0.72	152	M252Y/S254T / T256E / N434Y
F10	6.9E-08	61.7	0.94	130	M252Y / S254T / T256E / N434W
F11	3.1E-07	64.6	0.73	243	M252Y / N434Y
F12	1.7E-07	63.8	10.11	222	M252Y / N434W
F13	3.2E-07	63.7	1.21	196	M252W / N434Y
F14	1.8E-07	62.9	17.73	175	M252W / N434W
F19	4.6E-07	63.8	2.88	228	P257L / N434Y
F20	4.6E-07	54.8	1.96	327	V308F / N434Y
F21	3.0E-08	56.6	0.81	424	M252Y / V308P / N434Y
F22	2.0E-06	69.8	1.26	116	M428L / N434S
F25	9.2E-09	54.9	9.95	311	M252Y / S254T / T256E / V308P / N434W
F26	1.0E-06	68.4	0.31	2	I332V
F27	7.4E-06	69.6	0.85	113	G237M
F29	1.4E-06	67.1	0.79	114	I332V / N434Y
F31	2.8E-06	56.3	0.97	328	G237M / V308F
F32	8.0E-07	67.7	11.90	122	S254T / N434W
F33	2.3E-06	68.4	0.49	144	S254T / N434Y
F34	2.8E-07	64.6	10.22	93	T256E / N434W
F35	8.4E-07	66.1	1.15	115	T256E / N434Y
F36	3.6E-07	64.9	14.88	118	S254T / T256E / N434W

	F37	1.1E-06	65.6	0.68	140	S254T / T256E / N434Y
	F38	1.0E-07	64.1	11.74	193	M252Y / S254T / N434W
	F39	3.0E-07	64.8	0.84	214	M252Y / S254T / N434Y
	F40	8.2E-08	61.4	11.54	130	M252Y / T256E / N434W
	F41	1.5E-07	61.7	0.77	152	M252Y / T256E / N434Y
	F42	1.0E-06	63.2	0.81	56	M252Y / S254T / T256E / N434A
	F43	1.7E-06	64.3	0.63	147	M252Y / N434A
	F44	1.1E-06	64.5	1.81	100	M252W / N434A
	F47	2.4E-07	62.4	7.75	153	M252Y / T256Q / N434W
	F48	3.2E-07	64.2	0.82	175	M252Y / T256Q / N434Y
	F49	5.1E-07	61.2	16.63	173	M252F / T256D / N434W
	F50	1.2E-06	63.7	1.20	195	M252F / T256D / N434Y
	F51	8.1E-06	69.1	2.64	68	N434F / Y436H
	F52	3.1E-06	69.7	1.07	68	H433K / N434F / Y436H
	F53	1.0E-06	66.5	8.01	92	I332V / N434W
	F54	8.4E-08	64.2	8.27	271	V308P / N434W
[0874]	F56	9.4E-07	66.7	1.22	169	I332V / M428L / N434Y
	F57	1.1E-05	70.4	1.76	0	G385D / Q386P / N389S
	F58	7.7E-07	67.9	6.43	91	G385D / Q386P / N389S / N434W
	F59	2.4E-06	68.7	2.12	112	G385D / Q386P / N389S / N434Y
	F60	1.1E-05	69	2.17	14	G385H
	F61	9.7E-07	67.6	10.94	104	G385H / N434W
	F62	1.9E-06	68.5	0.98	126	G385H / N434Y
	F63	2.5E-06	68.5	1.18	95	N434F
	F64	5.3E-06	69	0.78	24	N434H
	F65	2.9E-07	62.9	4.38	135	M252Y / S254T / T256E / N434F
	F66	4.3E-07	63.3	2.96	63	M252Y / S254T / T256E / N434H
	F67	6.3E-07	63.1	1.08	227	M252Y / N434F
	F68	9.3E-07	63.6	0.89	155	M252Y / N434H
	F69	5.1E-07	67.9	7.45	167	M428L / N434W
	F70	1.5E-06	69	1.82	167	M428L / N434Y
	F71	8.3E-08	59.7	1.49	207	M252Y / S254T / T256E / M428L / N434W

[0875]

F72	2.0E-07	62.6	2.46	207	M252Y / S254T / T256E / M428L / N434Y
F73	1.7E-07	63.4	1.86	298	M252Y / M428L / N434W
F74	4.6E-07	64.6	1.52	298	M252Y / M428L / N434Y
F75	1.4E-06	62.6	0.98	226	M252Y / M428L / N434A
F76	1.0E-06	62.4	1.08	134	M252Y / S254T / T256E / M428L / N434A
F77	9.9E-07	66.7	1.62	170	T256E / M428L / N434Y
F78	7.8E-07	67.9	10.76	199	S254T / M428L / N434W
F79	5.9E-06	67.7	0.96	44	S254T / T256E / N434A
F80	2.7E-06	63.8	0.86	79	M252Y / T256Q / N434A
F81	1.6E-06	63.3	1.85	56	M252Y / T256E / N434A
F82	1.1E-06	67.4	10.30	120	T256Q / N434W
F83	2.6E-06	65.4	1.37	142	T256Q / N434Y
F84	2.8E-07	62.5	13.96	139	M252W / T256Q / N434W
F85	5.5E-07	59.9	1.61	161	M252W / T256Q / N434Y
F86	1.5E-06	67.6	10.35	118	S254T / T256Q / N434W
F87	4.3E-06	68.6	1.36	139	S254T / T256Q / N434Y
F88	1.9E-07	63.5	10.67	128	M252Y / S254T / T256Q / N434W
F89	3.6E-07	64	1.38	149	M252Y / S254T / T256Q / N434Y
F90	1.9E-08	64	10.23	311	M252Y / T256E / V308P / N434W
F91	4.8E-08	53.7	1.63	479	M252Y / V308P / M428L / N434Y
F92	1.1E-08	56.2	11.80	388	M252Y / S254T / T256E / V308P / M428L / N434W
F93	7.4E-07	62.2	12.74	252	M252W / M428L / N434W
F94	3.7E-07	63.4	11.86	283	P257L / M428L / N434Y
F95	2.6E-07	53.2	1.36	212	M252Y / S254T / T256E / M428L / N434F
F99	6.2E-07	62.9	1.27	63	M252Y / T256E / N434H
F101	1.1E-07	60.7	4.54	179	M252W / T256Q / P257L / N434Y
F103	4.4E-08	48.3	1.21	541	P238A / M252Y / V308P / N434Y
F104	3.7E-08	48.6	1.03	424	M252Y / D265A / V308P / N434Y
F105	7.5E-08	55.1	1.06	441	M252Y / T307A / V308P / N434Y
F106	3.7E-08	53.9	1.31	415	M252Y / V303A / V308P / N434Y

[0876]

F107	3.4E-08	53.2	1.85	562	M252Y / V308P / D376A / N434Y
F108	4.1E-08	53	0.98	414	M252Y / V305A / V308P / N434Y
F109	3.2E-08	56.8	1.13	454	M252Y / V308P / Q311A / N434Y
F111	3.2E-08	56.3	1.36	446	M252Y / V308P / K317A / N434Y
F112	6.4E-08	48.4	2.11	510	M252Y / V308P / E380A / N434Y
F113	3.2E-08	54.6	0.71	466	M252Y / V308P / E382A / N434Y
F114	3.8E-08	57.1	0.97	467	M252Y / V308P / S424A / N434Y
F115	6.6E-06	70	0.53	228	T307A / N434A
F116	8.7E-06	64.2	0.91	102	E380A / N434A
F118	1.4E-05	71.2	0.96	77	M428L
F119	5.4E-06	65.3	1.23	112	T250Q / M428L
F120	6.3E-08	54.2	3.54	464	P257L / V308P / M428L / N434Y
F121	1.5E-08	49.2	2.37	388	M252Y / T256E / V308P / M428L / N434W
F122	1.2E-07	61.4	1.71	207	M252Y / T256E / M428L / N434W
F123	3.0E-08	49.3	1.79	332	M252Y / T256E / V308P / N434Y
F124	2.9E-07	62.7	1.49	207	M252Y / T256E / M428L / N434Y
F125	2.4E-08	49.1	1.35	388	M252Y / S254T / T256E / V308P / M428L / N434Y
F128	1.7E-07	63.8	7.11	283	P257L / M428L / N434W
F129	2.2E-07	64.8	3.28	244	P257A / M428L / N434Y
F131	3.0E-06	61.6	7.07	229	P257G / M428L / N434Y
F132	2.1E-07	61.3	8.23	288	P257I / M428L / N434Y
F133	4.1E-07	62.7	6.78	254	P257M / M428L / N434Y
F134	2.7E-07	57.6	8.30	268	P257N / M428L / N434Y
F135	7.5E-07	63.3	8.81	251	P257S / M428L / N434Y
F136	3.8E-07	62	10.86	251	P257T / M428L / N434Y
F137	4.6E-07	65	13.28	283	P257V / M428L / N434Y
F139	1.5E-08	55	5.08	356	M252W / V308P / N434W
F140	3.6E-08	62.4	3.51	483	S239K / M252Y / V308P / N434Y
F141	3.5E-08	60.2	8.80	438	M252Y / S298G / V308P / N434Y
F142	3.7E-08	60.8	1.35	454	M252Y / D270F / V308P / N434Y
F143	2.0E-07	61.1	6.55	444	M252Y / V308A / N434Y
F145	5.3E-08	48	17.47	458	M252Y / V308F / N434Y

[0877]

F147	2.4E-07	65.4	7.78	419	M252Y / V308I / N434Y
F149	1.9E-07	58.9	1.49	430	M252Y / V308L / N434Y
F150	2.0E-07	56.3	1.64	447	M252Y / V308M / N434Y
F154	1.8E-07	59.3	1.05	436	M252Y / V308T / N434Y
F157	1.5E-07	53.3	1.24	425	P257A / V308P / M428L / N434Y
F158	5.9E-08	45.7	6.38	431	P257T / V308P / M428L / N434Y
F159	4.4E-08	53.3	9.24	464	P257V / V308P / M428L / N434Y
F160	8.5E-07	63	1.96	240	M252W / M428I / N434Y
F162	1.6E-07	66.9	1.11	216	M252W / M428Y / N434Y
F163	4.2E-07	66.8	1.22	208	M252W / M428F / N434Y
F164	3.7E-07	57.6	1.50	313	P238A / M252W / N434Y
F165	2.9E-07	58.1	1.53	196	M252W / D265A / N434Y
F166	1.5E-07	64.6	1.37	342	M252W / T307Q / N434Y
F167	2.9E-07	60.7	2.02	429	M252W / V303A / N434Y
F168	3.2E-07	59.8	2.33	335	M252W / D376A / N434Y
F169	2.9E-07	61.5	1.18	377	M252W / V305A / N434Y
F170	1.7E-07	63.3	1.46	335	M252W / Q311A / N434Y
F171	1.9E-07	55.3	1.58	249	M252W / D312A / N434Y
F172	2.2E-07	62.7	1.18	218	M252W / K317A / N434Y
F173	7.7E-07	58.1	1.40	283	M252W / E380A / N434Y
F174	3.4E-07	61.9	5.58	238	M252W / E382A / N434Y
F175	2.7E-07	63.6	0.88	239	M252W / S424A / N434Y
F176	2.9E-07	68.8	0.98	255	S239K / M252W / N434Y
F177	2.8E-07	66.7	5.20	210	M252W / S298G / N434Y
F178	2.7E-07	67.1	2.39	226	M252W / D270F / N434Y
F179	3.1E-07	66.8	1.32	286	M252W / N325G / N434Y
F182	6.6E-08	62.8	4.26	244	P257A / M428L / N434W
F183	2.2E-07	59.6	10.28	251	P257T / M428L / N434W
F184	2.7E-07	63.3	11.21	283	P257V / M428L / N434W
F185	2.6E-07	62.1	0.98	198	M252W / I332V / N434Y
F188	3.0E-06	59.2	3.09	282	P257I / Q311I
F189	1.9E-07	65.3	1.35	456	M252Y / T307A / N434Y
F190	1.1E-07	65.5	0.98	389	M252Y / T307Q / N434Y
F191	1.6E-07	62.4	0.91	495	P257L / T307A / M428L / N434Y

[0878]

F192	1.1E-07	63.2	0.82	456	P257A / T307A / M428L / N434Y
F193	8.5E-08	58.6	7.10	463	P257T / T307A / M428L / N434Y
F194	1.2E-07	62.2	0.61	495	P257V / T307A / M428L / N434Y
F195	5.6E-08	63.2	1.22	429	P257L / T307Q / M428L / N434Y
F196	3.5E-08	64.3	0.73	390	P257A / T307Q / M428L / N434Y
F197	3.3E-08	60.9	8.30	396	P257T / T307Q / M428L / N434Y
F198	4.8E-08	63.3	3.41	429	P257V / T307Q / M428L / N434Y
F201	2.1E-07	61.9	0.74	331	M252Y / T307D / N434Y
F203	2.4E-07	60.3	6.07	415	M252Y / T307F / N434Y
F204	2.1E-07	63.3	0.70	397	M252Y / T307G / N434Y
F205	2.0E-07	62.6	0.70	369	M252Y / T307H / N434Y
F206	2.3E-07	61.7	3.45	392	M252Y / T307I / N434Y
F207	9.4E-07	64.6	0.62	379	M252Y / T307K / N434Y
F208	3.9E-07	60.8	6.14	416	M252Y / T307L / N434Y
F209	1.3E-07	62.1	1.19	416	M252Y / T307M / N434Y
F210	2.9E-07	63.4	0.72	398	M252Y / T307N / N434Y
F211	2.4E-07	69	0.60	390	M252Y / T307P / N434Y
F212	6.8E-07	65.6	0.99	414	M252Y / T307R / N434Y
F213	2.3E-07	64.5	0.94	423	M252Y / T307S / N434Y
F214	1.7E-07	63.4	1.28	415	M252Y / T307V / N434Y
F215	9.6E-08	59.4	3.41	392	M252Y / T307W / N434Y
F216	2.3E-07	61.3	1.03	430	M252Y / T307Y / N434Y
F217	2.3E-07	62.3	1.08	268	M252Y / K334L / N434Y
F218	2.6E-07	64.2	0.91	257	M252Y / G385H / N434Y
F219	2.5E-07	62.6	0.87	266	M252Y / T289I1 / N434Y
F220	2.5E-07	63.3	0.92	318	M252Y / Q311H / N434Y
F221	3.1E-07	58.6	1.13	282	M252Y / D312H / N434Y
F222	3.4E-07	62.2	0.98	243	M252Y / N315H / N434Y
F223	2.7E-07	64.4	1.44	243	M252Y / K360H / N434Y
F225	1.5E-06	61.5	0.92	265	M252Y / L314R / N434Y
F226	5.4E-07	61	0.94	265	M252Y / L314K / N434Y
F227	1.2E-07	62.5	0.94	306	M252Y / N286E / N434Y
F228	2.3E-07	65.3	0.69	330	M252Y / L309E / N434Y
F229	5.1E-07	61.2	0.83	241	M252Y / R255E / N434Y

[0879]

F230	2.5E-07	66.2	0.66	243	M252Y / P387E / N434Y
F236	8.9E-07	67.7	2.23	229	K248I / M428L / N434Y
F237	2.3E-07	64.3	1.02	270	M252Y / M428A / N434Y
F238	7.4E-07	63.9	0.97	255	M252Y / M428D / N434Y
F240	7.2E-07	66.9	0.69	255	M252Y / M428F / N434Y
F241	1.5E-06	62.5	1.41	278	M252Y / M428G / N434Y
F242	8.5E-07	68.7	0.73	220	M252Y / M428H / N434Y
F243	1.8E-07	63.8	0.81	286	M252Y / M428I / N434Y
F244	1.3E-06	58.1	1.87	253	M252Y / M428K / N434Y
F245	4.7E-07	63.1	0.82	279	M252Y / M428N / N434Y
F246	1.1E-06	54.8	8.29	286	M252Y / M428P / N434Y
F247	4.4E-07	59.9	1.00	275	M252Y / M428Q / N434Y
F249	6.4E-07	64.2	0.72	273	M252Y / M428S / N434Y
F250	2.9E-07	62.5	0.74	271	M252Y / M428T / N434Y
F251	1.9E-07	63.4	1.20	289	M252Y / M428V / N434Y
F252	1.0E-06	68.4	0.83	255	M252Y / M428W / N434Y
F253	7.1E-07	67.2	0.79	263	M252Y / M428Y / N434Y
F254	7.5E-08	69	1.30	362	M252W / T307Q / M428Y / N434Y
F255	1.1E-07	66.5	1.23	355	M252W / Q311A / M428Y / N434Y
F256	5.4E-08	67.7	1.27	403	M252W / T307Q / Q311A / M428Y / N434Y
F257	5.0E-07	67.9	0.60	475	M252Y / T307A / M428Y / N434Y
F258	3.2E-07	68.2	0.63	409	M252Y / T307Q / M428Y / N434Y
F259	2.8E-07	68.1	1.15	273	M252Y / D270F / N434Y
F260	1.3E-07	64.4	0.78	496	M252Y / T307A / Q311A / N434Y
F261	8.4E-08	64.9	0.82	430	M252Y / T307Q / Q311A / N434Y
F262	1.9E-07	64.1	0.82	448	M252Y / T307A / Q311H / N434Y
F263	1.1E-07	64.6	0.80	358	M252Y / T307Q / Q311H / N434Y
F264	2.8E-07	62.9	1.15	285	M252Y / E382A / N434Y
F265	6.8E-07	65.1	0.57	305	M252Y / E382A / M428Y / N434Y
F266	4.7E-07	65.9	0.77	517	M252Y / T307A / E382A / M428Y / N434Y
F267	3.2E-07	66.4	0.81	450	M252Y / T307Q / E382A / M428Y / N434Y

[0880]

F268	6.3E-07	61.4	0.81	371	P238A / M252Y / M428F / N434Y
F269	5.2E-07	65.2	0.65	435	M252Y / V305A / M428F / N434Y
F270	6.6E-07	70.3	0.41	344	M252Y / N325G / M428F / N434Y
F271	6.9E-07	63.3	0.87	393	M252Y / D376A / M428F / N434Y
F272	6.8E-07	60	1.15	341	M252Y / E380A / M428F / N434Y
F273	6.5E-07	65.3	0.69	297	M252Y / E382A / M428F / N434Y
F274	7.6E-07	58.4	2.46	392	M252Y / E380A / E382A / M428F / N434Y
F275	4.2E-08	61.3	0.69	525	S239K / M252Y / V308P / E382A / N434Y
F276	4.1E-08	59.2	0.74	496	M252Y / D270F / V308P / E382A / N434Y
F277	1.3E-07	65.5	0.57	503	S239K / M252Y / V308P / M428Y / N434Y
F278	3.0E-08	55	0.62	411	M252Y / T307Q / V308P / E382A / N434Y
F279	6.1E-08	53.5	0.67	462	M252Y / V308P / Q311H / E382A / N434Y
F280	4.1E-08	65.5	0.58	513	S239K / M252Y / D270F / V308P / N434Y
F281	9.2E-08	57.2	0.71	477	M252Y / V308P / E382A / M428F / N434Y
F282	2.9E-08	49.2	0.82	521	M252Y / V308P / E382A / M428L / N434Y
F283	1.0E-07	57	0.49	485	M252Y / V308P / E382A / M428Y / N434Y
F284	1.0E-07	59.3	0.79	444	M252Y / V308P / M428Y / N434Y
F285	9.9E-08	59.4	0.60	436	M252Y / V308P / M428F / N434Y
F286	1.2E-07	63.6	0.64	544	S239K / M252Y / V308P / E382A / M428Y / N434Y
F287	1.0E-07	47	2.92	573	M252Y / V308P / E380A / E382A / M428F / N434Y
F288	1.9E-07	60.9	1.04	193	M252Y / T256E / E382A / N434Y
F289	4.8E-07	65.2	1.13	171	M252Y / T256E / M428Y / N434Y

[0881]

F290	4.6E-07	63.2	0.98	213	M252Y / T256E / E382A / M428Y / N434Y
F292	2.3E-08	60.8	1.16	568	S239K / M252Y / V308P / E382A / M428I / N434Y
F293	5.3E-08	46.3	3.40	604	M252Y / V308P / E380A / E382A / M428I / N434Y
F294	1.1E-07	65	0.64	495	S239K / M252Y / V308P / M428F / N434Y
F295	6.8E-07	65.5	1.58	451	S239K / M252Y / E380A / E382A / M428F / N434Y
F296	4.9E-07	66.6	0.76	401	M252Y / Q311A / M428Y / N434Y
F297	5.1E-07	59.1	0.81	315	M252Y / D312A / M428Y / N434Y
F298	4.8E-07	58.5	1.09	464	M252Y / Q311A / D312A / M428Y / N434Y
F299	9.4E-08	64.8	0.71	532	S239K / M252Y / V308P / Q311A / M428Y / N434Y
F300	8.3E-08	56.6	1.39	555	S239K / M252Y / V308P / D312A / M428Y / N434Y
F301	7.2E-08	56	1.08	627	S239K / M252Y / V308P / Q311A / D312A / M428Y / N434Y
F302	1.9E-07	67.2	0.77	298	M252Y / T256E / T307P / N434Y
F303	6.7E-07	71.8	0.59	409	M252Y / T307P / M428Y / N434Y
F304	1.6E-08	58.9	1.10	397	M252W / V308P / M428Y / N434Y
F305	2.7E-08	48.9	0.76	374	M252Y / T256E / V308P / E382A / N434Y
F306	3.6E-08	53.5	0.93	419	M252W / V308P / E382A / N434Y
F307	3.6E-08	60	1.76	478	S239K / M252W / V308P / E382A / N434Y
F308	1.9E-08	63.2	1.19	497	S239K / M252W / V308P / E382A / M428Y / N434Y
F310	9.4E-08	59.8	2.44	521	S239K / M252W / V308P / E382A / M428I / N434Y
F311	2.8E-08	64.1	0.98	448	S239K / M252W / V308P / M428F / N434Y

[0882]

F312	4.5E-07	64.3	1.33	404	S239K / M252W / E380A / E382A / M428F / N434Y
F313	6.5E-07	77.9	0.77	468	S239K / M252Y / T307P / M428Y / N434Y
F314	3.2E-07	56.1	1.27	372	M252Y / T256E / Q311A / D312A / M428Y / N434Y
F315	6.8E-07	72.8	0.80	322	S239K / M252Y / M428Y / N434Y
F316	7.0E-07	75.3	1.07	351	S239K / M252Y / D270F / M428Y / N434Y
F317	1.1E-07	68.5	0.84	532	S239K / M252Y / D270F / V308P / M428Y / N434Y
F318	1.8E-08	62	0.96	526	S239K / M252Y / V308P / M428I / N434Y
F320	2.0E-08	63.9	1.00	657	S239K / M252Y / V308P / N325G / E382A / M428I / N434Y
F321	3.2E-08	65.6	0.80	602	S239K / M252Y / D270F / V308P / N325G / N434Y
F322	9.2E-08	61.8	0.87	448	S239K / M252Y / D270F / T307P / V308P / N434Y
F323	2.7E-08	63.1	1.10	421	S239K / M252Y / T256E / D270F / V308P / N434Y
F324	2.8E-08	63	1.07	458	S239K / M252Y / D270F / T307Q / V308P / N434Y
F325	2.1E-08	62.4	0.84	473	S239K / M252Y / D270F / T307Q / V308P / Q311A / N434Y
F326	7.5E-08	73.2	0.90	518	S239K / M252Y / D270F / T307Q / Q311A / N434Y
F327	6.5E-08	70.4	1.19	427	S239K / M252Y / T256E / D270F / T307Q / Q311A / N434Y
F328	1.9E-08	62.3	0.76	556	S239K / M252Y / D270F / V308P / M428I / N434Y
F329	1.2E-08	64.2	0.97	575	S239K / M252Y / D270F / N286E / V308P / N434Y
F330	3.6E-08	65.5	0.75	414	S239K / M252Y / D270F / V308P / L309E / N434Y

[0883]

F331	3.0E-08	63.8	0.77	513	S239K / M252Y / D270F / V308P / P387E / N434Y
F333	7.4E-08	75.3	1.00	418	S239K / M252Y / D270F / T307Q / L309E / Q311A / N434Y
F334	1.9E-08	65.2	1.25	645	S239K / M252Y / D270F / V308P / N325G / M428I / N434Y
F335	1.5E-08	63.2	1.15	464	S239K / M252Y / T256E / D270F / V308P / M428I / N434Y
F336	1.4E-08	64.7	0.95	516	S239K / M252Y / D270F / T307Q / V308P / Q311A / M428I / N434Y
F337	5.6E-08	72.9	1.20	562	S239K / M252Y / D270F / T307Q / Q311A / M428I / N434Y
F338	7.7E-09	63.4	1.03	618	S239K / M252Y / D270F / N286E / V308P / M428I / N434Y
F339	1.9E-08	65.2	1.09	457	S239K / M252Y / D270F / V308P / L309E / M428I / N434Y
F343	3.2E-08	60.2	1.28	568	S239K / M252Y / D270F / V308P / M428L / N434Y
F344	3.0E-08	56.3	0.92	538	S239K / M252Y / V308P / M428L / N434Y
F349	1.5E-07	57.8	0.97	530	S239K / M252Y / V308P / L309P / M428L / N434Y
F350	1.7E-07	58.2	1.01	538	S239K / M252Y / V308P / L309R / M428L / N434Y
F352	6.0E-07	67.7	1.12	496	S239K / M252Y / L309P / M428L / N434Y
F353	1.1E-06	73.1	1.01	504	S239K / M252Y / L309R / M428L / N434Y
F354	2.8E-08	57.5	0.86	483	S239K / M252Y / T307Q / V308P / M428L / N434Y
F356	3.4E-08	67.2	0.85	414	S239K / M252Y / D270F / V308P / L309E / P387E / N434Y
F357	1.6E-08	62.7	1.16	554	S239K / M252Y / T256E / D270F / V308P / N325G / M428I / N434Y
F358	1.0E-07	70.8	0.79	448	S239K / M252Y / T307Q / N434Y

[0884]

F359	4.2E-07	63.5	7.84	417	P257V / T307Q / M428I / N434Y
F360	1.3E-06	63.9	4.93	419	P257V / T307Q / M428V / N434Y
F362	5.4E-08	70.1	13.44	518	P257V / T307Q / N325G / M428L / N434Y
F363	4.1E-08	63.3	15.02	470	P257V / T307Q / Q311A / M428L / N434Y
F364	3.5E-08	68.9	3.25	559	P257V / T307Q / Q311A / N325G / M428L / N434Y
F365	5.1E-08	60.2	3.22	458	P257V / V305A / T307Q / M428L / N434Y
F367	1.5E-08	59.4	1.25	500	S239K / M252Y / E258H / D270F / T307Q / V308P / Q311A / N434Y
F368	2.0E-08	64	0.97	687	S239K / M252Y / D270F / V308P / N325G / E382A / M428I / N434Y
F369	7.5E-08	62.8	4.07	408	M252Y / P257V / T307Q / M428I / N434Y
F372	1.3E-08	65.4	1.09	456	S239K / M252W / V308P / M428Y / N434Y
F373	1.1E-08	64.5	1.89	485	S239K / M252W / V308P / Q311A / M428Y / N434Y
F374	1.2E-08	63	1.30	399	S239K / M252W / T256E / V308P / M428Y / N434Y
F375	5.5E-09	63.5	1.18	518	S239K / M252W / N286E / V308P / M428Y / N434Y
F376	9.6E-09	61.9	14.59	483	S239K / M252Y / T256E / D270F / N286E / V308P / N434Y
F377	1.3E-07	77.7	0.95	421	S239K / M252W / T307P / M428Y / N434Y
F379	9.0E-09	62.2	54.64	428	S239K / M252W / T256E / V308P / Q311A / M428Y / N434Y
F380	5.6E-09	60.8	0.97	461	S239K / M252W / T256E / N286E / V308P / M428Y / N434Y
F381	1.1E-07	61.7	7.47	536	P257V / T307A / Q311A / M428L / N434Y

[0885]

F382	8.7E-08	58.6	3.55	489	P257V / V305A / T307A / M428L / N434Y
F386	3.2E-08	56.7	2.02	325	M252Y / V308P / L309E / N434Y
F387	1.5E-07	57.9	1.64	330	M252Y / V308P / L309D / N434Y
F388	7.0E-08	57.4	1.12	401	M252Y / V308P / L309A / N434Y
F389	1.7E-08	59.2	1.19	298	M252W / V308P / L309E / M428Y / N434Y
F390	6.8E-08	60.2	1.29	302	M252W / V308P / L309D / M428Y / N434Y
F391	3.6E-08	59.4	0.91	374	M252W / V308P / L309A / M428Y / N434Y
F392	6.9E-09	60.3	0.92	588	S239K / M252Y / N286E / V308P / M428I / N434Y
F393	1.2E-08	61.1	0.83	545	S239K / M252Y / N286E / V308P / N434Y
F394	5.3E-08	70.3	0.99	532	S239K / M252Y / T307Q / Q311A / M428I / N434Y
F395	2.4E-08	60.1	1.46	391	S239K / M252Y / T256E / V308P / N434Y
F396	2.0E-08	71.7	1.53	624	S239K / M252Y / D270F / N286E / T307Q / Q311A / M428I / N434Y
F397	4.5E-08	75.1	1.23	562	S239K / M252Y / D270F / T307Q / Q311A / P387E / M428I / N434Y
F398	4.4E-09	63.3	1.14	578	S239K / M252Y / D270F / N286E / T307Q / V308P / Q311A / M428I / N434Y
F399	6.5E-09	63.2	1.02	563	S239K / M252Y / D270F / N286E / T307Q / V308P / M428I / N434Y
F400	6.1E-09	63.4	1.22	647	S239K / M252Y / D270F / N286E / V308P / Q311A / M428I / N434Y
F401	6.9E-09	65.3	1.11	618	S239K / M252Y / D270F / N286E / V308P / P387E / M428I / N434Y
F402	2.3E-08	63.7	11.07	429	P257V / T307Q / M428L / N434W
F403	5.1E-08	61.9	11.06	495	P257V / T307A / M428L / N434W

[0886]

F404	9.4E-08	66.3	2.14	342	P257A / T307Q / L309P / M428L / N434Y
F405	1.7E-07	68.1	6.73	381	P257V / T307Q / L309P / M428L / N434Y
F406	1.5E-07	66.7	1.14	342	P257A / T307Q / L309R / M428L / N434Y
F407	1.6E-07	64.3	7.87	381	P257V / T307Q / L309R / M428L / N434Y
F408	2.5E-07	63.2	8.96	345	P257V / N286E / M428L / N434Y
F409	2.0E-07	64.4	10.17	283	P257V / P387E / M428L / N434Y
F410	2.2E-07	62.1	10.56	408	P257V / T307H / M428L / N434Y
F411	1.3E-07	62.4	10.50	438	P257V / T307N / M428L / N434Y
F412	8.8E-08	60.4	8.29	437	P257V / T307G / M428L / N434Y
F413	1.2E-07	66.9	7.29	430	P257V / T307P / M428L / N434Y
F414	1.1E-07	63.6	9.61	463	P257V / T307S / M428L / N434Y
F415	5.6E-08	61.1	8.69	558	P257V / N286E / T307A / M428L / N434Y
F416	9.4E-08	62.5	6.73	495	P257V / T307A / P387E / M428L / N434Y
F418	6.2E-07	81.7	0.58	558	S239K / M252Y / T307P / N325G / M428Y / N434Y
F419	1.6E-07	64.2	5.96	448	M252Y / T307A / Q311H / K360H / N434Y
F420	1.5E-07	65.9	1.10	448	M252Y / T307A / Q311H / P387E / N434Y
F421	1.3E-07	63.4	0.56	474	M252Y / T307A / Q311H / M428A / N434Y
F422	1.8E-07	62.4	0.46	489	M252Y / T307A / Q311H / E382A / N434Y
F423	8.4E-08	58.2	1.22	405	M252Y / T307W / Q311H / N434Y
F424	9.4E-08	57.9	1.25	484	S239K / P257A / V308P / M428L / N434Y
F425	8.0E-08	54.7	1.36	326	P257A / V308P / L309E / M428L / N434Y
F426	8.4E-08	65.3	3.50	374	P257V / T307Q / N434Y

	F427	1.1E-07	63.1	3.79	411	M252Y / P257V / T307Q / M428V / N434Y
	F428	8.0E-08	63.9	10.27	420	M252Y / P257V / T307Q / M428L / N434Y
	F429	3.7E-08	63.5	10.07	365	M252Y / P257V / T307Q / N434Y
	F430	8.1E-08	64.7	2.99	385	M252Y / P257V / T307Q / M428Y / N434Y
	F431	6.5E-08	64.9	4.77	377	M252Y / P257V / T307Q / M428F / N434Y
	F432	9.2E-07	67.1	6.21	550	P257V / T307Q / Q311A / N325G / M428V / N434Y
	F433	6.0E-08	68.4	2.56	504	P257V / T307Q / Q311A / N325G / N434Y
	F434	2.0E-08	69.3	1.66	524	P257V / T307Q / Q311A / N325G / M428Y / N434Y
	F435	2.5E-08	69.2	1.85	516	P257V / T307Q / Q311A / N325G / M428F / N434Y
[0887]	F436	2.5E-07	63.4	4.67	380	P257A / T307Q / M428V / N434Y
	F437	5.7E-08	65.3	0.75	335	P257A / T307Q / N434Y
	F438	3.6E-08	68.6	0.74	354	P257A / T307Q / M428Y / N434Y
	F439	4.0E-08	67.9	3.44	346	P257A / T307Q / M428F / N434Y
	F440	1.5E-08	68.7	9.15	622	P257V / N286E / T307Q / Q311A / N325G / M428L / N434Y
	F441	1.8E-07	64	2.87	383	P257A / Q311A / M428L / N434Y
	F442	2.0E-07	63.5	1.91	318	P257A / Q311H / M428L / N434Y
	F443	5.5E-08	64.5	8.58	431	P257A / T307Q / Q311A / M428L / N434Y
	F444	1.4E-07	62.8	1.96	497	P257A / T307A / Q311A / M428L / N434Y
	F445	6.2E-08	64.4	1.22	359	P257A / T307Q / Q311H / M428L / N434Y
	F446	1.1E-07	62.6	1.00	448	P257A / T307A / Q311H / M428L / N434Y
	F447	1.4E-08	63.9	1.20	452	P257A / N286E / T307Q / M428L / N434Y

[0888]

F448	5.3E-08	61.9	1.05	519	P257A / N286E / T307A / M428L / N434Y
F449	5.7E-07	81.9	0.64	587	S239K / M252Y / D270F / T307P / N325G / M428Y / N434Y
F450	5.2E-07	82.5	0.67	501	S239K / M252Y / T307P / L309E / N325G / M428Y / N434Y
F451	1.0E-07	60.4	4.14	463	P257S / T307A / M428L / N434Y
F452	1.4E-07	60.8	4.31	466	P257M / T307A / M428L / N434Y
F453	7.8E-08	55.5	7.22	480	P257N / T307A / M428L / N434Y
F454	9.6E-08	60.4	5.16	500	P257I / T307A / M428L / N434Y
F455	2.7E-08	66.3	2.85	393	P257V / T307Q / M428Y / N434Y
F456	3.4E-08	66.2	2.45	385	P257V / T307Q / M428F / N434Y
F457	4.0E-08	61.2	5.82	523	S239K / P257V / V308P / M428L / N434Y
F458	1.5E-08	57.1	7.48	499	P257V / T307Q / V308P / N325G / M428L / N434Y
F459	1.3E-08	56.5	5.57	514	P257V / T307Q / V308P / Q311A / N325G / M428L / N434Y
F460	4.7E-08	55.5	8.56	570	P257V / T307A / V308P / N325G / M428L / N434Y
F462	8.5E-08	57.2	1.10	514	P257A / V308P / N325G / M428L / N434Y
F463	1.3E-07	53	0.92	442	P257A / T307A / V308P / M428L / N434Y
F464	5.5E-08	54.3	1.14	370	P257A / T307Q / V308P / M428L / N434Y
F465	2.1E-08	69.2	9.95	581	P257V / N286E / T307Q / N325G / M428L / N434Y
F466	3.5E-07	63.6	0.35	167	T256E / P257V / N434Y
F467	5.7E-07	60.5	0.52	142	T256E / P257T / N434Y
F468	5.7E-08	55.8	0.71	490	S239K / P257T / V308P / M428L / N434Y
F469	5.6E-08	48.6	1.49	521	P257T / V308P / N325G / M428L / N434Y

[0889]

F470	5.4E-08	48.2	1.81	467	T256E / P257T / V308P / N325G / M428L / N434Y
F471	6.6E-08	48.4	1.43	563	P257T / V308P / N325G / E382A / M428L / N434Y
F472	5.4E-08	48.8	5.04	521	P257T / V308P / N325G / P387E / M428L / N434Y
F473	4.5E-07	48.7	2.13	513	P257T / V308P / L309P / N325G / M428L / N434Y
F474	3.5E-07	48.4	1.04	521	P257T / V308P / L309R / N325G / M428L / N434Y
F475	4.3E-08	61.9	3.67	368	T256E / P257V / T307Q / M428L / N434Y
F476	5.5E-08	61.8	4.57	471	P257V / T307Q / E382A / M428L / N434Y
F477	4.3E-08	62.8	2.35	429	P257V / T307Q / P387E / M428L / N434Y
F480	3.9E-08	53.8	2.30	409	P257L / V308P / N434Y
F481	5.6E-08	59.2	1.26	341	P257T / T307Q / N434Y
F482	7.0E-08	66.4	1.32	463	P257V / T307Q / N325G / N434Y
F483	5.7E-08	62.1	1.42	415	P257V / T307Q / Q311A / N434Y
F484	6.2E-08	58.6	1.84	403	P257V / V305A / T307Q / N434Y
F485	9.7E-08	60.4	2.64	503	P257V / N286E / T307A / N434Y
F486	3.4E-07	60.4	0.76	381	P257V / T307Q / L309R / Q311H / M428L / N434Y
F488	3.5E-08	56.4	3.69	553	P257V / V308P / N325G / M428L / N434Y
F490	7.5E-08	59.4	2.29	519	S239K / P257V / V308P / Q311H / M428L / N434Y
F492	9.8E-08	61.7	3.29	579	P257V / V305A / T307A / N325G / M428L / N434Y
F493	4.9E-07	84	0.52	456	S239K / D270F / T307P / N325G / M428Y / N434Y
F497	3.1E-06	58.2	4.34	453	P257T / T307A / M428V / N434Y
F498	1.3E-06	62.2	6.16	234	P257A / M428V / N434Y
F499	5.2E-07	61.3	2.03	447	P257A / T307A / M428V / N434Y

[0890]

F500	4.3E-08	61	2.81	396	P257S / T307Q / M428L / N434Y
F506	1.9E-07	57.1	8.70	454	P257V / N297A / T307Q / M428L / N434Y
F507	5.1E-08	59.9	4.51	499	P257V / N286A / T307Q / M428L / N434Y
F508	1.1E-07	65.1	3.93	429	P257V / T307Q / N315A / M428L / N434Y
F509	5.8E-08	62.8	3.94	447	P257V / T307Q / N384A / M428L / N434Y
F510	5.3E-08	62.7	4.35	429	P257V / T307Q / N389A / M428L / N434Y
F511	4.2E-07	63	2.28	228	P257V / N434Y
F512	5.8E-07	60	3.41	195	P257T / N434Y
F517	3.1E-07	61.4	2.82	290	P257V / N286E / N434Y
F518	4.2E-07	58.5	4.05	258	P257T / N286E / N434Y
F519	2.6E-08	61.3	2.45	436	P257V / N286E / T307Q / N434Y
F521	1.1E-08	63.5	1.51	456	P257V / N286E / T307Q / M428Y / N434Y
F523	2.6E-08	62.6	1.39	422	P257V / V305A / T307Q / M428Y / N434Y
F526	1.9E-08	62.2	1.60	361	P257T / T307Q / M428Y / N434Y
F527	9.4E-09	60.6	0.94	463	P257V / T307Q / V308P / N325G / M428Y / N434Y
F529	2.5E-08	61.7	1.82	353	P257T / T307Q / M428F / N434Y
F533	1.2E-08	64.8	1.01	409	P257A / N286E / T307Q / M428F / N434Y
F534	1.2E-08	65.6	0.84	417	P257A / N286E / T307Q / M428Y / N434Y
F535	3.9E-08	63.3	4.36	449	T250A / P257V / T307Q / M428L / N434Y
F538	9.9E-08	66.7	2.57	484	T250F / P257V / T307Q / M428L / N434Y
F541	6.0E-08	65.9	3.53	484	T250I / P257V / T307Q / M428L / N434Y

[0891]

F544	3.1E-08	64.5	4.00	484	T250M / P257V / T307Q / M428L / N434Y
F549	5.4E-08	61.8	5.82	415	T250S / P257V / T307Q / M428L / N434Y
F550	5.9E-08	66.6	3.19	484	T250V / P257V / T307Q / M428L / N434Y
F551	1.2E-07	65.1	3.72	484	T250W / P257V / T307Q / M428L / N434Y
F552	1.1E-07	65.4	2.98	484	T250Y / P257V / T307Q / M428L / N434Y
F553	1.7E-07	64.1	1.52	382	M252Y / Q311A / N434Y
F554	2.8E-08	62.8	1.39	454	S239K / M252Y / S254T / V308P / N434Y
F556	1.5E-06	66.5	0.96	318	M252Y / T307Q / Q311A
F559	8.0E-08	62.8	1.20	277	M252Y / S254T / N286E / N434Y
F560	2.8E-08	56.9	1.15	395	M252Y / S254T / V308P / N434Y
F561	1.4E-07	65.5	1.23	427	M252Y / S254T / T307A / N434Y
F562	8.3E-08	65.7	1.21	360	M252Y / S254T / T307Q / N434Y
F563	1.3E-07	64.2	1.02	353	M252Y / S254T / Q311A / N434Y
F564	1.9E-07	63.7	1.02	289	M252Y / S254T / Q311H / N434Y
F565	9.2E-08	65	1.00	467	M252Y / S254T / T307A / Q311A / N434Y
F566	6.1E-08	64.9	1.24	401	M252Y / S254T / T307Q / Q311A / N434Y
F567	2.2E-07	64.2	1.52	257	M252Y / S254T / M428I / N434Y
F568	1.1E-07	61.6	0.99	356	M252Y / T256E / T307A / Q311H / N434Y
F569	2.0E-07	64.4	0.96	379	M252Y / T256Q / T307A / Q311H / N434Y
F570	1.3E-07	64.5	1.04	419	M252Y / S254T / T307A / Q311H / N434Y
F571	8.1E-08	62.4	1.03	510	M252Y / N286E / T307A / Q311H / N434Y
F572	1.0E-07	63.6	1.33	491	M252Y / T307A / Q311H / M428I / N434Y

[0892]

F576	1.6E-06	62.7	0.99	154	M252Y / T256E / T307Q / Q311H
F577	1.3E-06	64.4	1.44	447	M252Y / N286E / T307A / Q311A
F578	5.7E-07	64.3	1.33	380	M252Y / N286E / T307Q / Q311A
F580	8.6E-07	63.9	1.06	308	M252Y / N286E / T307Q / Q311H
F581	7.2E-08	59.8	1.22	214	M252Y / T256E / N286E / N434Y
F582	7.5E-07	64.5	1.10	371	S239K / M252Y / V308P
F583	7.8E-07	63	1.01	412	S239K / M252Y / V308P / E382A
F584	6.3E-07	61.8	1.45	279	S239K / M252Y / T256E / V308P
F585	2.9E-07	62.7	1.15	433	S239K / M252Y / N286E / V308P
F586	1.4E-07	62	1.21	498	S239K / M252Y / N286E / V308P / M428I
F587	1.9E-07	61.9	1.47	361	M252Y / N286E / M428L / N434Y
F592	2.0E-07	62.9	0.99	256	M252Y / S254T / E382A / N434Y
F593	3.1E-08	60.8	1.27	497	S239K / M252Y / S254T / V308P / M428I / N434Y
F594	1.6E-08	59.3	1.32	434	S239K / M252Y / T256E / V308P / M428I / N434Y
F595	1.8E-07	69.4	0.91	345	S239K / M252Y / M428I / N434Y
F596	4.0E-07	56.6	1.05	357	M252Y / D312A / E382A / M428Y / N434Y
F597	2.2E-07	64.6	0.78	283	M252Y / E382A / P387E / N434Y
F598	1.4E-07	58.1	1.06	296	M252Y / D312A / P387E / N434Y
F599	5.2E-07	68.9	0.76	263	M252Y / P387E / M428Y / N434Y
F600	2.8E-07	62.5	0.89	217	M252Y / T256Q / E382A / N434Y
F601	9.6E-09	54.7	0.96	486	M252Y / N286E / V308P / N434Y
F611	2.8E-07	69.5	0.96	358	M252Y / V305T / T307P / V308I / L309A / N434Y
F612	3.6E-07	70.8	0.92	360	M252Y / T307P / V308I / L309A / N434Y
F617	7.4E-07	71.6	1.41	149	S239K / N434W
F618	6.4E-07	60.7	2.70	386	S239K / V308F / N434Y
F619	3.1E-07	70	0.67	302	S239K / M252Y / N434Y
F620	2.1E-07	69.6	1.18	273	S239K / M252Y / S254T / N434Y

[0893]

F621	1.5E-07	70	0.76	506	S239K / M252Y / T307A / Q311H / N434Y
F622	3.5E-07	69.9	0.74	234	S239K / M252Y / T256Q / N434Y
F623	1.8E-07	68	2.39	234	S239K / M252W / N434W
F624	1.4E-08	69.1	1.99	511	S239K / P257A / N286E / T307Q / M428L / N434Y
F625	7.6E-08	69.7	1.85	449	S239K / P257A / T307Q / M428L / N434Y
F626	1.3E-06	62.7	0.81	181	V308P
F629	3.9E-08	52	0.56	481	M252Y / V279L / V308P / N434Y
F630	3.7E-08	58.5	0.87	540	S239K / M252Y / V279L / V308P / N434Y
F633	2.4E-08	53.7	0.65	446	M252Y / V282D / V308P / N434Y
F634	3.2E-08	59.5	0.88	505	S239K / M252Y / V282D / V308P / N434Y
F636	4.8E-08	57.1	0.91	520	S239K / M252Y / V284K / V308P / N434Y
F637	1.5E-07	54.9	1.05	455	M252Y / K288S / V308P / N434Y
F638	1.4E-07	60.9	0.90	514	S239K / M252Y / K288S / V308P / N434Y
F639	2.7E-08	56.2	0.92	424	M252Y / V308P / G385R / N434Y
F640	3.6E-08	62.1	0.83	483	S239K / M252Y / V308P / G385R / N434Y
F641	3.0E-08	56.3	0.83	438	M252Y / V308P / Q386K / N434Y
F642	3.0E-08	62.2	0.87	497	S239K / M252Y / V308P / Q386K / N434Y
F643	3.2E-08	62.4	0.73	479	L235G / G236R / S239K / M252Y / V308P / N434Y
F644	3.0E-08	62.1	0.80	518	G236R / S239K / M252Y / V308P / N434Y
F645	3.3E-08	54.6	1.25	551	S239K / M252Y / V308P / L328R / N434Y
F646	3.8E-08	48.5	3.58	509	S239K / M252Y / N297A / V308P / N434Y
F647	2.9E-08	43	8.59	502	P238D / M252Y / V308P / N434Y

[0894]

F649	1.2E-07	68.3	0.90	364	S239K / M252Y / N286E / N434Y
F650	1.7E-07	68.1	1.19	210	S239K / M252Y / T256E / N434Y
F651	1.8E-07	69.4	0.69	441	S239K / M252Y / Q311A / N434Y
F652	2.4E-07	54.8	0.95	322	P238D / M252Y / N434Y
F654	3.2E-08	62.2	0.80	493	L235K / S239K / M252Y / V308P / N434Y
F655	3.4E-08	62.5	0.50	489	L235R / S239K / M252Y / V308P / N434Y
F656	3.3E-08	60	0.74	482	G237K / S239K / M252Y / V308P / N434Y
F657	3.2E-08	61.3	0.54	485	G237R / S239K / M252Y / V308P / N434Y
F658	3.2E-08	48.4	6.06	531	P238K / S239K / M252Y / V308P / N434Y
F659	3.0E-08	47.2	9.54	547	P238R / S239K / M252Y / V308P / N434Y
F660	3.1E-08	60.3	0.82	564	S239K / M252Y / V308P / P329K / N434Y
F661	3.4E-08	61	0.66	541	S239K / M252Y / V308P / P329R / N434Y
F663	6.4E-09	60.7	0.81	506	S239K / M252Y / N286E / T307Q / V308P / Q311A / N434Y
F664	3.9E-08	54.4	0.90	494	M252Y / N286A / V308P / N434Y
F665	2.0E-08	56.9	1.09	438	M252Y / N286D / V308P / N434Y
F666	2.1E-08	52.7	1.06	494	M252Y / N286F / V308P / N434Y
F667	3.0E-08	56.1	0.59	486	M252Y / N286G / V308P / N434Y
F668	4.0E-08	56.2	0.55	486	M252Y / N286H / V308P / N434Y
F670	2.1E-07	52.1	0.13	486	M252Y / N286K / V308P / N434Y
F671	2.2E-08	49.5	0.67	494	M252Y / N286L / V308P / N434Y
F672	2.4E-08	53.4	0.87	494	M252Y / N286M / V308P / N434Y
F673	2.3E-08	48.2	5.02	486	M252Y / N286P / V308P / N434Y
F674	3.2E-08	53.3	0.39	486	M252Y / N286Q / V308P / N434Y
F675	5.1E-08	49.3	0.67	494	M252Y / N286R / V308P / N434Y
F676	3.2E-08	55.6	0.64	494	M252Y / N286S / V308P / N434Y
F677	4.7E-08	57.1	0.92	486	M252Y / N286T / V308P / N434Y

[0895]

F679	1.7E-08	48.7	4.00	486	M252Y / N286W / V308P / N434Y
F680	1.5E-08	56	0.80	494	M252Y / N286Y / V308P / N434Y
F681	4.9E-08	54.4	0.95	455	M252Y / K288A / V308P / N434Y
F682	8.2E-08	54.5	0.98	424	M252Y / K288D / V308P / N434Y
F683	5.0E-08	56.2	1.17	432	M252Y / K288E / V308P / N434Y
F684	5.1E-08	56.6	1.27	458	M252Y / K288F / V308P / N434Y
F685	5.3E-08	48.5	1.14	432	M252Y / K288G / V308P / N434Y
F686	4.6E-08	56.3	1.00	455	M252Y / K288H / V308P / N434Y
F687	4.9E-08	59.1	1.13	463	M252Y / K288I / V308P / N434Y
F688	2.8E-08	56.5	1.07	466	M252Y / K288L / V308P / N434Y
F689	4.1E-08	56.4	0.95	455	M252Y / K288M / V308P / N434Y
F690	1.0E-07	54.9	0.98	455	M252Y / K288N / V308P / N434Y
F692	3.9E-08	56	1.18	440	M252Y / K288Q / V308P / N434Y
F693	3.6E-08	56.2	0.82	478	M252Y / K288R / V308P / N434Y
F694	4.7E-08	57.5	0.88	466	M252Y / K288V / V308P / N434Y
F695	4.0E-08	55	1.09	481	M252Y / K288W / V308P / N434Y
F696	4.4E-08	56.4	0.93	486	M252Y / K288Y / V308P / N434Y
F697	3.1E-08	65.1	0.56	572	S239K / M252Y / V308P / N325G / N434Y
F698	2.2E-08	62.8	0.69	492	M252Y / N286E / T307Q / Q311A / N434Y
F699	2.3E-08	68.3	0.74	551	S239K / M252Y / N286E / T307Q / Q311A / N434Y
F705	7.1E-09	53.7	0.71	530	M252Y / N286E / V308P / M428I / N434Y
F706	1.8E-08	62	0.86	535	M252Y / N286E / T307Q / Q311A / M428I / N434Y
F707	5.9E-09	54.5	0.73	447	M252Y / N286E / T307Q / V308P / Q311A / N434Y
F708	4.1E-09	53.6	0.43	490	M252Y / N286E / T307Q / V308P / Q311A / M428I / N434Y
F709	2.0E-08	68.3	0.77	594	S239K / M252Y / N286E / T307Q / Q311A / M428I / N434Y
F710	1.5E-08	48.6	1.68	614	P238D / M252Y / N286E / T307Q / Q311A / M428I / N434Y

[0896]

F711	6.5E-08	70.7	0.79	489	S239K / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y
F712	6.0E-08	55.2	0.89	508	P238D / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y
F713	2.0E-08	52.7	0.88	571	P238D / M252Y / N286E / T307Q / Q311A / N434Y
F714	2.3E-07	57.9	0.70	437	P238D / M252Y / N325S / N434Y
F715	2.3E-07	57.6	2.42	451	P238D / M252Y / N325M / N434Y
F718	2.8E-07	56.3	0.52	348	P238D / M252Y / Q295M / N434Y
F719	7.4E-08	57.3	0.76	411	P238D / M252Y / N325G / N434Y
F720	2.4E-08	56.4	0.66	385	M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y
F721	1.5E-08	55.3	0.77	428	M252Y / T307Q / V308P / Q311A / M428I / N434Y
F722	2.7E-07	53.7	0.43	322	P238D / M252Y / A327G / N434Y
F723	2.8E-07	45.3	7.75	347	P238D / M252Y / L328D / N434Y
F724	2.5E-07	43	24.31	355	P238D / M252Y / L328E / N434Y
F725	4.2E-08	61.5	0.56	485	L235K / G237R / S239K / M252Y / V308P / N434Y
F729	9.2E-07	68.3	0.61	365	T307A / Q311A / N434Y
F730	6.0E-07	69.1	0.52	299	T307Q / Q311A / N434Y
F731	8.5E-07	67.9	0.63	316	T307A / Q311H / N434Y
F732	6.8E-07	69	0.66	227	T307Q / Q311H / N434Y
F733	3.2E-07	48.8	2.59	276	M252Y / L328E / N434Y
F734	3.1E-07	46.8	9.34	340	G236D / M252Y / L328E / N434Y
F736	3.1E-07	52.2	2.27	298	M252Y / S267M / L328E / N434Y
F737	3.1E-07	48.6	2.82	298	M252Y / S267L / L328E / N434Y
F738	3.5E-07	59.8	0.91	468	P238D / M252Y / T307P / N434Y
F739	2.2E-07	68.1	0.77	430	M252Y / T307P / Q311A / N434Y
F740	2.9E-07	67.7	0.76	360	M252Y / T307P / Q311H / N434Y
F741	3.1E-07	52.9	1.14	322	P238D / T250A / M252Y / N434Y
F744	9.9E-07	58.6	1.09	357	P238D / T250F / M252Y / N434Y
F747	2.8E-07	59.4	0.93	357	P238D / T250I / M252Y / N434Y
F749	5.1E-07	58.6	1.13	357	P238D / T250L / M252Y / N434Y

[0897]

F750	3.0E-07	53	1.34	357	P238D / T250M / M252Y / N434Y
F753	1.8E-07	45	6.13	345	P238D / T250Q / M252Y / N434Y
F755	3.5E-07	47.8	1.24	322	P238D / T250S / M252Y / N434Y
F756	3.7E-07	59.9	0.81	357	P238D / T250V / M252Y / N434Y
F757	1.2E-06	55.3	1.29	357	P238D / T250W / M252Y / N434Y
F758	1.4E-06	60	0.77	357	P238D / T250Y / M252Y / N434Y
F761	1.1E-06	59.7	0.56	191	P238D / N434Y
F762	3.6E-08	68.8	0.79	561	L235K / S239K / M252Y / N286E / T307Q / Q311A / N434Y
F763	3.5E-08	69.2	0.76	557	L235R / S239K / M252Y / N286E / T307Q / Q311A / N434Y
F764	6.3E-07	60	0.48	377	P238D / T307Q / Q311A / N434Y
F765	8.5E-08	56.8	1.06	407	P238D / M252Y / T307Q / L309E / Q311A / N434Y
F766	6.0E-07	69.2	0.61	286	T307A / L309E / Q311A / N434Y
F767	4.3E-07	69.9	0.63	198	T307Q / L309E / Q311A / N434Y
F768	6.4E-07	68.8	0.65	286	T307A / L309E / Q311H / N434Y
F769	4.6E-07	69.5	0.77	190	T307Q / L309E / Q311H / N434Y
F770	3.0E-07	61.8	0.84	226	M252Y / T256A / N434Y
F771	4.0E-07	60	0.57	275	M252Y / E272A / N434Y
F772	3.8E-07	62.7	0.57	293	M252Y / K274A / N434Y
F773	3.9E-07	62	0.50	285	M252Y / V282A / N434Y
F774	4.0E-07	61.5	0.64	314	M252Y / N286A / N434Y
F775	6.2E-07	56.1	9.28	243	M252Y / K338A / N434Y
F776	3.9E-07	61.9	0.64	273	M252Y / K340A / N434Y
F777	3.9E-07	64.2	0.59	278	M252Y / E345A / N434Y
F779	3.9E-07	64.2	0.56	273	M252Y / N361A / N434Y
F780	3.9E-07	64.3	0.65	256	M252Y / Q362A / N434Y
F781	3.7E-07	64.2	0.58	307	M252Y / S375A / N434Y
F782	3.5E-07	63.9	0.93	243	M252Y / Y391A / N434Y
F783	4.0E-07	64.2	0.50	514	M252Y / D413A / N434Y
F784	5.0E-07	65.6	0.70	367	M252Y / L309A / N434Y
F785	7.4E-07	64.7	0.70	359	M252Y / L309H / N434Y

[0898]

F786	2.8E-08	62.6	0.61	463	M252Y / S254T / N286E / T307Q / Q311A / N434Y
F787	8.8E-08	66.1	0.72	300	M252Y / S254T / T307Q / L309E / Q311A / N434Y
F788	4.1E-07	65.5	0.53	251	M252Y / N315A / N434Y
F789	1.5E-07	64.3	0.67	243	M252Y / N315D / N434Y
F790	2.7E-07	63.9	0.97	265	M252Y / N315E / N434Y
F791	4.4E-07	60.6	1.27	243	M252Y / N315F / N434Y
F792	4.4E-07	65	0.59	243	M252Y / N315G / N434Y
F793	3.3E-07	61.4	0.75	251	M252Y / N315I / N434Y
F794	4.1E-07	62.8	0.64	243	M252Y / N315K / N434Y
F795	3.1E-07	62.8	0.85	265	M252Y / N315L / N434Y
F796	3.4E-07	64.4	0.85	251	M252Y / N315M / N434Y
F798	3.5E-07	64.3	0.72	273	M252Y / N315Q / N434Y
F799	4.1E-07	62.7	1.36	243	M252Y / N315R / N434Y
F800	3.8E-07	65.8	0.61	243	M252Y / N315S / N434Y
F802	3.3E-07	61.5	0.67	273	M252Y / N315V / N434Y
F803	3.6E-07	59.6	0.86	251	M252Y / N315W / N434Y
F804	4.0E-07	60.5	1.55	251	M252Y / N315Y / N434Y
F805	3.0E-07	65	0.70	397	M252Y / N325A / N434Y
F806	3.1E-07	64.3	0.70	262	M252Y / N384A / N434Y
F807	3.2E-07	64.2	0.71	243	M252Y / N389A / N434Y
F808	3.2E-07	64.1	0.69	274	M252Y / N389A / N390A / N434Y
F809	2.2E-07	63.3	0.56	202	M252Y / S254T / T256S / N434Y
F810	2.2E-07	65.2	0.68	360	M252Y / A378V / N434Y
F811	4.9E-07	59.4	1.03	301	M252Y / E380S / N434Y
F812	2.7E-07	62.8	0.69	267	M252Y / E382V / N434Y
F813	2.8E-07	64.3	0.77	284	M252Y / S424E / N434Y
F814	1.2E-07	63.3	0.90	188	M252Y / N434Y / Y436I
F815	5.5E-07	62.4	0.65	218	M252Y / N434Y / T437R
F816	3.6E-07	63.1	0.73	503	P238D / T250V / M252Y / T307P / N434Y
F817	9.8E-08	60.6	0.78	543	P238D / T250V / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y

[0899]

F819	1.4E-07	49.1	0.74	384	P238D / M252Y / N286E / N434Y
F820	3.4E-07	70.4	0.56	312	L235K / S239K / M252Y / N434Y
F821	3.1E-07	71	0.67	309	L235R / S239K / M252Y / N434Y
F823	1.1E-06	44.2	10.39	367	P238D / T250Y / M252Y / W313F / N434Y
F828	2.5E-06	60.8	0.80	361	P238D / T250V / M252Y / I253V / N434Y
F831	1.6E-06	59.1	0.70	333	P238D / T250V / M252Y / R255A / N434Y
F832	2.6E-06	52.6	1.46	290	P238D / T250V / M252Y / R255D / N434Y
F833	8.0E-07	56.6	0.82	343	P238D / T250V / M252Y / R255E / N434Y
F834	8.1E-07	55	0.96	386	P238D / T250V / M252Y / R255F / N434Y
F836	5.0E-07	58.9	0.66	317	P238D / T250V / M252Y / R255H / N434Y
F837	5.6E-07	49.1	2.06	365	P238D / T250V / M252Y / R255I / N434Y
F838	4.3E-07	56.2	1.02	351	P238D / T250V / M252Y / R255K / N434Y
F839	3.4E-07	58.1	0.76	376	P238D / T250V / M252Y / R255L / N434Y
F840	4.2E-07	56.6	0.77	379	P238D / T250V / M252Y / R255M / N434Y
F841	1.1E-06	59.6	0.70	330	P238D / T250V / M252Y / R255N / N434Y
F843	6.6E-07	57.2	0.72	343	P238D / T250V / M252Y / R255Q / N434Y
F844	1.3E-06	58.3	0.69	347	P238D / T250V / M252Y / R255S / N434Y
F847	3.4E-07	47.1	3.82	355	P238D / T250V / M252Y / R255W / N434Y
F848	8.3E-07	55.7	0.87	368	P238D / T250V / M252Y / R255Y / N434Y

[0900]

F849	3.3E-07	61.1	0.84	331	M252Y / D280A / N434Y
F850	2.9E-07	62.2	0.64	310	M252Y / D280E / N434Y
F852	3.3E-07	61.8	0.61	285	M252Y / D280G / N434Y
F853	3.2E-07	58.4	2.55	302	M252Y / D280H / N434Y
F855	3.2E-07	52.9	6.55	366	M252Y / D280K / N434Y
F858	3.2E-07	62.6	0.60	357	M252Y / D280N / N434Y
F860	3.3E-07	61.1	0.82	365	M252Y / D280Q / N434Y
F861	3.2E-07	49.2	9.26	363	M252Y / D280R / N434Y
F862	3.0E-07	61	0.72	310	M252Y / D280S / N434Y
F863	2.7E-07	55.3	16.98	326	M252Y / D280T / N434Y
F867	2.8E-07	64.4	0.75	262	M252Y / N384A / N389A / N434Y
F870	7.3E-08	69.9	0.93	499	L235K / S239K / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y
F871	7.1E-08	70.7	0.92	495	L235R / S239K / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y
F872	1.3E-07	68.8	0.85	374	L235K / S239K / M252Y / N286E / N434Y
F873	1.2E-07	69	0.92	371	L235R / S239K / M252Y / N286E / N434Y
F875	4.8E-07	63.7	0.88	165	M252Y / N434Y / Y436A
F877	8.3E-07	65.2	0.99	147	M252Y / N434Y / Y436E
F878	1.9E-07	65	0.68	210	M252Y / N434Y / Y436F
F879	9.2E-07	64.2	0.89	172	M252Y / N434Y / Y436G
F880	3.9E-07	65	0.81	170	M252Y / N434Y / Y436H
F881	3.1E-07	62.7	0.93	183	M252Y / N434Y / Y436K
F882	1.3E-07	64	1.04	188	M252Y / N434Y / Y436L
F883	2.1E-07	64.5	0.83	222	M252Y / N434Y / Y436M
F884	4.0E-07	64.1	0.84	177	M252Y / N434Y / Y436N
F888	4.8E-07	63.9	0.83	163	M252Y / N434Y / Y436S
F889	2.2E-07	63.4	0.84	171	M252Y / N434Y / Y436T
F890	1.1E-07	63.4	0.73	200	M252Y / N434Y / Y436V
F891	1.7E-07	62.9	2.54	208	M252Y / N434Y / Y436W
F892	7.1E-08	63.9	1.83	159	M252Y / S254T / N434Y / Y436I

[0901]

F893	9.8E-08	70.2	0.73	257	L235K / S239K / M252Y / N434Y / Y436I
F894	9.2E-08	70.6	0.87	253	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436I
F895	2.1E-08	68.7	0.76	573	L235K / S239K / M252Y / N286E / T307Q / Q311A / N315E / N434Y
F896	2.0E-08	68.7	0.65	569	L235R / S239K / M252Y / N286E / T307Q / Q311A / N315E / N434Y
F897	9.7E-08	64.6	0.87	262	M252Y / N315D / N384A / N389A / N434Y
F898	1.7E-07	64.1	0.92	283	M252Y / N315E / N384A / N389A / N434Y
F899	1.1E-07	58.4	0.72	243	M252Y / N315D / G316A / N434Y
F900	1.7E-07	52.3	2.50	243	M252Y / N315D / G316D / N434Y
F901	1.3E-07	55.6	0.67	243	M252Y / N315D / G316E / N434Y
F902	2.2E-07	57.2	0.90	266	M252Y / N315D / G316F / N434Y
F903	2.3E-07	58.6	0.84	243	M252Y / N315D / G316H / N434Y
F904	1.0E-07	48.6	3.34	266	M252Y / N315D / G316I / N434Y
F905	1.3E-07	54.7	0.70	243	M252Y / N315D / G316K / N434Y
F906	1.5E-07	54	0.59	266	M252Y / N315D / G316L / N434Y
F907	1.3E-07	55.8	0.62	266	M252Y / N315D / G316M / N434Y
F908	1.5E-07	58.1	0.87	243	M252Y / N315D / G316N / N434Y
F910	1.4E-07	55.8	0.68	243	M252Y / N315D / G316Q / N434Y
F911	1.3E-07	56.3	0.71	243	M252Y / N315D / G316R / N434Y
F912	1.2E-07	59.1	0.57	243	M252Y / N315D / G316S / N434Y
F913	1.1E-07	53.6	0.58	243	M252Y / N315D / G316T / N434Y
F914	1.5E-07	48.9	2.04	266	M252Y / N315D / G316V / N434Y
F915	2.3E-07	54.8	0.61	243	M252Y / N315D / G316W / N434Y
F917	2.5E-07	63.4	0.64	314	M252Y / N286S / N434Y
F918	2.8E-07	61.8	0.72	329	M252Y / D280E / N384A / N389A / N434Y
F919	3.3E-07	61.7	0.67	303	M252Y / D280G / N384A / N389A / N434Y
F920	2.5E-07	63.3	0.72	332	M252Y / N286S / N384A / N389A / N434Y

[0902]

F921	1.2E-07	62.3	0.74	324	M252Y / N286E / N384A / N389A / N434Y
F922	5.9E-08	69	0.88	319	L235K / S239K / M252Y / N286E / N434Y / Y436I
F923	6.0E-08	68.9	0.87	316	L235R / S239K / M252Y / N286E / N434Y / Y436I
F924	3.4E-08	70.5	0.78	444	L235K / S239K / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Y436I
F925	3.2E-08	70.8	0.75	440	L235R / S239K / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Y436I
F926	1.1E-07	70.6	0.87	228	L235K / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436I
F927	1.0E-07	70.8	0.80	224	L235R / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436I
F928	2.9E-08	63.9	0.76	375	M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Y436I
F929	2.9E-08	64.2	0.87	346	M252Y / S254T / T307Q / Q311A / N434Y / Y436I
F930	1.4E-07	58.6	0.78	419	P238D / T250V / M252Y / N286E / N434Y
F931	1.2E-07	60.1	1.00	301	P238D / T250V / M252Y / N434Y / Y436I
F932	3.2E-07	69.7	0.60	278	T250V / M252Y / N434Y
F933	3.0E-07	63.2	0.67	323	L234R / P238D / T250V / M252Y / N434Y
F934	3.1E-07	63.2	0.70	361	G236K / P238D / T250V / M252Y / N434Y
F935	3.2E-07	64.2	0.61	354	G237K / P238D / T250V / M252Y / N434Y
F936	3.2E-07	64.2	0.73	382	G237R / P238D / T250V / M252Y / N434Y
F937	3.1E-07	66.2	0.65	320	P238D / S239K / T250V / M252Y / N434Y
F938	1.6E-07	69.9	0.85	269	L235K / S239K / M252Y / N434Y / Y436V

[0903]

F939	1.5E-07	70	0.83	265	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V
F940	1.5E-07	59.9	1.04	313	P238D / T250V / M252Y / N434Y / Y436V
F941	1.2E-08	61.4	1.17	449	M252Y / N286E / T307Q / Q311A / N434Y / Y436V
F942	4.2E-08	70.3	0.98	455	L235K / S239K / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Y436V
F943	4.0E-08	70.4	0.77	452	L235R / S239K / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Y436V
F944	1.7E-07	69.2	1.06	235	T250V / M252Y / N434Y / Y436V
F945	1.7E-08	61	0.95	416	T250V / M252Y / V308P / N434Y / Y436V
F946	4.3E-08	69	1.25	421	T250V / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Y436V
F947	1.1E-08	60.5	1.18	376	T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V
F954	5.3E-07	62.5	3.12	217	M252Y / N434Y / H435K / Y436V
F957	7.7E-07	62.4	3.82	186	M252Y / N434Y / H435N / Y436V
F960	8.0E-07	62.3	1.36	191	M252Y / N434Y / H435R / Y436V
F966	3.1E-07	63.1	1.06	246	M252Y / S254A / N434Y
F970	2.5E-06	64.8	0.90	214	M252Y / S254G / N434Y
F971	2.6E-06	64.7	0.75	230	M252Y / S254H / N434Y
F972	2.6E-07	58.7	2.25	239	M252Y / S254I / N434Y
F978	1.3E-06	63.4	0.82	235	M252Y / S254Q / N434Y
F980	1.8E-07	59.7	0.81	261	M252Y / S254V / N434Y
F987	4.0E-08	59.5	0.87	500	P238D / T250V / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Y436V
F988	6.9E-08	56.8	1.08	375	P238D / T250V / M252Y / N286E / N434Y / Y436V
F989	1.4E-08	61.6	0.82	446	L235R / S239K / M252Y / V308P / N434Y / Y436V
F990	9.4E-09	61	0.88	406	L235R / S239K / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V

[0904]

F991	1.3E-08	68.4	1.24	514	L235R / S239K / M252Y / N286E / T307Q / Q311A / N434Y / Y436V
F992	5.1E-08	66.7	1.34	495	L235R / S239K / M252Y / T307Q / Q311A / M428I / N434Y / Y436V
F993	3.8E-08	63.4	0.93	387	M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Y436V
F994	2.8E-07	67	0.67	333	M252Y / N325G / N434Y
F995	2.9E-07	59.9	0.71	279	L235R / P238D / S239K / M252Y / N434Y
F996	1.3E-07	58.6	1.04	235	L235R / P238D / S239K / M252Y / N434Y / Y436V
F997	3.8E-07	69.1	2.40	300	K248I / T250V / M252Y / N434Y / Y436V
F998	8.5E-07	66.2	2.51	262	K248Y / T250V / M252Y / N434Y / Y436V
F999	2.1E-07	67.4	1.13	273	T250V / M252Y / E258H / N434Y / Y436V
F1008	1.7E-07	74.5	1.18	300	L235R / S239K / T250V / M252Y / N434Y / Y436V
F1009	1.2E-08	66.6	0.37	441	L235R / S239K / T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V
F1010	1.9E-07	70.6	0.29	513	L235R / S239K / M252Y / T307A / Q311H / N434Y
F1011	4.5E-08	62.2	0.43	459	T250V / M252Y / V308P / N434Y
F1012	4.7E-08	67.9	0.31	524	L235R / S239K / T250V / M252Y / V308P / N434Y
F1013	3.0E-08	61.8	0.44	419	T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y
F1014	3.2E-08	67.2	0.40	485	L235R / S239K / T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y
F1015	2.2E-08	63	0.34	450	L235R / S239K / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y
F1016	3.8E-09	58.5	0.61	438	T250V / M252Y / N286E / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V

[0905]

F1017	4.2E-09	65.1	0.56	504	L235R / S239K / T250V / M252Y / N286E / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V
F1018	3.2E-09	60	0.52	469	L235R / S239K / M252Y / N286E / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V
F1019	3.4E-07	62.4	0.45	446	P238D / T250V / M252Y / N325G / N434Y
F1020	8.5E-08	63	0.54	633	P238D / T250V / M252Y / T307Q / Q311A / N325G / N434Y
F1021	3.3E-07	61.9	0.47	510	P238D / T250V / M252Y / N325A / N434Y
F1026	8.4E-08	63.3	0.47	404	M252Y / T307A / Q311H / N434Y / Y436V
F1027	8.6E-08	70.1	0.39	469	L235R / S239K / M252Y / T307A / Q311H / N434Y / Y436V
F1032	4.3E-08	61.7	0.67	589	P238D / T250V / M252Y / T307Q / Q311A / N325G / N434Y / Y436V
F1033	1.0E-06	58.1	1.89	169	P238D / N434W
F1034	1.5E-08	61.1	0.83	450	L235K / S239K / M252Y / V308P / N434Y / Y436V
F1035	1.0E-08	60.1	1.69	410	L235K / S239K / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V
F1036	1.4E-08	68.9	0.87	518	L235K / S239K / M252Y / N286E / T307Q / Q311A / N434Y / Y436V
F1037	6.1E-08	67.7	1.44	498	L235K / S239K / M252Y / T307Q / Q311A / M428I / N434Y / Y436V
F1038	2.8E-07	60.3	0.78	264	L235K / P238D / S239K / M252Y / N434Y
F1039	1.3E-07	58.9	0.81	220	L235K / P238D / S239K / M252Y / N434Y / Y436V
F1040	2.0E-07	74.4	1.08	304	L235K / S239K / T250V / M252Y / N434Y / Y436V

[0906]

F1041	1.4E-08	63.5	0.84	445	L235K / S239K / T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V
F1042	2.0E-07	70.3	0.82	516	L235K / S239K / M252Y / T307A / Q311H / N434Y
F1043	5.2E-08	64.8	0.64	528	L235K / S239K / T250V / M252Y / V308P / N434Y
F1044	3.5E-08	64	0.53	488	L235K / S239K / T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y
F1045	2.5E-08	62.8	0.59	453	L235K / S239K / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y
F1046	4.5E-09	64.5	0.96	507	L235K / S239K / T250V / M252Y / N286E / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V
F1047	3.4E-09	60	0.96	472	L235K / S239K / M252Y / N286E / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V
F1048	9.9E-08	69.9	1.16	473	L235K / S239K / M252Y / T307A / Q311H / N434Y / Y436V
F1050	3.5E-09	58.2	0.90	481	T250V / M252Y / N286E / T307Q / V308P / Q311A / M428I / N434Y / Y436V
F1051	3.9E-09	65	0.72	547	L235R / S239K / T250V / M252Y / N286E / T307Q / V308P / Q311A / M428I / N434Y / Y436V
F1052	3.2E-09	59.6	1.08	512	L235R / S239K / M252Y / N286E / T307Q / V308P / Q311A / M428I / N434Y / Y436V
F1058	1.3E-07	63.7	0.74	214	M252Y / Q386E / N434Y / Y436V
F1059	1.4E-07	63.1	0.63	214	M252Y / Q386R / N434Y / Y436V
F1060	1.4E-07	63.3	0.62	214	M252Y / Q386S / N434Y / Y436V
F1061	1.2E-07	64.7	0.60	200	M252Y / P387E / N434Y / Y436V
F1062	1.2E-07	61	0.58	208	M252Y / P387R / N434Y / Y436V
F1063	1.4E-07	63	0.58	214	M252Y / P387S / N434Y / Y436V
F1064	1.3E-07	63	0.73	200	M252Y / V422E / N434Y / Y436V

	F1065	1.4E-07	62.9	0.54	242	M252Y / V422R / N434Y / Y436V
	F1066	1.4E-07	62.9	0.75	223	M252Y / V422S / N434Y / Y436V
	F1067	1.3E-07	63.5	0.73	241	M252Y / S424E / N434Y / Y436V
	F1068	1.7E-07	62.7	0.47	250	M252Y / S424R / N434Y / Y436V
	F1069	1.4E-07	62.9	0.87	186	M252Y / N434Y / Y436V / Q438E
	F1070	1.7E-07	62.9	0.62	209	M252Y / N434Y / Y436V / Q438R
	F1071	1.2E-07	63.1	0.57	235	M252Y / N434Y / Y436V / Q438S
	F1072	1.3E-07	63.3	0.75	133	M252Y / N434Y / Y436V / S440E
	F1073	1.3E-07	63	0.56	166	M252Y / N434Y / Y436V / S440R
	F1074	1.3E-07	57.7	0.67	200	S239D / M252Y / N434Y / Y436V
	F1075	1.4E-07	58.8	0.74	237	M252Y / K326D / L328Y / N434Y / Y436V
	F1076	1.3E-07	52.8	0.55	237	S239D / M252Y / K326D / L328Y / N434Y / Y436V
	F1077	2.0E-06	58	2.77	271	K248N / M252Y / N434Y
	F1078	4.7E-07	57.3	1.26	324	M252Y / F380N / F382S / N434Y
[0907]	F1079	3.4E-07	62.2	0.75	270	M252Y / E382N / N384S / N434Y
	F1080	3.2E-07	64	0.66	286	M252Y / S424N / N434Y
	F1081	6.2E-07	63.6	0.93	169	M252Y / N434Y / Y436N / Q438T
	F1082	2.8E-07	64.5	8.15	261	M252Y / N434Y / Q438N
	F1083	3.5E-07	64	0.81	188	M252Y / N434Y / S440N
	F1094	2.6E-07	63.8	0.61	230	M252Y / N434Y / S442N
	F1095	2.9E-07	64.3	0.64	265	M252Y / S383N / G385S / N434Y
	F1096	2.7E-07	64.3	0.66	257	M252Y / Q386T / N434Y
	F1097	2.8E-07	64.2	0.69	279	M252Y / G385N / P387S / N434Y
	F1098	2.6E-07	58.9	0.63	243	S239D / M252Y / N434Y
	F1099	2.6E-07	60	0.48	280	M252Y / K326D / L328Y / N434Y
	F1100	2.4E-07	54.5	0.61	280	S239D / M252Y / K326D / L328Y / N434Y
	F1101	6.6E-08	59.4	0.47	430	S239D / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y
	F1102	6.5E-08	60.2	0.58	467	M252Y / T307Q / Q311A / K326D / L328Y / N434Y

[0908]

F1103	6.1E-08	54.8	0.83	467	S239D / M252Y / T307Q / Q311A / K326D / L328Y / N434Y
F1104	1.8E-07	62.9	0.61	242	M252Y / V422E / S424R / N434Y / Y436V
F1105	1.5E-07	62.6	0.59	258	M252Y / V422S / S424R / N434Y / Y436V
F1106	1.4E-07	63.1	0.60	158	M252Y / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1107	1.2E-07	63.2	0.75	208	M252Y / V422D / N434Y / Y436V
F1108	1.3E-07	63.2	0.59	234	M252Y / V422K / N434Y / Y436V
F1109	1.3E-07	63.4	0.58	200	M252Y / V422T / N434Y / Y436V
F1110	1.3E-07	63.4	0.61	208	M252Y / V422Q / N434Y / Y436V
F1111	1.6E-07	63.1	0.65	242	M252Y / S424K / N434Y / Y436V
F1112	1.2E-07	63.1	0.57	209	M252Y / N434Y / Y436V / Q438K
F1113	1.2E-07	63.6	0.68	133	M252Y / N434Y / Y436V / S440D
F1114	1.3E-07	63.5	0.57	145	M252Y / N434Y / Y436V / S440Q
F1115	1.3E-07	64	0.75	243	M252Y / S424N / N434Y / Y436V
F1116	7.4E-08	64.4	0.58	473	M252Y / T307Q / Q311A / S424N / N434Y
F1117	4.9E-08	69.3	0.71	465	T250V / M252Y / T307Q / Q311A / S424N / N434Y / Y436V
F1118	1.3E-08	61	0.72	419	T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / S424N / N434Y / Y436V
F1119	1.0E-08	60.5	0.72	376	T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / V422E / N434Y / Y436V
F1120	1.0E-08	59.7	0.61	426	T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / S424R / N434Y / Y436V
F1121	1.0E-08	59.9	0.54	418	T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / V422E / S424R / N434Y / Y436V
F1122	1.4E-08	59.6	0.41	385	T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V / Q438R
F1123	9.5E-09	60.8	0.61	309	T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V / S440E

[0909]

F1124	1.2E-08	59.9	0.61	334	T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1125	5.2E-08	64.3	0.59	346	M252Y / T307Q / N434Y / Y436V
F1126	9.0E-08	64.3	0.58	412	M252Y / T307A / N434Y / Y436V
F1127	7.9E-08	62.8	0.53	338	M252Y / Q311A / N434Y / Y436V
F1128	1.2E-07	62.3	0.41	274	M252Y / Q311H / N434Y / Y436V
F1129	4.5E-08	63.2	0.51	315	M252Y / T307Q / Q311H / N434Y / Y436V
F1130	5.5E-08	63.7	0.54	453	M252Y / T307A / Q311A / N434Y / Y436V
F1131	1.3E-07	69.5	0.81	265	L235R / S239K / M252Y / V422E / N434Y / Y436V
F1132	1.4E-07	69.1	0.87	288	L235R / S239K / M252Y / V422S / N434Y / Y436V
F1133	1.6E-07	69.5	0.71	316	L235R / S239K / M252Y / S424R / N434Y / Y436V
F1134	1.7E-07	70.4	0.58	274	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V / Q438R
F1135	1.3E-07	69.8	0.72	198	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V / S440E
F1136	1.6E-07	68.5	0.74	308	L235R / S239K / M252Y / V422E / S424R / N434Y / Y436V
F1137	1.6E-07	69.4	0.82	323	L235R / S239K / M252Y / V422S / S424R / N434Y / Y436V
F1138	1.7E-07	70.5	0.67	223	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1139	1.5E-07	71.2	0.58	308	L235R / S239K / M252Y / S424N / N434Y / Y436V
F1140	1.6E-07	62.6	0.89	201	M252Y / V422E / S424R / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1141	1.8E-07	62.7	0.94	216	M252Y / V422S / S424R / N434Y / Y436V / Q438R / S440E

[0910]

F1142	1.9E-07	70	0.80	266	L235R / S239K / M252Y / V422E / S424R / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1143	2.0E-07	70.2	0.90	281	L235R / S239K / M252Y / V422S / S424R / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1144	1.4E-08	66.7	0.81	400	L235R / S239K / T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1145	5.2E-08	68.9	0.89	380	T250V / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1146	6.2E-08	75.6	0.85	445	L235R / S239K / T250V / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1147	7.2E-08	64.1	0.68	367	M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Q438R / S440E
F1148	7.6E-08	70.9	0.69	432	L235R / S239K / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Q438R / S440E
F1151	2.5E-07	71.3	0.52	352	L235R / S239K / M252Y / S424N / N434Y
F1152	7.4E-08	71.3	0.56	538	L235R / S239K / M252Y / T307Q / Q311A / S424N / N434Y
F1153	4.8E-08	76.7	0.90	530	L235R / S239K / T250V / M252Y / T307Q / Q311A / S424N / N434Y / Y436V
F1154	1.3E-08	67.6	0.68	484	L235R / S239K / T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / S424N / N434Y / Y436V
F1157	2.1E-07	64.2	0.13	180	M252Y / N434Y / Q438R / S440E
F1158	2.4E-07	70.9	0.67	245	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Q438R / S440E
F1159	4.8E-07	67.9	0.54	134	S424N / N434W
F1160	2.9E-07	54	2.75	370	V308F / S424N / N434Y
F1161	1.1E-06	67.3	0.77	157	I332V / S424N / N434Y

[0911]

F1162	3.4E-07	58.1	0.93	313	P238D / T250Y / M252Y / N434Y / Y436V
F1163	1.5E-07	60.2	0.84	543	P238D / T250Y / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y
F1164	7.0E-08	58.2	0.91	500	P238D / T250Y / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Y436V
F1165	1.6E-08	46.6	1.26	454	P238D / T250Y / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V
F1174	4.9E-07	60.3	1.38	145	P257I / N434H
F1176	2.0E-06	57	1.10	215	V308F
F1178	8.7E-07	60.1	1.09	353	V259I / V308F / M428L
F1183	1.3E-06	63.9	0.61	203	E380A / M428L / N434S
F1184	1.0E-06	70.1	0.40	329	T307A / M428L / N434S
F1185	9.2E-07	64.6	0.55	415	T307A / E380A / M428L / N434S
F1188	1.7E-06	64.3	0.56	322	T307A / E380A / N434H
F1189	1.6E-07	63	0.52	161	M252Y / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1190	2.4E-07	63.7	0.58	161	M252Y / H433E / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1191	2.1E-07	63	0.70	147	M252Y / N434Y / Y436V / T437A / Q438R / S440E
F1192	1.3E-07	62.3	0.82	133	M252Y / N434Y / Y436V / T437G / Q438R / S440E
F1194	1.6E-07	60.3	0.84	168	M252Y / N434Y / Y436V / Q438R / K439D / S440E
F1195	1.8E-07	60.5	2.91	156	M252Y / N434Y / Y436V / Q438R / S440E / L441A
F1196	1.5E-07	60.4	0.90	161	M252Y / N434Y / Y436V / Q438R / S440E / L441E
F1197	9.5E-08	63.2	0.48	129	M252Y / S254T / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1198	7.8E-08	60.8	0.68	67	M252Y / T256E / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1199	6.2E-08	61.2	0.74	67	M252Y / S254T / T256E / N434Y / Y436V / Q438R / S440E

[0912]

F1200	1.3E-07	68.8	0.68	164	T250V / M252Y / S254T / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1201	1.1E-07	66.3	0.97	101	T250V / M252Y / T256E / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1202	8.8E-08	66	0.77	101	T250V / M252Y / S254T / T256E / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1203	1.5E-07	62.4	0.60	90	M252Y / T256Q / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1204	1.2E-07	62.6	0.35	64	M252Y / S254T / T256Q / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1205	2.0E-07	68.4	0.87	125	T250V / M252Y / T256Q / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1206	1.7E-07	68.5	0.71	99	T250V / M252Y / S254T / T256Q / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1207	1.1E-06	59.6	0.70	116	I332E / M428L / N434S
F1208	5.7E-07	57.5	2.22	114	L251A / M252Y / N434Y / Y436V
F1211	1.2E-06	55.8	3.02	89	L251H / M252Y / N434Y / Y436V
F1216	1.2E-06	55.8	3.33	91	L251S / M252Y / N434Y / Y436V
F1217	1.1E-06	55.5	2.65	116	L251T / M252Y / N434Y / Y436V
F1218	2.5E-07	57.3	1.11	200	L251V / M252Y / N434Y / Y436V
F1229	2.8E-06	62.9	0.76	204	M252Y / I253V / N434Y / Y436V
F1230	1.1E-07	63.1	0.68	145	M252Y / N434Y / Y436V / Q438R / S440D
F1231	9.7E-08	63	0.87	145	M252Y / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1232	9.8E-08	63.2	0.86	145	M252Y / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1243	1.3E-07	70.6	0.73	194	L235R / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1244	1.0E-07	69.2	0.85	132	L235R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1245	8.2E-08	69.3	0.97	132	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / N434Y / Y436V / Q438R / S440E

[0913]

F1246	1.7E-07	75.1	0.74	229	L235R / S239K / T250V / M252Y / S254T / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1247	1.5E-07	72.9	1.20	167	L235R / S239K / T250V / M252Y / T256E / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1248	1.2E-07	73	0.94	167	L235R / S239K / T250V / M252Y / S254T / T256E / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1249	2.1E-07	70.5	0.78	155	L235R / S239K / M252Y / T256Q / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1250	1.7E-07	70.7	0.72	129	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256Q / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1251	2.8E-07	74.6	1.13	190	L235R / S239K / T250V / M252Y / T256Q / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1252	2.3E-07	75	0.90	164	L235R / S239K / T250V / M252Y / S254T / T256Q / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1253	1.1E-07	70.9	0.87	436	L235R / S239K / M252Y / T307A / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1254	6.4E-08	71.6	0.67	369	L235R / S239K / M252Y / T307Q / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1255	1.1E-07	69.9	0.74	362	L235R / S239K / M252Y / Q311A / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1256	1.6E-07	69.6	0.74	298	L235R / S239K / M252Y / Q311H / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1257	7.8E-08	70.5	0.83	477	L235R / S239K / M252Y / T307A / Q311A / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1258	1.1E-07	70.1	0.60	428	L235R / S239K / M252Y / T307A / Q311H / N434Y / Y436V / Q438R / S440E

[0914]

F1259	4.5E-08	71	0.79	410	L235R / S239K / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1260	6.5E-08	70.7	0.49	338	L235R / S239K / M252Y / T307Q / Q311H / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1261	1.4E-07	70.3	0.69	210	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V / Q438R / S440D
F1262	1.3E-07	70.1	0.70	210	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1263	1.2E-07	70.3	0.67	210	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1264	1.3E-07	68.6	0.67	206	L235R / S239K / M252Y / T256A / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1265	1.6E-07	65.8	0.72	182	L235R / S239K / M252Y / T256G / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1266	1.0E-07	69.7	0.70	210	L235R / S239K / M252Y / T256N / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1267	1.5E-07	69	0.73	226	L235R / S239K / M252Y / S254A / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1268	2.0E-07	70.3	0.70	226	L235R / S239K / M252Y / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1269	1.7E-07	70.5	0.80	212	L235R / S239K / M252Y / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1270	1.2E-07	69	0.66	212	L235R / S239K / M252Y / S254A / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1271	2.0E-07	69	0.69	228	L235R / S239K / M252Y / S254A / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1272	1.7E-07	69.2	0.86	215	L235R / S239K / M252Y / S254A / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1273	1.5E-07	70.4	0.79	142	L235R / S239K / M252Y / T256Q / N434Y / Y436V / Q438K / S440D

[0915]

F1274	2.5E-07	70.4	0.70	158	L235R / S239K / M252Y / T256Q / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1275	2.1E-07	70.7	0.78	144	L235R / S239K / M252Y / T256Q / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1276	1.0E-07	68.7	0.77	192	L235R / S239K / M252Y / T256A / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1277	1.7E-07	68.8	0.69	208	L235R / S239K / M252Y / T256A / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1278	1.4E-07	68.9	0.97	195	L235R / S239K / M252Y / T256A / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1279	1.2E-07	66.2	0.79	169	L235R / S239K / M252Y / T256G / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1280	2.1E-07	66.1	1.03	185	L235R / S239K / M252Y / T256G / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1281	1.7E-07	66.4	0.99	171	L235R / S239K / M252Y / T256G / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1282	7.7E-08	69.8	0.77	196	L235R / S239K / M252Y / T256N / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1283	1.3E-07	69.8	0.81	212	L235R / S239K / M252Y / T256N / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1284	1.1E-07	70	1.02	198	L235R / S239K / M252Y / T256N / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1285	9.4E-08	70.4	0.72	181	L235R / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1286	1.6E-07	70.4	0.86	197	L235R / S239K / M252Y / S254T / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E

[0916]

F1287	1.5E-07	71.2	0.63	183	L235R / S239K / M252Y / S254T / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1288	7.9E-08	68.8	0.92	118	L235R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1289	1.3E-07	68.8	0.76	134	L235R / S239K / M252Y / T256E / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1290	1.1E-07	69.2	0.91	121	L235R / S239K / M252Y / T256E / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1291	1.5E-07	70.4	0.62	275	L235R / S239K / M252Y / H433D / N434Y / Y436V
F1292	4.2E-07	71.1	0.66	95	L235R / S239K / H433D / N434W / Y436V / Q438R / S440E
F1293	1.6E-07	68.6	0.73	153	L235R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Q438R / S440E
F1294	2.0E-07	68.9	0.90	106	L235R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Y436T / Q438R / S440E
F1295	9.8E-08	68.7	0.81	128	L235R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Y436F / Q438R / S440E
F1296	2.3E-07	68.8	0.76	152	L235R / S239K / M252Y / T256E / H433D / N434Y / Q438R / S440E
F1297	2.5E-07	69.1	0.81	107	L235R / S239K / M252Y / T256E / H433D / N434Y / Y436T / Q438R / S440E
F1298	1.5E-07	69.1	0.82	106	L235R / S239K / M252Y / T256E / H433D / N434Y / Y436F / Q438R / S440E
F1299	1.5E-07	68.7	0.72	140	L235R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Q438K / S440D
F1300	1.6E-07	69	0.86	118	L235R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Y436T / Q438K / S440D
F1301	8.3E-08	69	0.85	140	L235R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Y436F / Q438K / S440D

[0917]

F1302	2.2E-07	69.2	0.75	138	L235R / S239K / M252Y / T256E / H433D / N434Y / Q438K / S440D
F1303	2.1E-07	69.1	0.81	119	L235R / S239K / M252Y / T256E / H433D / N434Y / Y436T / Q438K / S440D
F1304	1.2E-07	69.4	0.75	118	L235R / S239K / M252Y / T256E / H433D / N434Y / Y436F / Q438K / S440D
F1305	2.0E-07	70.8	0.77	212	L235R / S239K / M252Y / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440D
F1306	1.9E-07	70.5	0.70	238	L235R / S239K / M252Y / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1307	1.4E-07	69.5	0.68	337	L235R / S239K / M252Y / V422A / S424A / N434Y / Y436V
F1308	2.1E-07	68.5	0.56	345	L235R / S239K / M252Y / V422L / S424L / N434Y / Y436V
F1309	1.3E-07	70.2	0.83	284	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V / Q438A / S440A
F1310	2.3E-07	68.2	1.27	325	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V / Q438L / S440L
F1311	1.7E-07	70.6	0.59	347	L235R / S239K / M252Y / V422A / S424A / H433D / N434Y / Y436V
F1312	1.8E-07	70.4	0.55	355	L235R / S239K / M252Y / V422L / S424L / H433D / N434Y / Y436V
F1313	1.8E-07	70.5	0.75	300	L235R / S239K / M252Y / H433D / N434Y / Y436V / Q438A / S440A
F1314	2.3E-07	69.4	1.15	302	L235R / S239K / M252Y / H433D / N434Y / Y436V / Q438L / S440L
F1315	1.5E-07	67.5	0.67	258	G237K / S239K / M252Y / N434Y / Y436V
F1316	1.5E-07	67.7	0.70	260	G237R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V
F1317	1.4E-07	65.8	0.59	340	S239K / M252Y / P329K / N434Y / Y436V

[0918]

F1318	1.4E-07	66.2	0.57	317	S239K / M252Y / P329R / N434Y / Y436V
F1319	2.7E-07	60.2	0.54	310	M252Y / L328Y / N434Y
F1320	1.2E-07	70.5	0.71	181	L235R / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436V / Q438R / S440D
F1321	1.0E-07	70.4	0.73	181	L235R / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1322	1.6E-07	70.7	0.77	183	L235R / S239K / M252Y / S254T / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440D
F1323	1.5E-07	70.8	0.88	209	L235R / S239K / M252Y / S254T / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1324	1.3E-07	63.8	0.52	223	L234A / L235A / M252Y / N434Y / Y436V
F1325	2.1E-07	55.1	1.87	249	L234A / L235A / M252Y / N297A / N434Y / Y436V
F1326	1.1E-08	60.4	0.62	399	L234A / L235A / T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V
F1327	1.4E-08	48.2	0.91	425	L234A / L235A / T250V / M252Y / N297A / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V
F1328	1.5E-07	71.2	0.68	258	L235R / G236R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1329	1.3E-07	71.2	0.74	229	L235R / G236R / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1330	1.0E-07	69.8	0.80	167	L235R / G236R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1331	7.7E-08	70	0.90	167	L235R / G236R / S239K / M252Y / S254T / T256E / N434Y / Y436V / Q438R / S440E

[0919]

F1333	1.2E-07	70.4	0.60	300	L235R / G236R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V
F1334	1.0E-07	71.1	0.59	245	L235R / G236R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1335	8.8E-08	71.3	0.54	216	L235R / G236R / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1336	7.2E-08	69.8	0.84	153	L235R / G236R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1337	7.4E-08	68.9	0.69	118	L235R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1338	1.0E-07	69.2	0.84	146	L235R / S239K / M252Y / T256E / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1339	2.5E-07	69.5	0.59	144	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / H433D / N434Y / Y436T / Q438K / S440E
F1340	5.6E-08	69.1	0.76	118	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1341	3.2E-07	70.7	0.44	181	L235R / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436T / Q438K / S440E
F1342	2.5E-07	69.2	0.68	118	L235R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Y436T / Q438K / S440E
F1343	2.0E-07	69.1	0.56	118	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / N434Y / Y436T / Q438K / S440E
F1344	4.0E-07	70.5	0.53	210	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436T / Q438K / S440E
F1345	1.0E-07	71.2	0.77	245	L235R / G236R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1346	8.6E-08	71.3	0.70	216	L235R / G236R / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436V / Q438K / S440E

[0920]

F1347	7.1E-08	69.9	0.95	153	L235R / G236R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1348	5.5E-08	70.1	0.72	153	L235R / G236R / S239K / M252Y / S254T / T256E / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1349	3.4E-07	70.2	0.67	198	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436T / Q438R / S440E
F1350	1.2E-07	70.6	0.70	232	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436F / Q438K / S440E
F1351	1.6E-07	70.4	0.68	220	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436F / Q438R / S440E
F1352	3.9E-07	70.5	0.75	236	L235R / S239K / M252Y / H433D / N434Y / Y436T / Q438K / S440E
F1353	4.3E-07	70.4	0.73	199	L235R / S239K / M252Y / H433D / N434Y / Y436T / Q438R / S440E
F1354	2.3E-07	70.7	0.66	210	L235R / S239K / M252Y / H433D / N434Y / Y436F / Q438K / S440E
F1355	2.5E-07	70.8	0.64	198	L235R / S239K / M252Y / H433D / N434Y / Y436F / Q438R / S440E
F1356	1.6E-07	58.9	0.62	412	G236R / M252Y / L328R / N434Y / Y436V
F1357	2.8E-07	70.5	0.61	169	L235R / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436T / Q438R / S440E
F1358	9.1E-08	71	0.64	203	L235R / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436F / Q438K / S440E
F1359	1.3E-07	71.1	0.67	191	L235R / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436F / Q438R / S440E
F1360	3.1E-07	70.6	0.57	207	L235R / S239K / M252Y / S254T / H433D / N434Y / Y436T / Q438K / S440E
F1361	3.5E-07	70.5	0.63	170	L235R / S239K / M252Y / S254T / H433D / N434Y / Y436T / Q438R / S440E

[0921]

F1362	1.4E-07	71	0.67	181	L235R / S239K / M252Y / S254T / H433D / N434Y / Y436F / Q438K / S440E
F1363	1.9E-07	71	0.48	169	L235R / S239K / M252Y / S254T / H433D / N434Y / Y436F / Q438R / S440E
F1364	7.5E-08	69	0.84	140	L235R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Y436F / Q438K / S440E
F1365	3.1E-07	69.1	0.78	144	L235R / S239K / M252Y / T256E / H433D / N434Y / Y436T / Q438K / S440E
F1366	1.2E-07	69.3	0.71	118	L235R / S239K / M252Y / T256E / H433D / N434Y / Y436F / Q438K / S440E
F1367	1.8E-07	69.2	0.68	106	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / N434Y / Y436T / Q438R / S440E
F1368	5.5E-08	69	0.89	140	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / N434Y / Y436F / Q438K / S440E
F1369	7.6E-08	69.2	0.84	128	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / N434Y / Y436F / Q438R / S440E
F1370	9.1E-08	69.5	0.77	146	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1371	1.1E-07	69.1	0.51	134	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1372	2.3E-07	69.4	0.70	107	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / H433D / N434Y / Y436T / Q438R / S440E
F1373	8.7E-08	69.5	0.77	118	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / H433D / N434Y / Y436F / Q438K / S440E

[0922]

F1374	1.2E-07	69.3	0.54	106	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / H433D / N434Y / Y436F / Q438R / S440E
F1375	1.0E-07	69.9	0.47	236	L235R / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436V
F1376	9.1E-08	68.7	0.70	173	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / N434Y / Y436V
F1377	8.3E-08	68.4	0.73	173	L235R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Y436V
F1378	3.6E-07	70.6	0.65	236	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436T
F1379	2.8E-07	71.1	0.68	275	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436F
F1410	1.9E-06	61.1	0.59	183	V308P / I332V
F1411	1.7E-07	60.2	0.55	299	V308P / I332V / M428L / N434S
F1413	3.7E-08	68.3	2.19	332	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / T307Q / Q311A / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1414	5.6E-08	69.7	0.76	292	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / T307Q / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1415	5.9E-08	68.4	2.01	284	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / Q311A / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1416	1.3E-08	60.1	1.20	327	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / V308P / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1417	5.9E-08	68.6	1.72	121	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / H433D / N434W / Y436V / Q438K / S440E
F1418	7.5E-08	68.4	1.25	134	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / H433D / N434W / Y436V / Q438R / S440E
F1419	1.5E-07	69.5	0.71	226	L235R / S239K / M252Y / H433D / N434W / Y436V / Q438R / S440E

[0923]

F1420	1.3E-07	69.5	0.70	212	L235R / S239K / M252Y / H433D / N434W / Y436V / Q438K / S440E
F1421	3.2E-08	58.9	2.59	348	V308P / M428L / N434W
F1422	1.9E-08	59.8	1.27	315	L235R / S239K / M252Y / T256E / V308P / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1423	1.6E-08	45.4	4.03	157	L235R / S239K / M252Y / T256E / V302D / V308P / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1424	1.6E-08	49	0.90	159	L235R / S239K / M252Y / T256E / V302E / V308P / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1425	1.9E-08	49.4	2.04	185	L235R / S239K / M252Y / T256E / V303D / V308P / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1426	1.8E-08	59.7	1.53	212	L235R / S239K / M252Y / T256E / V303E / V308P / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1428	1.5E-08	45	8.91	243	L235R / S239K / M252Y / T256E / S304E / V308P / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1430	3.1E-08	48.6	1.97	156	L235R / S239K / M252Y / T256E / V305E / V308P / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1433	4.5E-08	46.2	9.04	181	L235R / S239K / M252Y / T256E / T307D / V308P / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1434	3.6E-08	49.5	2.54	206	L235R / S239K / M252Y / T256E / T307E / V308P / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E

[0924] 各自包含如上所述制备的重链和L(WT)-CK(SEQ ID NO:2)的变体(IgG1-F600-IgG-F1434)通过WO2011/122011的参比实施例2中描述的本领域技术人员已知的方法表达和纯化。

[0925] 1-2.采用Biacore评价Fc变体的FcRn结合亲和力

[0926] 采用Biacore T100(GE Healthcare)评价实施例1制备的新的Fc变体(F600-F1434)和WO2011/122011的实施例1制备的之前的Fc变体 (F1-F599)的hFcRn结合亲和力。为此,按照参比实施例A2所述制备人FcRn。通过氨基偶联方法,将适量的蛋白质L(ACTIGEN)固定在Sensor芯片CM4(GE Healthcare),并使芯片俘获目标抗体。然后,注入稀释的FcRn溶液和运行缓冲液(作为参比溶液)以供人FcRn与传感器芯片上俘获的抗体相互作用。所用的

运行缓冲液包含50mmol/l磷酸钠、150mmol/lNaCl和0.05％(w/v)Tween20(pH7.0)。将FcRn用各缓冲液稀释。芯片使用10mmol/l甘氨酸-HCl(pH1.5)再生。全部均在25℃下进行测定。根据在测定中获得的传感图计算结合速率常数ka(1/Ms)和解离速率常数k_d(1/s)，其二者皆为动力学参数，从这些值求出各抗体对人FcRn的KD(M)。应用BiacoreT100评价软件(GE Healthcare)计数各个参数。表16显示了所有Fc变体的结合亲和力。

[0927] 1-3.采用差示扫描荧光测定法(DSF)评价Fc变体的稳定性

[0928] 采用差示扫描荧光测定法(DSF)评价实施例1制备的新的Fc变体(F600-F1434)和WO2011/122011的实施例1制备的之前的Fc变体(F1-F599)的稳定性。该方法包括在逐步递增温度下测量极性敏感探针的荧光强度，并获得暴露蛋白质疏水区的转变温度。已报道了采用DSF获得的转变温度与采用差示扫描量热法获得的熔解温度有良好的相关性(Journal of Pharmaceutical Science2010;4:1707-1720)。将SYPRO橙染料(Molecular Probes)在PBS(Sigma)中稀释，并加入蛋白质溶液中。各样品与20微升的染料溶液一起使用。以470nm为固定激发波长，在555nm下收集荧光发射。在DSF实验期间，温度以0.4℃增幅从30℃增加至99℃，在测量前在各温度下的平衡时间为6秒钟。应用Rotor-Gene Q Series软件(QIAGEN)分析数据。荧光转换的温度定义为熔解温度(Tm)。表16中显示了Fc变体F1-F1434的Tm值。

[0929] 1-4.采用大小排阻层析法(SEC)评价Fc变体的纯度

[0930] 采用大小排阻层析法(SEC)，评价实施例1制备的新的Fc变体(F600-F1434)和WO2011/122011的实施例1制备的之前的Fc变体(F1-F599)的高分子量物类百分比(HMW(％))。SEC在ACQUITY UPLC H-Class系统(Waters)中进行。将抗体注入BEH200SEC柱(1.7微米，4.6x150mm，waters)中。流动相为0.05M磷酸钠，0.3M氯化钠(pH7.0，Isekyu)，以0.3mL/分钟的流速等度运行。通过215nm下的UV吸光度检测洗脱的蛋白质。采用Empower2(waters)分析数据。以HMW组分百分位数记录比抗体单体峰早洗脱出的峰。表16显示了所有Fc变体(F1-F1434)的HMW(％)。

[0931] 1-5.应用计算机模拟(insilico)的免疫原性预测工具Epibase评价Fc变体的免疫原性风险

[0932] 治疗性抗体的临床效用和功效可能受抗药抗体(ADA)产生的限制，因为ADA可影响其功效和药代动力学，并且有时导致严重的副作用。虽然许多因素影响治疗性抗体的免疫原性，但多份报告描述了存在于治疗性蛋白质上的效应T细胞表位的重要性。

[0933] 开发出预测T细胞表位的计算机模拟工具，例如Epibase(Lonza)、iTope/TCED(Antitope)和EpiMatrix(EpiVax)。通过应用这些计算机模拟工具，可预测各氨基酸序列中存在的T细胞表位(Expert Opin Biol Ther.2007年3月;7(3):405-18.)，以供评价Fc变体潜在的免疫原性。应用Epibase Light(Lonza)评价Fc变体的潜在免疫原性。

[0934] Epibase Light(Lonza)是应用FASTER算法(Expert Opin Biol Ther.2007年3月;7(3):405-18)计算9聚体肽对主要DRB1等位基因的结合亲和力的计算机模拟工具。Epibase Light(Lonza)鉴定出对MHCII类具有强结合和中等结合的T细胞表位。应用并入Epibase Light(Lonza)系统的下式，计算各Fc变体的计算机模拟免疫原性评分。免疫原性评分＝求和((各DRB1同种异型群频率)x(关键表位的数目))。

[0935] 对于用于该公式的DRB1同种异型群频率，使用基于高加索人群的下列DRB1同种异

型群频率。

[0936] DRB1*0701(25.3%),DRB1*1501(23.1%),DRB1*0301(21.7%),DRB1*0101(15.3%),DRB1*0401(13.8%),DRB1*1101(11.8%),DRB1*1302(8.0%),DRB1*1401(4.9%),DRB1*0403(2.3%), DRB1*0901(1.8%)。

[0937] 对通过FASTER算法鉴定的变体恒定区(CH1-铰链-CH2-CH3)的任何强结合和中等结合表位的总数用作该公式中的关键表位的数目。过滤表位(filtered epitope)是具有人抗体种系序列或可变区与恒定区间的连接区的表位,在免疫原性评分计算中仅考虑非过滤表位(以关键表位计数)。

[0938] 应用上述Epibase Light(Lonza)系统计算实施例1中描述的新的Fc变体(F600-F1434)和WO2011/122011的实施例1中描述的之前的Fc变体(F1-F599)的氨基酸序列的免疫原性评分。表16中显示了所有Fc变体(F1-F1434)的免疫原性评分。

[0939] [实施例2]鉴定具有高稳定性、低高分子量物类和低免疫原性风险的FcRn结合改进的Fc变体

[0940] 2-1.将Tm、HMW(%)和免疫原性评分针对hFcRn结合亲和力作图对之前的和新的Fc变体进行分析

[0941] 对WO2011/122011的实施例1中描述的之前的Fc变体(F1-F599)和实施例1中产生和评价的新的Fc变体(F600-F1052)的hFcRn结合亲和力和Tm作图,并在图2中显示。对之前的和新的Fc变体的hFcRn结合亲和力和HMW(%)作图,并在图3中显示。对Fc变体F1-F599和新的Fc变体(F600-F1052)的hFcRn结合亲和力和免疫原性评分作图,并在图4中显示。

[0942] 从图中删除具有Ser239Lys或Asp270Phe突变的新的Fc变体(F600-F1052)和之前的Fc变体(F1-F599)变体。因为在下面第1-4组的详细分析中,Ser239Lys和Asp270Phe突变改进稳定性(Tm),然而不改进FcRn结合亲和力并且降低对所有人Fcγ受体的结合亲和力,因此应在既无Ser239Lys又无Asp270Phe突变的变体内比较Fc变体的稳定性。

[0943] 另外,从图中删除具有Pro257Xxx(Xxx为Ala或Val或Ile或Leu或Thr)或Met252Trp突变的新的Fc变体(F600-F1052)和之前的Fc变 体(F1-F599)变体,尽管这些变体改进FcRn结合亲和力。Pro257Xxx和Met252Trp突变不显示Tm的显著下降,这表明了具有Pro257Xxx和Met252Trp突变的变体具有高的稳定性。然而,具有Pro257Xxx或Met252Trp突变的这些变体在加速稳定性研究期间或当冷藏保存时显示明显的聚集和沉淀。由于其不利的稳定性,因此具有Pro257Xxx和Met252Trp突变的Fc变体对于药物开发是不可接受的,因而,在下面第1-4组的详细分析中,应从图中删除这类Fc变体。

[0944] 2-2.第1组(对hFcRn的结合亲和力强于15nM)的详细分析

[0945] 通过对X轴hFcRn结合亲和力与Y轴上的Tm、HMW(%)和免疫原性评分作图,对具有强于15nM的对hFcRn的结合亲和力的实施例1中产生和评价的新的Fc变体(F600-F1052)和WO2011/122011的实施例1中描述的之前的Fc变体(F1-F599)(下文称为第1组)进行了详细分析。

[0946] 通过对X轴的hFcRn结合亲和力(KD强于15nM)和Y轴的Tm、HMW(%)和免疫原性评分作图进行的第1组的详细分析分别见图5、6和7。

[0947] 至于第1组中的Fc变体的可开发性标准,Tm标准设置为高于57.5℃,HMW(%)标准设置为低于2%,免疫原性评分设置为低于500。

[0948] 满足全部可开发性标准(Tm高于57.5℃、HMW(%)低于2%和免疫原性评分低于500)的第1组的Fc变体见表17。

[0949] [表17]

[0950]

变体名称	hFcRn KD (M)	Tm (°C)	HMW (%)	免疫原性评分	突变
F941	1.2E-08	61.4	1.2	449	M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F947	1.1E-08	60.5	1.2	376	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1016	3.8E-09	58.5	0.6	438	T250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1050	3.5E-09	58.2	0.9	481	T250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y/Y436V

[0951] 之前的Fc变体(F1-F599)无一的亲和力强于15nM,而实施例1中产生的几个新的Fc变体强于15nM并满足所有的可开发性标准。尤其当与pH依赖性抗原结合结构域联用时,表17中描述的这类第1组新的Fc变体对于使得能够从血浆中极快速和大规模地消除抗原的Fc结构域是极有用的。

[0952] 2-3.第2组(对hFcRn的结合亲和力介于15nM和50nM之间)的详细分析

[0953] 通过对X轴上的hFcRn结合亲和力和Y轴上的Tm、HMW(%)和免疫原性评分作图,对具有介于15nM和50nM之间的对hFcRn的结合亲和力的实施例1中产生和评价的新的Fc变体(F600-F1052)和WO2011/122011的实施例1中描述的之前的Fc变体(F1-F599)(下文称为“第2组”)进行了详细分析。

[0954] 通过对x轴上的hFcRn结合亲和力(KD介于15nM和50nM之间)和Y轴上的Tm、HMW(%)或免疫原性评分作图对第2组进行的详细分析分别见图8、9和10。

[0955] 至于第2组中的Fc变体的可开发性标准,Tm标准设置为高于60℃,HMW(%)标准设置为低于2%,免疫原性评分设置为低于500。

[0956] 满足全部可开发性标准(Tm高于60℃、HMW(%)低于2%和免疫原性评分低于500)的第2组中的Fc变体见表18。

[0957] [表18]

[0958]

变体名称	hFcRn KD (M)	Tm (°C)	HMW (%)	免疫原性评分	突变
F928	2.9E-08	63.9	0.8	375	M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436I
F929	2.9E-08	64.2	0.9	346	M252Y/S254T/T307Q/Q311A/N434Y/Y436I
F945	1.7E-08	61	1	416	T250V/M252Y/V308P/N434Y/Y436V
F946	4.3E-08	69	1.3	421	T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F993	3.8E-08	63.4	0.9	387	M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F1011	4.5E-08	62.2	0.4	459	T250V/M252Y/V308P/N434Y

[0959] 之前的Fc变体(F1-F599)无一满足全部可开发性标准，但实施例1中产生的几个新的Fc变体满足全部标准。尤其当与pH依赖性抗原结合结构域联用时，满足可开发性标准的第2组的这类Fc变体对于使得能够快速和大规模地从血浆中消除抗原是极有用的。

[0960] 2-4.第3组(对hFcRn的结合亲和力介于50nM和150nM之间)的详细分析

[0961] 通过对X轴上的hFcRn结合亲和力和Y轴上的Tm、HMW(%)和免疫原性评分作图，对具有介于50nM和150nM之间的对hFcRn的结合亲和力的实施例1中产生和评价的新的Fc变体(F600-F1052)和WO2011/122011的实施例1中描述的之前的Fc变体(F1-F599)(下文称为“第3组”)进行了详细分析。

[0962] 通过对X轴上的hFcRn结合亲和力(KD介于50nM和150nM之间)和Y轴上的Tm、HMW(%)或免疫原性评分作图对第3组进行的详细分析分别见图11、12和13。

[0963] 至于第3组中的Fc变体的可开发性标准，Tm标准设置为高于63.0℃，HMW(%)标准设置为低于2%，免疫原性评分设置为低于250。

[0964] 满足全部可开发性标准(Tm高于63.0℃、HMW(%)低于2%和免 疫原性评分低于250)的第3组中的Fc变体见表19。

[0965] [表19]

[0966]

变体名称	hFcRn KD (M)	Tm (°C)	HMW (%)	免疫原性评分	突变
F789	1.5E-07	64.3	0.7	243	M252Y/N315D/N434Y
F814	1.2E-07	63.3	0.9	188	M252Y/N434Y/Y436I
F882	1.3E-07	64	1	188	M252Y/N434Y/Y436L
F890	1.1E-07	63.4	0.7	200	M252Y/N434Y/Y436V
F892	7.1E-08	63.9	1.8	159	M252Y/S254T/N434Y/Y436I

[0967] 之前的Fc变体(F1-F599)无一满足全部可开发性标准，而实施例1中产生的几个新的Fc变体满足全部标准。尤其与pH依赖性抗原结合结构域联用时，满足全部可开发性标准的

第3组的这类新的Fc变体对于使得能够适度和持续地从血浆中消除抗原是非常极其有用的。

[0968] 2-5.第4组(对hFcRn的结合亲和力介于150nM和700nM之间)的详细分析

[0969] 通过对X轴上的hFcRn结合亲和力和Y轴上的Tm、HMW(%)和免疫原性评分作图,对具有介于150nM和700nM之间的对hFcRn的结合亲和力的实施例1中产生和评价的新的Fc变体(F600-F1052)和WO2011/122011的实施例1中描述的之前的Fc变体(F1-F599)(下文称为"第4组")进行了详细分析。

[0970] 通过对X轴上的hFcRn结合亲和力(KD介于150nM和700nM之间)和Y轴上的Tm、HMW(%)或免疫原性评分对第4组进行的详细分析分别见图14、15和16。

[0971] 至于第4组中的Fc变体的可开发性标准,Tm标准设置为高于66.5℃,HMW(%)标准设置为低于2%,免疫原性评分设置为低于250。

[0972] 满足全部可开发性标准(Tm高于66.5℃、HMW(%)低于2%和免疫原性评分低于250)的第4组中的Fc变体见表20。

[0973] [表20]

[0974]

变体名称	hFcRn KD (M)	Tm (℃)	HMW (%)	免疫原性评分	突变
F732	6.8E-07	69	0.7	227	T307Q/Q311H/N434Y
F767	4.3E-07	69.9	0.6	198	T307Q/L309E/Q311A/N434Y
F769	4.6E-07	69.5	0.8	190	T307Q/L309E/Q311H/N434Y
F944	1.7E-07	69.2	1.1	235	T250V/M252Y/N434Y/Y436V

[0975] 之前的Fc变体(F1-F599)无一满足全部可开发性标准,而实施例1中产生的几个新的Fc变体满足全部标准。尤其与pH依赖性抗原结合结构域联用时,满足全部可开发性标准的第4组的这类新的Fc变体对于使得能够适度和持续地从血浆中消除抗原是极其有用的。

[0976] 总之,表17-20中所述的新的Fc变体具有高Tm、低HMW(%)和低免疫原性评分,其适于能够从血浆消除抗原的抗原结合分子的药物开发。

[0977] [实施例3]在人IL-6受体稳态输注模型中使用人FcRn转基因对新的Fc变体的体内抗原消除研究

[0978] 3-1.用于体内研究的抗体的制备

[0979] 通过WO2011/122011的参比实施例2中描述的本领域技术人员已知的方法,表达并纯化pH依赖性抗人IL6受体IgG1抗体:包含VH3-IgG1(SEQ ID NO:1)和VL3-CK(SEQ ID NO:3)的Fv4-IgG1、包含VH3-F11(SEQ ID NO:4)和VL3-CK(SEQ ID NO:3)的之前的Fc变体Fv4-F11、新的Fc变体:包含VH3-F652(SEQ ID NO:5)和VL3-CK(SEQ ID NO:3)的Fv4-F652和包含VH3-F890(SEQ ID NO:6)和VL3-CK(SEQ ID NO:3)的Fv4-F890和包含VH3-F946(SEQ ID NO:7)和VL3-CK(SEQ ID NO:3)的Fv4-F946。

[0980] 在人IL-6受体稳态输注模型中使用人FcRn转基因进行Fv4-IgG1、Fv4-F11、Fv4-F652、Fv4-F890和Fv4-F946的体内抗原消除研究。

[0981] 3-2.使用人FcRn转基因小鼠品系32通过稳态输注模型进行的体内抗体研究

[0982] 使用人FcRn转基因小鼠品系32通过稳态输注模型进行体内试验。将装有可溶性人IL-6受体的输注泵(MINI-OSMOTIC PUMP MODEL2004;alzet)植入人FcRn转基因小鼠品系32(B6.mFcRn-/-.hFcRn Tg line32+/+小鼠(B6.mFcRn-/-hFCRN Tg32B6.Cg-Fcgrt<tm1Dcr>

Tg(FCGRT)32Dcr),Jackson Laboratories;Methods Mol Biol.(2010)602:93-104)背部皮肤下以制备其中使可溶性人IL-6受体的血浆浓度保持恒定的模型动物。将抗人IL-6受体抗体给予模型动物,以评价给予可溶性人IL-6受体后的体内动力学。在植入输注泵前和在将抗体给予尾静脉后7和17天,以20mg/kg给予单克隆抗小鼠CD4抗体(内部),以抑制抗可溶性人IL-6受体的中和抗体产生。然后,将装有92.8微克/ml可溶性人IL-6受体的输注泵植入小鼠背部皮肤下。在植入输注泵后3天,将抗人IL-6受体抗体一次给予尾静脉。在研究1中,与约1g/kg Sanglopor(CSL Behring)一起给予1mg/kg剂量的Fv4-IgG1、Fv4-F652、Fv4-F890和Fv4-F946,而在研究2中,以1mg/kg给予Fv4-IgG1、Fv4-F11和Fv4-F652。在两个研究中,不给予对照组(无抗体注射)抗体。在给予抗人IL-6受体抗体后的合适时间点上采血。立即将采集的血液在15,000rpm和4℃下离心15分钟以分离血浆。测定前将分离的血浆保存在-20℃或更低的冰箱中。

[0983] 3-3.通过ELISA测量抗人IL-6受体抗体血浆浓度

[0984] 通过ELISA测量小鼠血浆中抗人IL-6受体抗体的浓度。将抗人IgG(γ链特异性)F(ab')2抗体片段(Sigma)分配在Nunc-ImmunoPlate MaxiSorp(Nalge Nunc International)上,使之在4℃下静置过夜以制备抗人IgG-固定化板。制备具有血浆浓度为0.8、0.4、0.2、0.1、0.05、0.025和0.0125微克/ml的校准曲线样品和稀释100倍或更多倍的小鼠血浆样品。将200微升的20ng/mlhsIL-6R加入100微升的校准曲线样品和血浆样品中,然后使样品在室温下静置1小时。随后,将样品分配到抗人IgG-固定化板中,使之在室温下静置1小时。然后,加入 生物素化抗人IL-6R抗体(R&D),在室温下反应1小时。随后,加入链霉抗生物素-PolyHRP80(Stereospecific Detection Technologies),在室温下反应1小时,并使用TMP One Component HRP Microwell Substrate(BioFX Laboratories)作为底物进行显色反应。用1N硫酸(Showa Chemical)终止反应后,通过微量板读板仪测量450nm下的吸光度。应用分析软件SOFTmax PRO(Molecular Devices),由校准曲线的吸光度计算小鼠血浆中的浓度。

[0985] 3-4.通过电化学发光测定法测量hsIL-6R血浆浓度

[0986] 通过电化学发光法测量小鼠血浆中的hsIL-6R浓度。制备了调节至2,000、1,000、500、250、125、62.5和31.25pg/ml的浓度的hsIL-6R校准曲线样品,和稀释50倍或更多倍的小鼠血浆样品。将样品与用Sulfo-TagNHS Ester(Meso Scale Discovery)钌标记的单克隆抗人IL-6R抗体(R&D)、生物素化抗人IL-6R抗体(R&D,Systems Inc.,USA)和托珠单抗(Chugai Pharmaceutical Co.,Ltd.))的溶液一起混合,然后使之在37℃下反应过夜。作为抗人IL-6受体抗体的托珠单抗的终浓度为333微克/ml,其超出样品中所含抗人IL-6受体抗体的浓度,其目的是使样品中几乎所有的hsIL-6R分子都与托珠单抗结合。随后,将样品分配在MA400PR链霉抗生物素板(Meso Scale Discovery)中,使之在室温下反应1小时,并进行洗涤。恰在分配Read Buffer T(x4)(Meso Scale Discovery)后,通过SectorPR400读数器(Meso Scale Discovery)进行测量。应用分析软件SOFTmax PRO(Molecular Devices),根据校准曲线的反应计算hsIL-6R浓度。

[0987] 3-5.研究1的结果;新的Fc变体的体内抗原消除作用

[0988] 图17显示血浆hsIL-6R浓度时间概况,图18显示在Fv4-IgG1、Fv4-F652、Fv4-F890和Fv4-F946注射后的血浆抗体浓度时间概况。与Fv4-IgG1和对照(无抗体注射)相比,具有

在中性pH下对FcRn改进的结合的新的Fc变体Fv4-F652、Fv4-F890和Fv4-F946显示血浆hsIL-6R浓度显著降低，这表明了在中性pH下对FcRn的结合改进的 pH依赖性抗原结合抗体的体内抗原消除作用。尽管与Fv4-IgG1相比，Fv4-F652和Fv4-F890在第7天分别显示30倍和10倍的抗原消除作用，但Fv4-F652和Fv4-F890的血浆抗体浓度时间概况与Fv4-IgG1相当。

[0989] 因此，该研究表明，Fv4-F652和Fv4-F890能够选择性地从血浆消除可溶性抗原，同时保持与Fv4-IgG1相当的抗体药代动力学。Fv4-F890属于第3组，该研究表明，第3组的Fc变体可因此降低血浆抗原浓度达约10倍同时保持抗体与IgG1相当的药代动力学。这意味着将第3组Fc变体应用于pH依赖性抗原结合IgG1抗体可降低抗体剂量达10倍。当需要降低抗体剂量，同时需要不常给药时，通过第3组Fc变体达到抗体剂量的这种降低尤其有意义。

[0990] 另一方面，与Fv4-IgG1相比，Fv4-F946显示血浆hsIL-6R浓度降低100倍，且Fv4-F946的抗体清除大于Fv4-IgG1。Fv4-F946属于第2组，该研究表明，第2组的Fc变体可降低血浆抗原浓度达约100倍，但是抗体清除大于IgG1。这意味着将第2组Fc变体应用于pH依赖性抗原结合IgG1抗体可降低血浆总抗原浓度达约100倍。在血浆靶抗原浓度太高而不能通过实际可行的抗体剂量(即100mg/kg)中和的情况下，不论第2组Fc变体的抗原清除是否增加，总抗原浓度降低100倍都意味着靶抗原可被小于10mg/kg剂量中和，小于10mg/kg是实际可行的抗体剂量。

[0991] 以一式多份测量了Fv4-F652和Fv4-F890的hFcRn结合亲和力，针对hFcRn的亲和力对于F652为2.4E-07M(n＝7)，对于F890为1.1E-07M(n＝12)。WO2011/122011的实施例1中描述的之前的研究显示抗原消除和抗体清除的程度与在中性pH下对FcRn的结合亲和力相关。如图17所示，Fv4-F652显示与Fv4-F890相比较大程度的抗原消除，但是抗体药代动力学与Fv4-F890相当。因此，表明F652中的特定突变有助于抗原扫除作用(sweeping effect)提高。

[0992] 为了鉴定哪个残基有助于F652的抗原扫除作用提高，使用F11 (Met252Tyr、Asn434Tyr双重突变体)和F652(Pro238Asp、Met252Tyr、Asn434Tyr三重突变体)进行了研究2。针对hFcRn的亲和力对于F11为3.1E-07M(n＝12)，其与针对F652所测量的亲和力相当。

[0993] 3-6.研究2的结果;Pro238Asp突变的体内抗原消除作用

[0994] 图19显示血浆hsIL-6R浓度时间概况，图20显示在注射Fv4-IgG1、Fv4-F11和Fv4-F652后的血浆抗体浓度时间概况。虽然Fv4-F11显示血浆hsIL-6R浓度降低，但是Fv4-F652显示血浆hsIL-6R浓度更大的降低。Fv4-F11和Fv4-F652显示相当的血浆抗体浓度时间概况。

[0995] 因此，该研究表明，Pro238Asp突变能够提高血浆抗原消除同时保持与Fv4-IgG1相当的抗体药代动力学。因此，Pro238Asp突变对于通过pH依赖性抗原结合抗体提高抗原消除是极其有用的。

[0996] [实施例4]通过位点定向诱变消除类风湿因子与FcRn结合改进的Fc变体的结合

[0997] 治疗性抗体的临床效用和功效可受抗药抗体(ADA)的产生所限制，因为ADA可影响其功效和药代动力学，并且有时导致严重的副作用。许多因素影响治疗性抗体的免疫原性，效应T细胞表位的存在是因素之一。另外，从ADA的观点看，针对治疗性抗体的预存抗体的存在也可能是成问题的。尤其在用于自身免疫病(例如类风湿性关节炎)的患者的治疗性抗体的情况下，类风湿因子，一种针对人IgG的自身抗体，可能是预存抗体的问题。最近，报告了具有Asn434His突变的人源化抗CD4IgG1抗体诱导明显的类风湿因子结合(Clin Pharmacol Ther.2011年2月;89(2):283-90)。详细研究证实，与亲本人IgG1相比，人IgG1中的

Asn434His突变增加类风湿因子与抗体的Fc区的结合。

[0998] 类风湿因子是针对人IgG的多克隆自身抗体，其在人IgG中的表位在克隆间不同，但是其表位似乎位于可能与FcRn结合表位重叠的CH2/CH3界面区以及CH3结构域。因此，提高对FcRn的结合亲和力 的突变也可能提高对类风湿因子的特定克隆的结合亲和力。

[0999] 之前的研究表明，提高在酸性pH下对FcRn的结合亲和力的Fc工程改造改进内体再循环效率并延长抗体的药代动力学。例如，M252Y/S254T/T256E(YTE)变体(J Biol Chem2006281:23514-23524)、M428L/N434S(LS)变体(Nat Biotechnol,201028:157-159)和N434H变体(Clinical Pharmacology&Therapeutics(2011)89(2):283-290)显示相对于天然IgG1的半衰期改进。

[1000] 为了实现从血浆消除抗原，对与FcRn相互作用的抗原结合分子(抗体)的Fc区(Nat Rev Immunol.2007年9月;7(9):715-25)进行改造以使之在中性pH下与FcRn的结合亲和力改进，这种经改造的Fc变体包括F11变体、F68变体、F890变体和F947变体。与常规抗体比较的通过具有改进的在中性pH下与FcRn的结合亲和力的pH依赖性抗原结合抗体从血浆消除抗原的机制见图1。

[1001] (在pH6.0下和/或在中性pH下)FcRn结合改进的这种Fc变体可显示与类风湿因子的结合增加，同在之前报告的Asn434His突变的情况下的一样。因此，我们测试了这些FcRn结合改进的Fc变体是否会显示与类风湿因子的结合增加。用于以下研究的变体抗体为Fv4-hIgG1、Fv4-YTE、Fv4-LS、Fv4-N434H、Fv4-F11、Fv4-F68、Fv4-890和Fv4-F947。

[1002] 4-1.FcRn结合改进的Fc变体的类风湿因子结合研究

[1003] 针对类风湿因子的结合测定法通过在pH7.4下的电化学发光法(ECL)进行。该测定法用15或30名RA患者的血清(Proteogenex)进行。将50倍稀释的血清样品、生物素标记的试验抗体(1微克/mL)和SULFO-TAG NHS Ester(Meso Scale Discovery)标记的试验抗体(1微克/mL)混合，在室温下温育3小时。然后，将混合物加入链霉抗生物素包被的MULTI-ARRAY96孔板(Meso Scale Discovery)中，将板在室温下温育2小时，并洗涤。在将Read BufferT(x4)(Meso Scale Discovery)加入各孔后，将板立即置于SECTOR imager2400读数器(Meso Scale Discovery)中，测量化学发光。

[1004] 该研究的结果见图21和22。图21和22是15或30名RA患者血清的ECL反应。具有天然人IgG1的Fv4-hIgG1(图21-1和22-1)仅显示弱的类风湿因子结合，而所有FcRn结合改进的Fc变体(Fv4-YTE(图21-2)、Fv4-LS(图21-3)、Fv4-N434H(图22-2)、Fv4-F11(图22-3)、Fv4-F68(图22-4)、Fv4-890(图22-5)和Fv4-F947(图22-6))在超过两名供体中显著提高类风湿因子结合。该研究清楚表明，当针对自身免疫病(例如类风湿性关节炎)，考虑对FcRn的结合亲和力改进的治疗性抗体的临床开发时，与预存类风湿因子相关的免疫原性可能成问题。图23显示上述抗体变体与15名RA患者血液的血清ECL反应的平均值、几何平均值和中位值。

[1005] 因此，在接下来的研究中，我们得到可能潜在降低多克隆类风湿因子结合同时保持FcRn结合能力的变体组。

[1006] 4-2.通过在Fc区中引入突变降低FcRn结合改进的Fc变体与类风湿因子的结合

[1007] 为了产生多克隆类风湿因子结合降低同时保持FcRn结合能力的变体，将突变合理地引入被假定为不干扰人FcRn/人IgG相互作用的CH2/CH3界面附近的表面残基。

[1008] 选择Fv4-F890作为亲本Fc变体，将单个突变和单个突变的组合Fc变体引入Fv4-F890。产生表21所述的新的Fc变体F1058-F1073、F1107-F1114、F1104-F1106和F1230-

F1232。另外，选择Fv4-F947作为亲本Fc变体，引入相同的单个突变和组合突变。产生表21所述的新的Fc变体F1119-F1124。首先针对在pH7.0下其与人FcRn的结合亲和力对变体进行评价。结果亦描述于表21。与亲本Fv4-F890或Fv4-F947相比，在针对人FcRn的结合亲和力方面，这些变体不显示显著降低，表明这些突变不影响人FcRn结合。

[1009] [表21]

变体名称	在pH7.0下的hFcRn KD(M)	突变
F890	1.07E-07	M252Y/N434Y/Y436V
F1058	1.30E-07	M252Y/Q386E/N434Y/Y436V
F1059	1.40E-07	M252Y/Q386R/N434Y/Y436V
F1060	1.40E-07	M252Y/Q386S/N434Y/Y436V
F1061	1.20E-07	M252Y/P387E/N434Y/Y436V
F1062	1.20E-07	M252Y/P387R/N434Y/Y436V
F1063	1.40E-07	M252Y/P387S/N434Y/Y436V
F1064	1.30E-07	M252Y/V422E/N434Y/Y436V
F1065	1.40E-07	M252Y/V422R/N434Y/Y436V
F1066	1.40E-07	M252Y/V422S/N434Y/Y436V
F1067	1.30E-07	M252Y/S424E/N434Y/Y436V
F1068	1.70E-07	M252Y/S424R/N434Y/Y436V
F1069	1.40E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438E
F1070	1.70E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438R
F1071	1.20E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438S
F1072	1.30E-07	M252Y/N434Y/Y436V/S440E
F1073	1.34E-07	M252Y/N434Y/Y436V/S440R
F1107	1.20E-07	M252Y/V422D/N434Y/Y436V
F1108	1.30E-07	M252Y/V422K/N434Y/Y436V
F1109	1.30E-07	M252Y/V422T/N434Y/Y436V
F1110	1.30E-07	M252Y/V422Q/N434Y/Y436V
F1111	1.60E-07	M252Y/S424K/N434Y/Y436V
F1112	1.20E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438K
F1113	1.20E-07	M252Y/N434Y/Y436V/S440D
F1114	1.30E-07	M252Y/N434Y/Y436V/S440Q
F1104	1.80E-07	M252Y/V422E/S424R/N434Y/Y436V
F1105	1.50E-07	M252Y/V422S/S424R/N434Y/Y436V
F1106	1.40E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1230	1.12E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1231	9.73E-08	M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1232	9.79E-08	M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F947	1.11E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V

[1011]

F1119	1.00E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/V422E/N434Y/Y436V
F1120	1.00E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/S424R/N434Y/Y436V
F1121	1.00E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/V422E/S424R/N434Y/Y436V
F1122	1.40E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R
F1123	9.50E-09	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V/S440E
F1124	1.20E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E

[1012] 然后针对表21中的变体，我们进行了在pH7下的类风湿因子结合研究。该研究的结果见图24-29。这些图显示15名RA患者的血清对下列抗体变体的ECL反应：Fv4-IgG1、Fv4-F890、Fv4-F1058-Fv4-1073(图24)、Fv4-F1104-Fv4-F1106(图26)、Fv4-F1107-Fv4-F1114(图27)、Fv4-F1230-Fv4-F1232(图28)、Fv4-947和Fv4-F1119-Fv4-F1124(图29)。图25-1、25-2和25-3是15名RA患者的血清对变体Fv4-IgG1、Fv4-F890和Fv4-F1058-Fv4-1073的ECL反应的平均值、几何平均值和中位值。

[1013] 出乎意料地，与显示强类风湿因子结合的F890相比，具有对F890的单个突变的新Fc变体例如F1062、F1064-F1072和F1107-F1114显示类风湿因子结合显著的降低。尤其F1062、F1064、F1068、F1070、F1072、F1107-F1109和F1111-F1113显示与天然IgG1相当的类风湿因子结合，表明了通过引入降低类风湿因子结合而不影响人FcRn结合的额外单个突变完全消除升高的F890变体的免疫原性风险。因为患者中类风湿因子是与在Fc区中的多个表位结合的多克隆抗体，所以意料不到的是单个突变明显消除类风湿因子与Fc区的结合。

[1014] 此外，与单一突变的Fc F1070(Q438R)或F1072(S440E)相比，双重突变的FcF1106(Q438R/S440E)显示类风湿因子结合的显著降低。同样地，双重突变的FcF1230(Q438R/S440D)、F1231(Q438K/S440E)和F1232(Q438K/S440D)亦显示通过突变的组合额外降低类风湿因子结合。同时，F1104(V422E/S424R)或F1105(V422S/S424R)不显示任何组合作用。

[1015] 另外，将Fv4-F939选择作为亲本Fc变体，评价了用于提高FcRn结合(S254T或T256E)和降低类风湿因子结合(H433D)的其它突变。产 生了表22所述新的Fc变体(F1291、F1268、F1269、F1243、F1245、F1321、F1340和F1323)。首先，针对在pH7.0下其与人FcRn的结合亲和力对变体进行评价。结果亦见表22。

[1016] [表22]

[1017]

变体名称	在pH7.0下的hFcRn KD(M)	突变
F939	1.5E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V
F1291	1.5E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V
F1268	2.0E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1269	1.7E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1243	1.3E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1245	8.2E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1321	1.0E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1340	5.6E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1323	1.5E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E

[1018] 然后，如上所述，我们针对这些变体进行了类风湿因子结合研究。该研究的结果见图30。出乎意料地，与F939相比，F1291 (F939的单个H433D突变) 显示在一些供体中类风湿因子结合的显著降低。类似地，与F1321相比，F1323 (F1321的单个H433D突变) 显示在一些供体中类风湿因子结合的显著降低。此外，Q438R/S440E、Q438K/S440D和Q438K/S440E突变显示具有用于提高FcRn结合的其它突变 (S254T或T256E) 的变体的类风湿因子结合显著降低。

[1019] 4-3.通过在Fc区中引入另外的N-糖基化降低FcRn结合改进的Fc变体与类风湿因子的结合

[1020] 由于庞大N-糖基化的位阻所致，在类风湿因子结合表位附近引入额外的N-糖基化亦可消除类风湿因子结合。突变可选自使得突变引入N-糖基化序列 (Asn-Xxx-Ser/Thr) 同时保持FcRn结合的点。为了将额外的N-糖基化序列引入Fc区中，将单个突变或双重突变引入Fv4-F11中。产生表23所述的新的Fc变体 (F1077-F1083、F1094-F1097) 。通过SDS-Page，针对在pH7.0下其与人FcRn的结合亲和力和额外糖基 化的存在，对变体进行评价。结果见表23。发现F1077 (K248N) 、F1080 (S424N) 、F1081 (Y436N/Q438T) 和F1082 (Q438N) 具有额外的糖基化，尤其F1080 (S424N) 保持针对人FcRn的结合亲和力。

[1021] [表23]

[1022]

变体名称	在 pH7 下的 hFcRn KD (M)	糖基化	突变
F11	3.3E-07		M252Y/N434Y
F1077	2.0E-06	++	K248N/M252Y/N434Y
F1078	4.7E-07	-	M252Y/E380N/E382S/N434Y
F1079	3.4E-07	-	M252Y/E382N/N384S/N434Y
F1080	3.2E-07	++	M252Y/S424N/N434Y
F1081	6.2E-07	++	M252Y/N434Y/Y436N/Q438T
F1082	2.8E-07	+	M252Y/N434Y/Q438N
F1083	3.5E-07	-	M252Y/N434Y/S440N
F1094	2.6E-07	-	M252Y/N434Y/S442N
F1095	2.9E-07	-	M252Y/S383N/G385S/N434Y
F1096	2.7E-07	-	M252Y/Q386T/N434Y
F1097	2.8E-07	-	M252Y/G385N/P387S/N434Y

[1023] 因此，在接下来的研究中，将S424N突变引入Fv4-F890中，产生表24所述Fv4-F1115，并评价在pH7.0下其与人FcRn的结合亲和力。结果亦见表24。

[1024] [表24]

[1025]

变体名称	在 pH7.0 下的 hFcRn KD (M)	突变
F890	1.1E-07	M252Y/N434Y/Y436V
F1115	1.3E-07	M252Y/S424N/N434Y/Y436V

[1026] 然后如上所述，我们针对这些变体进行了类风湿因子结合研究。该研究的结果见

图31。出乎意料地，单个S424N突变体Fv4-F1115显示类风湿因子结合的显著降低。该结果表明引入额外的N-糖基化是消除类风湿因子结合的有效方法。

[1027] 4-4.YTE、N434H和LS变体的类风湿因子结合的降低

[1028] 为了降低Fv4-YTE、Fv4-N434H和Fv4-LS变体(其改进在酸性pH下的FcRn结合并延长抗体药代动力学)的类风湿因子结合，将Q438R/S440E突变或S424N突变引入这些变体。产生表25所述的新的Fc变体(F1166、F1167、F1172、F1173、F1170和F1171)。首先针对其在pH6.0下与人FcRn的结合亲和力对变体进行了评价。结果亦见表25。

[1029] [表25]

[1030]

变体名称	在 pH6.0 下的 hFcRn KD (M)	突变
IgG1	2.4E-06	无
YTE	2.1E-07	M252Y/S254T/T256E
F1166	2.1E-07	M252Y/S254T/T256E/Q438R/S440E
F1167	2.5E-07	M252Y/S254T/T256E/S424N
LS	1.6E-07	M428L/N434S
F1170	1.5E-07	M428L/N434S/Q438R/S440E
F1171	2.4E-07	S424N/M428L/N434S
N434H	4.3E-07	N434H
F1172	4.0E-07	N434H/Q438R/S440E
F1173	5.3E-07	S424N/N434H

[1031] 然后如上所述，我们针对这些变体(Fv4-F1166、F1167、F1172、F1173、F1170和F1171)进行了类风湿因子结合研究。该研究的结果见图32。与在两个供体(90216S和90214S)中显示强类风湿因子结合的YTE相比，F1166(Q438R/S440E)和F1167(S424N)显示类风湿因子结合的显著降低。此外，F1173和F1171显示S424N突变亦可消除N434H和LS变体的类风湿因子结合。然而，Q438R/S440E突变无法完全消除N434H和LS变体的类风湿因子结合，在一个或两个供体中观察到类风湿因子结合。

[1032] 4-5.降低LS变体的类风湿因子结合的备选突变

[1033] 将新的单个突变引入Fv4-LS中，产生表26所述的Fc变体(Fv4-F1380-Fv4-F1392)。

[1034] [表26]

[1035]

变体名称	在 pH6.0 下的 hFcRn KD (M)	突变
F22 (=LS)	7.1E-08	M428L/N434S
F1380	7.3E-08	S426D/M428L/N434S
F1381	8.6E-08	S426E/M428L/N434S
F1382	1.3E-07	S426K/M428L/N434S
F1383	1.6E-07	S426R/M428L/N434S
F1384	8.6E-08	S426A/M428L/N434S
F1385	7.7E-08	S426Q/M428L/N434S
F1386	1.6E-07	S426Y/M428L/N434S
F1387	1.5E-07	M428L/N434S/Y436M
F1388	8.0E-08	M428L/N434S/Y436F
F1389	6.8E-08	M428L/N434S/Y436T
F1390	4.0E-07	M428L/N434S/Y436H
F1391	4.2E-07	M428L/N434S/Y436N
F1392	2.7E-07	M428L/N434S/Y436K

[1036] 然后我们针对在pH6.0下保持FcRn结合的变体(Fv4-F1380、F1384-F1386、F1388和F1389),进行了类风湿因子结合研究。该研究的结果见图33。这些变体显示在一些供体中类风湿因子结合的显著降低。尤其Fv4-F1389显示与天然IgG1相当的类风湿因子结合。

[1037] 因此,对于降低含有FcRn结合提高的Fc区的抗原结合分子(例如F1-F1434),例如能够从血浆中消除抗原的在中性pH下与FcRn的结合亲和力改进的pH依赖性抗原结合抗体和能够改进抗体药代动力学的在酸性pH下对FcRn的结合亲和力改进的抗体的免疫原性,突变例如Pro387Arg、Val422Glu、Val422Arg、Val422Ser、Val422Asp、Val422Lys、Val422Thr、Val422Gln、Ser424Glu、Ser424Arg、Ser424Lys、Ser424Asn、Ser426Asp、Ser426Ala、Ser426Gln、Ser426Tyr、His433Asp、Tyr436Thr、Gln438Glu、Gln438Arg、Gln438Ser、Gln438Lys、Ser440Glu、Ser440Asp、Ser440Gln(位置以EU编号提供)是极其有用的。

[1038] 用于降低类风湿因子的结合而不影响人FcRn结合的EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438和EU440以外的突变位点可选自以EU编号的248-257、305-314、342-352、380-386、388、414-421、423、425-437、439和441-444。

[1039] [实施例5]降低在中性pH下对人FcRn的结合改进的新Fc变体的类风湿因子结合

[1040] 产生表27所述的新的Fc变体(F939、F1378、F1379、F1262、F1138、F1344、F1349、F1350、F1351、F1261、F1263、F1305、F1306、F1268、F1269、F1413、F1416、F1419、F1420、F1370、F1371、F1599、F1600、F1566、F1448、F1601-F1603、F1531、F1604、F1605、F1586、F1592、F1610-F1615、F1567、F1572、F1576、F1578、F1579、F1641-F1655、F1329、F1331)。首先针对在pH7.0下其与人FcRn的结合亲和力,对变体进行评价。结果亦见表27。

[1041] [表27]

[1042]

变体名称	在pH7.0下的hFcRn KD(M)	突变
F939	1.5E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V
F1378	3.6E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436T
F1379	2.8E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436F
F1262	1.3E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1138	1.7E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1344	4.0E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1349	3.4E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1350	1.2E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1351	1.6E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1261	1.4E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1263	1.2E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1305	2.0E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1306	1.9E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1268	2.0E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1269	1.7E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1413	3.7E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/T307Q/Q311A/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1416	1.3E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1419	1.5E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434W/Y436V/Q438R/S440E
F1420	1.3E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434W/Y436V/Q438K/S440E
F1370	9.1E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1371	1.1E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1599	7.4E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1600	8.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1566	4.0E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E

[1043]

F1448	4.9E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1601	3.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1602	3.6E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1603	5.9E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1531	7.6E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1604	6.0E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1605	6.1E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1586	5.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1592	5.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1610	4.8E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1611	5.2E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1612	4.9E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1613	5.2E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1614	5.1E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1615	6.0E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1567	4.8E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1572	4.1E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1576	4.3E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438R/S440E

[1044]

F1578	4.6E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1579	5.4E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1641	4.1E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1642	4.1E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1643	3.9E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1644	3.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1645	3.6E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1646	3.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1647	3.8E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1648	3.8E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1649	3.7E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1650	4.0E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1651	4.4E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1652	4.0E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1653	4.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1654	4.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1655	4.4E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1329	1.3E-07	L235R/G236R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1331	7.7E-08	L235R/G236R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E

[1045] 然后我们针对表27中的变体进行了在pH7.4下的类风湿因子结合研究。该研究的结果见图34-94。

[1046] 对于用于提高在中性pH下的FcRn结合的其它突变，用于降低类风湿因子结合的双重

突变(Q438R/S440E、Q438R/S440D、Q438K/S440E和Q438K/S440D)显示类风湿因子结合的显著降低。

[1047] 5-1.在酸性pH下对人FcRn结合改进的新Fc变体的类风湿因子结合的降低

[1048] 产生表28所述的新的Fc变体(F1718-F1721、F1671、F1670、F1711-F1713、F1722-F1725、F1675、F1714-F1717、F1683、F1756-F1759、F1681、F1749-F1751、F1760-F1763、F1752-F1755、F1685)。首先针对其在pH6.0下与人FcRn的结合亲和力对变体进行了评价。结果亦见表28。

[1049] [表28]

变体名称	在pH6.0下的hFcRn KD(M)	突变
F1718	6.1E-08	N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1719	5.2E-08	N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1720	4.5E-08	N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1721	5.5E-08	N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1671	9.5E-08	L235R/S239K/N434Y/Y436V
F1670	6.4E-08	L235R/S239K/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1711	5.5E-08	L235R/S239K/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1712	5.5E-08	L235R/S239K/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1713	5.1E-08	L235R/S239K/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1722	1.0E-07	H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1723	9.6E-08	H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1724	9.9E-08	H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1725	9.3E-08	H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1675	9.7E-08	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436V
F1714	1.1E-07	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1715	1.1E-07	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1716	9.6E-08	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1717	9.5E-08	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1683	5.7E-08	L235R/S239K/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1756	8.0E-08	N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1757	7.2E-08	N434Y/Y436T/Q438R/S440D
F1758	7.0E-08	N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1759	6.3E-08	N434Y/Y436T/Q438K/S440D
F1681	8.4E-08	L235R/S239K/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1749	8.7E-08	L235R/S239K/N434Y/Y436T/Q438R/S440D
F1750	7.0E-08	L235R/S239K/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1751	6.9E-08	L235R/S239K/N434Y/Y436T/Q438K/S440D
F1760	1.2E-07	H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1761	1.3E-07	H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440D
F1762	1.1E-07	H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1763	1.1E-07	H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440D
F1752	1.5E-07	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440E

[1051]

F1753	1.3E-07	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440D
F1754	1.2E-07	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1755	1.3E-07	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440D
F1685	8.7E-08	L235R/S239K/N434Y/Q438R/S440E

[1052] 然后我们针对表28中的变体，进行了在pH7.4下的类风湿因子结合研究。该研究的结果见图95-130。

[1053] 对于用于提高在酸性pH下的FcRn结合的其它突变，用于降低类风湿因子结合的双重突变(Q438R/S440E、Q438R/S440D、Q438K/S440E和Q438K/S440D)显示类风湿因子结合的显著降低。

[1054] [实施例6]在人IL-6受体稳态输注模型中使用人FcRn转基因小鼠对新的Fc变体进行的体内抗原消除研究

[1055] 6-1.用于体内研究的抗体制备

[1056] 通过WO2011/122011的实施例2中描述的本领域技术人员已知方法，表达并纯化pH依赖性抗人IL6受体IgG1抗体：包含VH3-IgG1(SEQ ID NO:1)和VL3-CK(SEQ ID NO:3)的Fv4-IgG1、新的Fc变体——包含VH3-F1243(SEQ ID NO:8)和VL3-CK(SEQ ID NO:3)的Fv4-F1243和包含VH3-F1245(SEQ ID NO:9)和VL3-CK(SEQ ID NO:3)的Fv4-F1245。

[1057] 如实施例4所述，Fv4-F1243和Fv4-F1245具有在中性pH下对人FcRn的结合亲和力改进但对类风湿因子的结合显著降低的新Fc区。为了评价这些变体的抗原消除作用，使用人FcRn转基因小鼠在人IL-6受体稳态输注模型中进行了Fv4-IgG1、Fv4-F1243和Fv4-F1245的体内研究。

[1058] 6-2.使用人FcRn转基因小鼠品系32通过稳态输注模型进行的体内抗体研究

[1059] 通过WO2011/122011的实施例13中描述的相同方法，使用人FcRn转基因小鼠品系32通过稳态输注模型进行体内试验。

[1060] 6-3.研究结果；新的Fc变体的体内抗原消除作用

[1061] 图131显示血浆hsIL-6R浓度时间概况，图132显示在注射 Fv4-IgG1、Fv4-F1243和Fv4-F1245后的血浆抗体浓度时间概况。与Fv4-IgG1和对照(无抗体注射)相比，具有在中性pH下对FcRn的结合改进的新Fc变体的Fv4-F1243和Fv4-F1245显示血浆hsIL-6R浓度显著降低，这就表明了在中性pH下对FcRn的结合改进的pH依赖性抗原结合抗体的体内抗原消除。在第21天或第7天，与Fv4-IgG1相比，Fv4-F1243和Fv4-F1245分别表明10倍的抗原消除作用，而Fv4-F1243和Fv4-F1245的血浆抗体浓度时间概况与Fv4-IgG1相当。

[1062] [实施例7]使用人FcRn转基因小鼠的新Fc变体的体内PK研究

[1063] 7-1.用于体内研究的抗体的制备

[1064] 通过WO2011/122011的参比实施例2中描述的本领域技术人员已知的方法，表达和纯化pH依赖性抗人IL6受体IgG1抗体：包含VH3-IgG1(SEQ ID NO:1)和VL3-CK(SEQ ID NO:3)的Fv4-IgG1、新的Fc变体——包含VH3-F1389(SEQ ID NO:10)和VL3-CK(SEQ ID NO:3)的Fv4-F1389。

[1065] 如实施例4和5所述，Fv4-F1389具有在酸性pH下对人FcRn的结合亲和力改进但对类风湿因子的结合显著降低的新Fc区。为了评价该变体的药代动力学，使用人FcRn转基因小鼠进行了Fv4-IgG1和Fv4-F1389的体内研究。

[1066] 7-2.通过使用人FcRn转基因小鼠品系32对抗体的体内研究

[1067] 通过WO2011/122011的实施例13中描述的相同方法，使用人FcRn转基因小鼠品系32进行了体内试验。

[1068] 7-3.新的Fc变体的体内PK研究结果

[1069] 图133显示在注射Fv4-IgG1和Fv4-F1389后的血浆抗体浓度时间概况。与Fv4-IgG1相比，具有在酸性pH下对FcRn的结合改进且类风湿因子的结合降低的新Fc变体的Fv4-F1389显示药代动力学改进。表28中所述的新Fc变体在pH6.0下对FcRn的结合亲和力提高至与F1389相同的水平。因此，还预期这些变体显示使用人FcRn转基因小鼠品系32时改进的药代动力学，同时具有降低的与类风湿因 子的结合。

[1070] [实施例8]以钙依赖性方式与人IgA结合的抗体的制备

[1071] 8-1.人IgA(hIgA)的制备

[1072] 通过采用下列重组技术，制备人IgA(在下文亦简写为“hIgA”)作为抗原。hIgA(可变区来源于抗人IL-6受体抗体)通过培养携带插入有H(WT)-IgA1(SEQ ID NO:12)和L(WT)(SEQ ID NO:13)的重组载体的宿主细胞来表达，并通过本领域技术人员已知方法，采用离子交换层析法和凝胶过滤层析法纯化。

[1073] 8-2.与hIgA结合的抗体的表达和纯化

[1074] GA2-IgG1(重链SEQ ID NO:14;轻链SEQ ID NO:15)是与hIgA结合的抗体。通过本领域技术人员已知方法，将编码GA2-IgG1的重链(SEQ ID NO:14)和GA2-IgG1的轻链(SEQ ID NO:15)的DNA序列插入动物细胞表达质粒中。通过下述方法表达抗体。将人胎肾细胞来源的细胞系FreeStyle293-F(Invitrogen)悬浮于FreeStyle293表达培养基(Invitrogen)中。以$1.33x10^6$个细胞/ml的细胞密度将细胞悬液接种在6孔板(3mL/孔)中。然后，通过脂转染方法将构建的质粒导入细胞。将细胞在CO_2培养箱(37℃，8%CO_2，90rpm)中培养4天。使用rProtein A Sepharose™ Fast Flow(Amersham Biosciences)，通过本领域技术人员已知方法，从分离的培养上清液中纯化出抗体。采用分光光度计，测量纯化的抗体溶液的吸光度(波长:280nm)。利用通过PACE方法计算的吸收系数，从测量值求出抗体浓度(Protein Science(1995)4,2411-2423)。

[1075] 8-3.针对钙依赖性hIgA结合活性对所获得的抗体进行评价

[1076] 采用BiacoreT200(GE Healthcare)，针对其hIgA结合活性(解离常数K_D(M))，对按8-2中所述分离的抗体进行评价。测量中所用的运行缓冲液为含有3μM或1.2mM$CaCl_2$的0.05%tween20/20mmol/L ACES/150mmol/LNaCl(pH7.4或5.8)。

[1077] 使抗体与通过氨基偶联方法固定有适量的重组蛋白质A/G (Thermo Scientific)的Sensor芯片CM5(GE Healthcare)结合。然后，注入适当浓度的hIgA(8-1中所述)作为分析物，使之与传感器芯片上的抗体相互作用。测量在37℃下进行。在测量后，注入10mmol/L甘氨酸-HCl(pH1.5)使传感器芯片再生。应用BiacoreT200评价软件(GE Healthcare)，通过曲线拟合分析和平衡参数分析，从测量结果计算解离常数K_D(M)。结果和所获得的传感图分别见表29和图134。结果显示GA2-IgG1在1.2mM的Ca^{2+}浓度下与hIgA强结合，而所述抗体在3μM的Ca^{2+}浓度下与hIgA弱结合。此外，在1.2mM的Ca^{2+}浓度下，GA2-IgG1显示在pH7.4下与人IgA强结合但在pH5.8下弱结合。更具体地讲，显示GA2-IgG1以pH依赖性方式和钙依赖性方式与人IgA结合。

[1078] [表29]

[1079]

抗体名称	条件	拟合	ka	kd	KD [M]
GA2-IgG1	pH 7.4, 1.2 mM Ca	1:1 结合模型	4.0E+05	1.6E-02	3.9E-08
	pH 7.4, 3 μM Ca	稳态亲和力	-	-	6.7E-06
	pH 5.8, 1.2 mM Ca	稳态亲和力	-	-	4.0E-06
	pH 5.8, 3 μM Ca	稳态亲和力	-	-	5.0E-06

[1080] [实施例9]具有以钙依赖性方式与hIgA结合的修饰Fc区的抗体的制备

[1081] 接下来，为了评价FcRn结合对从血浆消除抗原(hIgA)的作用，通过将氨基酸取代L235R和S239K引入GA2-IgG1中，来构建GA2-F760(重链SEQ ID NO:16；轻链SEQ ID NO:15)以消除与Fcγ R的结合。此外通过将氨基酸取代G236R、M252Y、S254T、T256E、N434Y、Y436V、Q438R和S440E引入GA2-F760中，来构建GA2-F1331(重链SEQ ID NO:17；轻链SEQ ID NO:15)，其在pH7.4下与FcRn结合强于GA2-F760。使用通过本领域技术人员已知方法插入有编码 GA2-F1331(重链SEQ ID NO:17；轻链SEQ ID NO:15)和GA2-F760(重链SEQ ID NO:16；轻链SEQ ID NO:15)的DNA序列的动物表达质粒，通过上述方法表达修饰的抗体。在纯化后测定抗体浓度。针对其与各种小鼠Fcγ R(mFcγ RI、mFcγ RII、mFcγ RIII和mFcγ RIV)的结合，对GA2-F760进行评价。结果显示GA2-F760不与任何受体结合。

[1082] [实施例10]使用人FcRn转基因小鼠评价Ca依赖性hIgA-结合抗体对抗原血浆滞留的作用

[1083] 10-1.使用人FcRn转基因小鼠的体内试验

[1084] 将hIgA(人IgA；按实施例8中所述制备)单独或与抗hIgA抗体组合给予人FcRn转基因小鼠(B6.mFcRn-/-.hFcRn Tg line32+/+小鼠，Jackson Laboratories；Methods Mol Biol.(2010)602:93-104)后，对hIgA和抗hIgA抗体的药代动力学进行评价。以10mL/kg的剂量通过尾静脉一次给予hIgA和抗hIgA抗体的混合物。上述GA2-F760和GA2-F1331是所使用的抗hIgA抗体。

[1085] 在每个混合物中，hIgA浓度为80μg/mL，抗hIgA抗体浓度为2.69mg/mL。在上述条件下，预测大部分hIgA与抗体结合，因为抗hIgA抗体的存在量充分超过hIgA。在给予后15分钟、1小时、2小时、7小时、1天、3天、7天和14天，自小鼠采血。将采集的血液立即在12,000rpm和4℃下离心15分钟以获得血浆。测定前将分离的血浆保存在-20℃或更低的冰箱中。

[1086] 10-2.在人FcRn转基因小鼠中通过ELISA测量血浆抗hIgA抗体浓度

[1087] 小鼠血浆中的抗hIgA抗体浓度通过ELISA测定。首先，通过将抗人IgG(γ 链特异性)F(ab')2片段抗体(SIGMA)等分到Nunc-ImmunoPlate，MaxiSorp(Nalge nunc International)的各孔中，并使板在4℃下静置过夜，来制备抗人IgG-固定化板。将作为血浆浓度为0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125、0.01563和0.007813μg/mL的标准溶液制备的抗hIgA抗体标准曲线样品和通过稀释小鼠血浆样品100倍或更多倍制备的测定样品等分至抗人IgG-固定化板中，然后将板在 25℃下温育1小时。接下来，在将山羊抗人IgG(γ 链特异

性)生物素(BIOT)缀合物(Southern Biotechnology Associates Inc.)等分到板的各孔中,然后将板在25℃下温育1小时。然后,将链霉抗生物素-PolyHRP80(Stereospecific Detection Technologies)加入板的各孔中,之后将板在25℃下温育1小时。用1N硫酸(Showa Chemical)终止采用TMB One Component HRP Microwell Substrate(BioFX Laboratories)作为底物的显色反应,然后使用微量板读板仪测量各孔中的反应混合物以测量450nm下的吸光度。应用分析软件SOFTmax PRO(Molecular Devices),自标准曲线的吸光度计算小鼠血浆中的抗hIgA抗体浓度。通过上述方法测定的人FcRn转基因小鼠中GA2-F1331和GA2-F760的血浆抗体浓度的时程见图135。

[1088] 10-3.通过ELISA测定血浆hIgA浓度

[1089] 小鼠血浆hIgA浓度通过ELISA测定。首先,将山羊抗人IgA抗体(BETHYL)等分到Nunc-ImmunoPlate,MaxiSorp(Nalge nunc International)的各孔中,并使板在4℃下静置过夜,来制备抗人IgA-固定化板。制备hIgA标准曲线样品作为血浆浓度为0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125和0.00625μg/mL的标准溶液,通过稀释小鼠血浆样品100倍或更多倍制备测定样品。将各样品(100μL)与200μL的500ng/mLhsIL-6R在室温下混合1小时,然后将其以100μL/孔等分至抗人IgA-固定化板中。将所得板在室温下静置1小时。接下来,在将生物素化抗人IL-6R抗体(R&D)加入板的各孔中后,将板在室温下温育1小时。然后,在将链霉抗生物素-PolyHRP80(Stereospecific Detection Technologies)等分至板的各孔中后,将板在室温下温育1小时。用1N硫酸(Showa Chemical)终止使用底物TMB One Component HRP Microwell Substrate(BioFX Laboratories)的显色反应,然后使用微量板读板仪测量各孔中的反应混合物以测量450nm下的吸光度。应用分析软件SOFTmax PRO(Molecular Devices),自标准曲线的吸光度计算小鼠血浆中的浓度。静脉内给予后,通过上述方法测定的人FcRn 转基因小鼠中血浆hIgA浓度的时程见图136。

[1090] 结果显示与当hIgA与GA2-F760(其与人FcRn的亲和力非常弱)组合给予时相比,当hIgA与GA2-F1331(一种显示强的人FcRn结合的抗体)组合给予时,hIgA消除被显著加快。

[1091] [实施例11]pH依赖性抗IgE抗体的制备

[1092] 11-1.抗人IgE抗体的制备

[1093] 为了制备pH依赖性抗人IgE抗体,使用FreeStyle293(Life Technologies),表达人IgE(重链SEQ ID NO:18;轻链SEQ ID NO:19)(可变区来源于抗人磷脂酰肌醇聚糖3抗体)作为抗原。采用本领域技术人员已知的常规层析方法,通过纯化表达的人IgE,来制备人IgE。

[1094] 从多个获得的抗体中选择以pH依赖性方式与人IgE结合的抗体。使用人IgG1重链恒定区和人轻链恒定区,表达所选择的抗人IgE抗体,然后纯化。所产生的抗体命名为克隆278(重链SEQ ID NO:20;轻链SEQ ID NO:21)。

[1095] 11-2.针对其结合活性和pH依赖性结合活性评价抗人IgE抗体

[1096] 不仅可通过对其进行设计从而以pH依赖性方式与抗原结合,而且还可通过对其进行设计从而以Ca依赖性方式与抗原结合来产生能够在内体中自抗原解离的抗体。因此,针对其人IgE(hIgE)结合活性的pH依赖性和pH/Ca依赖性,对克隆278和其IgE结合活性不依赖于pH/Ca的对照Xolair(奥马珠单抗;Novartis)进行评价。

[1097] 更具体地讲,采用Biacore T200(GE Healthcare),对克隆278和Xolair的hIgE-结

合活性(解离常数K_D(M))进行评价。测定中使用的运行缓冲液为：

[1098] 1.2mmol/l $CaCl_2$/0.05％tween20,20mmol/lACES,150mmol/l NaCl,pH7.4;

[1099] 1.2mmol/l $CaCl_2$/0.05％tween20,20mmol/lACES,150mmol/l NaCl,pH5.8;和

[1100] 3μM/l$CaCl_2$/0.05％tween20,20mmol/lACES,150mmol/lNaCl, pH5.8。

[1101] 根据生物素和链霉抗生物素之间的亲和力,将适量的具有其C端Lys是生物素化的人磷脂酰肌醇聚糖3蛋白质衍生序列(SEQ ID NO:22)的化学合成的肽(下文简写为“生物素化GPC3肽”)加入并固定在Sensor芯片SA(GE Healthcare)上。通过以适当浓度将其注入使得被生物素化GPC3肽俘获,使人IgE固定在芯片上。作为分析物,以适当浓度注入克隆278,使之与传感器芯片的人IgE相互作用。然后,注入10mmol/L甘氨酸-HCl(pH1.5)使传感器芯片再生。总是在37℃下测量相互作用。应用BiacoreT200评价软件(GE Healthcare),通过曲线拟合分析测量结果,以计算结合速率常数ka(1/Ms)和解离速率常数kd(1/s)。解离常数K_D(M)自上述常数计算。此外,计算各抗体在[pH5.8,1.2mMCa]条件下比[pH7.4,1.2mMCa]条件下的KD比率,以评价pH依赖性结合,同时计算各抗体在[pH5.8,3μM Ca]条件下比[pH7.4,1.2mM Ca]条件下的KD比率,以评价pH/Ca依赖性结合。结果见表30。

[1102] [表30]

[1103]

抗体命名(缩写)	缓冲条件	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	pH依赖性	pH/Ca依赖性
					KD (pH 5.8, 1.2 mM Ca)/KD (pH 7.4, 1.2 mM Ca)	KD (pH 5.8, 3 μM Ca)/KD (pH 7.4, 1.2 mM Ca)
克隆278	pH 7.4, 1.2 mM Ca	1.5E+06	3.6E-03	2.4E-09	842.5	1636.5
	pH 5.8, 1.2 mM Ca	1.2E+05	2.3E-01	2.0E-06		
	pH 5.8, 3 μM Ca	6.2E+04	2.4E-01	3.9E-06		
Xolair	pH 7.4, 1.2 mM Ca	2.5E+06	1.1E-02	4.4E-09	2.3	2.9
	pH 5.8, 1.2 mM Ca	2.4E+06	2.4E-02	9.9E-09		
	pH 5.8, 3 μM Ca	1.4E+06	1.7E-02	1.3E-08		

[1104] [实施例12]用于体内测试的具有与人IgE结合的修饰Fc区的抗体的制备

[1105] 接下来，为了评价FcRn结合对从血浆消除抗原(人IgE)的作用，构建了278-F760(重链SEQ ID NO:23；轻链SEQ ID NO:21)以消除与Fcγ R的结合。此外通过将氨基酸取代G236R、M252Y、S254T、T256E、N434Y、Y436V、Q438R和S440E引入278-F760来构建278-F1331(重链SEQ ID NO:24；轻链SEQ ID NO:21)，其在pH7.4下与FcRn的结合强于278-F760。使用通过本领域技术人员已知方法插入有编码278-F1331(重链SEQ ID NO:24；轻链SEQ ID NO:21)和278-F760(重链SEQ ID NO:23；轻链SEQ ID NO:21)的DNA序列的动物表达质粒，通过上述方法表达修饰的抗体。纯化后测定抗体浓度。

[1106] [实施例13]克隆278的体内评价

[1107] 13-1.用于体内评价的人IgE(hIgE(Asp6))的制备

[1108] 通过与实施例11描述的相同方法，产生hIgE(Asp6)(可变区来源于抗人磷脂酰肌醇聚糖3抗体)，其是由重链(SEQ ID NO:25)和轻链(SEQ ID NO:19)组成的用于体内评价的人IgE。hIgE(Asp6)是修饰的分子，由人IgE中的6个N-联糖基化位点处的天冬酰胺至天冬氨酸变化而产生，使得人IgE的N-联糖链异质性不受作为抗原的人IgE血浆浓度的时间依赖性

变化影响。

[1109] 13-2.使用人FcRn转基因小鼠针对加快人IgE消除的作用对克隆278进行评价

[1110] 将hIgE(Asp6)与抗hIgE抗体(278-F760和278-F1331)和Sanglopor(人正常免疫球蛋白,CSL Behring)的组合给予人FcRn转基因小鼠(B6.mFcRn-/-.hFcRn Tg line32+/+小鼠,Jackson Laboratories;Methods Mol Biol.(2010)602:93-104)后,评价hIgE(Asp6)和抗人IgE抗体的药代动力学。以10mL/kg的剂量通过尾静脉一次给予hIgE(Asp6)、抗人IgE抗体和Sanglopor(浓度见表31)的混合物。在上述条件下,预测hIgE(Asp6)与抗体几乎完全结合,因为各抗体的存在量充分超过hIgE(Asp6)。在给予5分钟、2小时、7小时、1天、2天、4或5天、7天、14天、21天和28天后自小鼠采血。将采集的血液立即在15,000rpm和4℃下离心5分钟以获得血浆。测定前将分离的血浆保存在-20℃或更低的冰箱中。

[1111] [表31]

[1112]

抗hIgE抗体	所给予溶液中的hIgE(Asp6)浓度(微克/mL)	所给予溶液中的抗hIgE抗体浓度(微克/mL)	所给予溶液中的Sanglopor浓度(mg/mL)
278-F760	20	100	100
278-F1331	20	100	100

[1113] 13-3.测定人FcRn转基因小鼠中的血浆抗人IgE抗体浓度

[1114] 通过电化学发光(ECL)测定法测定小鼠血浆中的抗hIgE抗体浓度。以32、16、8、4、2、1、0.5和0.25微克/mL的血浆浓度制备标准曲线样品。将标准曲线样品和小鼠血浆测定样品等分到固定有hIgE(Asp6)的ECL板中。使板在4℃下静置过夜。然后,使SULFO-TAG标记的抗兔抗体(山羊)(Meso Scale Discovery)在室温下反应1小时。恰在分配Read Buffer T(x4)(Meso Scale Discovery)后,通过Sector Imager2400读数器(Meso Scale Discovery)进行测量。应用分析软件SOFTmax PRO(Molecular Devices),从标准曲线的反应计算小鼠血浆的浓度。通过上述方法测定的静脉内给予后血浆抗体浓度的时程见图137。

[1115] 13-4.测定人FcRn转基因小鼠中的血浆hIgE(Asp6)浓度

[1116] 通过ELISA测定小鼠血浆中的hIgE(Asp6)浓度。以192、96、48、24、12、6和3ng/mL的血浆浓度制备标准曲线样品。将10微克/mL的Xolair(Novartis)加入标准曲线样品和小鼠血浆测定样品中以使hIgE(Asp6)和抗hIgE抗体的免疫复合物平衡。在室温下温育30分钟后,将标准曲线样品和小鼠血浆测定样品等分到固定有抗人IgE抗体的免疫板(MABTECH)或固定有抗人IgE抗体(克隆107;MABTECH)的免疫板(Nunc F96Micro Well Plate(Nalge nunc International))中。使板在室温下静置2小时或在4℃下过夜。然后,使人GPC3核心蛋白(SEQ ID NO:26)、用NHS-PEG4-Biotin生物素化的抗GPC3抗体(Thermo Fisher Scientific)(在Chugai PharmaceuticalCo.,Ltd.制备)和链霉抗生物素-PolyHRP80(Stereospecific Detection Technologies)相继反应各1小时。用1N硫酸(Showa Chemical)终止使用底物TMB One Component HRP Microwell Substrate(BioFX Laboratories)的显色反应,然后通过其中显色通过使用微量板读板仪测量450nm下的吸光度来评价的方法,或其中使用SuperSignal(r)ELISA Pico Chemiluminescent Substrate(Thermo Fisher Scientific)作为底物进行发光反应并用微量板读板仪测量发光强度的

方法，来测定小鼠血浆浓度。应用分析软件SOFTmax PRO(Molecular Devices)，自标准曲线的吸光度或发光强度计算小鼠血浆浓度。通过上述方法测定的在静脉内给予后血浆hIgE(Asp6)浓度的时程见图138。

[1117] 结果显示当与278-F1331(其与人FcRn的结合远强于278-F760)组合给予人IgE时，人IgE的消除显著加快。具体而言，结果表明，不仅在IL6R和IgA的情况下，而且还在IgE的情况下，对FcRn的结合活性提高的pH依赖性抗原结合抗体可加快抗原从血浆中清除并降低血浆抗原的浓度。

[1118] [参比实施例A1]可溶性人IL-6受体(hsIL-6R)的制备

[1119] 如下制备作为抗原的重组人IL-6受体。通过本领域技术人员已知方法，建立组成型表达具有来自N端的1-357位氨基酸序列的可溶性人IL-6受体(下文亦称hsIL-6R)的细胞系(如J.Immunol.152:4958-4968(1994)中报道)。培养细胞以表达hsIL-6R。通过以下两个步骤从培养上清液中纯化hsIL-6R:BlueSepharose6FF柱层析法和凝胶过滤层析法。在最后阶段作为主峰洗脱出的级分用作最终的纯化产物。

[1120] [参比实施例A2]人FcRn的制备

[1121] FcRn是FcRnα链和β2-微球蛋白的异二聚体。根据已公布的人FcRn基因序列(JExpMed.1994年12月1日;180(6):2377-81)，制备寡聚DNA引物。使用作为模板的人cDNA(Human Placenta Marathon-Ready cDNA,Clontech)和所制备的引物，通过PCR制备编码完整基因的DNA片段。使用所得到的DNA片段作为模板，通过PCR扩增编码含有信号区(Met1-Leu290)的胞外结构域的DNA片段，并将该片段插入哺乳动物细胞表达载体中。同样地，根据已公布的人β2-微球蛋白基因序列(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.99(26):16899-16903(2002))，制备寡聚DNA引物。使用作为模板的人cDNA(Human Placenta Marathon-Ready cDNA,Clontech)和所制备的引物，通过PCR制备编码完整基因的DNA片段。使用所得到的DNA片段 作为模板，通过PCR扩增编码含有信号区(Met1-Met119)的完整蛋白质的DNA片段，并将该片段插入哺乳动物细胞表达载体中。

[1122] 通过下列方法表达可溶性人FcRn。使用PEI(Polyscience)通过脂转染方法，将所构建的用于表达人FcRnα链(SEQ ID NO:27)和β2-微球蛋白(SEQ ID NO:28)的质粒导入人胚肾癌衍生细胞系HEK293H(Invitrogen)的细胞中。收集所得培养上清液，使用IgG Sepharose6Fast Flow(Amersham Biosciences)纯化FcRn，接着使用HiTrap Q HP(GE Healthcare)进一步纯化(J Immunol.2002年11月1日;169(9):5171-80)。[参比实施例A3]人IgA(hIgA)的制备

[1123] 通过本领域的技术人员已知方法，使用rProteinL-琼脂糖(ACTIgen)，接着使用凝胶过滤层析法，表达和纯化包含H(WT)-IgA1(SEQ ID NO:12)和L(WT)(SEQ ID NO:13)的hIgA。

[1124] [参比实施例A4]可溶性人丛蛋白A1(hsPlexinA1)的制备

[1125] 如下制备作为抗原的重组可溶性人丛蛋白A1(下文亦称hsPlexin A1)。参照NCBI参比序列(NP_115618)构建hsPlexin A1。特别是hsPlexin A1由来自上述NCBI参比的27-1243位氨基酸序列组成，将FLAG标签(DYKDDDDK,SEQ ID NO:29)与其C端连接。使用FreeStyle293(Invitrogen)使hsPlexin A1瞬时表达，并通过以下两个步骤从培养上清液中纯化:抗FLAG柱层析法和凝胶过滤层析法。在最后阶段作为主峰洗脱出的级分用作最终

的纯化产物。

[1126] 工业实用性

[1127] 当将靶向可溶性抗原的常规抗体给予受试者时，抗原与抗体结合，并稳定地在血浆持续存在。由于与抗体结合的抗原比仅抗原具有显著较长的半衰期，因此在注射常规抗体后，血浆总抗原浓度增加至基线的约10-1000倍。血浆总抗原浓度的这种增加对于治疗性抗体不是优选的，因为与不发生血浆总抗原浓度显著增加时相比，抗体浓度(剂量)必需是所需要浓度的10-1000倍。因此，与常规抗体相比，从血浆消除抗原并且还降低血浆总抗原浓度的抗体极其有用，因为所需 剂量将是常规抗体所需剂量的1/10-1/1000。

[1128] 本发明人对以下方面进行了专心致志的研究：在中性pH下对FcRn的亲和力提高的修饰的FcRn结合结构域和包含所述FcRn结合结构域的具有低免疫原性、高稳定性并只形成少量聚集体的抗原结合分子。结果，发现在FcRn结合结构域特定位置上的取代提高在中性pH下对FcRn的亲和力而又不显著提高免疫原性和高分子量物类的比率，并且不显著降低包含FcRn结合结构域的抗原结合分子的稳定性。包含本发明的FcRn结合结构域的抗原结合分子在促进血浆抗原浓度降低的药代动力学方面极优，并满足低免疫原性、高稳定性和极少聚集体的可开发性标准中。

[1129] 此外，提高在中性或酸性pH下对FcRn的结合亲和力的Fc工程改造可改进抗体的内体再循环效率和药代动力学。然而，抗体氨基酸序列的修饰(例如氨基酸取代和插入)也可能增加治疗性抗体的免疫原性，这继而可导致细胞因子风暴和/或抗药抗体(ADA)的产生。

[1130] 本发明人对包含修饰的FcRn结合结构域的抗原结合分子进行了专心致志的研究，由于在FcRn结合结构域中提高在中性pH或酸性pH下对FcRn的亲和力的取代所致，所述修饰的FcRn结合结构域对预存抗药抗体(ADA)的结合活性在中性pH下提高。结果，发现在FcRn结合结构域特定位置上的其它取代降低在中性pH下对预存抗药抗体(ADA)的结合活性，同时在很高程度上保持在相应pH范围内提高的FcRn结合活性。本发明的抗原结合分子在促进血浆抗原浓度降低而又不增加抗体清除的药代动力学方面极优。

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> 具有促进抗原清除的 FcRn 结合结构域的治疗性抗原结合分子

<130> C1-A1112Y1P

<150> JP 2011-218736
<151> 2011-09-30

<150> JP 2012-139211
<151> 2012-06-20

<150> PCT/JP2012/058603
<151> 2012-03-30

<150> JP 2012-123781
<151> 2012-05-30

<150> JP 2012-123773
<151> 2012-05-30

<150> JP 2012-177311
<151> 2012-08-09

<150> JP 2012-123782
[0001] <151> 2012-05-30

<160> 29

<170> PatentIn 版本 3.4

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

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<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 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

[0002] 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

[0003] 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> 人工合成的肽序列

<400> 2

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

Asp 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

[0004]

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> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的肽序列

〈400〉 3

```
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
```

[0005]

```
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> 4
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 4

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

[0006]

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 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

[0007]

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

<210> 5
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 5

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

[0008]

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 Asp
225 230 235 240

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

[0009]

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

<210> 6
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

[0010]

<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
```

[0011]

```
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 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 Tyr His Val Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

[0012]

<210> 7
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 7

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

[0013]

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 Val Leu Tyr 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 Gln Val Leu His Ala 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

[0014]

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

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

<210> 8
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<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
```

[0015]

```
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 Arg Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

Lys Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr
                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

[0016]

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 Val Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 9
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<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

[0017]

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 Arg Gly Gly Pro
225 230 235 240

Lys 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

[0018]

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 Val Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 10
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<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

[0019]

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

[0020] 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 Leu His Glu
420 425 430

Ala Leu His Ser His Thr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

<210> 11
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 11

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 12
<211> 464
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 12

[0021]
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

[0022]

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 Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
    450                 455                 460
```

[0023]

<210> 13
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 13

```
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

[0024]

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> 14
<211> 451
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 14

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Pro Arg Trp Glu Thr Ala Ile Ser Ser Asp Ala Phe Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

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

[0025] Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

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

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

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

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

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

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

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

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

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

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

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

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

[0026]

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

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro
450

<210> 15
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 15

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 Ser Ile Ser Asp Asp
20 25 30

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

Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

[0027]

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> 16
<211> 451
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 16

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0028] 65 70 75 80

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

Ala Arg Pro Arg Trp Glu Thr Ala Ile Ser Ser Asp Ala Phe Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

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

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

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

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val

180 185 190

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

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

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240

Arg Gly Gly Pro Lys Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

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

[0029] Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

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

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

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

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

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

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro
450

<210> 17
<211> 451
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 17

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
[0030] 20 25 30

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Pro Arg Trp Glu Thr Ala Ile Ser Ser Asp Ala Phe Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly

130 135 140

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

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

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

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

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

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240

[0031] Arg Arg Gly Pro Lys Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

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

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

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

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

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

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

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

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

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Tyr His Val Thr Arg Lys Glu Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro
450

<210> 18
<211> 543
[0032] <212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 18

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

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

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

Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Val Ser Ser Ala Ser Thr Gln Ser Pro Ser Val Phe Pro Leu Thr Arg
115 120 125

Cys Cys Lys Asn Ile Pro Ser Asn Ala Thr Ser Val Thr Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Ala Thr Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Met Val Thr Trp Asp Thr
145 150 155 160

Gly Ser Leu Asn Gly Thr Thr Met Thr Leu Pro Ala Thr Thr Leu Thr
165 170 175

Leu Ser Gly His Tyr Ala Thr Ile Ser Leu Leu Thr Val Ser Gly Ala
180 185 190

Trp Ala Lys Gln Met Phe Thr Cys Arg Val Ala His Thr Pro Ser Ser
195 200 205

[0033] Thr Asp Trp Val Asp Asn Lys Thr Phe Ser Val Cys Ser Arg Asp Phe
210 215 220

Thr Pro Pro Thr Val Lys Ile Leu Gln Ser Ser Cys Asp Gly Gly Gly
225 230 235 240

His Phe Pro Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr
245 250 255

Pro Gly Thr Ile Asn Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp
260 265 270

Val Asp Leu Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser
275 280 285

Thr Gln Ser Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg
290 295 300

Thr Tyr Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser
305 310 315 320

Thr Lys Lys Cys Ala Asp Ser Asn Pro Arg Gly Val Ser Ala Tyr Leu

325 330 335

Ser Arg Pro Ser Pro Phe Asp Leu Phe Ile Arg Lys Ser Pro Thr Ile
340 345 350

Thr Cys Leu Val Val Asp Leu Ala Pro Ser Lys Gly Thr Val Asn Leu
355 360 365

Thr Trp Ser Arg Ala Ser Gly Lys Pro Val Asn His Ser Thr Arg Lys
370 375 380

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

Val Gly Thr Arg Asp Trp Ile Glu Gly Glu Thr Tyr Gln Cys Arg Val
405 410 415

Thr His Pro His Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr Thr Lys Thr
420 425 430

Ser Gly Pro Arg Ala Ala Pro Glu Val Tyr Ala Phe Ala Thr Pro Glu
[0034] 435 440 445

Trp Pro Gly Ser Arg Asp Lys Arg Thr Leu Ala Cys Leu Ile Gln Asn
450 455 460

Phe Met Pro Glu Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu His Asn Glu Val Gln
465 470 475 480

Leu Pro Asp Ala Arg His Ser Thr Thr Gln Pro Arg Lys Thr Lys Gly
485 490 495

Ser Gly Phe Phe Val Phe Ser Arg Leu Glu Val Thr Arg Ala Glu Trp
500 505 510

Glu Gln Lys Asp Glu Phe Ile Cys Arg Ala Val His Glu Ala Ala Ser
515 520 525

Pro Ser Gln Thr Val Gln Arg Ala Val Ser Val Asn Pro Gly Lys
530 535 540

〈210〉 19
〈211〉 219

<212> PRT
<213> 人

<400> 19

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
85 90 95

[0035]

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile 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> 20
<211> 443
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 20

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

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr His
20 25 30

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

Val Ile Asn Ser Ala Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

[0036]

Arg Phe Thr Val Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Asn Leu Thr
65 70 75 80

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

Phe Ser Ser Gly Ser His Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

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

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

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

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

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly 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 His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270

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

[0037]

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

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

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

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

Arg 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 Val 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

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440

<210> 21
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 21

Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Val Ala Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Trp
20 25 30

[0038]

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Cys
65 70 75 80

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

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

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

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
130 135 140

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

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

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

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 22
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

[0039]

<400> 22

Val Asp Asp Ala Pro Gly Asn Ser Gln Gln Ala Thr Pro Lys Asp Asn
1 5 10 15

Glu Ile Ser Thr Phe His Asn Leu Gly Asn Val His Ser Pro Leu Lys
20 25 30

<210> 23
<211> 443
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 23

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

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr His
20 25 30

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

Val Ile Asn Ser Ala Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Val Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Asn Leu Thr
65 70 75 80

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

Phe Ser Ser Gly Ser His Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

[0040] Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

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

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

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

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

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Arg Gly Gly Pro Lys 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 His Glu Asp Pro Glu Val Lys

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 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

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

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

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

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

[0041] 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 Val 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

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440

<210> 24
<211> 443
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 24

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

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr His
20 25 30

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

Val Ile Asn Ser Ala Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Val Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Asn Leu Thr
65 70 75 80

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

Phe Ser Ser Gly Ser His Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

[0042] Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

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

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

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

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

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Arg Arg Gly Pro Lys Val Phe Leu

225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
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 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

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

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

[0043] Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Asp Glu Leu 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 Val 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

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Tyr
420 425 430

His Val Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro
435 440

<210> 25
<211> 543

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 25

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

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

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

Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80
```

[0044]

```
Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

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

Val Ser Ser Ala Ser Thr Gln Ser Pro Ser Val Phe Pro Leu Thr Arg
        115                 120                 125

Cys Cys Lys Asn Ile Pro Ser Asp Ala Thr Ser Val Thr Leu Gly Cys
    130                 135                 140

Leu Ala Thr Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Met Val Thr Trp Asp Thr
145                 150                 155                 160

Gly Ser Leu Asp Gly Thr Thr Met Thr Leu Pro Ala Thr Thr Leu Thr
                165                 170                 175

Leu Ser Gly His Tyr Ala Thr Ile Ser Leu Leu Thr Val Ser Gly Ala
            180                 185                 190

Trp Ala Lys Gln Met Phe Thr Cys Arg Val Ala His Thr Pro Ser Ser
```

195 200 205

Thr Asp Trp Val Asp Asp Lys Thr Phe Ser Val Cys Ser Arg Asp Phe
210 215 220

Thr Pro Pro Thr Val Lys Ile Leu Gln Ser Ser Cys Asp Gly Gly Gly
225 230 235 240

His Phe Pro Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr
245 250 255

Pro Gly Thr Ile Asp Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp
260 265 270

Val Asp Leu Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser
275 280 285

Thr Gln Ser Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg
290 295 300

[0045]

Thr Tyr Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser
305 310 315 320

Thr Lys Lys Cys Ala Asp Ser Asn Pro Arg Gly Val Ser Ala Tyr Leu
325 330 335

Ser Arg Pro Ser Pro Phe Asp Leu Phe Ile Arg Lys Ser Pro Thr Ile
340 345 350

Thr Cys Leu Val Val Asp Leu Ala Pro Ser Lys Gly Thr Val Asp Leu
355 360 365

Thr Trp Ser Arg Ala Ser Gly Lys Pro Val Asp His Ser Thr Arg Lys
370 375 380

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

Val Gly Thr Arg Asp Trp Ile Glu Gly Glu Thr Tyr Gln Cys Arg Val
405 410 415

Thr His Pro His Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr Thr Lys Thr
420 425 430

Ser Gly Pro Arg Ala Ala Pro Glu Val Tyr Ala Phe Ala Thr Pro Glu
435 440 445

Trp Pro Gly Ser Arg Asp Lys Arg Thr Leu Ala Cys Leu Ile Gln Asn
450 455 460

Phe Met Pro Glu Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu His Asn Glu Val Gln
465 470 475 480

Leu Pro Asp Ala Arg His Ser Thr Thr Gln Pro Arg Lys Thr Lys Gly
485 490 495

Ser Gly Phe Phe Val Phe Ser Arg Leu Glu Val Thr Arg Ala Glu Trp
500 505 510

Glu Gln Lys Asp Glu Phe Ile Cys Arg Ala Val His Glu Ala Ala Ser
515 520 525

Pro Ser Gln Thr Val Gln Arg Ala Val Ser Val Asn Pro Gly Lys
530 535 540

[0046]

<210> 26
<211> 545
<212> PRT
<213> 人

<400> 26

Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro Asp Ala Thr Cys His Gln Val Arg Ser
1 5 10 15

Phe Phe Gln Arg Leu Gln Pro Gly Leu Lys Trp Val Pro Glu Thr Pro
20 25 30

Val Pro Gly Ser Asp Leu Gln Val Cys Leu Pro Lys Gly Pro Thr Cys
35 40 45

Cys Ser Arg Lys Met Glu Glu Lys Tyr Gln Leu Thr Ala Arg Leu Asn
50 55 60

Met Glu Gln Leu Leu Gln Ser Ala Ser Met Glu Leu Lys Phe Leu Ile
65 70 75 80

Ile Gln Asn Ala Ala Val Phe Gln Glu Ala Phe Glu Ile Val Val Arg
85 90 95

His Ala Lys Asn Tyr Thr Asn Ala Met Phe Lys Asn Asn Tyr Pro Ser
100 105 110

Leu Thr Pro Gln Ala Phe Glu Phe Val Gly Glu Phe Phe Thr Asp Val
115 120 125

Ser Leu Tyr Ile Leu Gly Ser Asp Ile Asn Val Asp Asp Met Val Asn
130 135 140

Glu Leu Phe Asp Ser Leu Phe Pro Val Ile Tyr Thr Gln Leu Met Asn
145 150 155 160

Pro Gly Leu Pro Asp Ser Ala Leu Asp Ile Asn Glu Cys Leu Arg Gly
165 170 175

Ala Arg Arg Asp Leu Lys Val Phe Gly Asn Phe Pro Lys Leu Ile Met
180 185 190

[0047] Thr Gln Val Ser Lys Ser Leu Gln Val Thr Arg Ile Phe Leu Gln Ala
195 200 205

Leu Asn Leu Gly Ile Glu Val Ile Asn Thr Thr Asp His Leu Lys Phe
210 215 220

Ser Lys Asp Cys Gly Arg Met Leu Thr Arg Met Trp Tyr Cys Ser Tyr
225 230 235 240

Cys Gln Gly Leu Met Met Val Lys Pro Cys Gly Gly Tyr Cys Asn Val
245 250 255

Val Met Gln Gly Cys Met Ala Gly Val Val Glu Ile Asp Lys Tyr Trp
260 265 270

Arg Glu Tyr Ile Leu Ser Leu Glu Glu Leu Val Asn Gly Met Tyr Arg
275 280 285

Ile Tyr Asp Met Glu Asn Val Leu Leu Gly Leu Phe Ser Thr Ile His
290 295 300

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

305 310 315 320

Ile Gly Lys Leu Cys Ala His Ser Gln Gln Arg Gln Tyr Arg Ser Ala
325 330 335

Tyr Tyr Pro Glu Asp Leu Phe Ile Asp Lys Lys Val Leu Lys Val Ala
340 345 350

His Val Glu His Glu Glu Thr Leu Ser Ser Arg Arg Arg Glu Leu Ile
355 360 365

Gln Lys Leu Lys Ser Phe Ile Ser Phe Tyr Ser Ala Leu Pro Gly Tyr
370 375 380

Ile Cys Ser His Ser Pro Val Ala Glu Asn Asp Thr Leu Cys Trp Asn
385 390 395 400

Gly Gln Glu Leu Val Glu Arg Tyr Ser Gln Lys Ala Ala Arg Asn Gly
405 410 415

Met Lys Asn Gln Phe Asn Leu His Glu Leu Lys Met Lys Gly Pro Glu
420 425 430

[0048]

Pro Val Val Ser Gln Ile Ile Asp Lys Leu Lys His Ile Asn Gln Leu
435 440 445

Leu Arg Thr Met Ser Met Pro Lys Gly Arg Val Leu Asp Lys Asn Leu
450 455 460

Asp Glu Glu Gly Phe Glu Ala Gly Asp Cys Gly Asp Asp Glu Asp Glu
465 470 475 480

Cys Ile Gly Gly Ala Gly Asp Gly Met Ile Lys Val Lys Asn Gln Leu
485 490 495

Arg Phe Leu Ala Glu Leu Ala Tyr Asp Leu Asp Val Asp Asp Ala Pro
500 505 510

Gly Asn Ser Gln Gln Ala Thr Pro Lys Asp Asn Glu Ile Ser Thr Phe
515 520 525

His Asn Leu Gly Asn Val His Ser Pro Leu Lys His His His His His
530 535 540

His
545

<210> 27
<211> 365
<212> PRT
<213> 人

<400> 27

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

[0049]

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

[0050] 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> 28
<211> 119
<212> PRT
<213> 人

<400> 28

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

[0051]

Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile
100 105 110

Val Lys Trp Asp Arg Asp Met
115

<210> 29
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 29

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

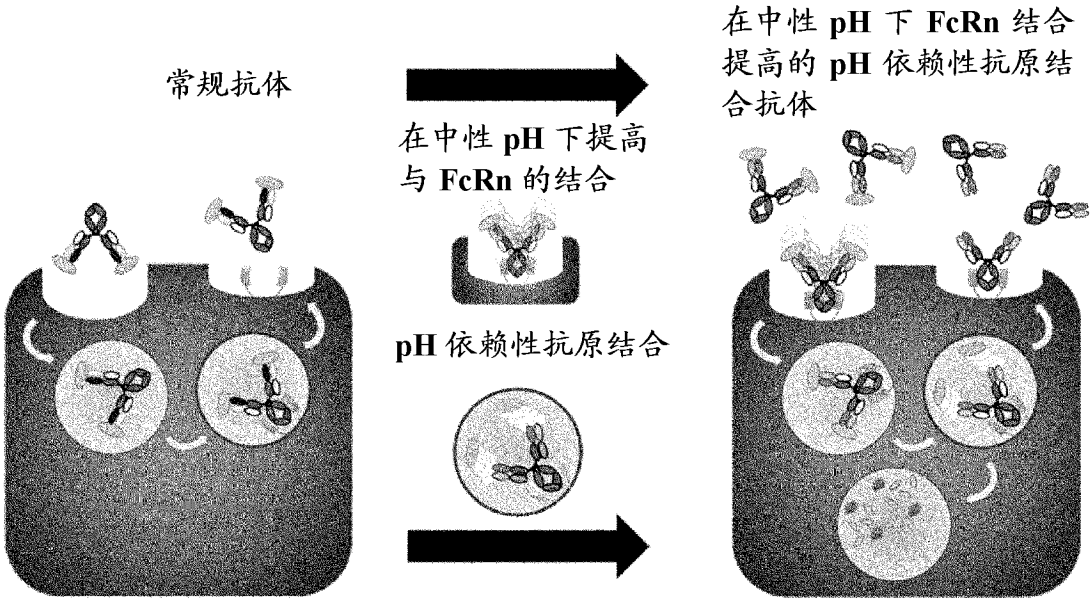
常规抗体
在中性 pH 下提高
与 FcRn 的结合
pH 依赖性抗原结合
在中性 pH 下 FcRn 结合
提高的 pH 依赖性抗原结
合抗体

图 1A

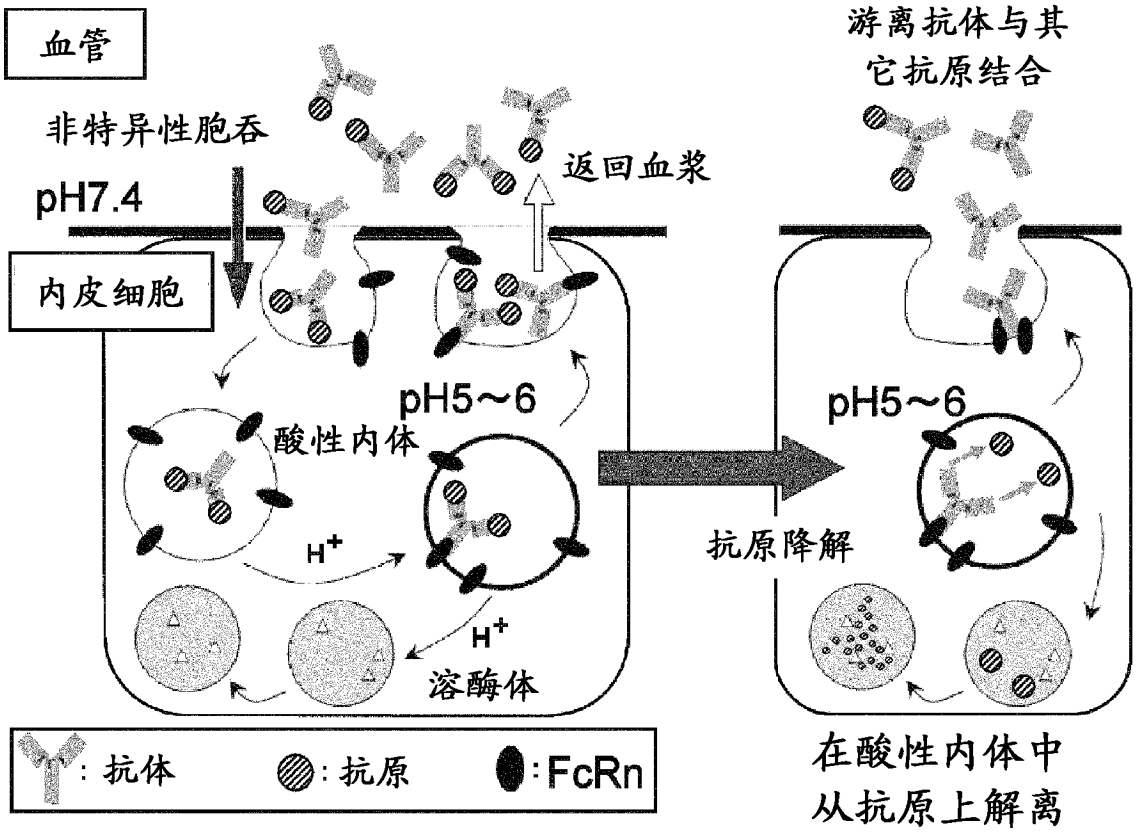
血管
非特异性胞吞
pH7.4
返回血浆
内皮细胞
pH5~6
酸性内体
H+
H+
溶酶体
游离抗体与其
它抗原结合
pH5~6
抗原降解
在酸性内体中
从抗原上解离
: 抗体
: 抗原
: FcRn

图 1B

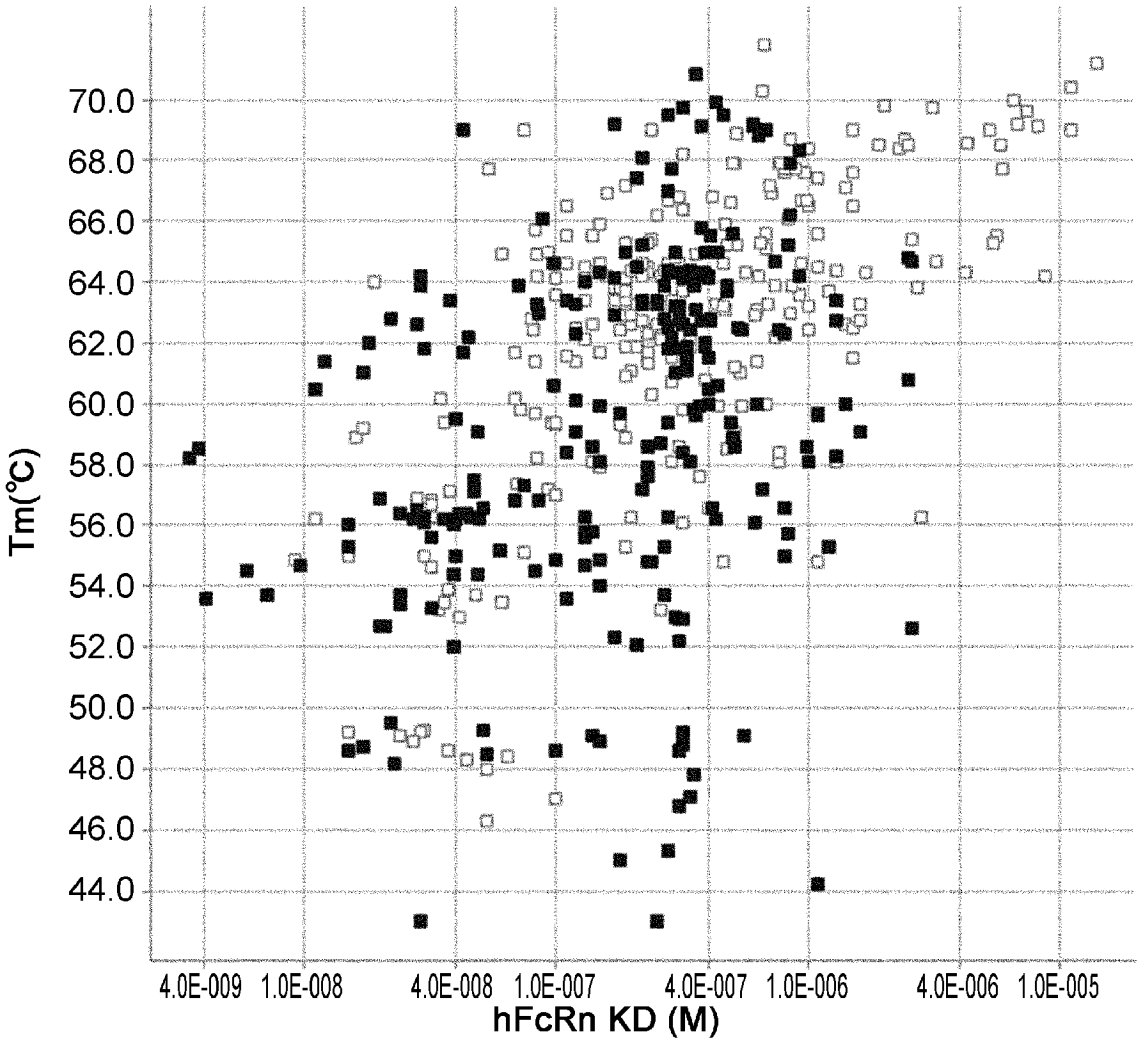
70.0
68.0
66.0
64.0
62.0
60.0
58.0
56.0
54.0
52.0
50.0
48.0
46.0
44.0
Tm(℃)
4.0E-009
1.0E-008
4.0E-008
1.0E-007
4.0E-007
1.0E-006
4.0E-006
1.0E-005
hFcRn KD (M)

图 2

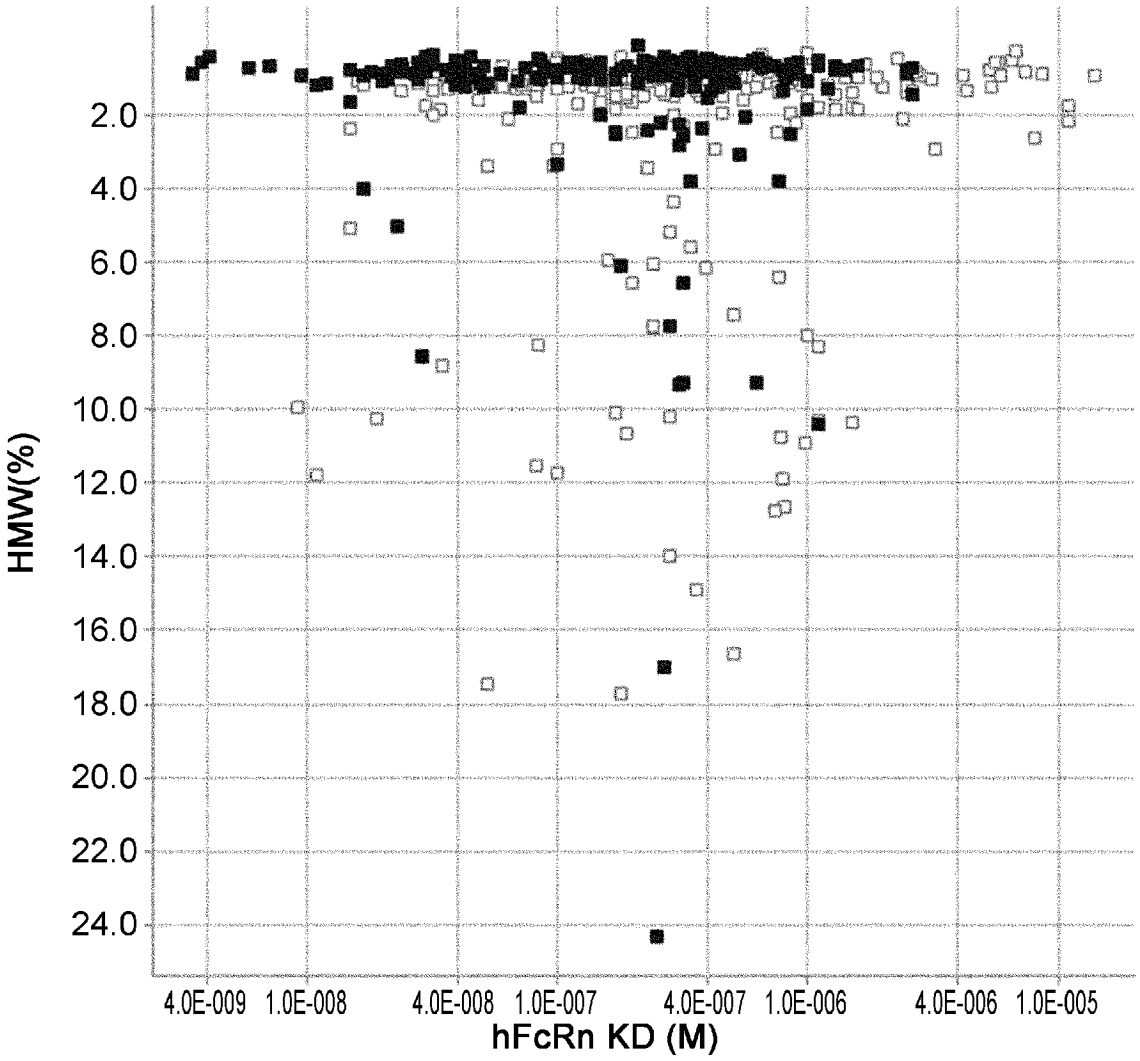
HMW(%)
2.0
4.0
6.0
8.0
10.0
12.0
14.0
16.0
18.0
20.0
22.0
24.0
4.0E-009
1.0E-008
4.0E-008
1.0E-007
4.0E-007
1.0E-006
4.0E-006
1.0E-005
hFcRn KD (M)

图 3

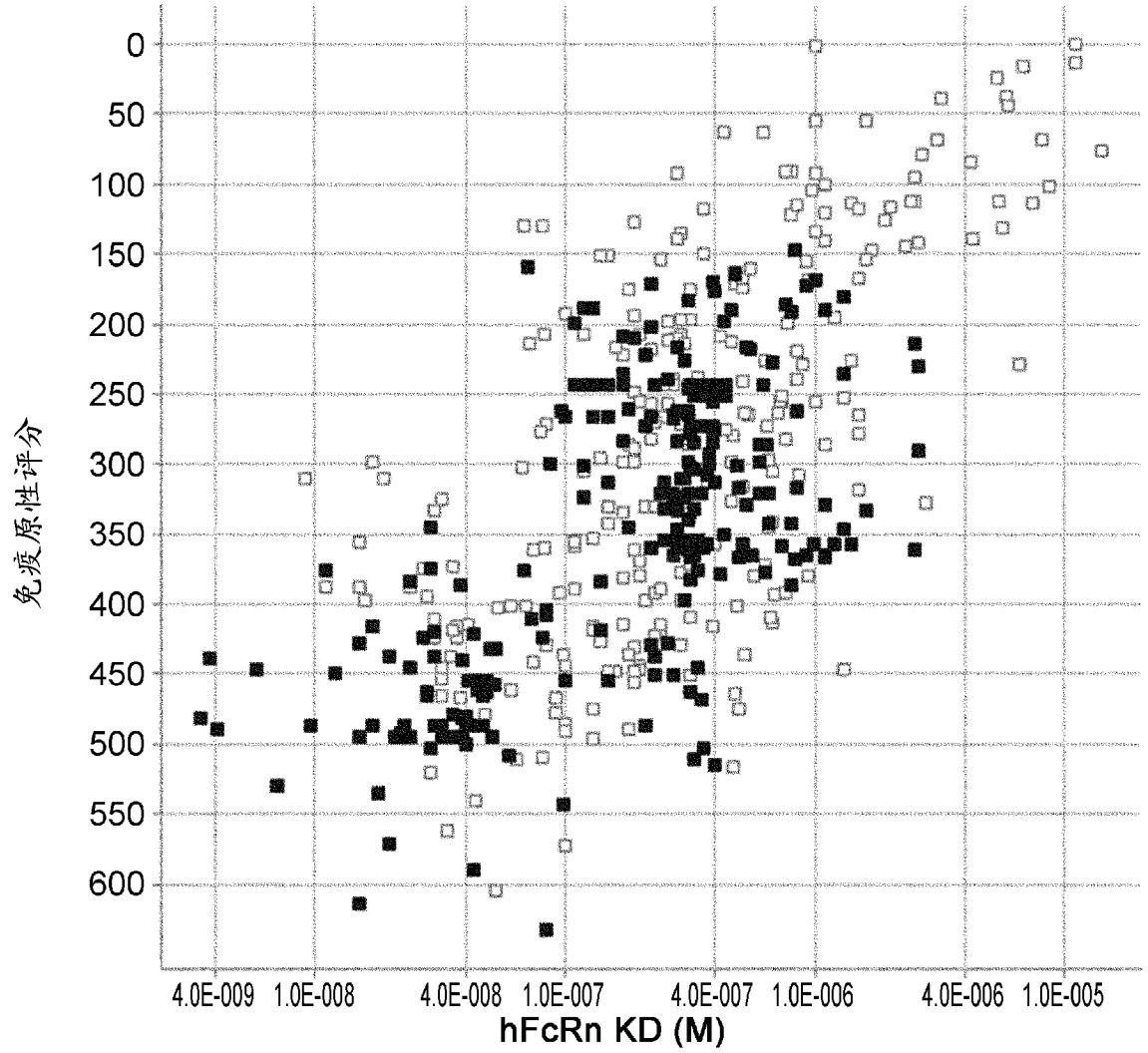
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450
500
550
600
免疫原性评分
4.0E-009
1.0E-008
4.0E-008
1.0E-007
4.0E-007
1.0E-006
4.0E-006
1.0E-005
hFcRn KD (M)

图 4

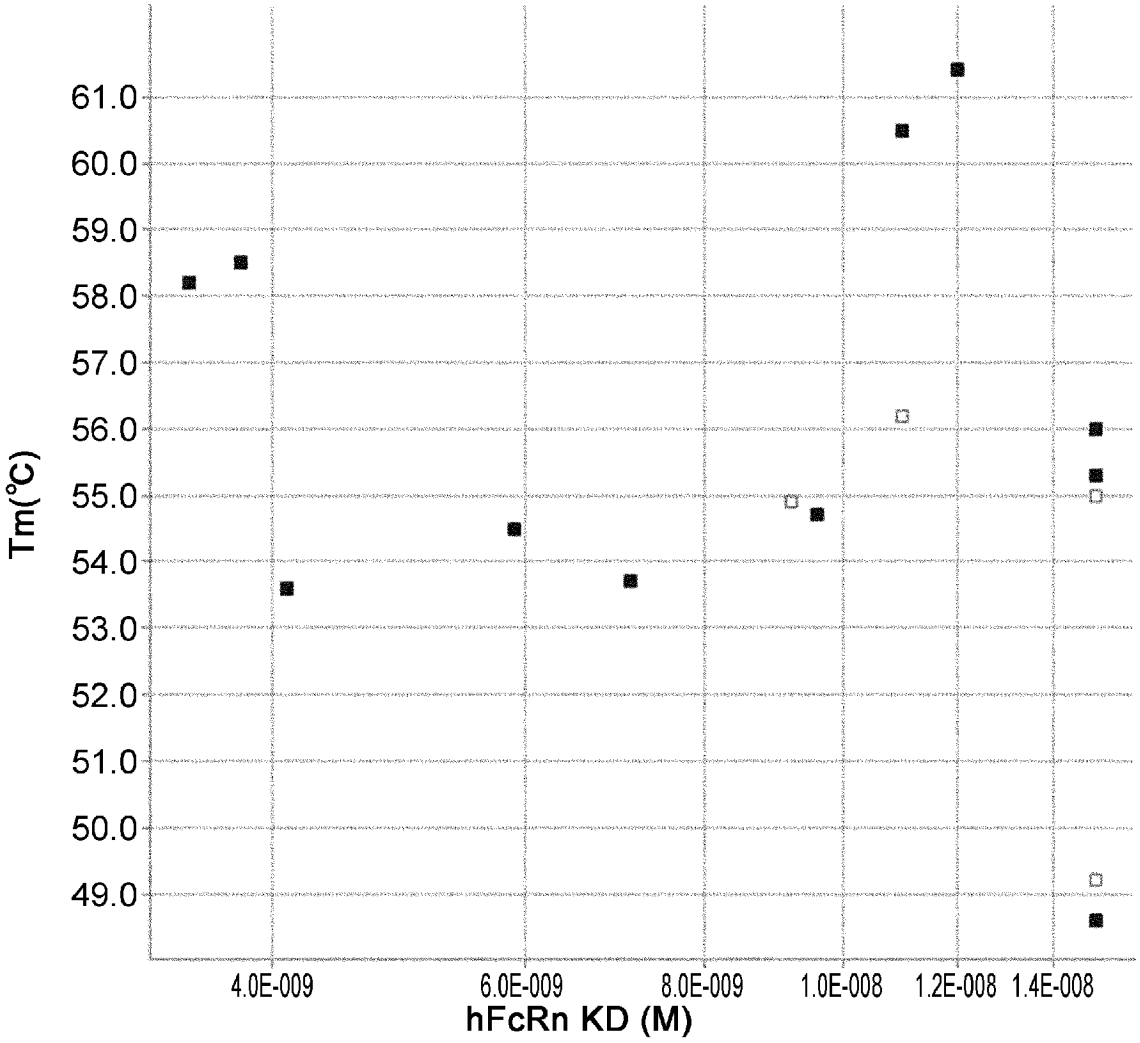
61.0
60.0
59.0
58.0
57.0
56.0
55.0
54.0
53.0
52.0
51.0
50.0
49.0
Tm(°C)
4.0E-009
6.0E-009
8.0E-009
1.0E-008
1.2E-008
1.4E-008
hFcRn KD (M)

图 5

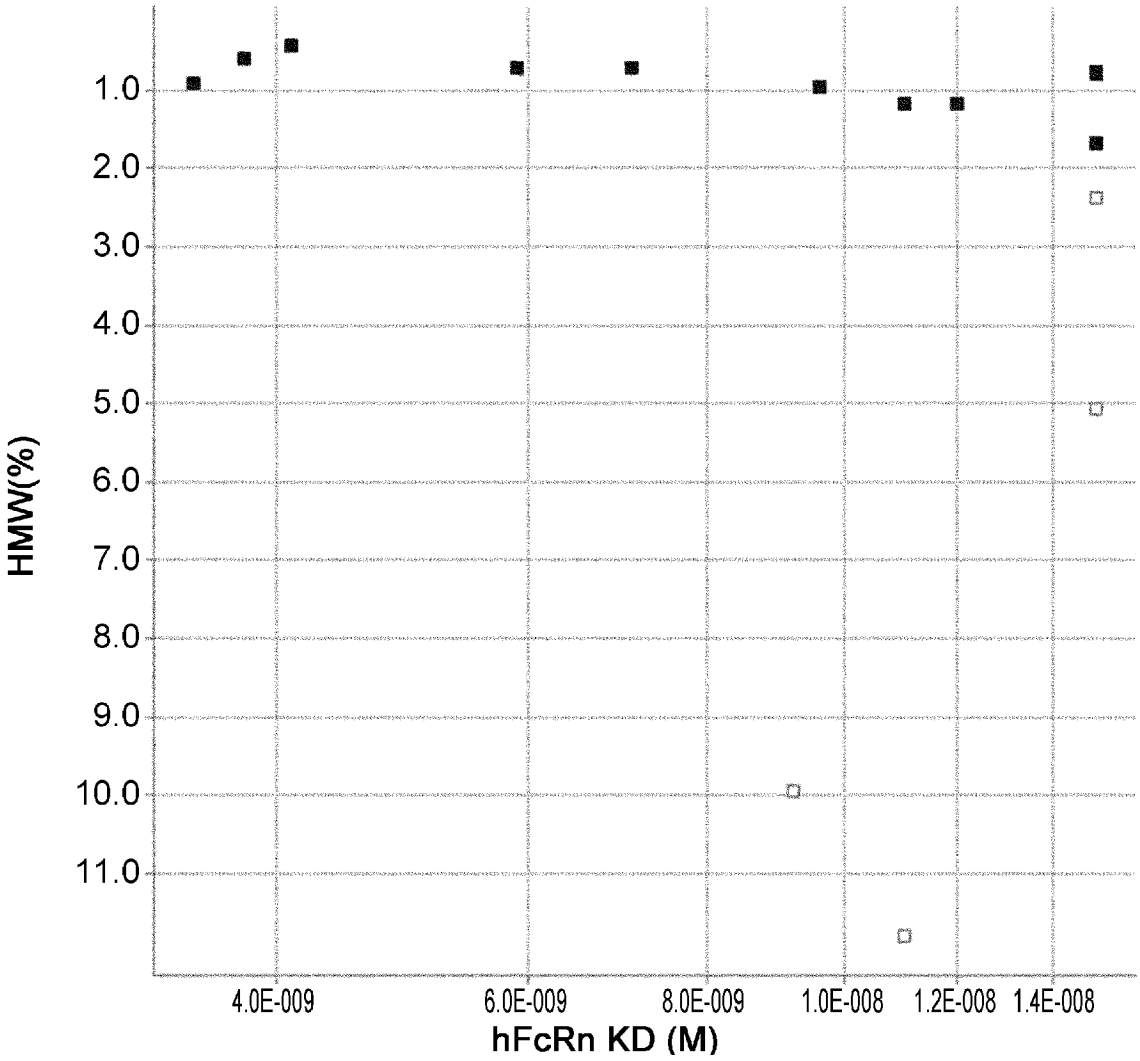
HMW(%)
1.0
2.0
3.0
4.0
5.0
6.0
7.0
8.0
9.0
10.0
11.0
4.0E-009
6.0E-009
8.0E-009
1.0E-008
1.2E-008
1.4E-008
hFcRn KD (M)

图 6

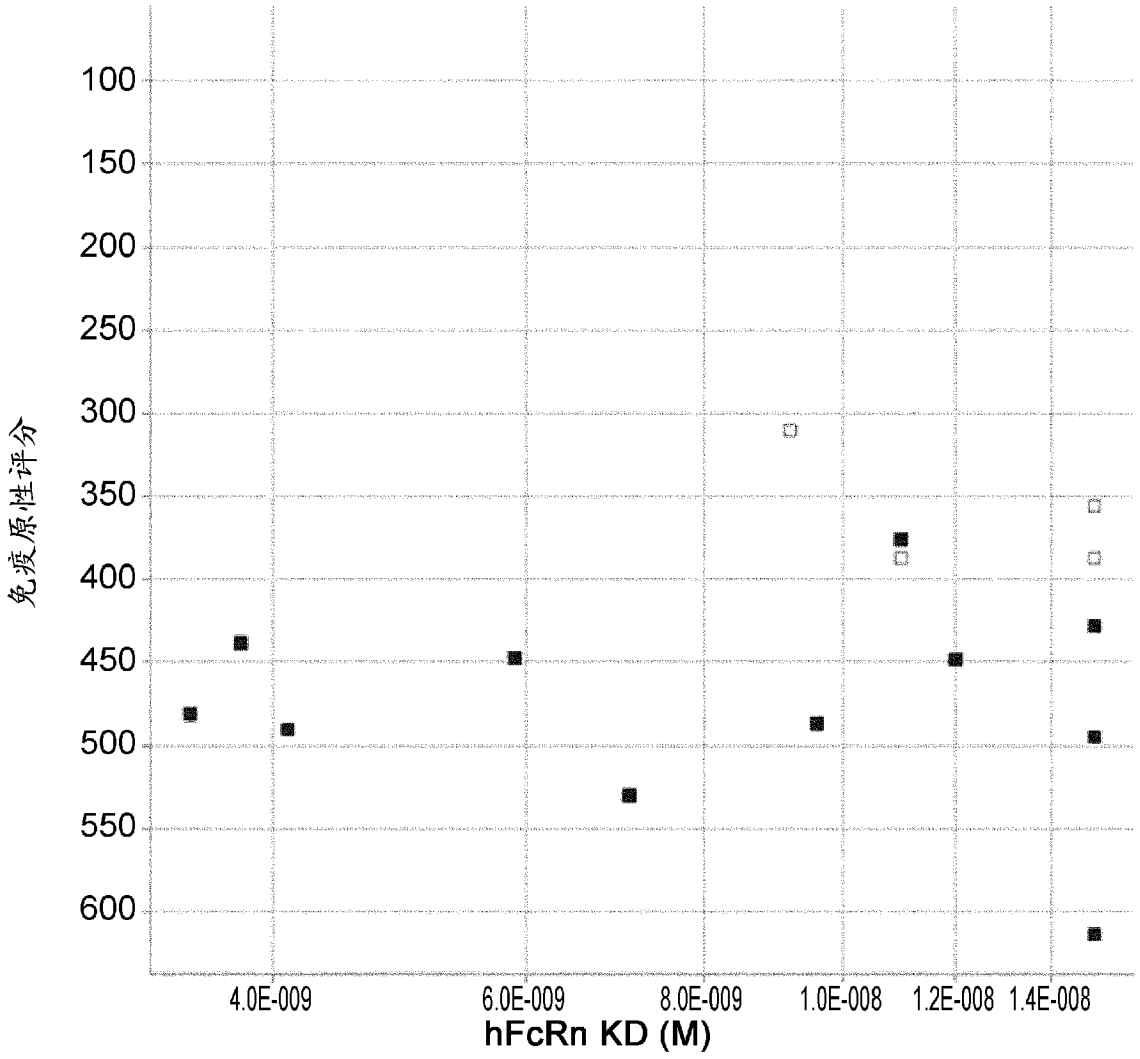
100
150
200
250
300
350
400
450
500
550
600
免疫原性评分
4.0E-009
6.0E-009
8.0E-009
1.0E-008
1.2E-008
1.4E-008
hFcRn KD (M)

图 7

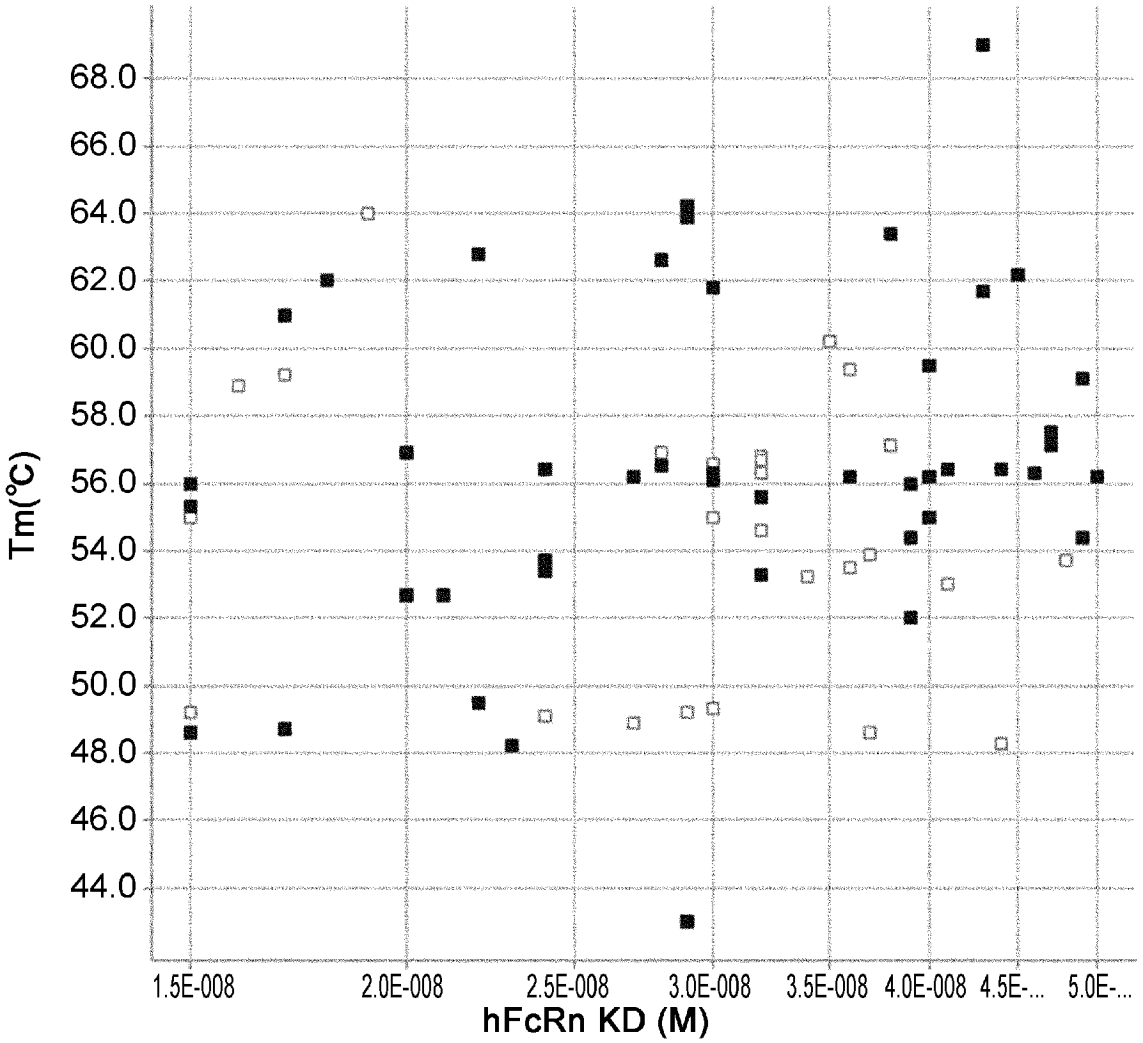
68.0
66.0
64.0
62.0
60.0
58.0
56.0
54.0
52.0
50.0
48.0
46.0
44.0
Tm(°C)
1.5E-008
2.0E-008
2.5E-008
3.0E-008
3.5E-008
4.0E-008
4.5E-...
5.0E-...
hFcRn KD (M)

图 8

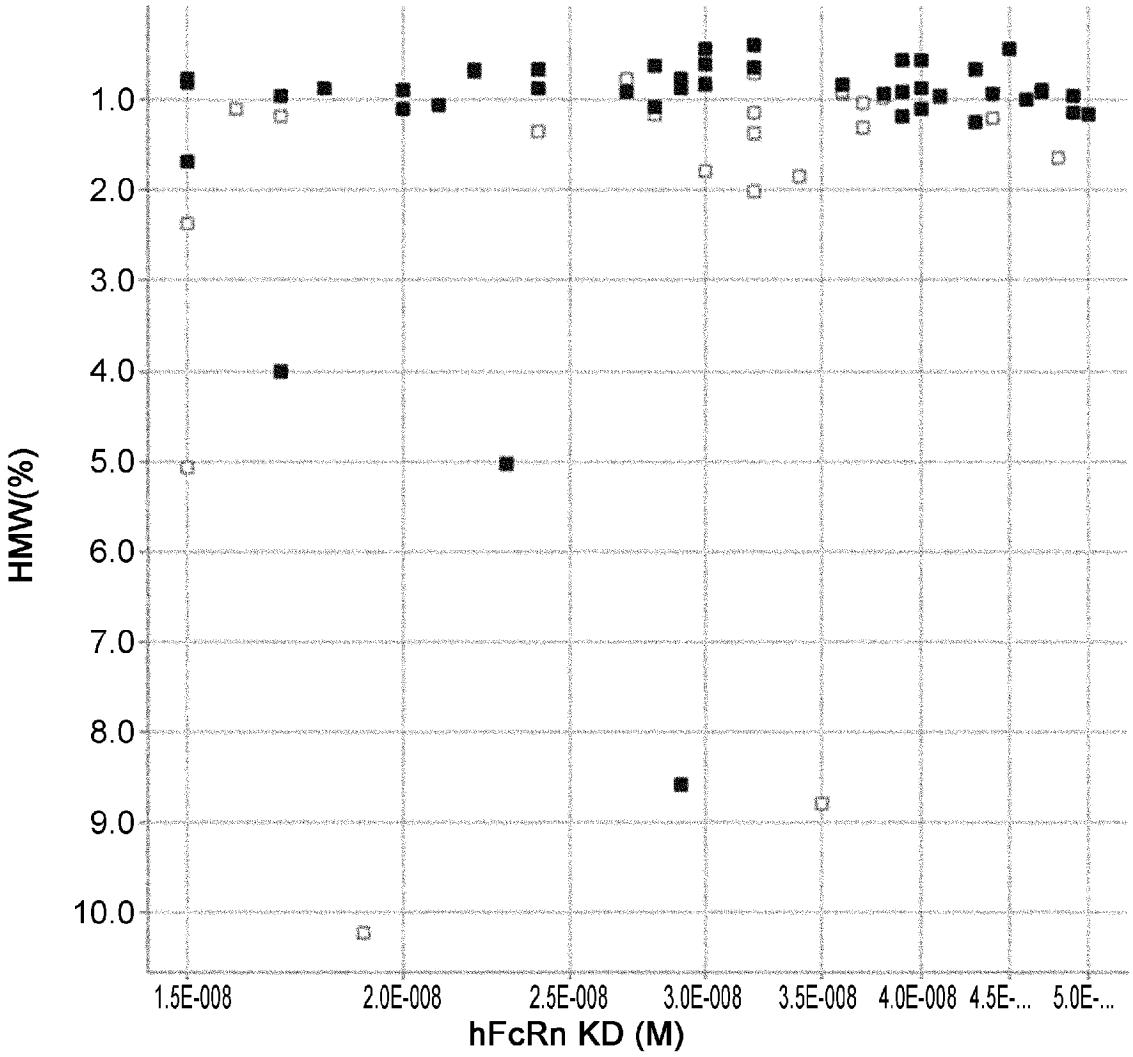
HMW(%)
1.0
2.0
3.0
4.0
5.0
6.0
7.0
8.0
9.0
10.0
1.5E-008
2.0E-008
2.5E-008
3.0E-008
3.5E-008
4.0E-008
4.5E-...
5.0E-...
hFcRn KD (M)

图 9

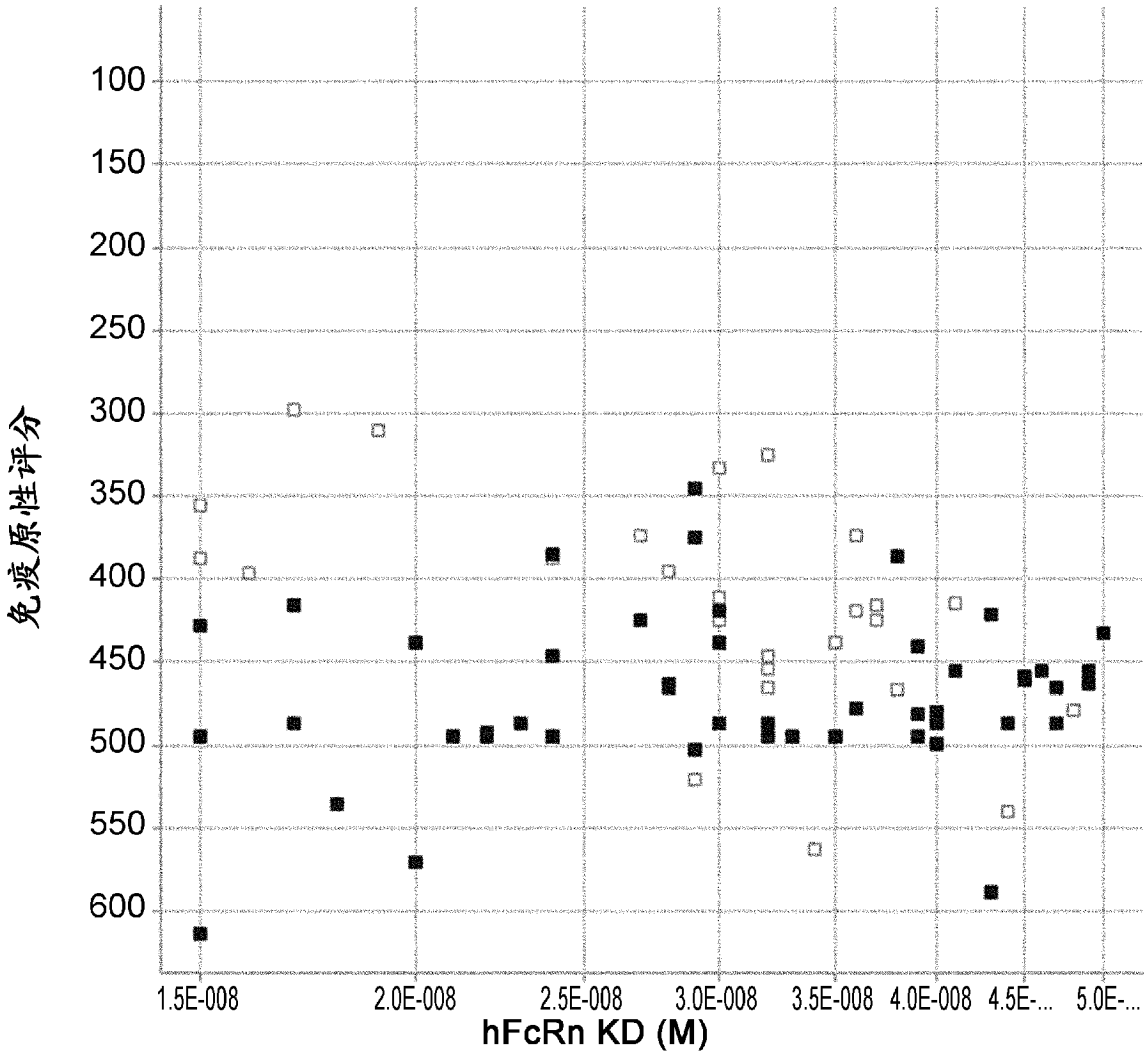
免疫原性评分
100
150
200
250
300
350
400
450
500
550
600
1.5E-008
2.0E-008
2.5E-008
3.0E-008
3.5E-008
4.0E-008
4.5E-...
5.0E-...
hFcRn KD (M)

图 10

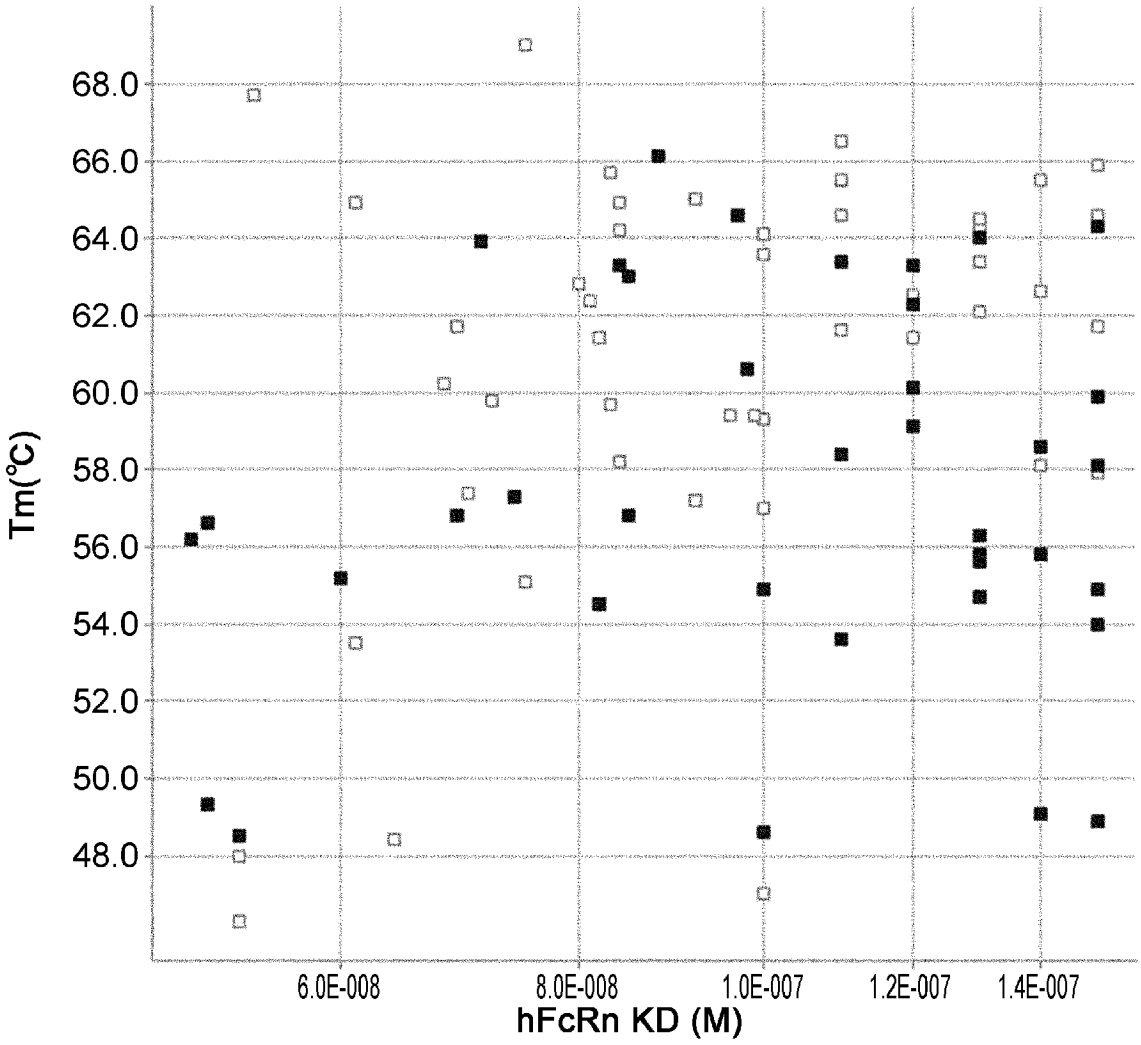
68.0
66.0
64.0
62.0
60.0
58.0
56.0
54.0
52.0
50.0
48.0
Tm(℃)
6.0E-008
8.0E-008
1.0E-007
1.2E-007
1.4E-007
hFcRn KD (M)

图 11

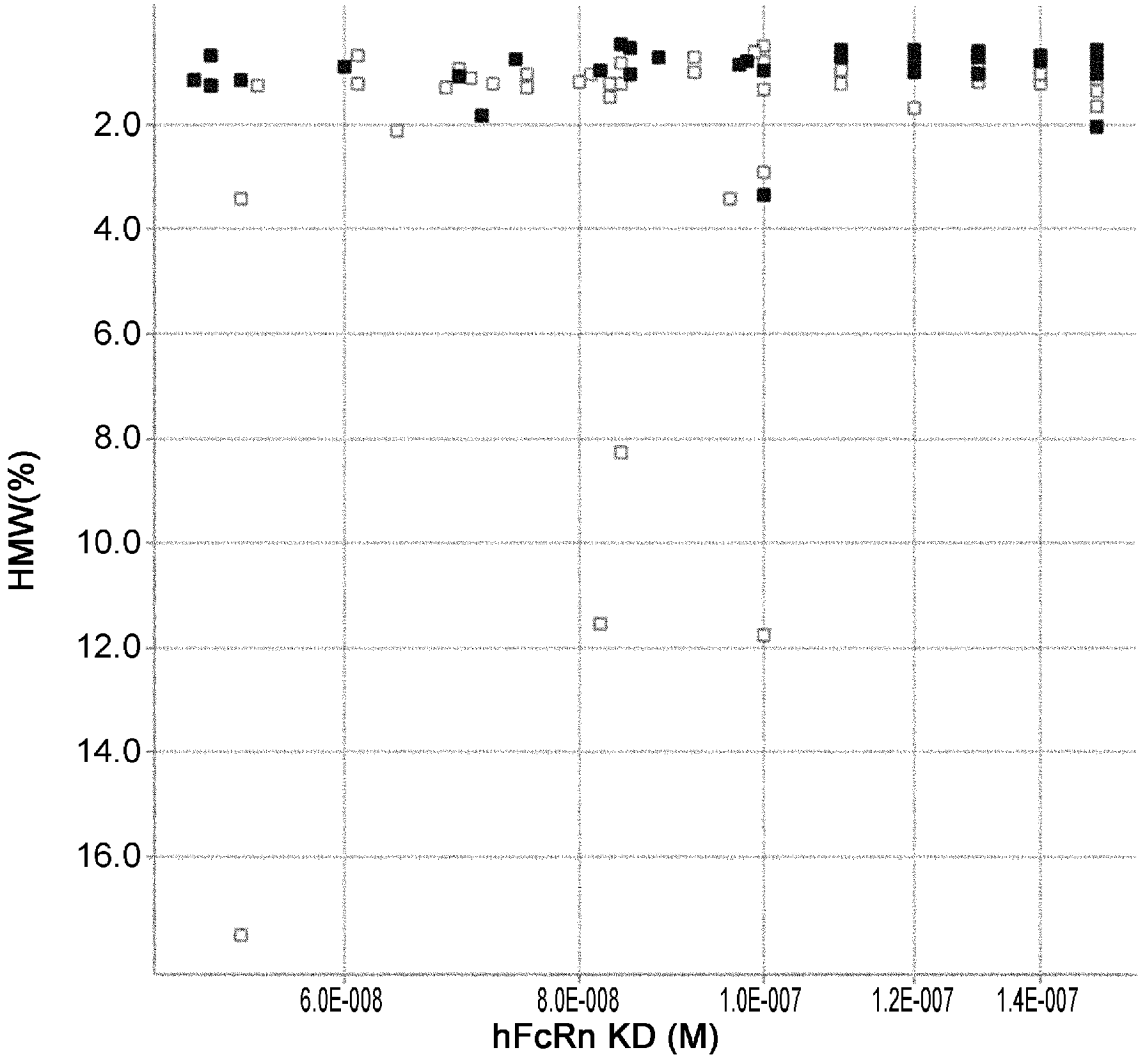
2.0
4.0
6.0
8.0
10.0
12.0
14.0
16.0
HMW(%)
6.0E-008
8.0E-008
1.0E-007
1.2E-007
1.4E-007
hFcRn KD (M)

图 12

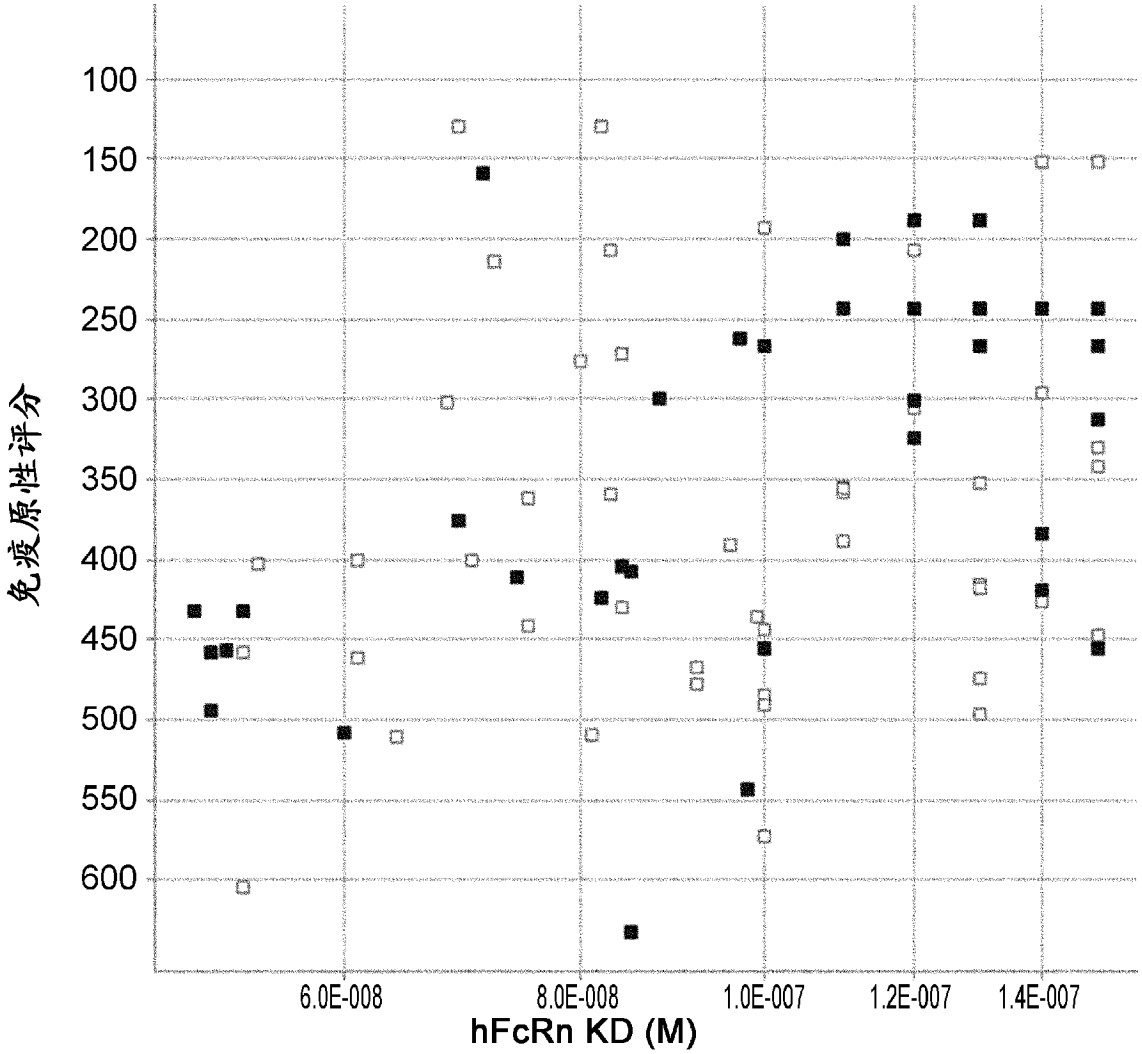
100
150
200
250
300
350
400
450
500
550
600
免疫原性评分
6.0E-008
8.0E-008
1.0E-007
1.2E-007
1.4E-007
hFcRn KD (M)

图 13

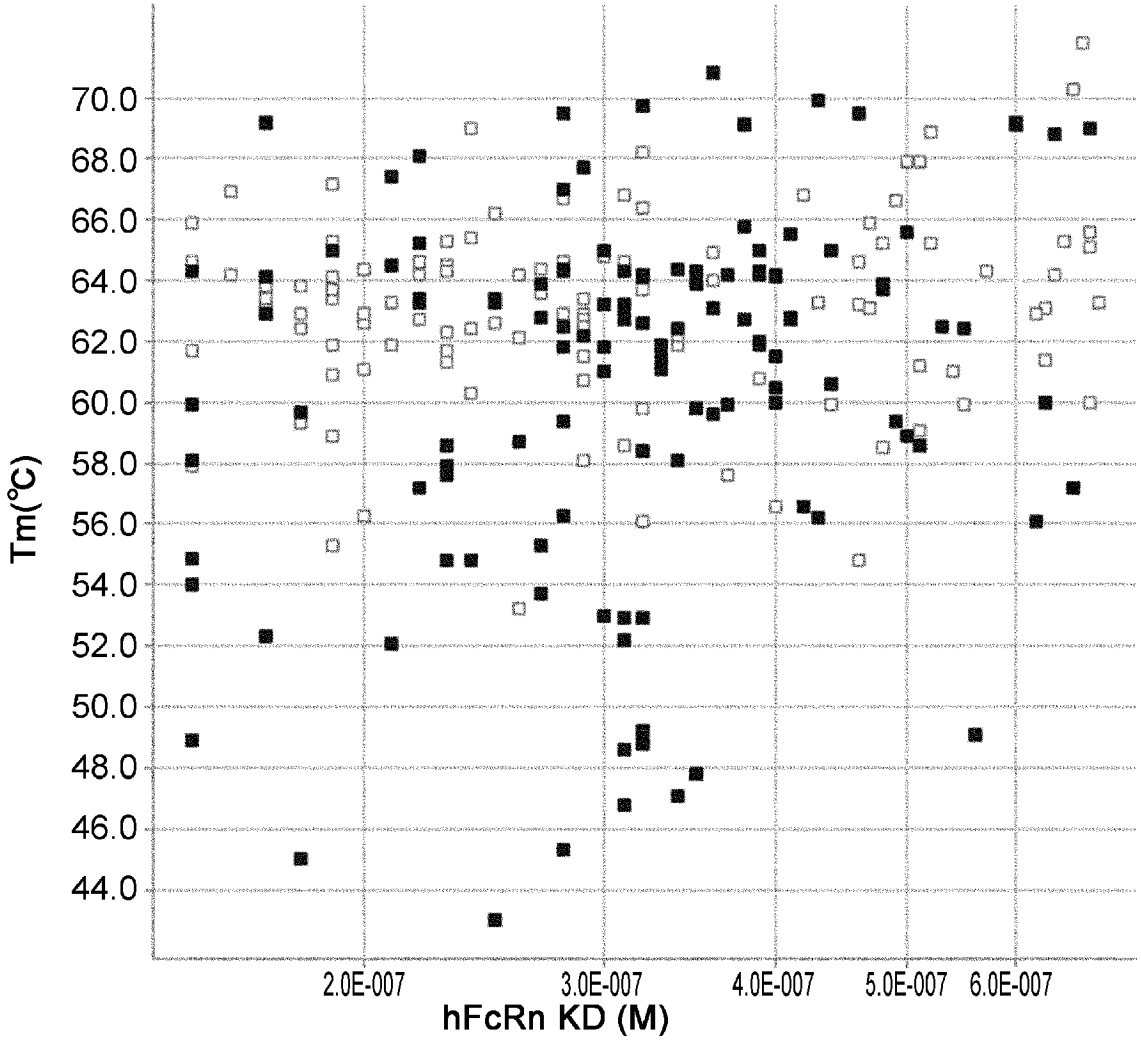
70.0
68.0
66.0
64.0
62.0
60.0
58.0
56.0
54.0
52.0
50.0
48.0
46.0
44.0
Tm(℃)
2.0E-007
3.0E-007
4.0E-007
5.0E-007
6.0E-007
hFcRn KD (M)

图 14

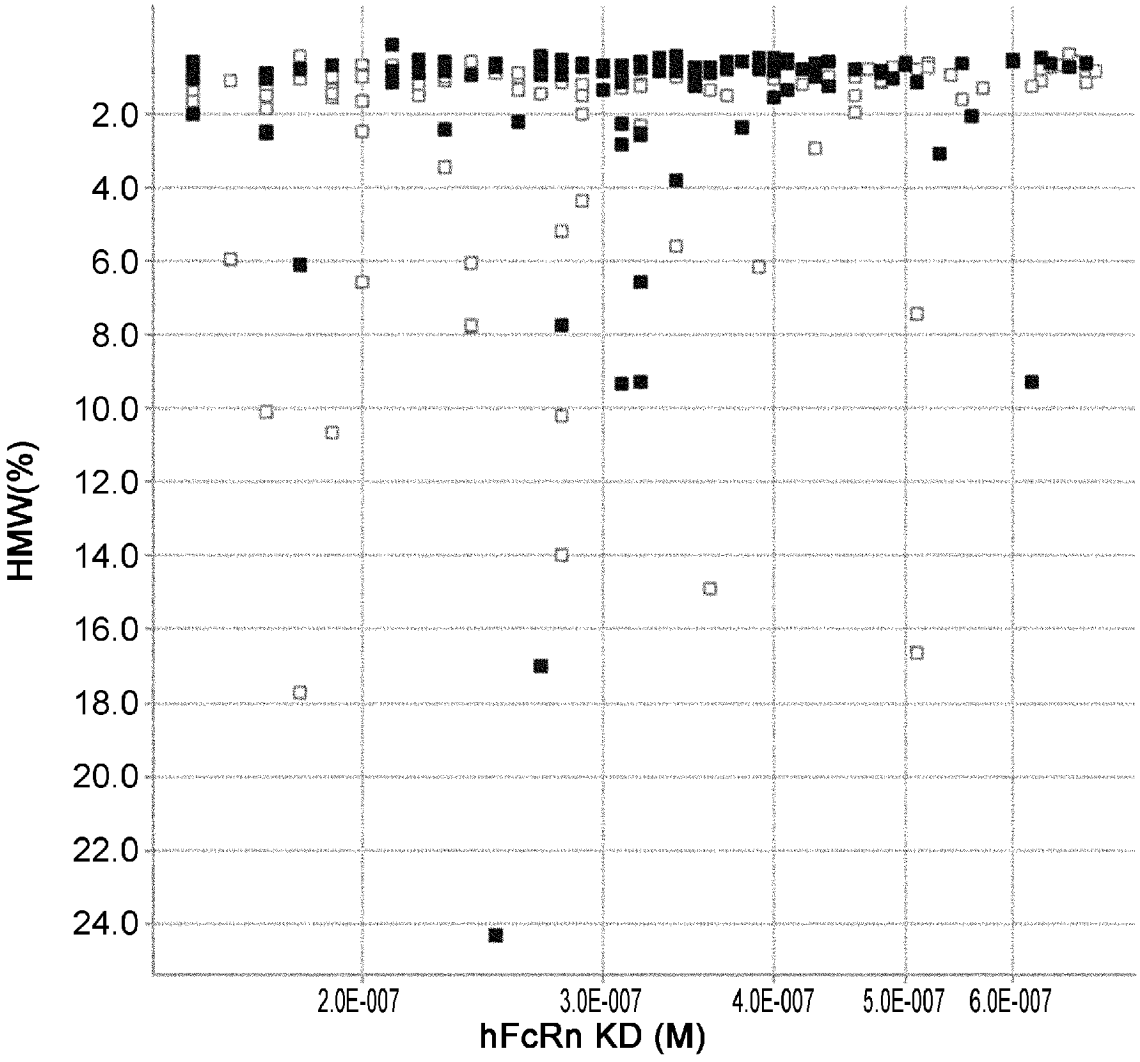
HMW(%)
2.0
4.0
6.0
8.0
10.0
12.0
14.0
16.0
18.0
20.0
22.0
24.0
2.0E-007
3.0E-007
4.0E-007
5.0E-007
6.0E-007
hFcRn KD (M)

图 15

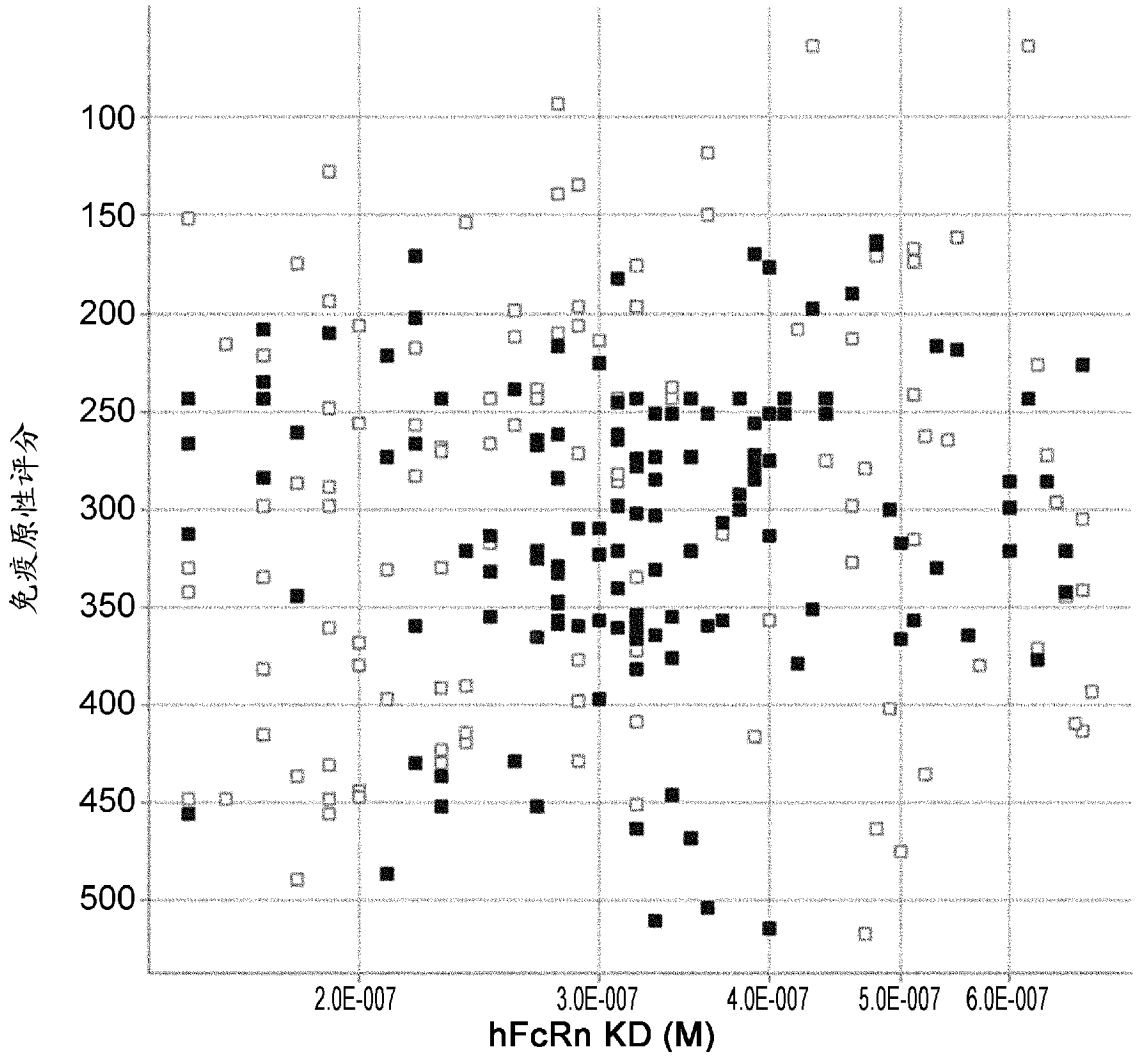
100
150
200
250
300
350
400
450
500
免疫原性评分
2.0E-007
3.0E-007
4.0E-007
5.0E-007
6.0E-007
hFcRn KD (M)

图 16

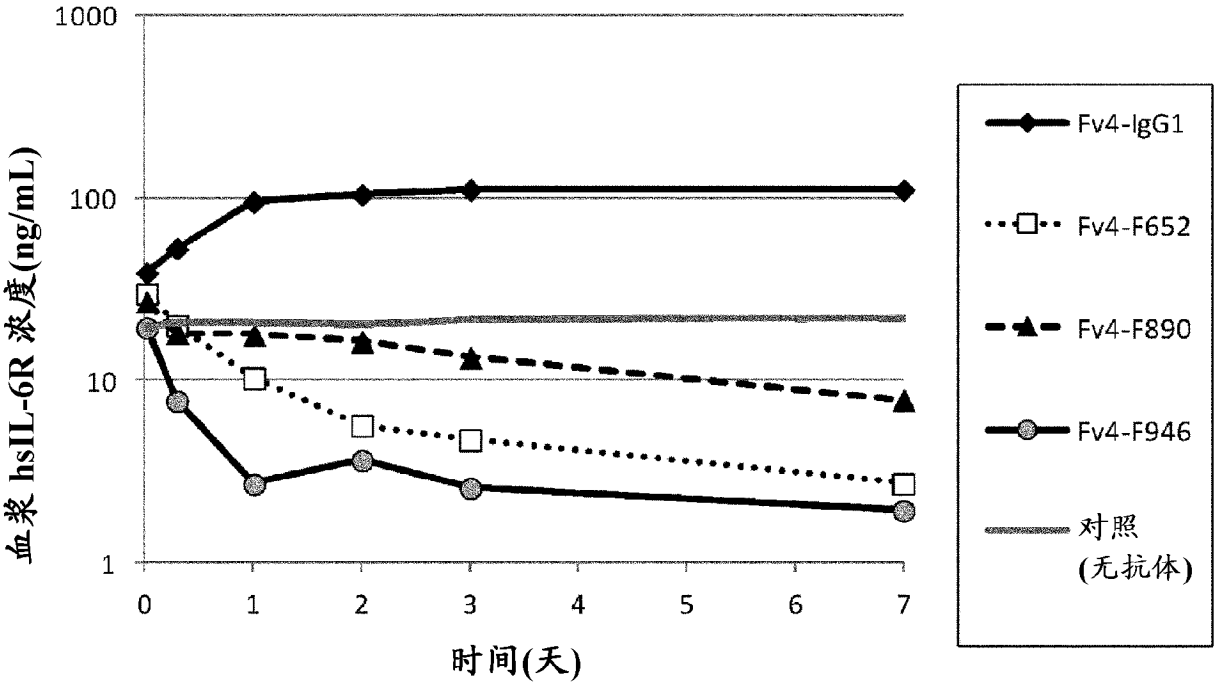
1000
100
10
1
血浆 hsIL-6R 浓度(ng/mL)
0
1
2
3
4
5
6
7
时间(天)
Fv4-IgG1
Fv4-F652
Fv4-F890
Fv4-F946
对照
(无抗体)

图 17

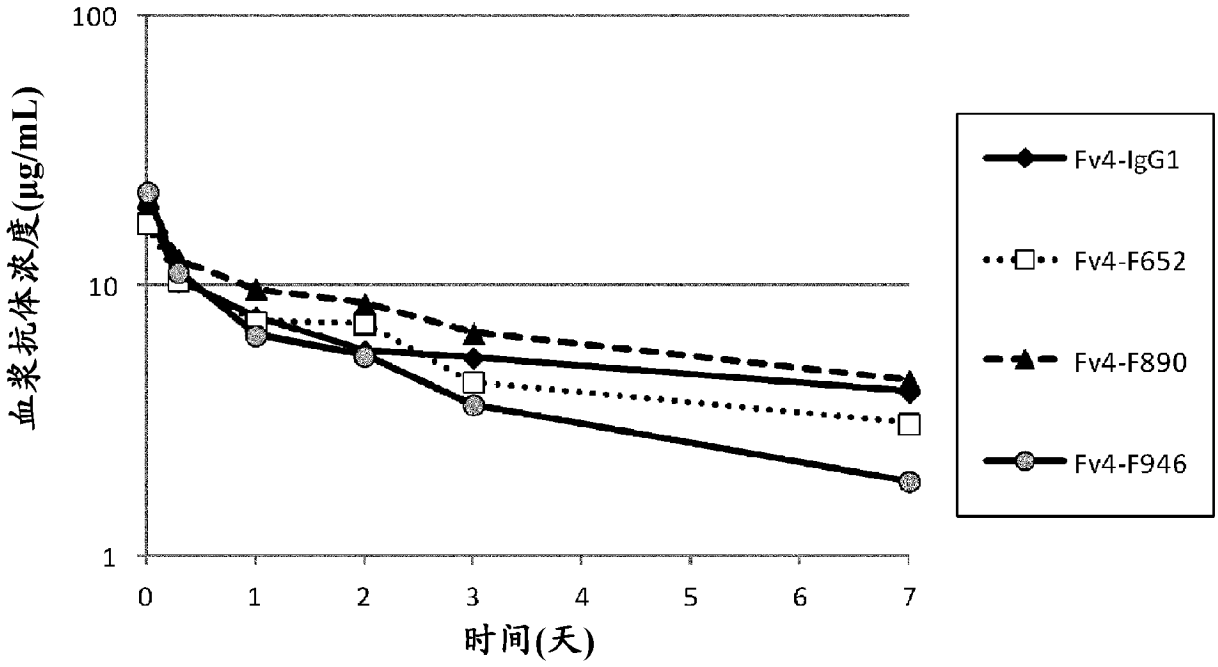
100
10
1
血浆抗体浓度(μg/mL)
0
1
2
3
4
5
6
7
时间(天)
Fv4-IgG1
Fv4-F652
Fv4-F890
Fv4-F946

图 18

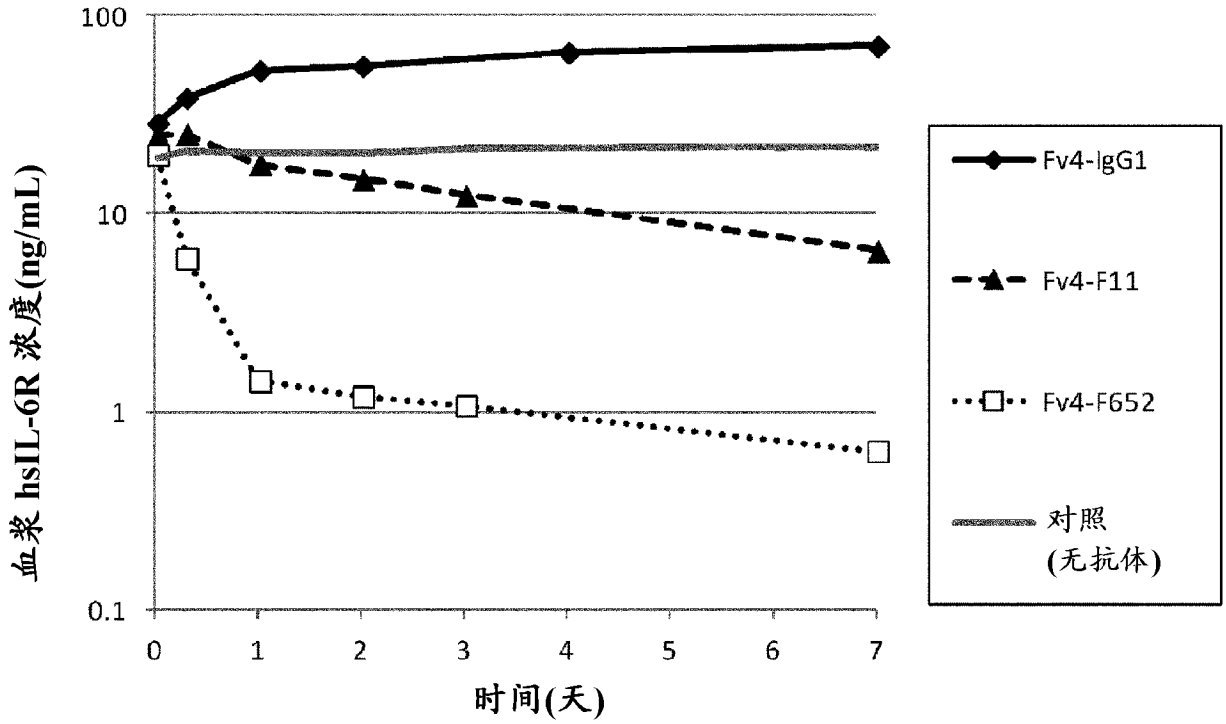
100
10
1
0.1
血浆 hsIL-6R 浓度(ng/mL)
0
1
2
3
4
5
6
7
时间(天)
Fv4-IgG1
Fv4-F11
Fv4-F652
对照
(无抗体)

图 19

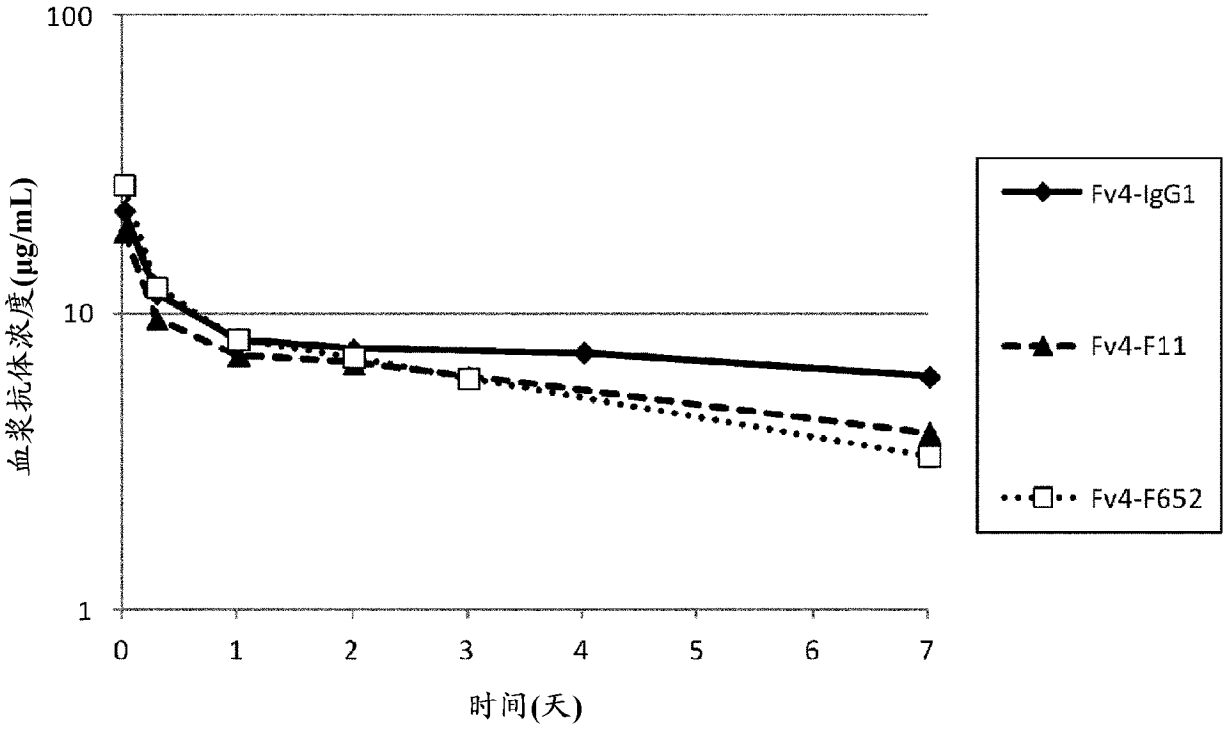
100
10
1
血浆抗体浓度(μg/mL)
0
1
2
3
4
5
6
7
时间(天)
Fv4-IgG1
Fv4-F11
Fv4-F652

图 20

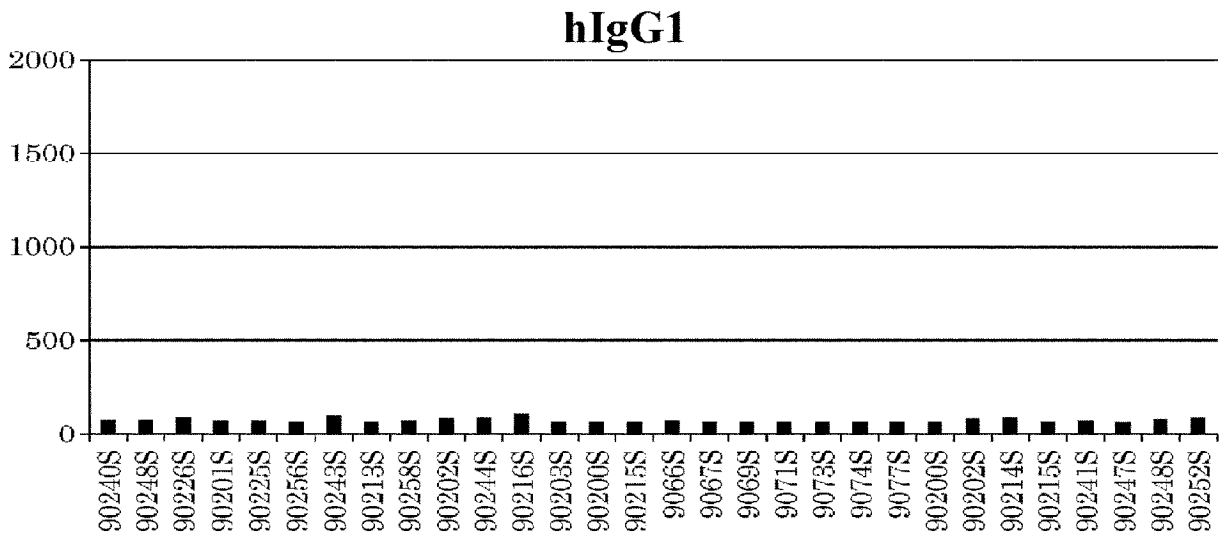
hIgG1
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 21-1

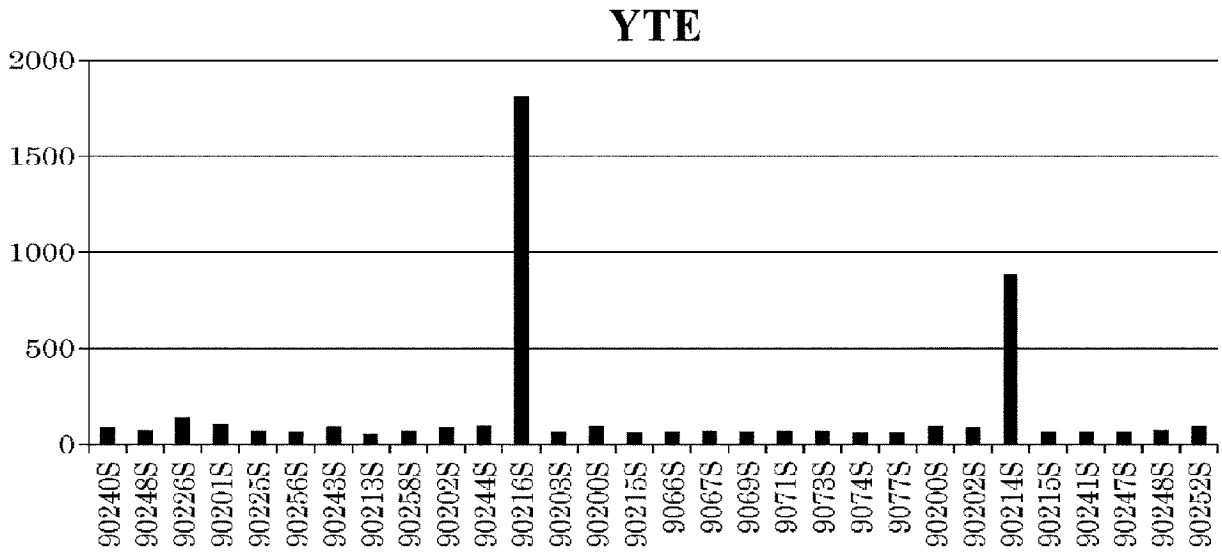
YTE
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 21-2

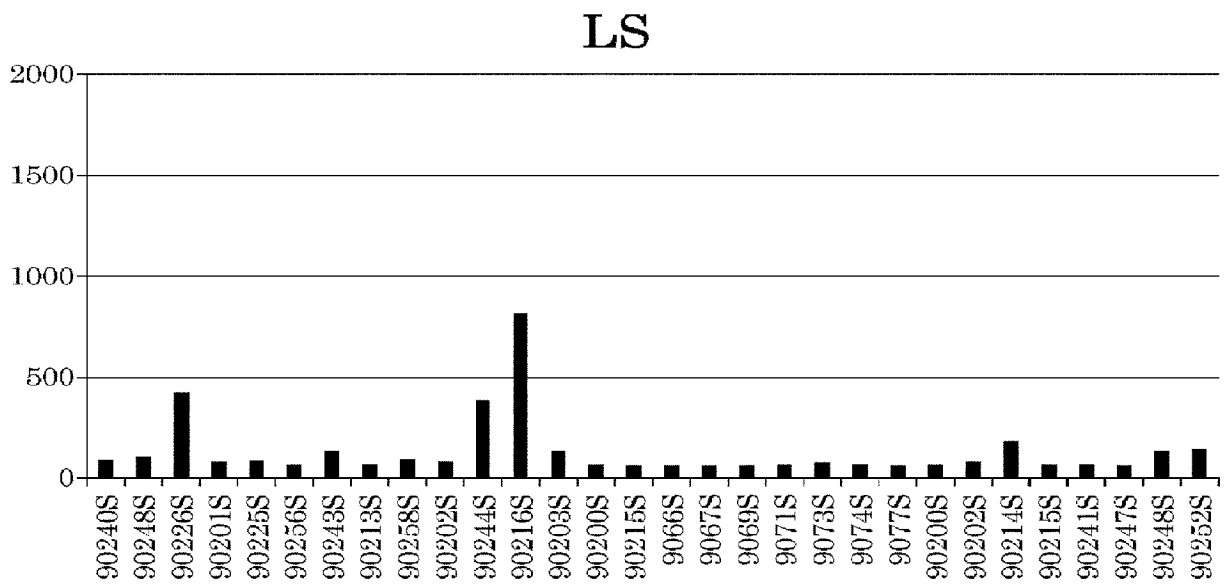
LS
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 21-3

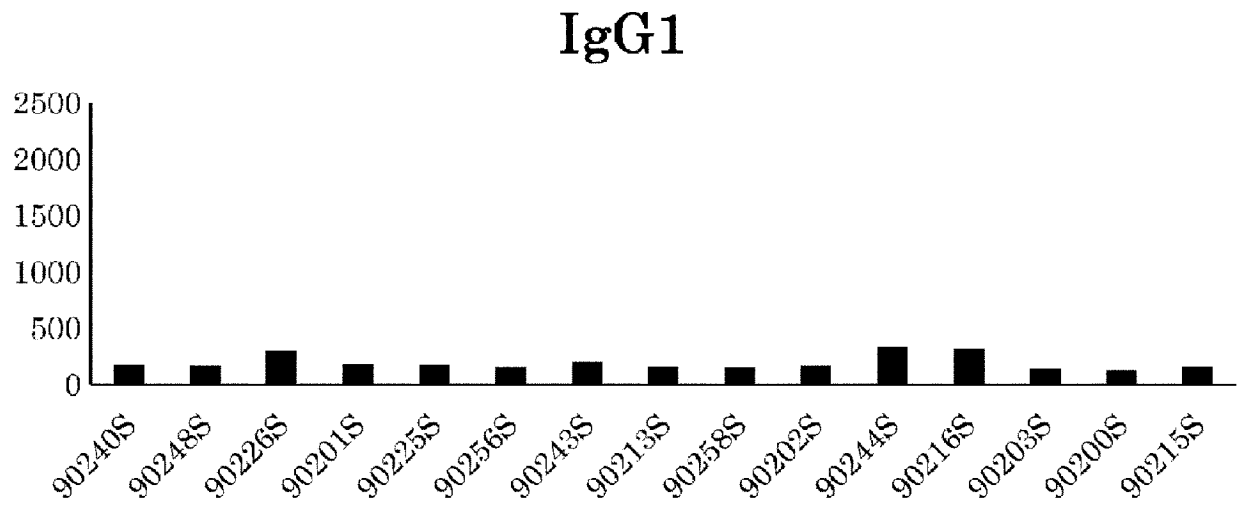
IgG1
2500
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S

图 22-1

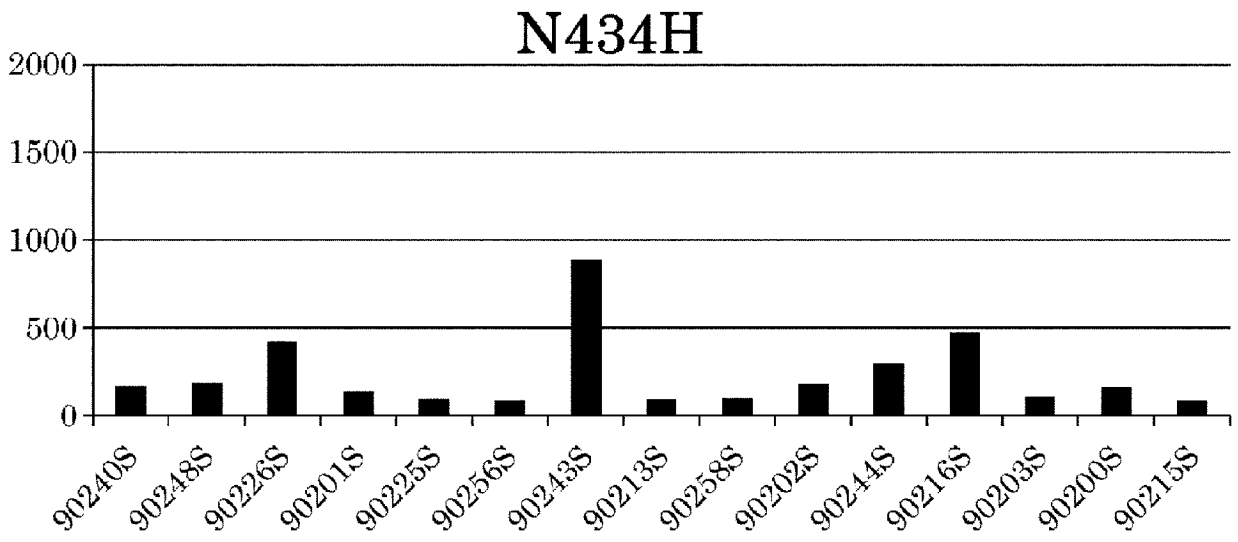
N434H
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S

图 22-2

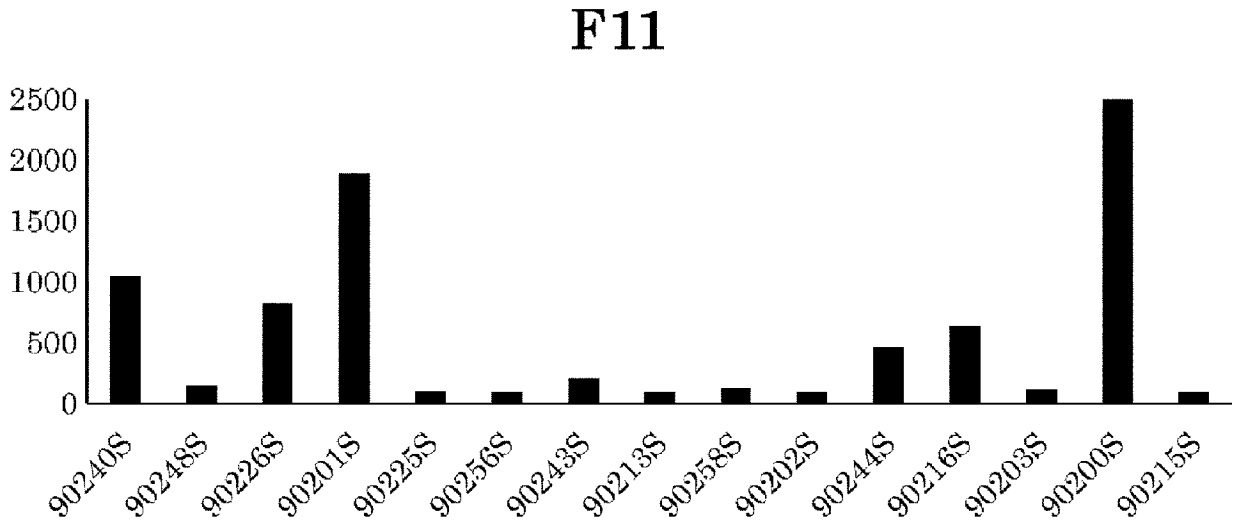
F11
2500
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S

图 22-3

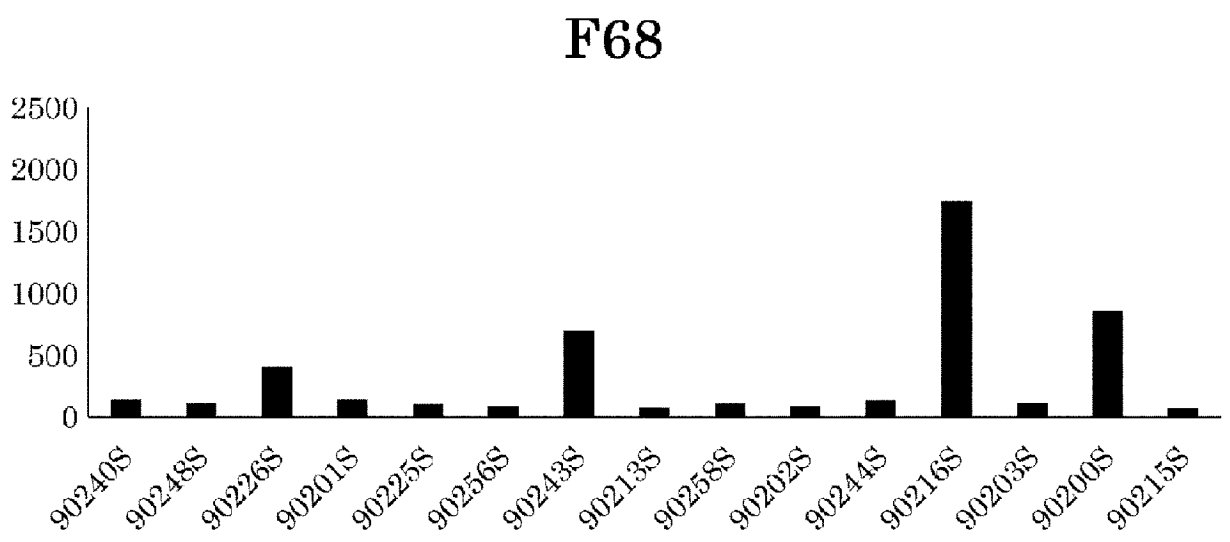
F68
2500
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S

图 22-4

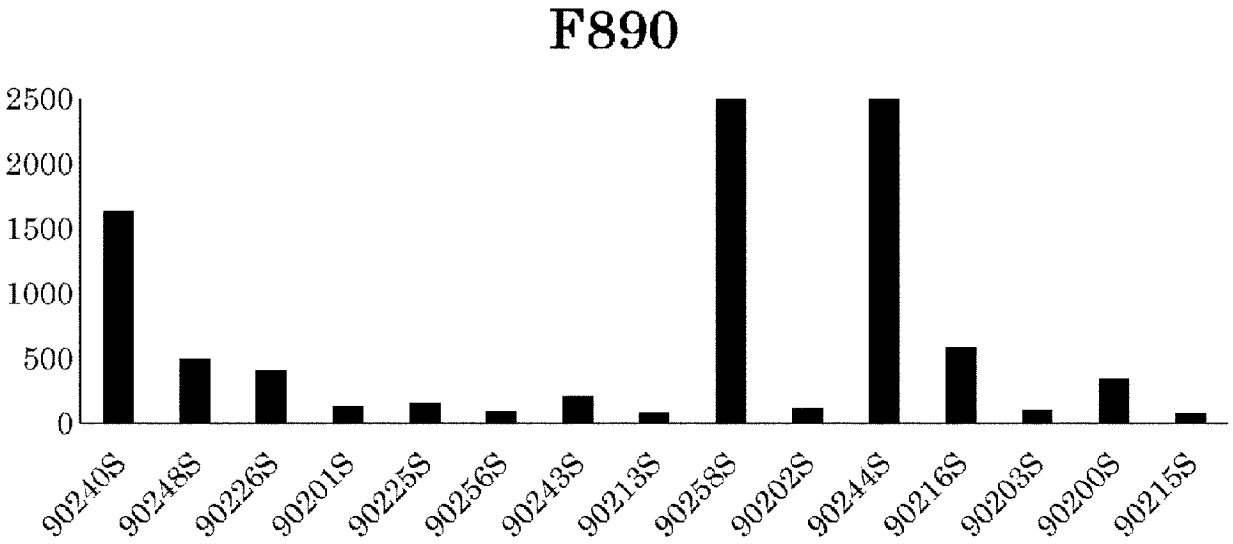
F890
2500
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S

图 22-5

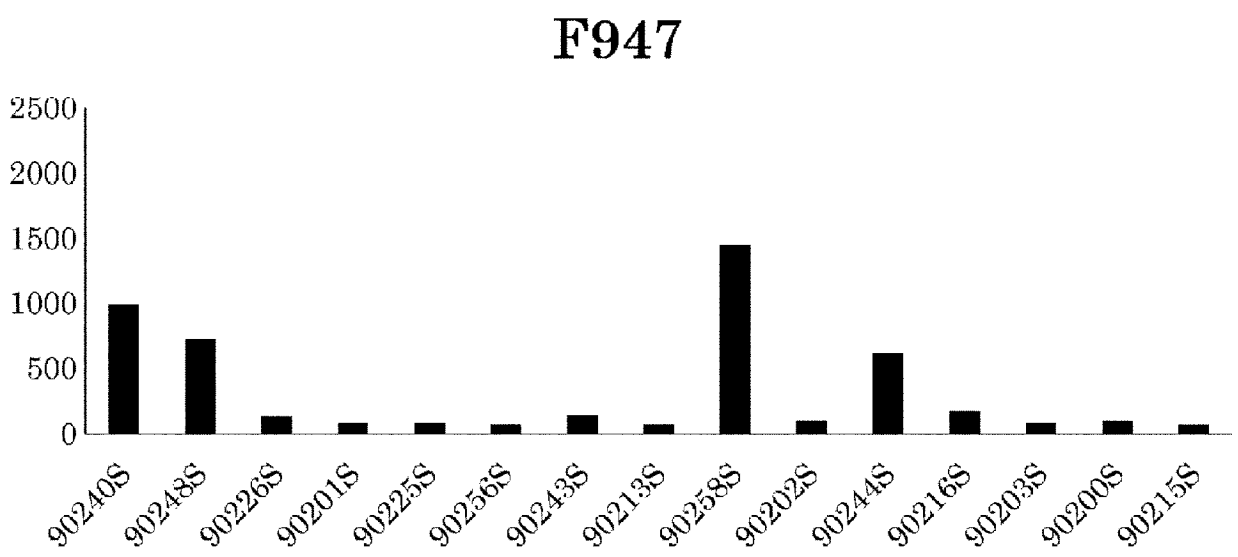
F947
2500
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S

图 22-6

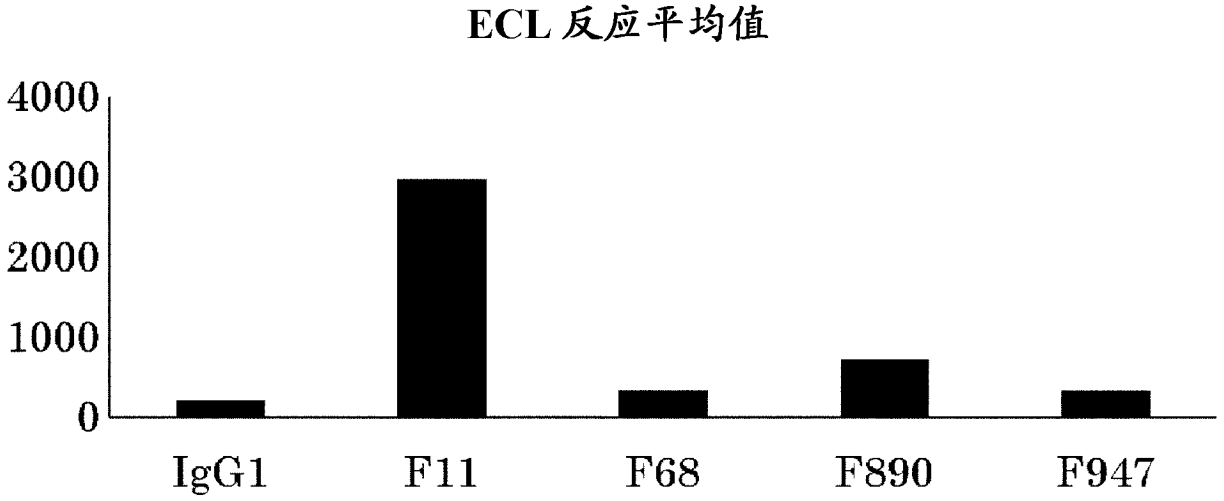
ECL 反应平均值
4000
3000
2000
1000
0
IgG1
F11
F68
F890
F947

图 23-1

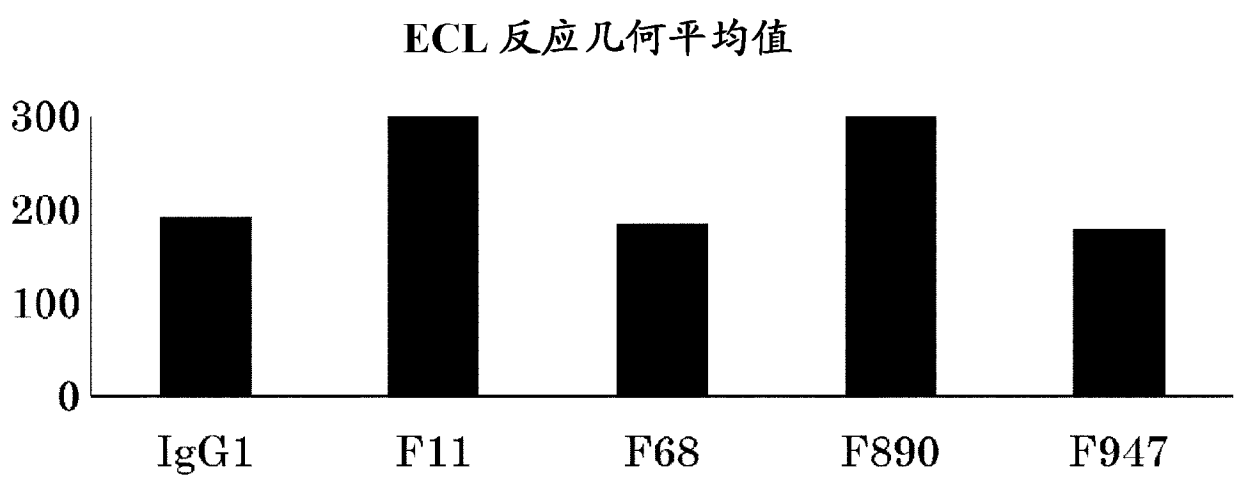
ECL 反应几何平均值
300
200
100
0
IgG1
F11
F68
F890
F947

图 23-2

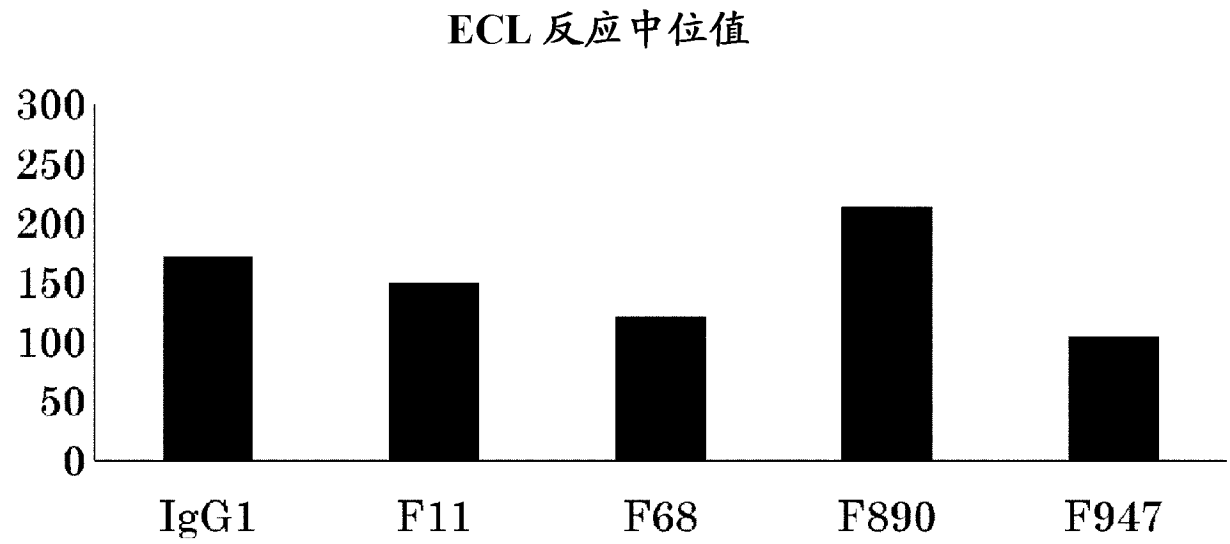
ECL 反应中位值
300
250
200
150
100
50
0
IgG1
F11
F68
F890
F947

图 23-3

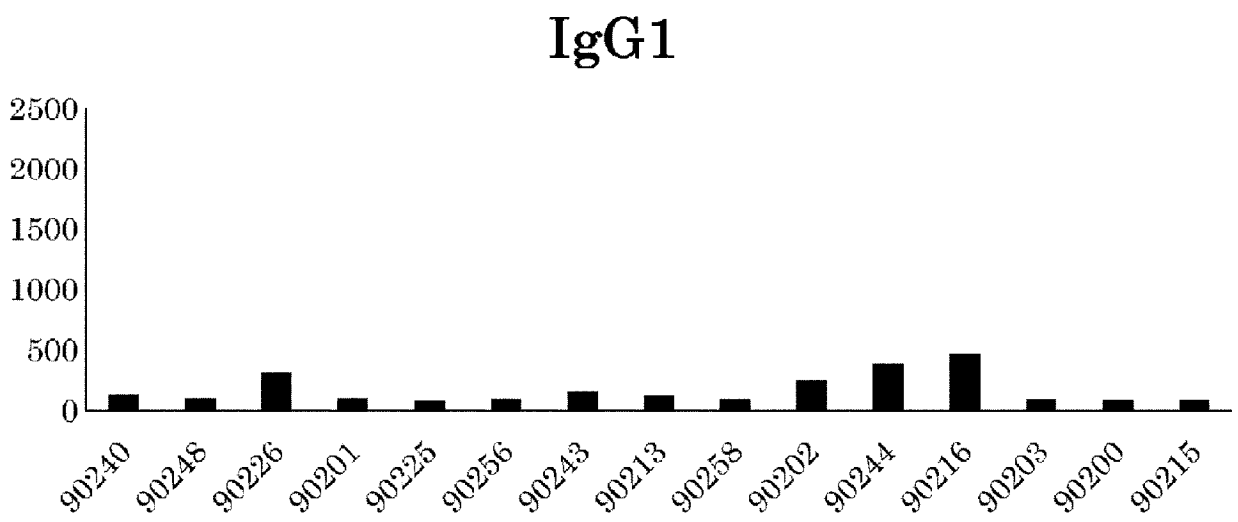
IgG1
2500
2000
1500
1000
500
0
90240
90248
90226
90201
90225
90256
90243
90213
90258
90202
90244
90216
90203
90200
90215

图 24-1

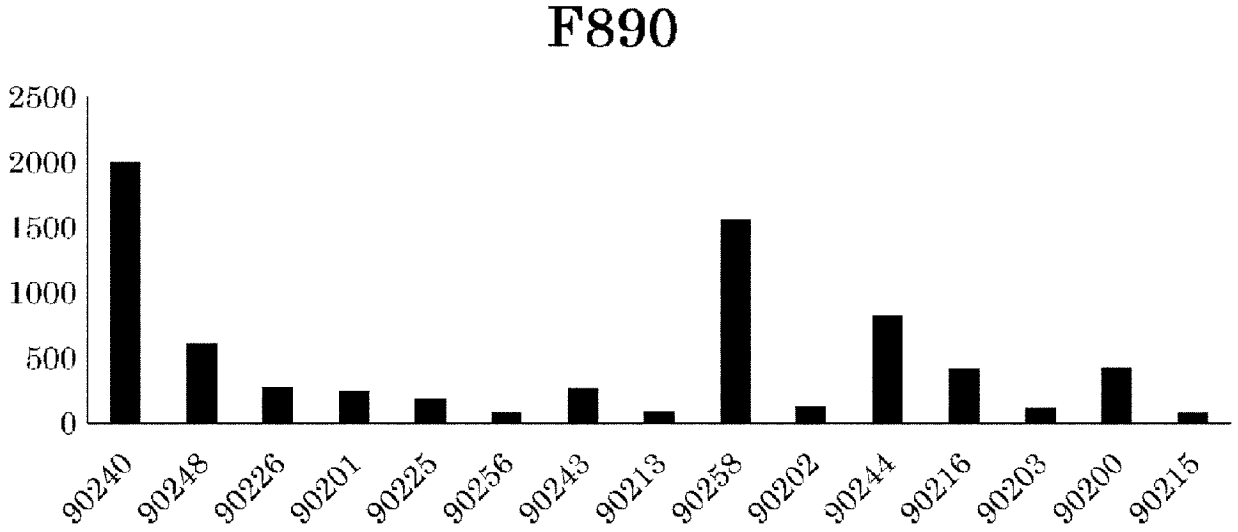
F890
2500
2000
1500
1000
500
0
90240
90248
90226
90201
90225
90256
90243
90213
90258
90202
90244
90216
90203
90200
90215

图 24-2

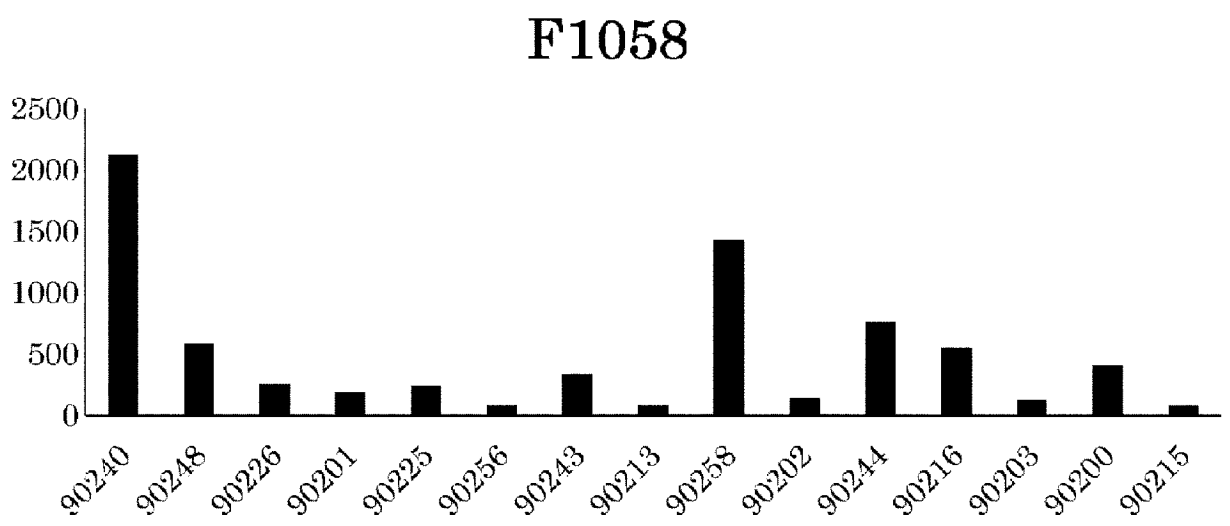
F1058
2500
2000
1500
1000
500
0
90240
90248
90226
90201
90225
90256
90243
90213
90258
90202
90244
90216
90203
90200
90215

图 24-3

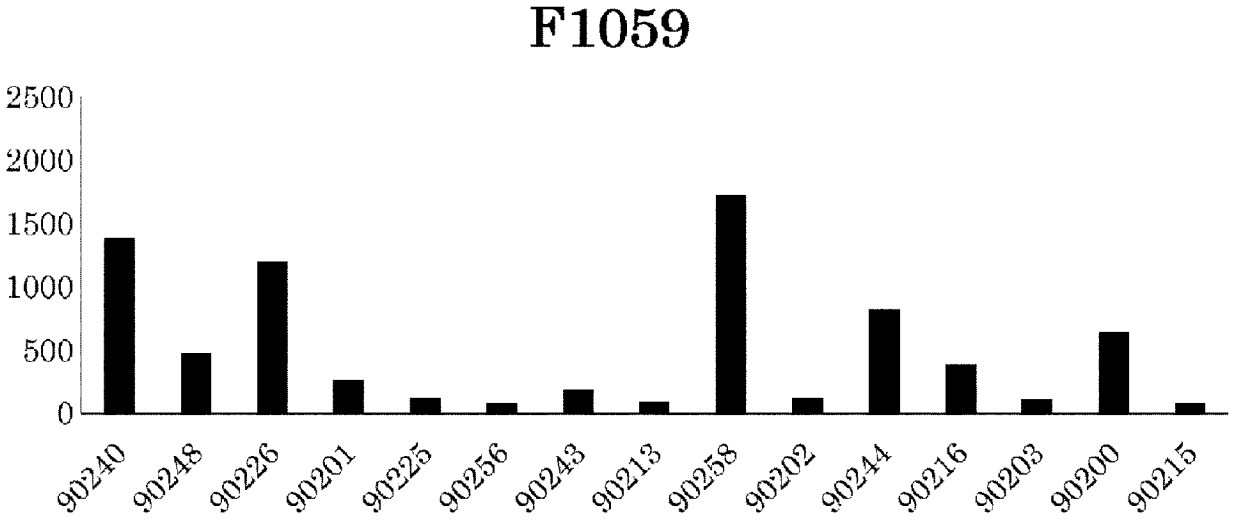
F1059
2500
2000
1500
1000
500
0
90240
90248
90226
90201
90225
90256
90243
90213
90258
90202
90244
90216
90203
90200
90215

图 24-4

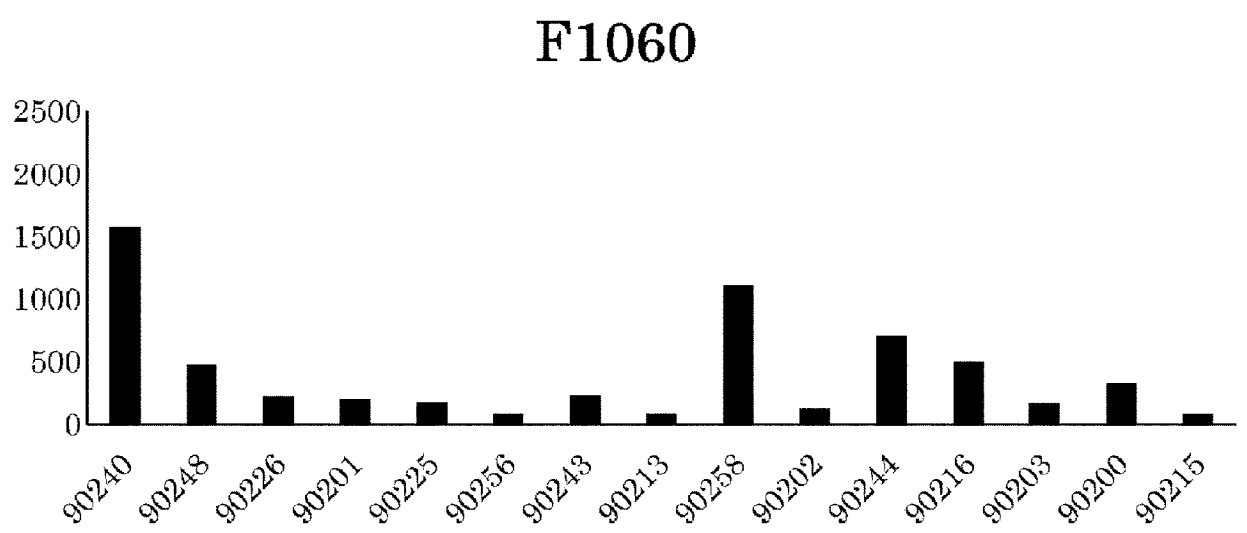
F1060
2500
2000
1500
1000
500
0
90240
90248
90226
90201
90225
90256
90243
90213
90258
90202
90244
90216
90203
90200
90215

图 24-5

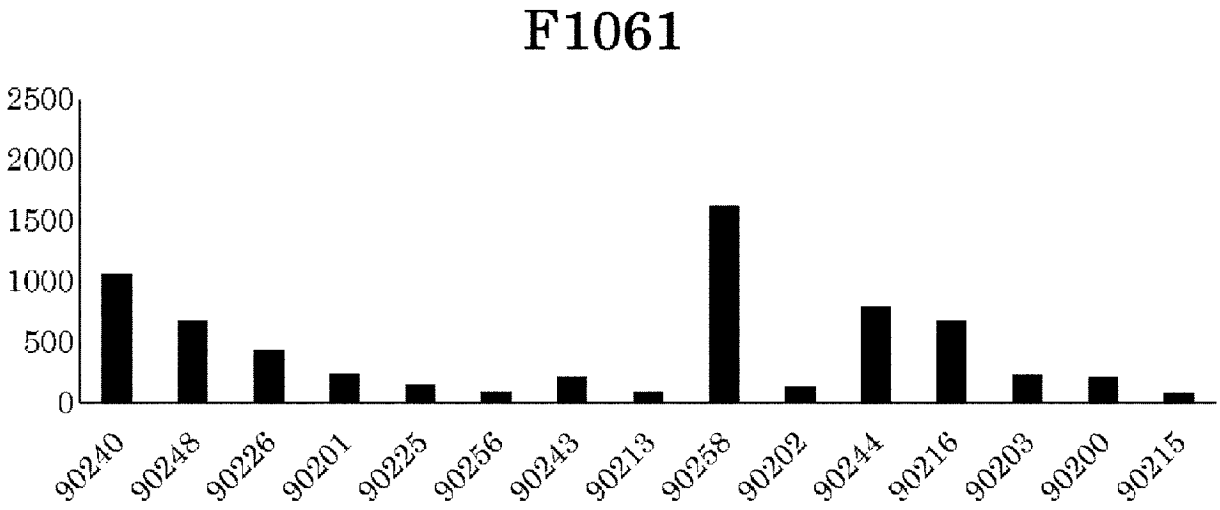
F1061
2500
2000
1500
1000
500
0
90240
90248
90226
90201
90225
90256
90243
90213
90258
90202
90244
90216
90203
90200
90215

图 24-6

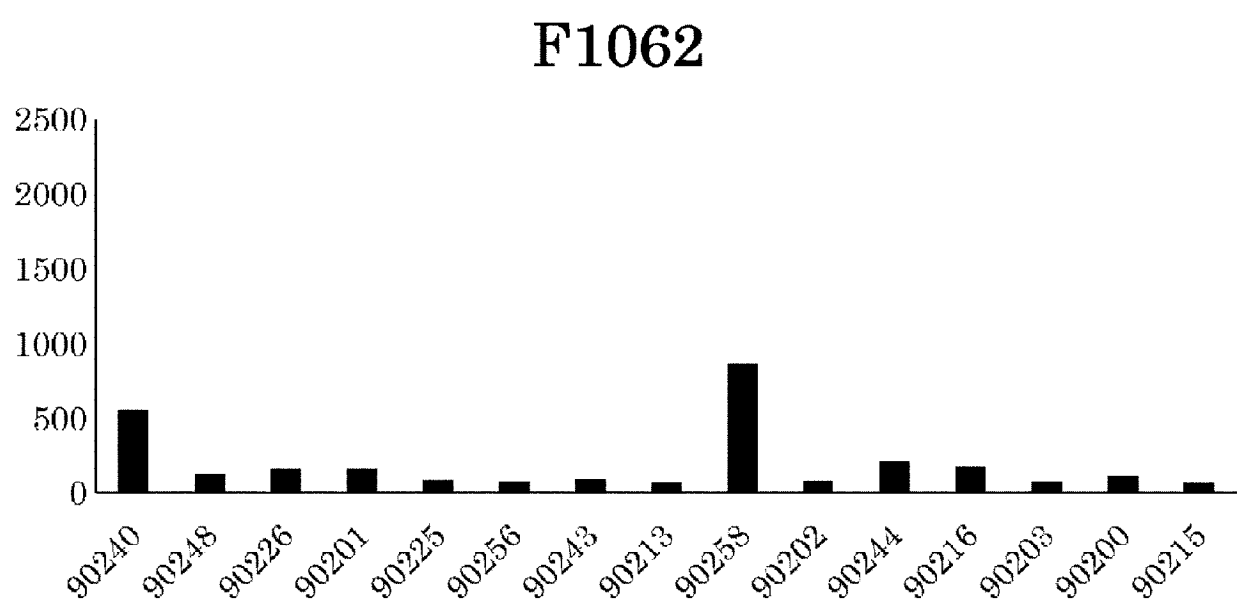
F1062
2500
2000
1500
1000
500
0
90240
90248
90226
90201
90225
90256
90243
90213
90258
90202
90244
90216
90203
90200
90215

图 24-7

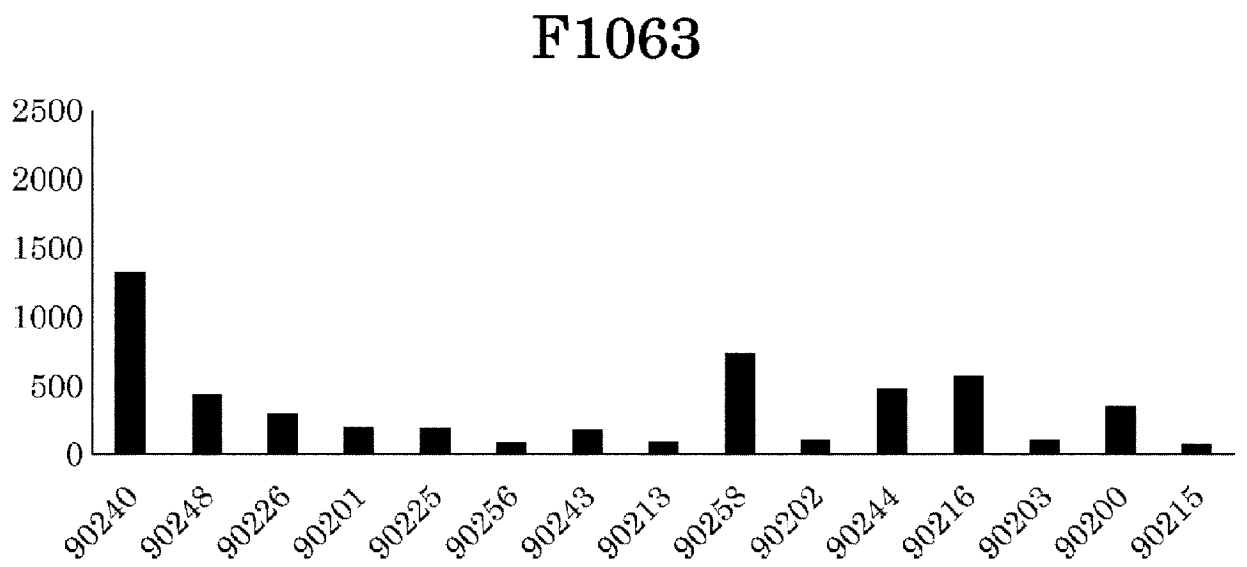
F1063
2500
2000
1500
1000
500
0
90240
90248
90226
90201
90225
90256
90243
90213
90258
90202
90244
90216
90203
90200
90215

图 24-8

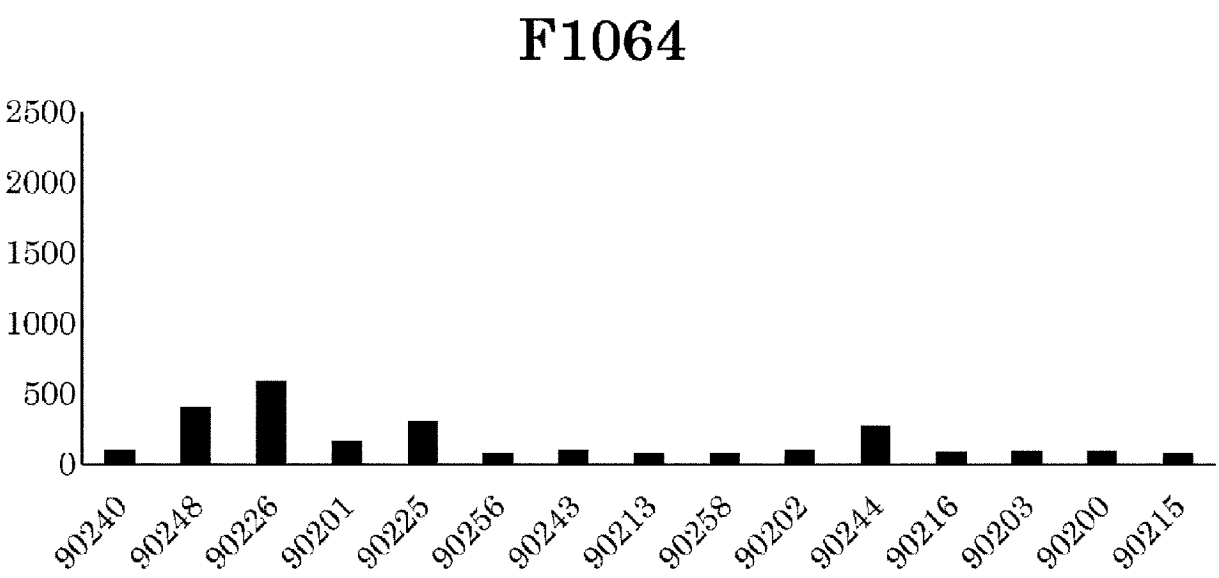
F1064
2500
2000
1500
1000
500
0
90240
90248
90226
90201
90225
90256
90243
90213
90258
90202
90244
90216
90203
90200
90215

图 24-9

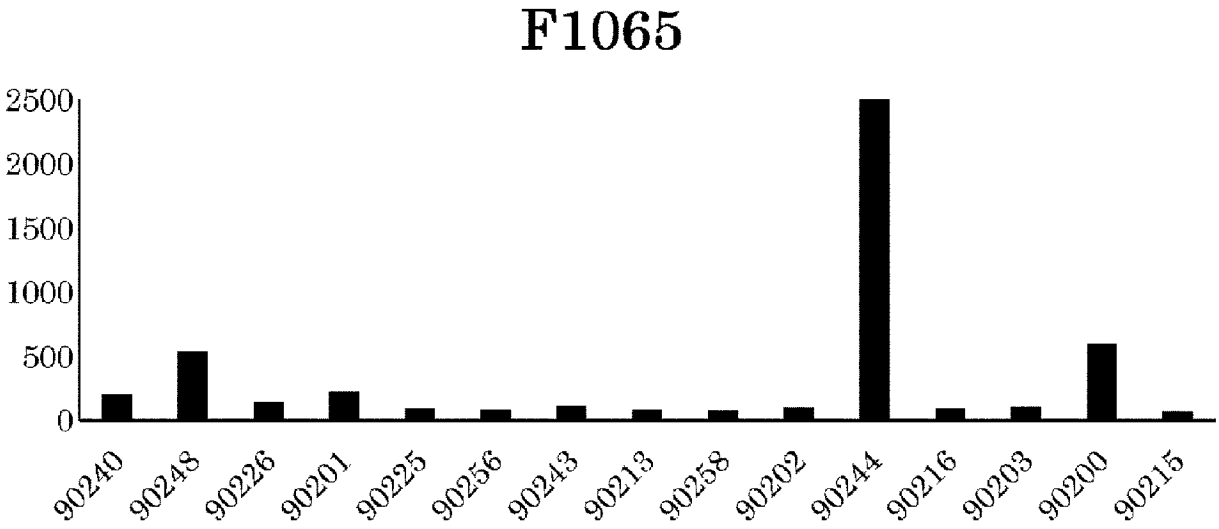
F1065
2500
2000
1500
1000
500
0
90240
90248
90226
90201
90225
90256
90243
90213
90258
90202
90244
90216
90203
90200
90215

图 24-10

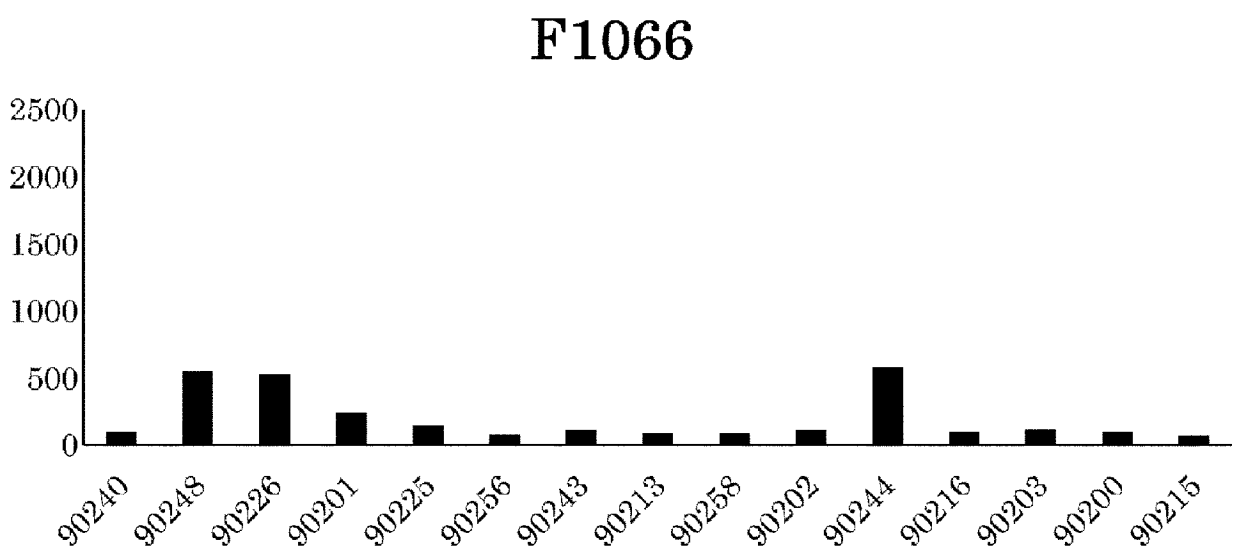
F1066
2500
2000
1500
1000
500
0
90240
90248
90226
90201
90225
90256
90243
90213
90258
90202
90244
90216
90203
90200
90215

图 24-11

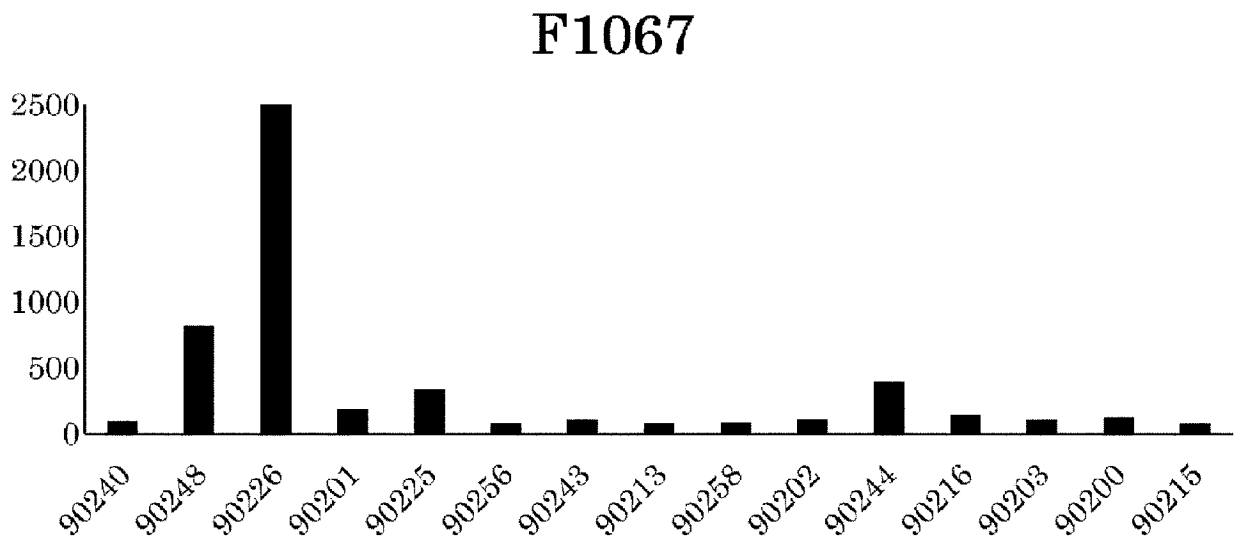
F1067
2500
2000
1500
1000
500
0
90240
90248
90226
90201
90225
90256
90243
90213
90258
90202
90244
90216
90203
90200
90215

图 24-12

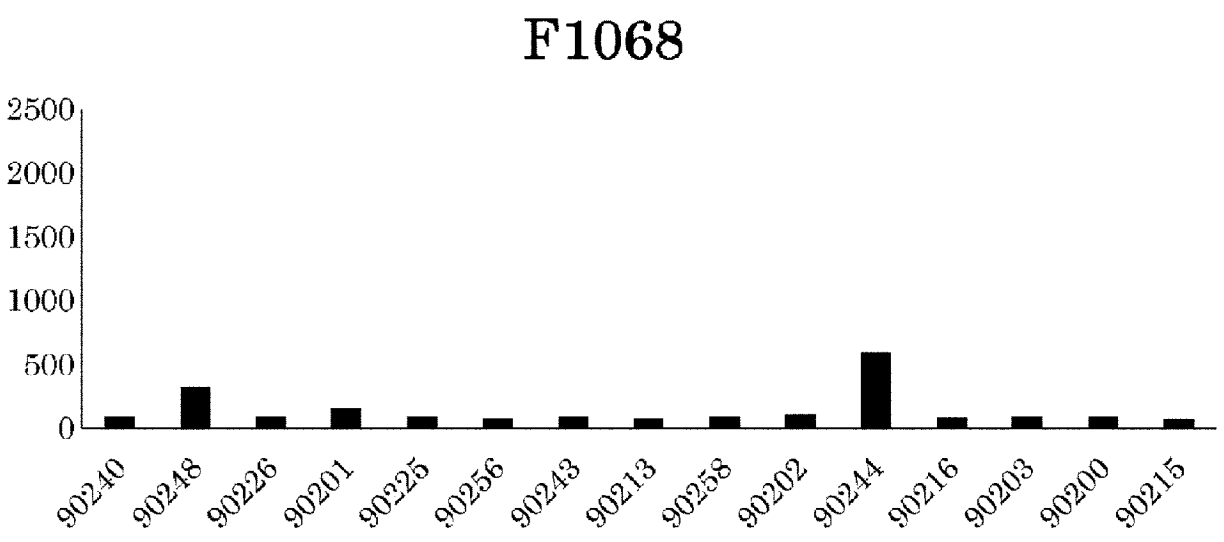
F1068
2500
2000
1500
1000
500
0
90240
90248
90226
90201
90225
90256
90243
90213
90258
90202
90244
90216
90203
90200
90215

图 24-13

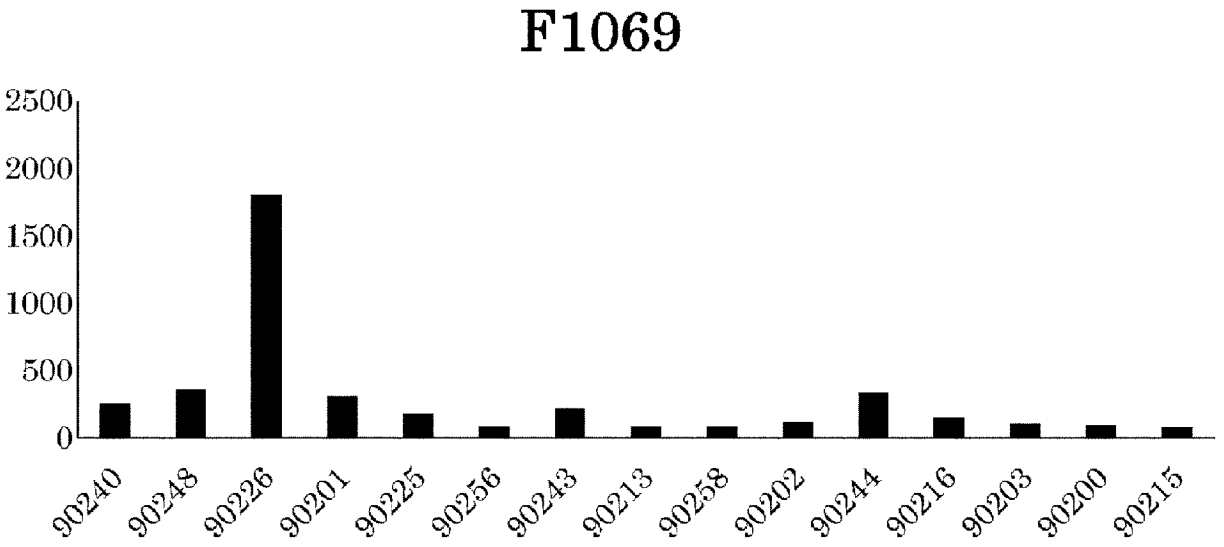
F1069
2500
2000
1500
1000
500
0
90240
90248
90226
90201
90225
90256
90243
90213
90258
90202
90244
90216
90203
90200
90215

图 24-14

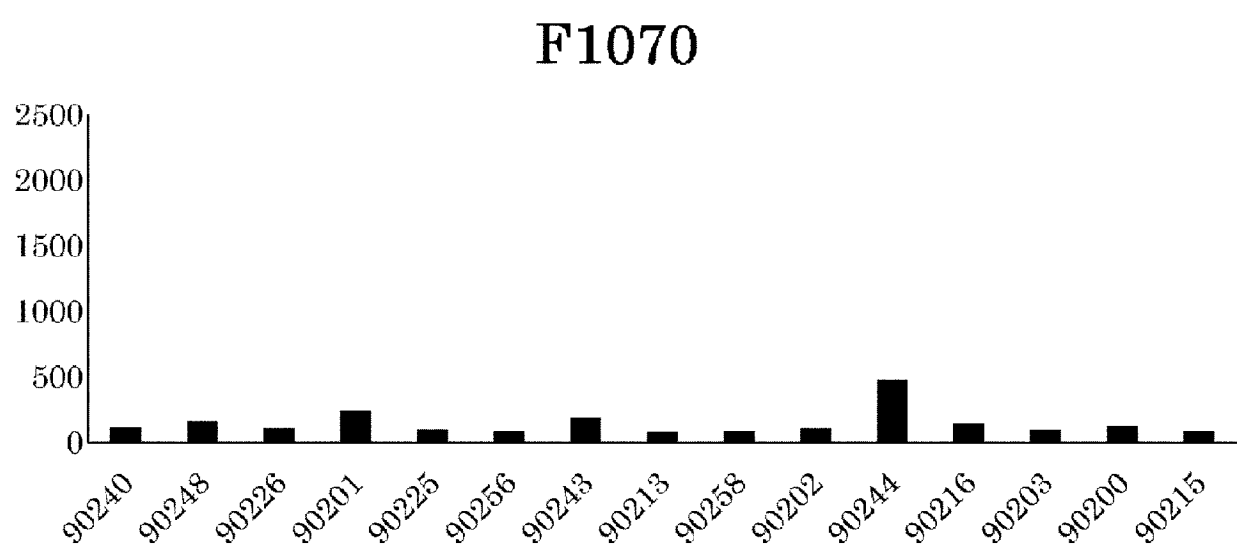
F1070
2500
2000
1500
1000
500
0
90240
90248
90226
90201
90225
90256
90243
90213
90258
90202
90244
90216
90203
90200
90215

图 24-15

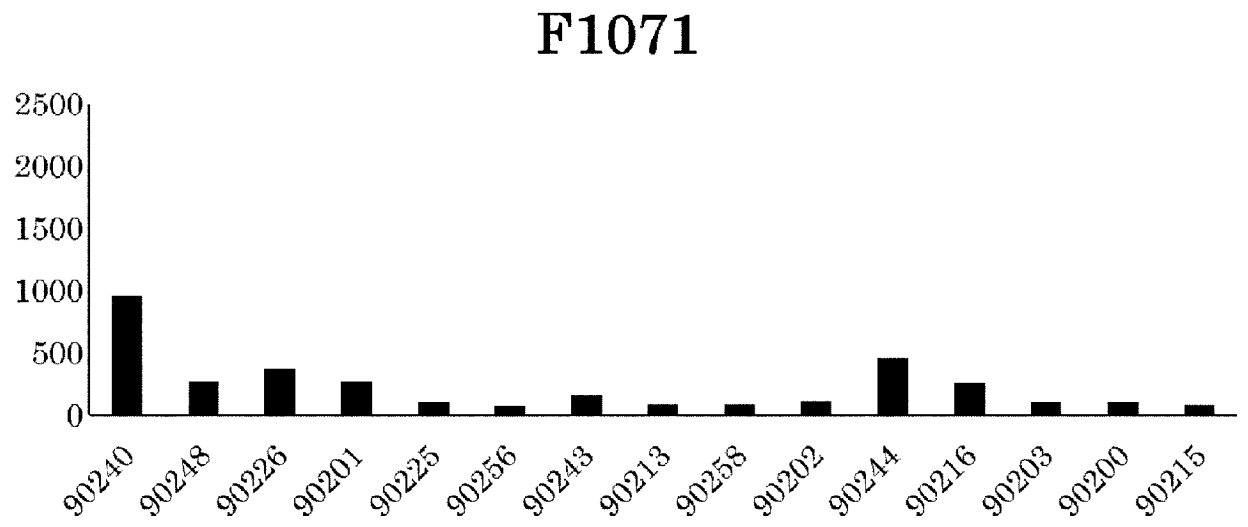
F1071
2500
2000
1500
1000
500
0
90240
90248
90226
90201
90225
90256
90243
90213
90258
90202
90244
90216
90203
90200
90215

图 24-16

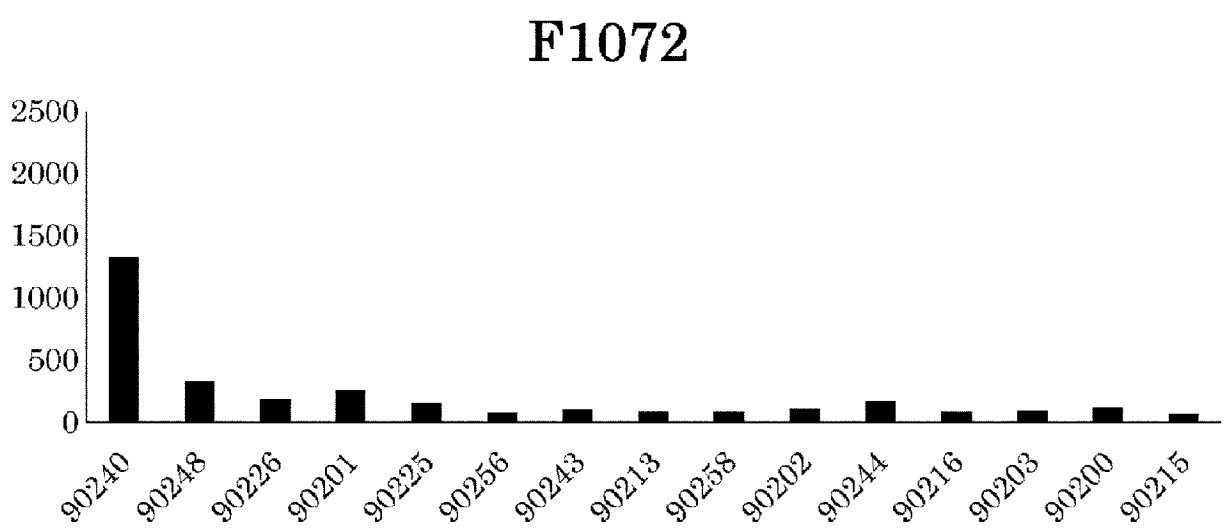
F1072
2500
2000
1500
1000
500
0
90240
90248
90226
90201
90225
90256
90243
90213
90258
90202
90244
90216
90203
90200
90215

图 24-17

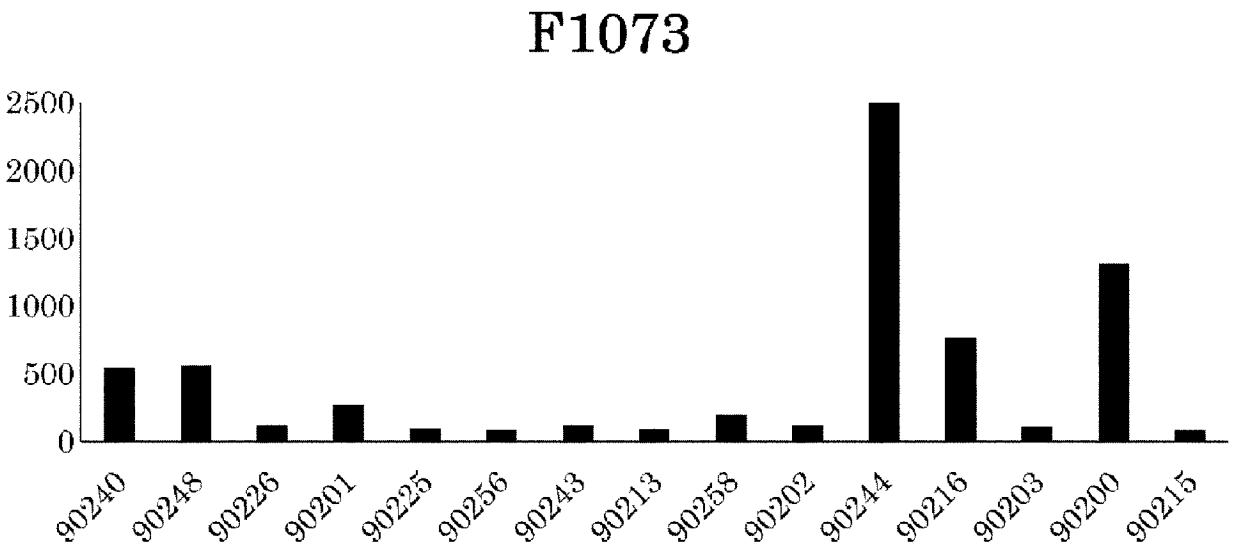
F1073
2500
2000
1500
1000
500
0
90240
90248
90226
90201
90225
90256
90243
90213
90258
90202
90244
90216
90203
90200
90215

图 24-18

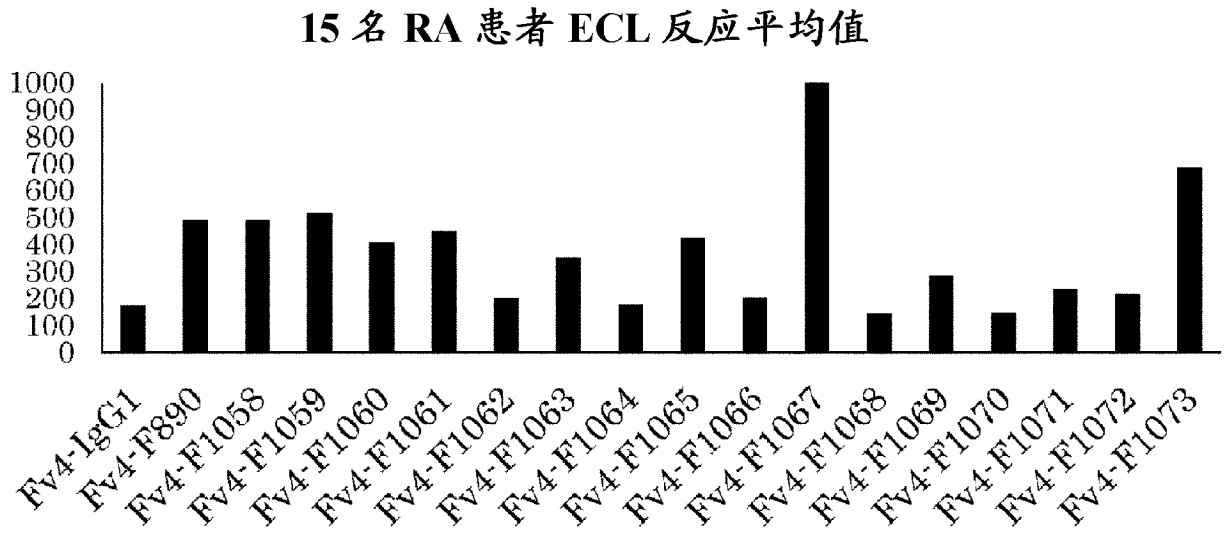
15 名 RA 患者 ECL 反应平均值
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
Fv4-IgG1
Fv4-F890
Fv4-F1058
Fv4-F1059
Fv4-F1060
Fv4-F1061
Fv4-F1062
Fv4-F1063
Fv4-F1064
Fv4-F1065
Fv4-F1066
Fv4-F1067
Fv4-F1068
Fv4-F1069
Fv4-F1070
Fv4-F1071
Fv4-F1072
Fv4-F1073

图 25-1

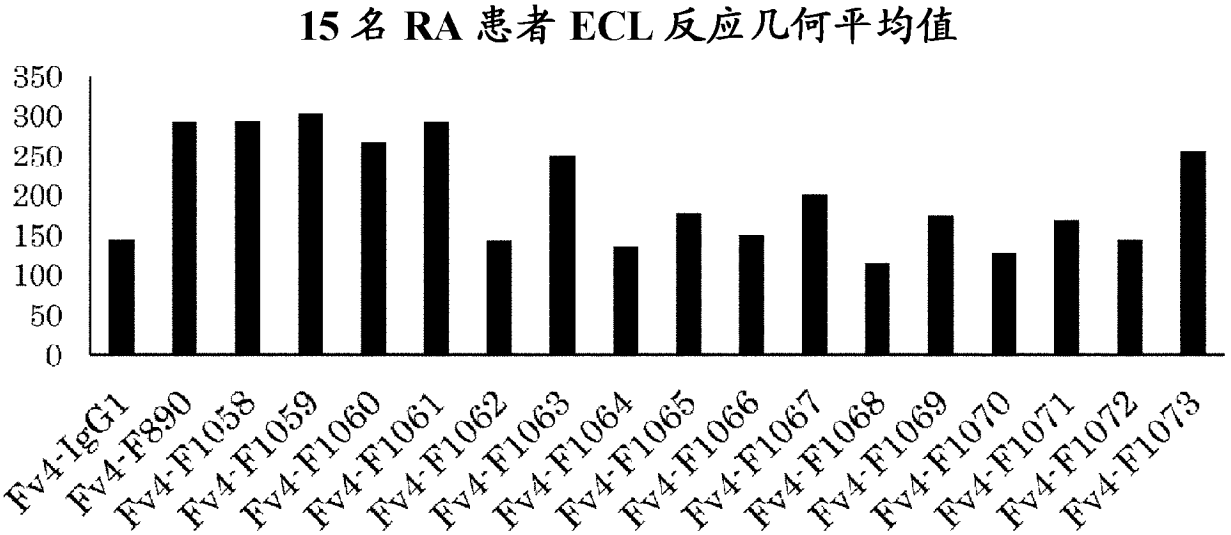
15 名 RA 患者 ECL 反应几何平均值
350
300
250
200
150
100
50
0
Fv4-IgG1
Fv4-F890
Fv4-F1058
Fv4-F1059
Fv4-F1060
Fv4-F1061
Fv4-F1062
Fv4-F1063
Fv4-F1064
Fv4-F1065
Fv4-F1066
Fv4-F1067
Fv4-F1068
Fv4-F1069
Fv4-F1070
Fv4-F1071
Fv4-F1072
Fv4-F1073

图 25-2

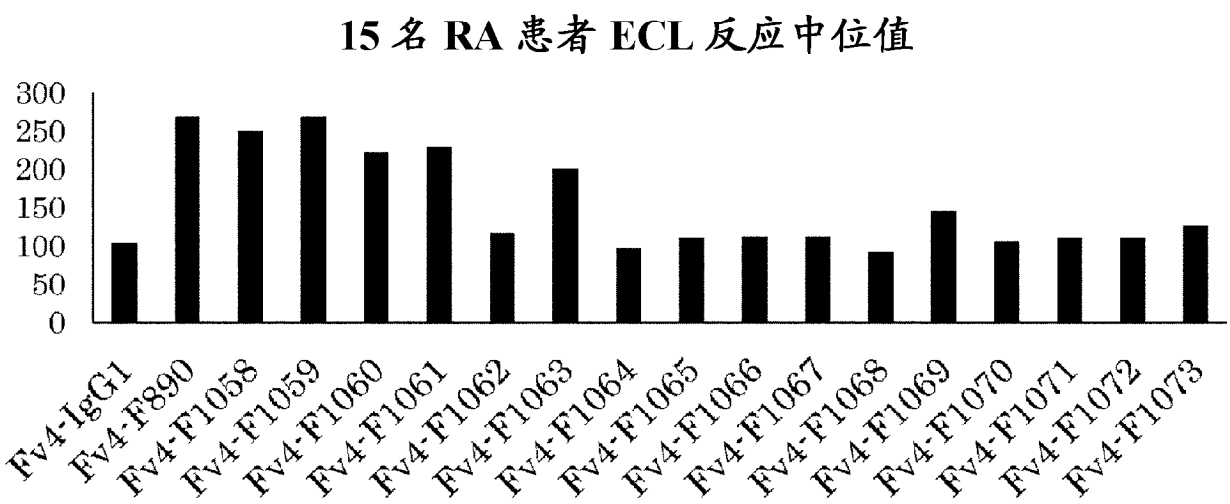
15 名 RA 患者 ECL 反应中位值
300
250
200
150
100
50
0
Fv4-IgG1
Fv4-F890
Fv4-F1058
Fv4-F1059
Fv4-F1060
Fv4-F1061
Fv4-F1062
Fv4-F1063
Fv4-F1064
Fv4-F1065
Fv4-F1066
Fv4-F1067
Fv4-F1068
Fv4-F1069
Fv4-F1070
Fv4-F1071
Fv4-F1072
Fv4-F1073

图 25-3

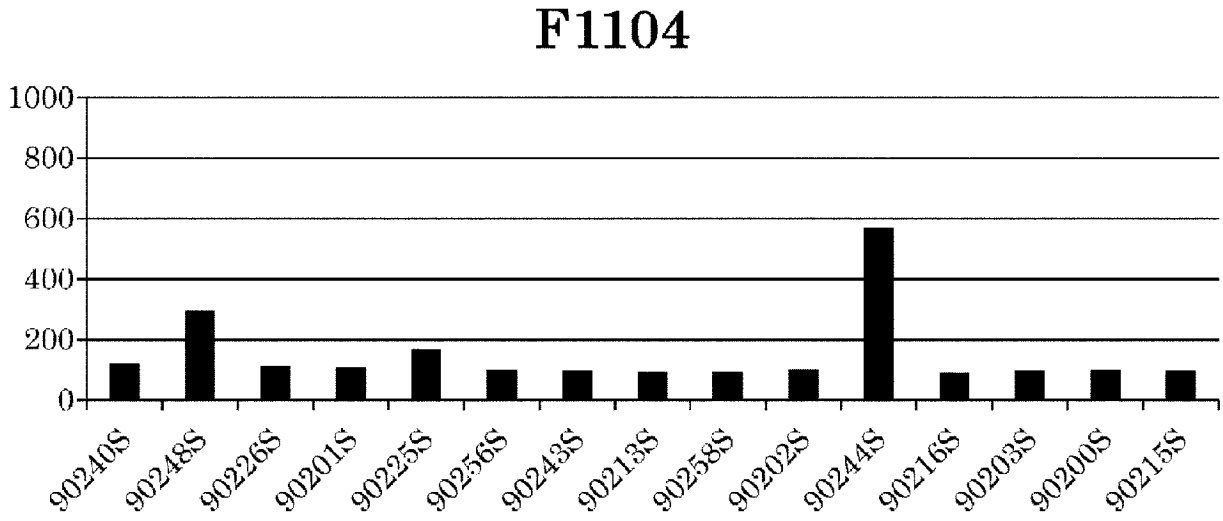
F1104
1000
800
600
400
200
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S

图 26-1

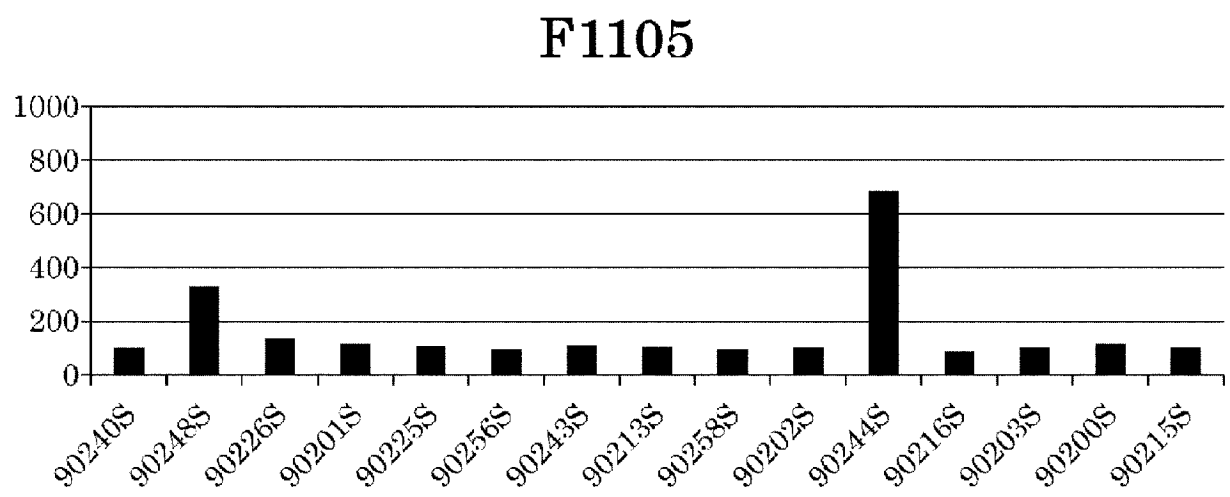
F1105
1000
800
600
400
200
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S

图 26-2

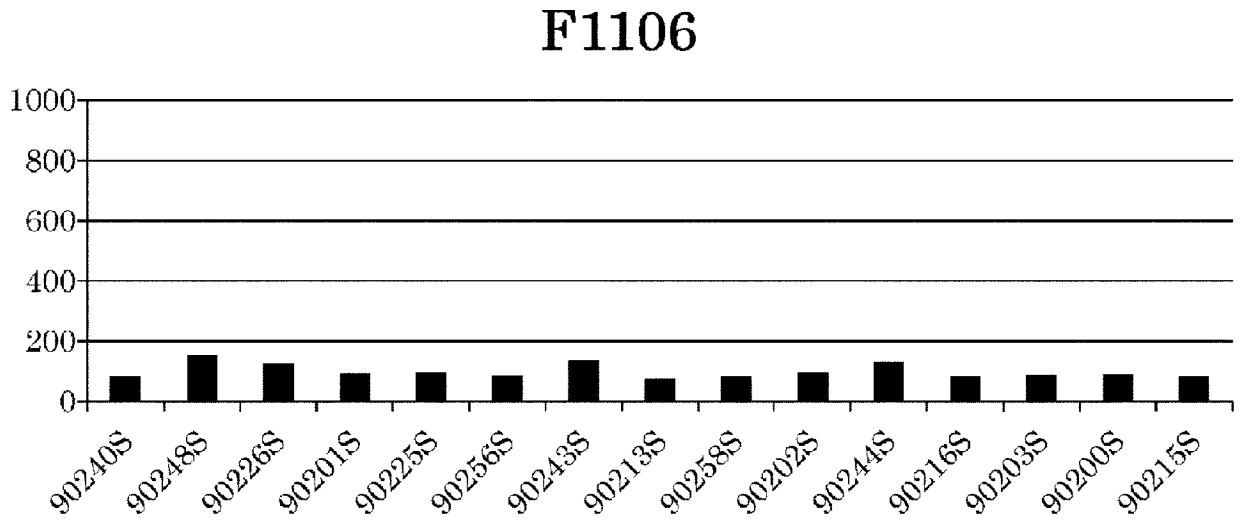
F1106
1000
800
600
400
200
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S

图 26-3

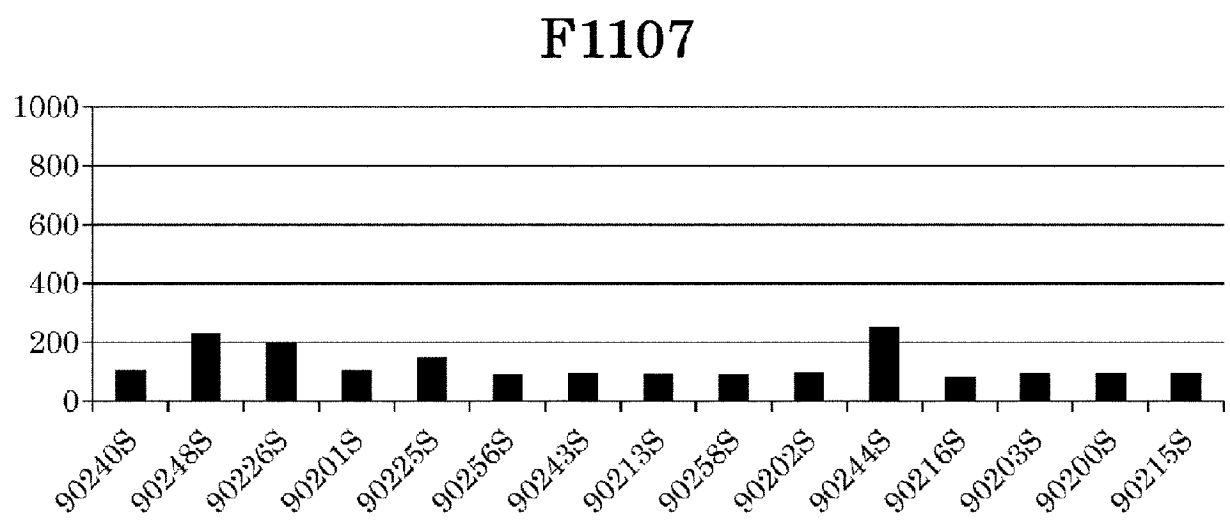
F1107
1000
800
600
400
200
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S

图 27-1

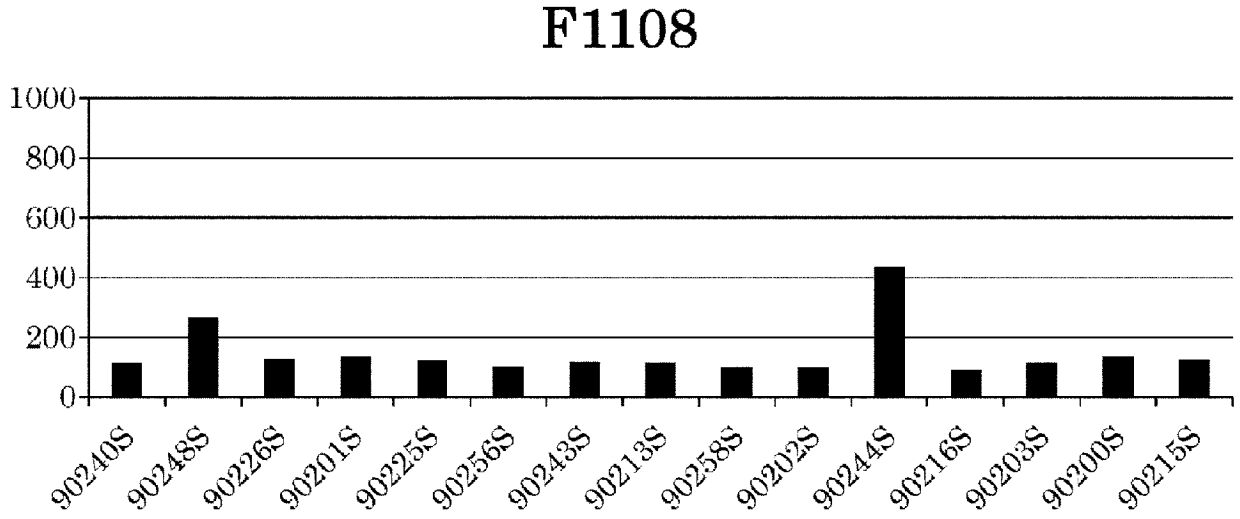
F1108
1000
800
600
400
200
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S

图 27-2

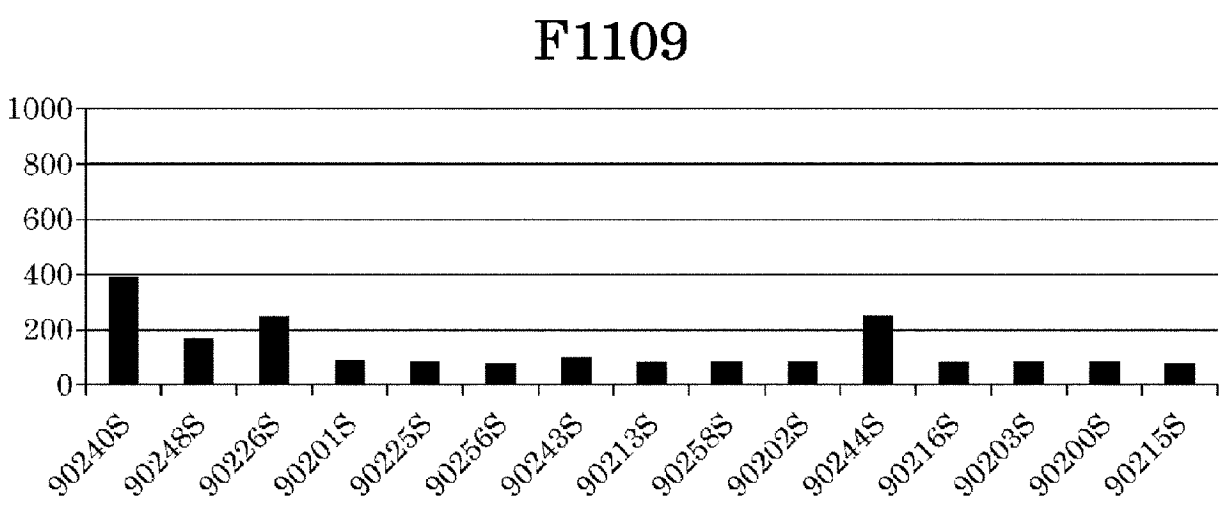
F1109
1000
800
600
400
200
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S

图 27-3

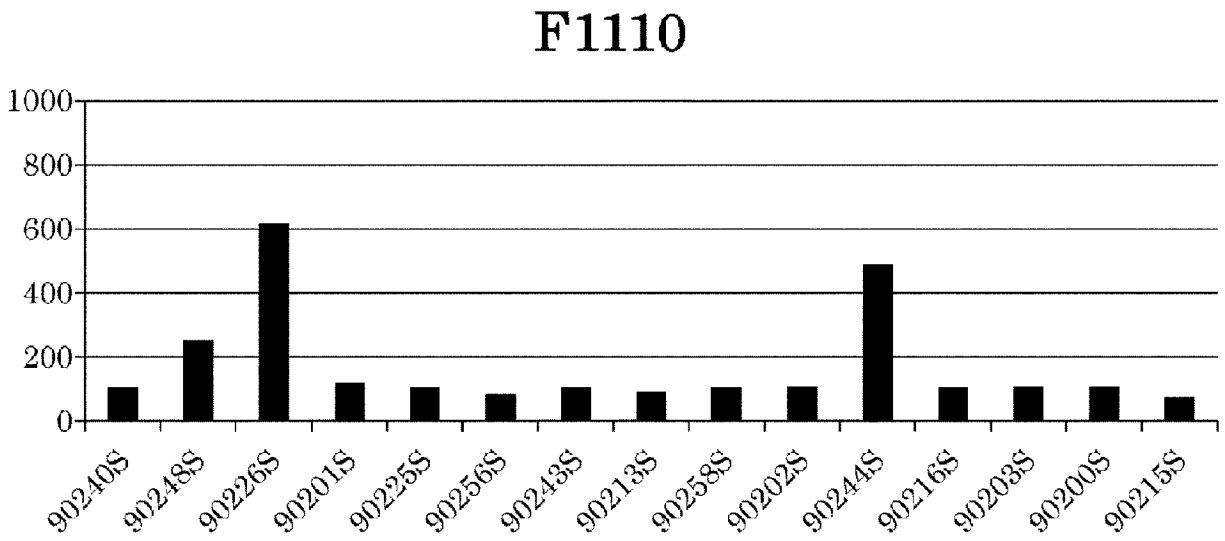
F1110
1000
800
600
400
200
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S

图 27-4

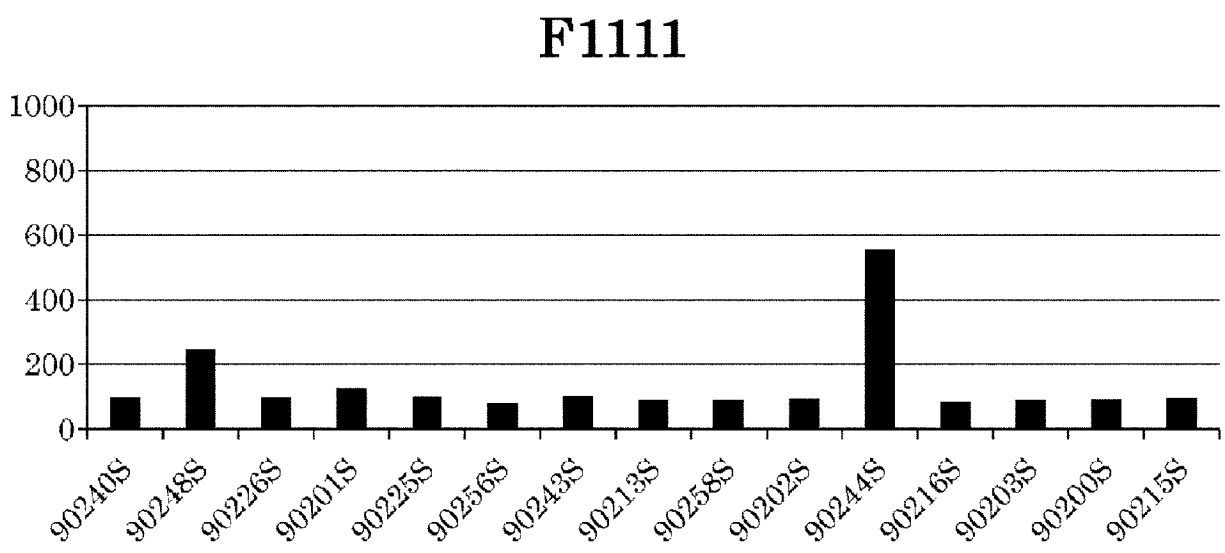
F1111
1000
800
600
400
200
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S

图 27-5

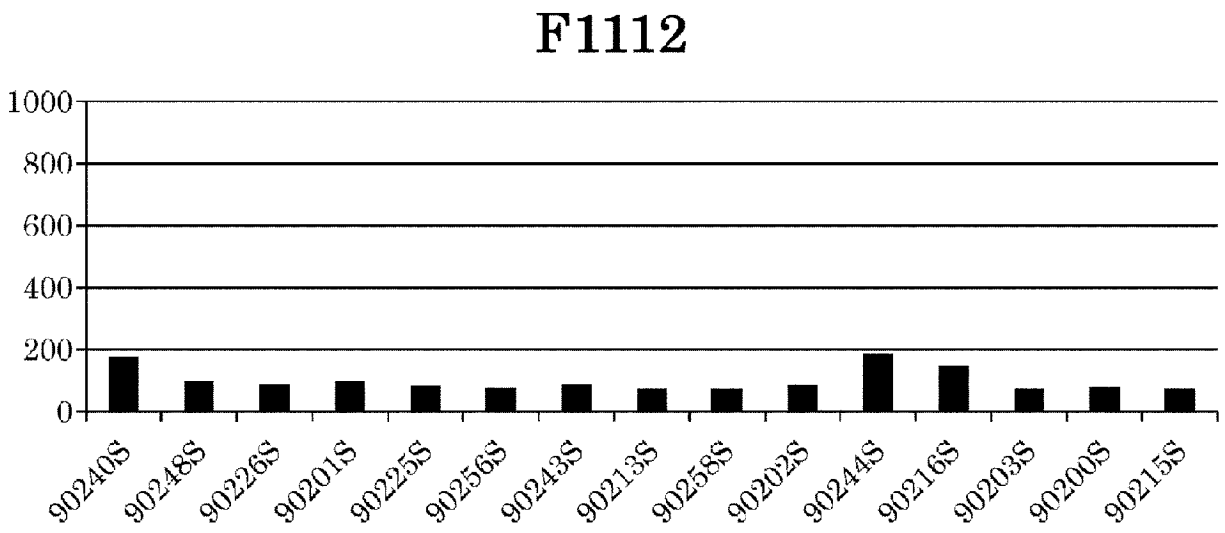
F1112
1000
800
600
400
200
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S

图 27-6

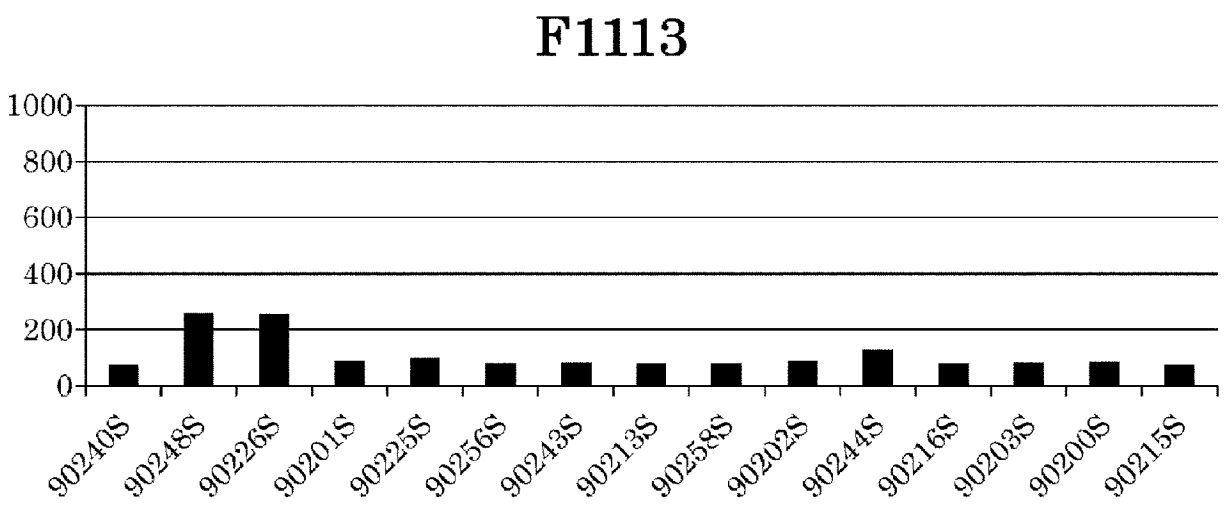
F1113
1000
800
600
400
200
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S

图 27-7

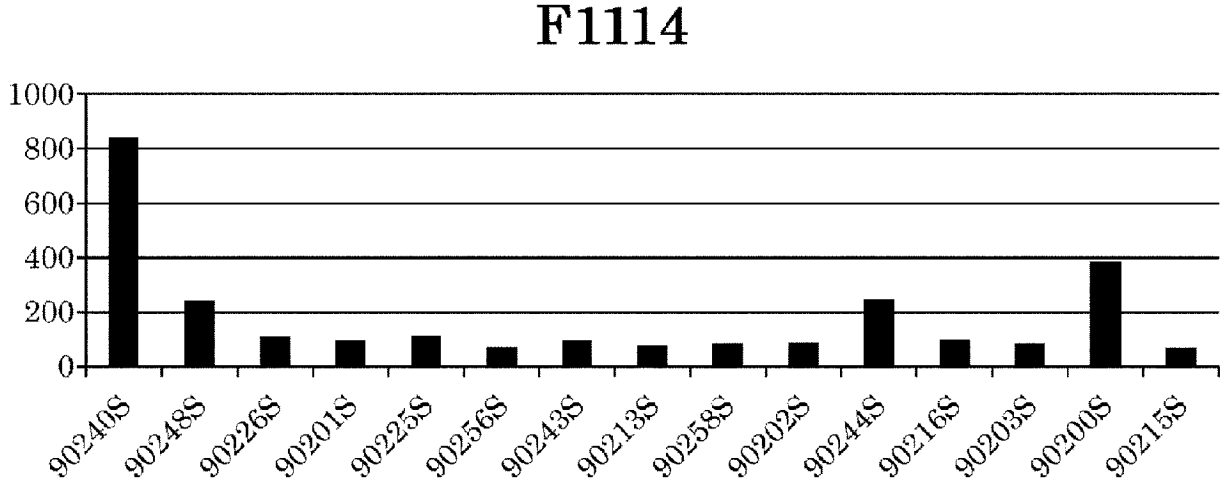
F1114
1000
800
600
400
200
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S

图 27-8

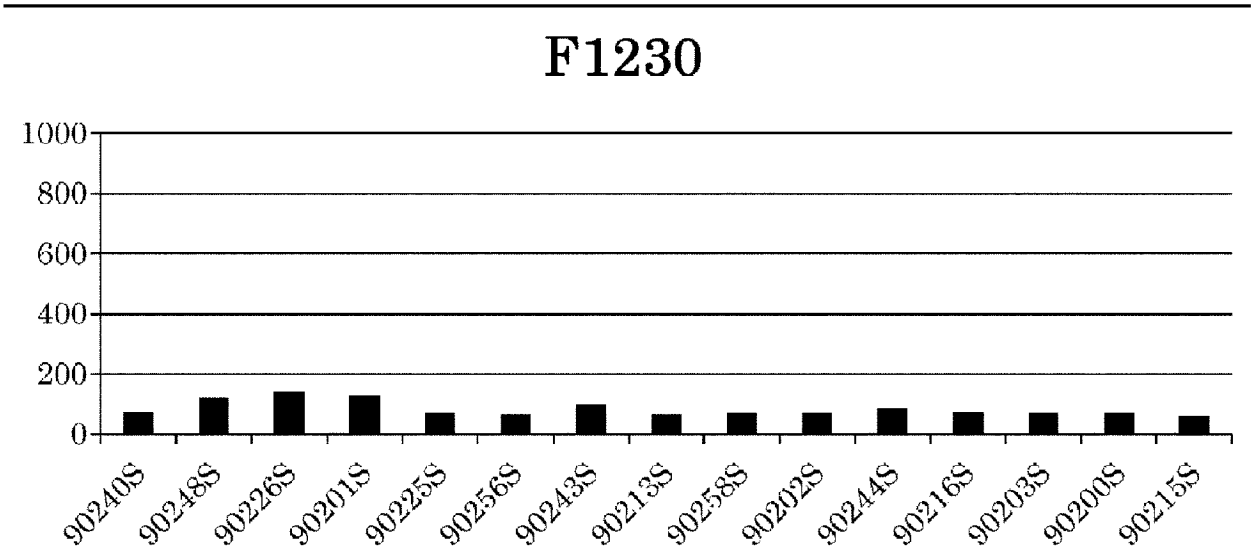
F1230
1000
800
600
400
200
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S

图 28-1

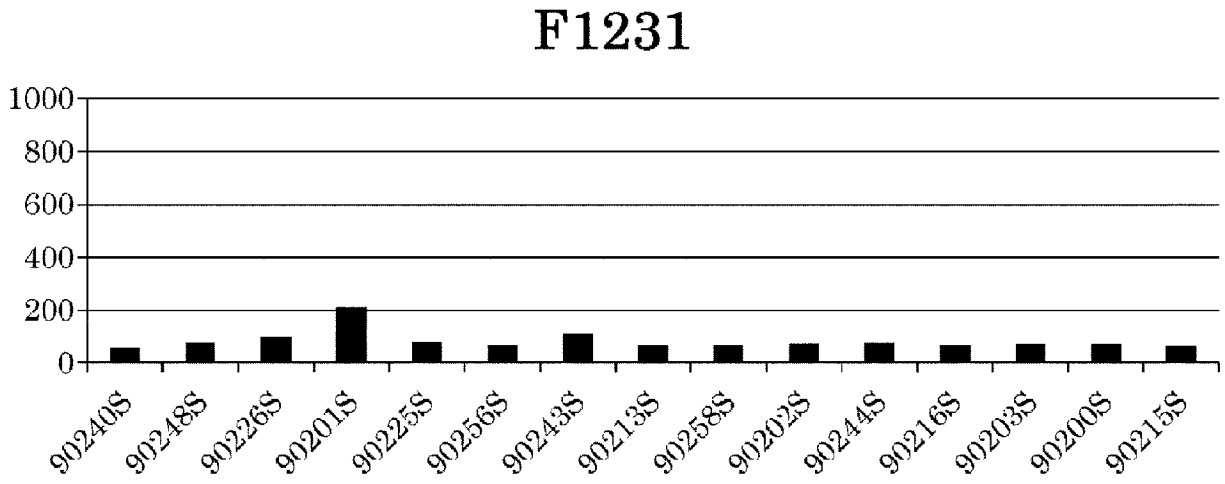
F1231
1000
800
600
400
200
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S

图 28-2

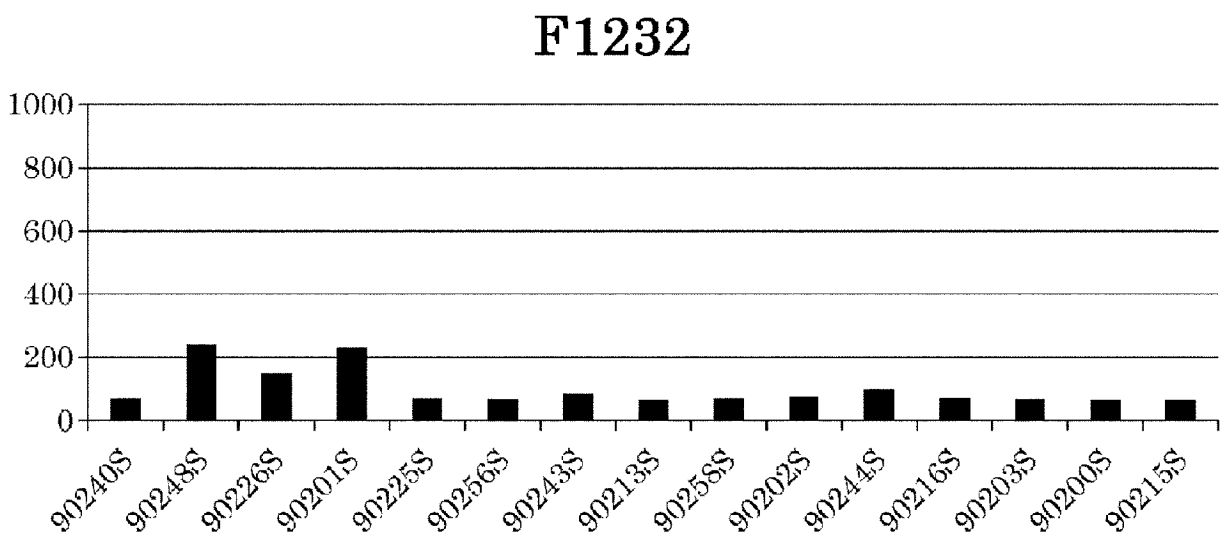
F1232
1000
800
600
400
200
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S

图 28-3

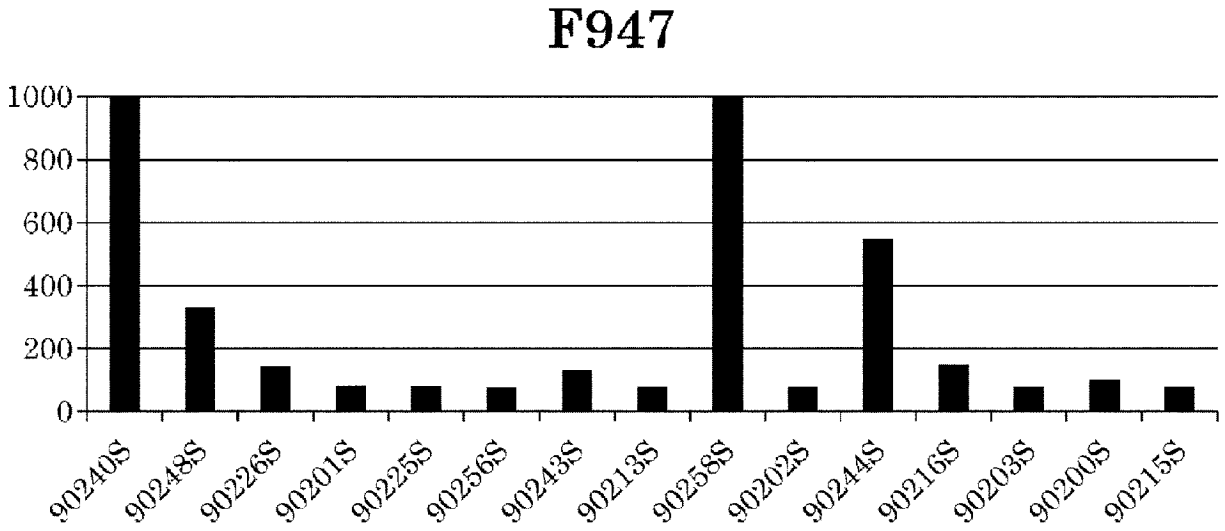
F947
1000
800
600
400
200
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S

图 29-1

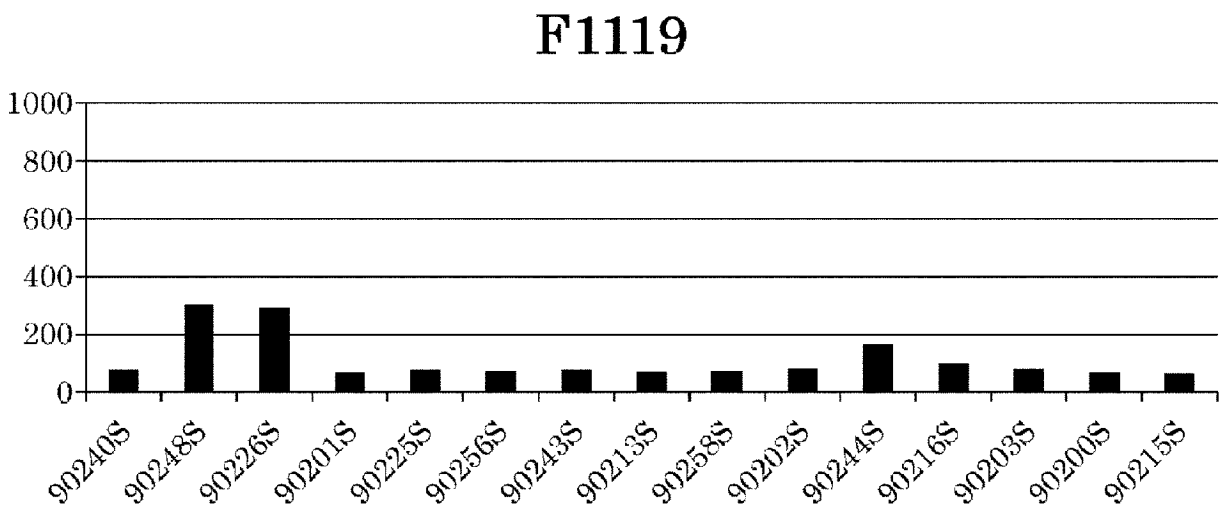
F1119
1000
800
600
400
200
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S

图 29-2

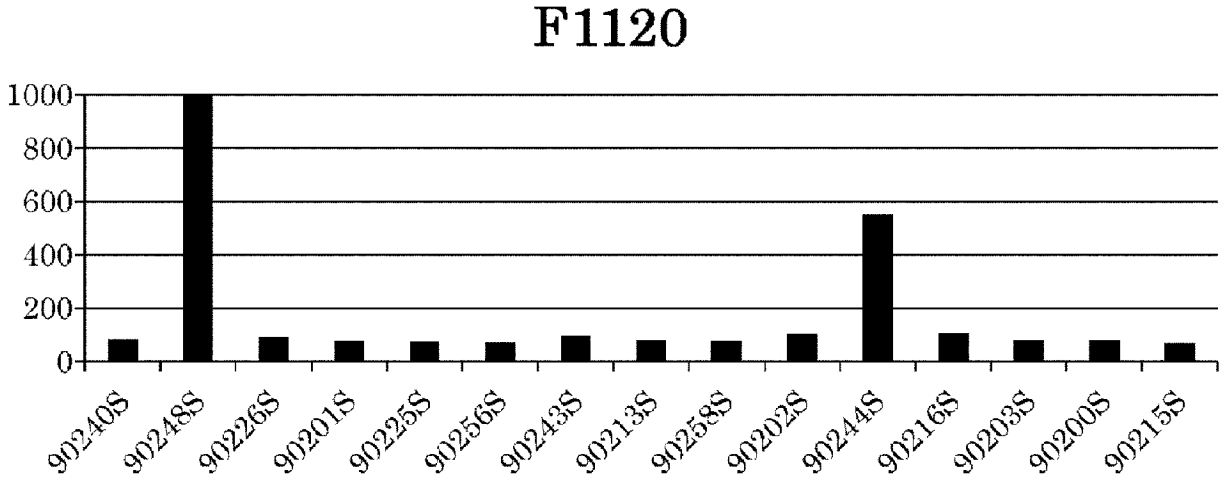
F1120
1000
800
600
400
200
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S

图 29-3

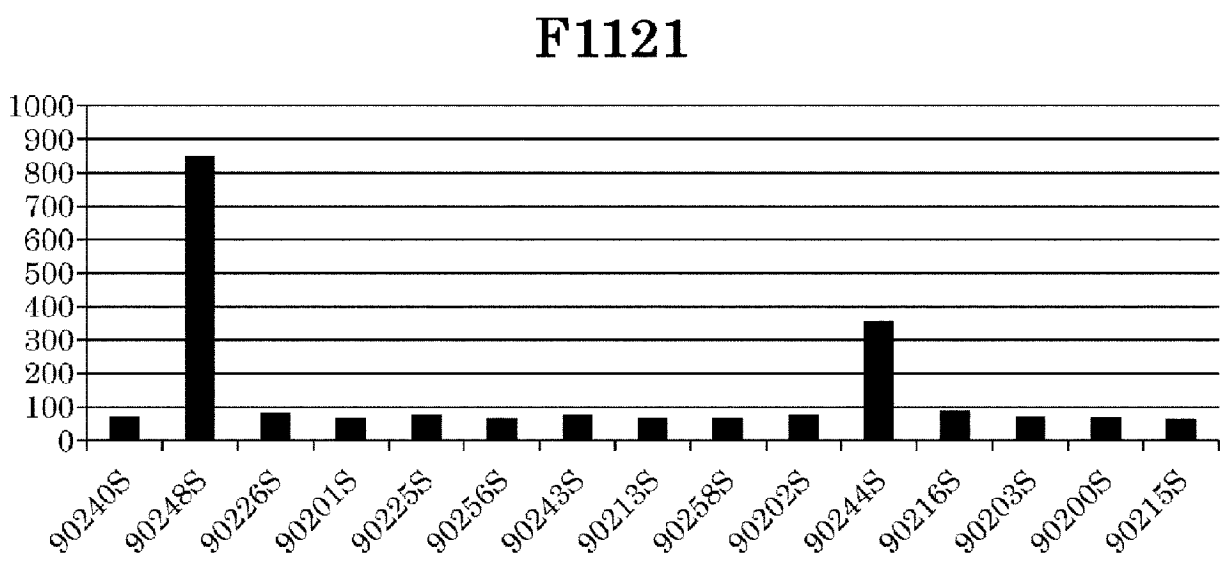
F1121
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S

图 29-4

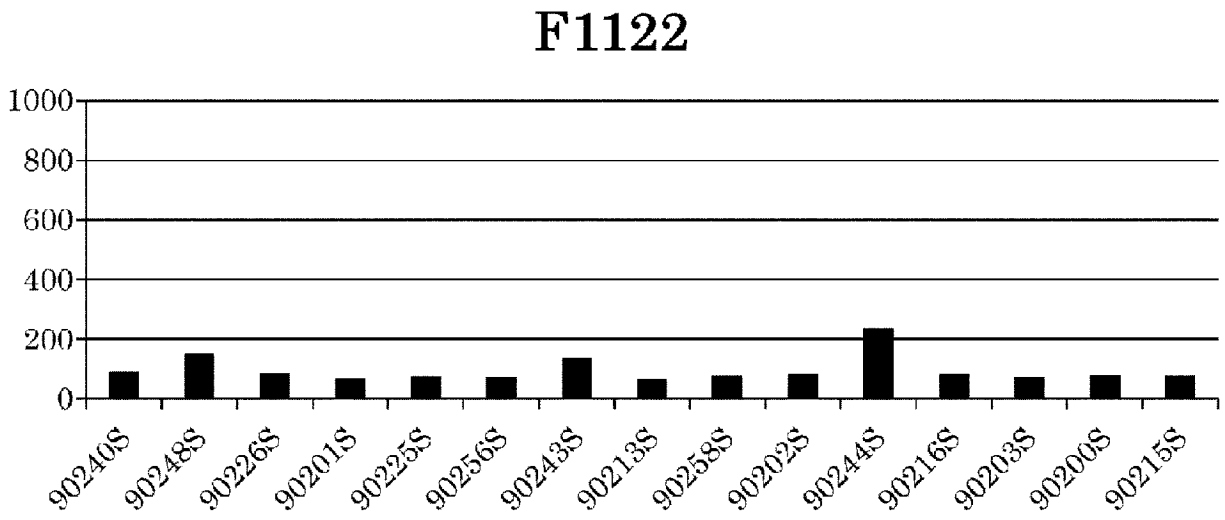
F1122
1000
800
600
400
200
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S

图 29-5

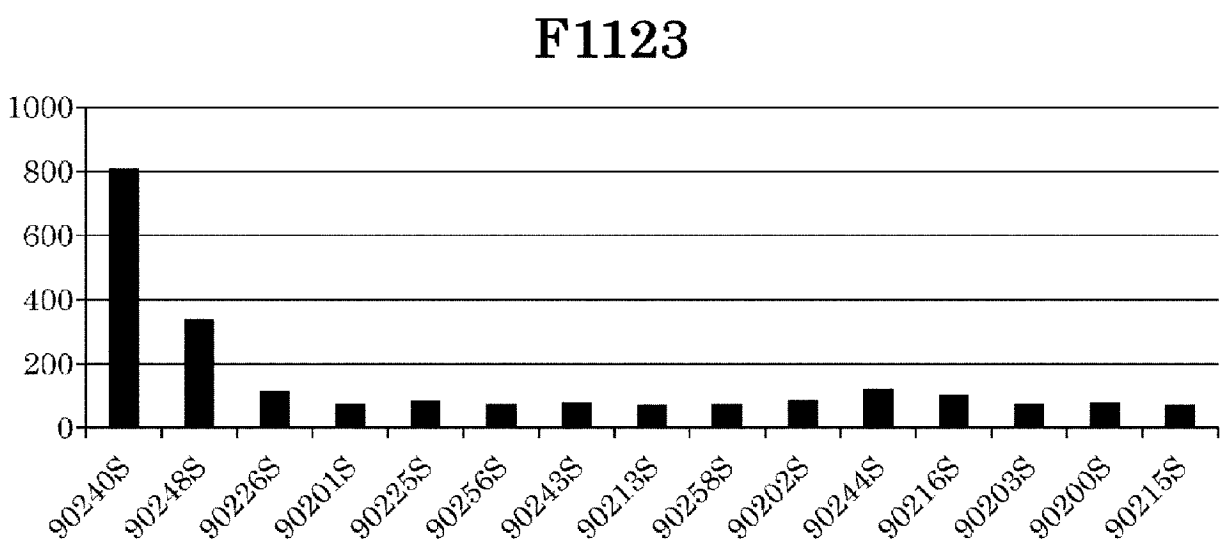
F1123
1000
800
600
400
200
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S

图 29-6

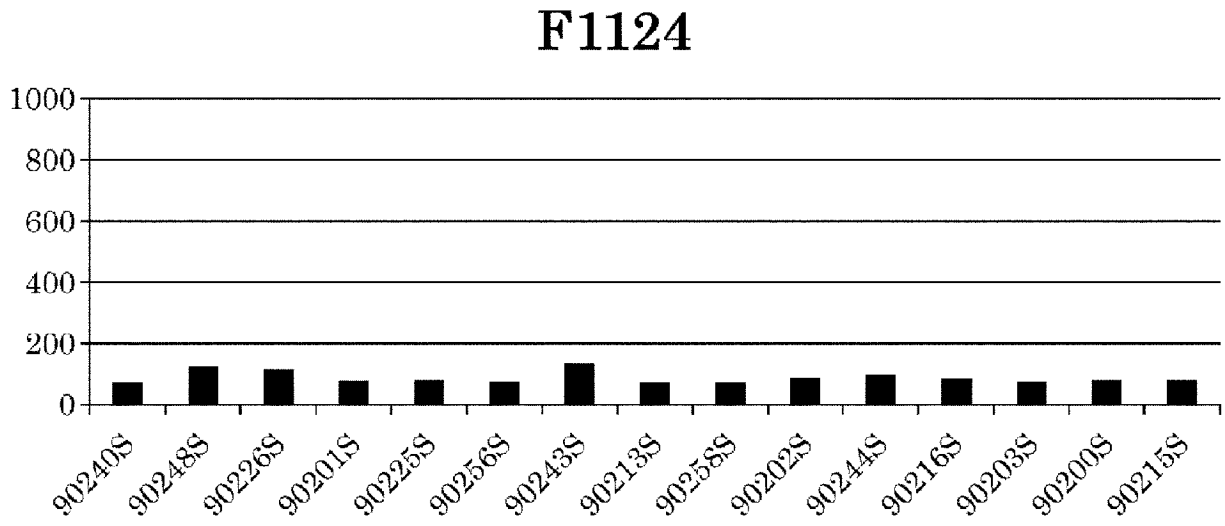
F1124
1000
800
600
400
200
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S

图 29-7

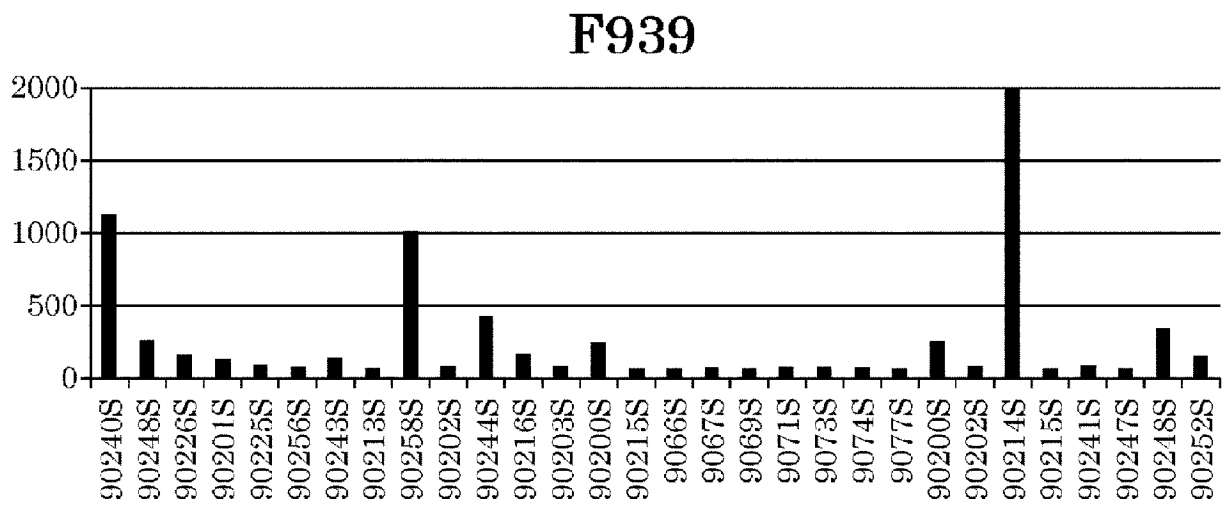
F939
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 30-1

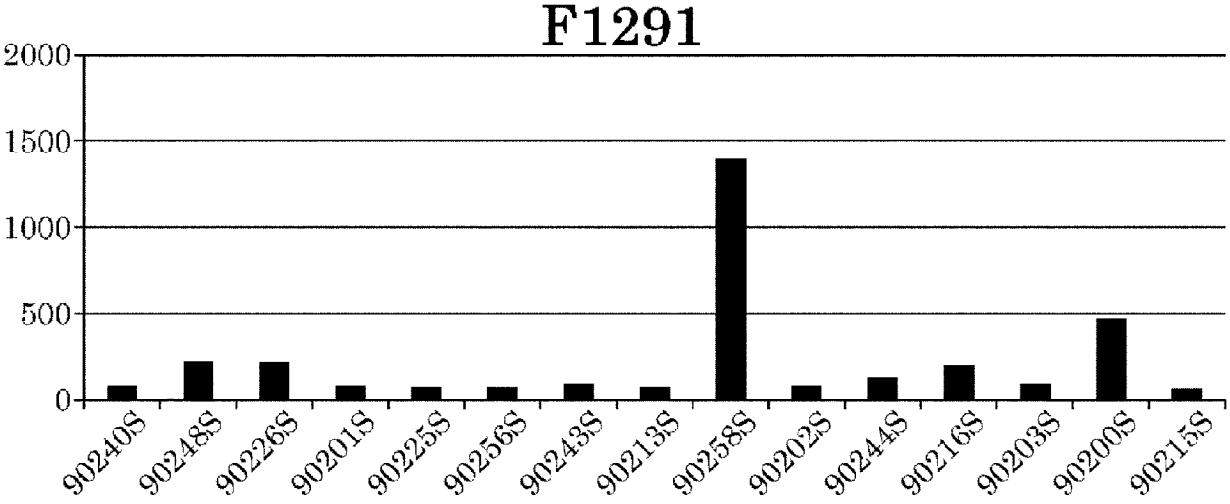
F1291
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S

图 30-2

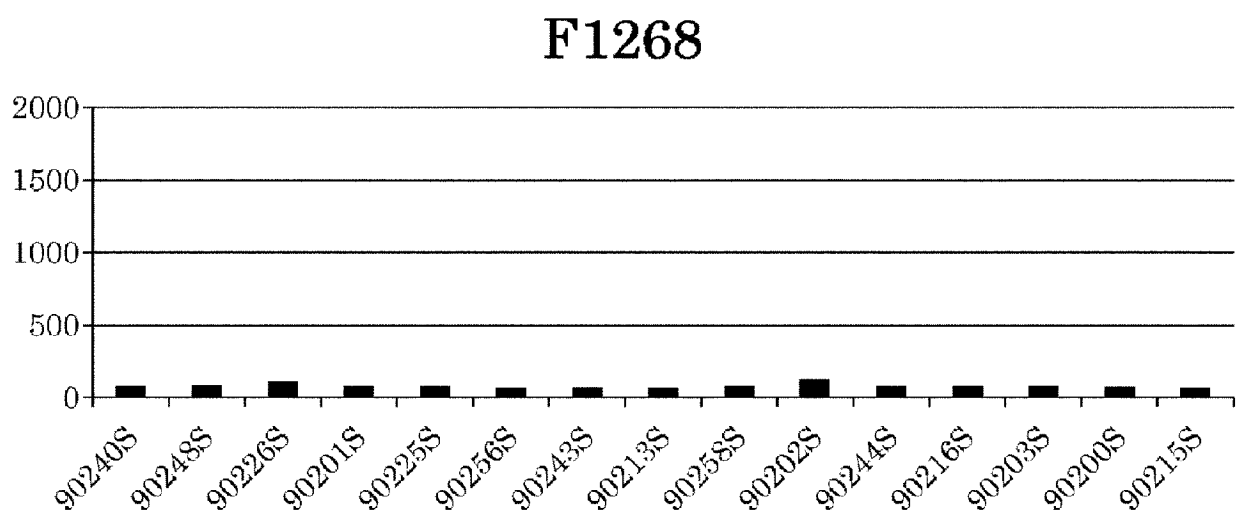
F1268
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S

图 30-3

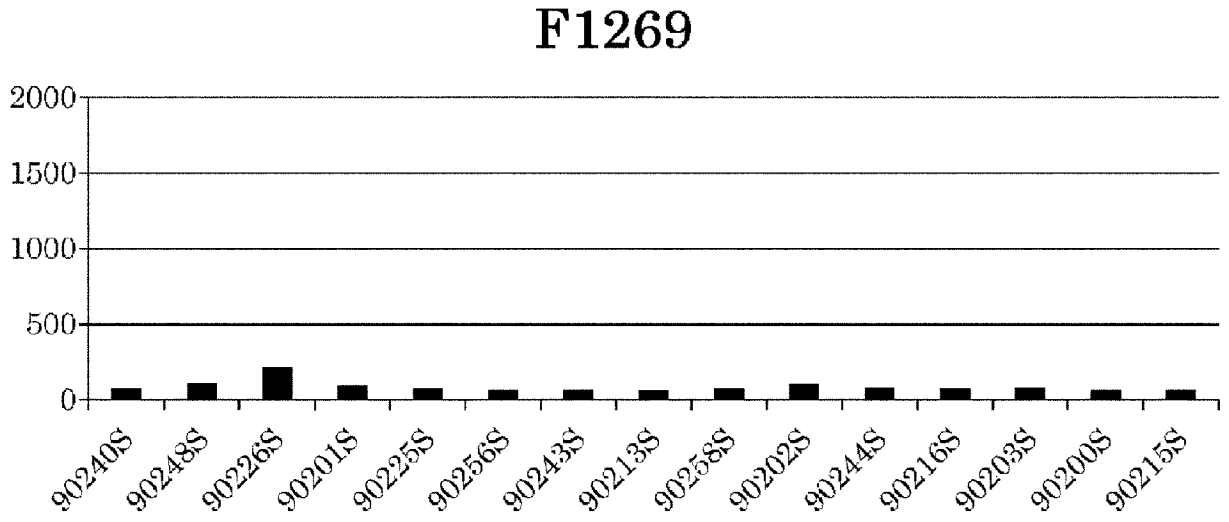
F1269
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S

图 30-4

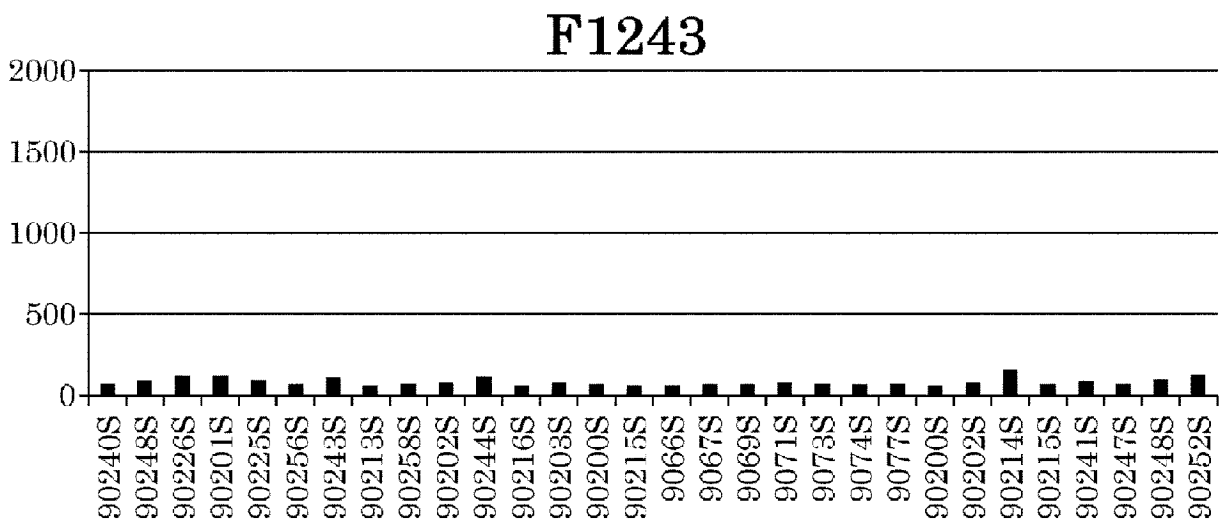
F1243
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 30-5

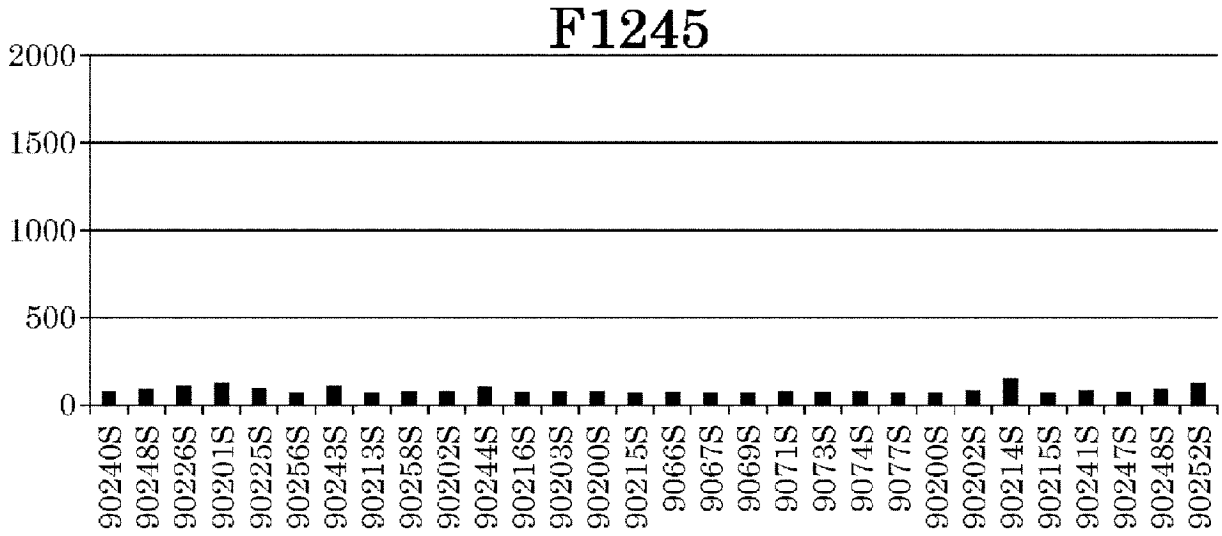
F1245
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 30-6

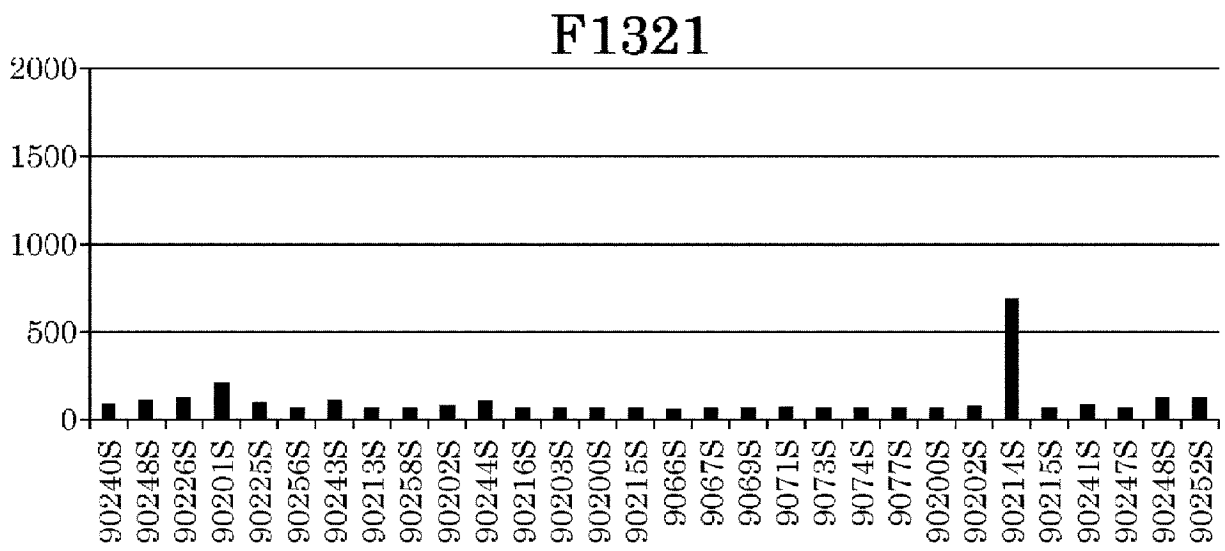
F1321
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 30-7

F1340
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 30-8

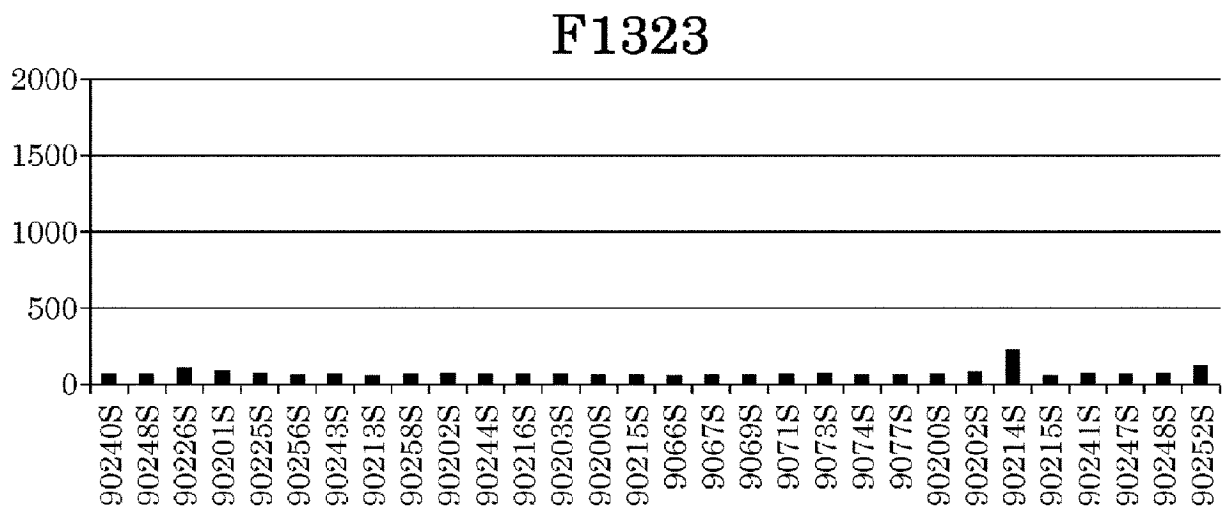
F1323
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 30-9

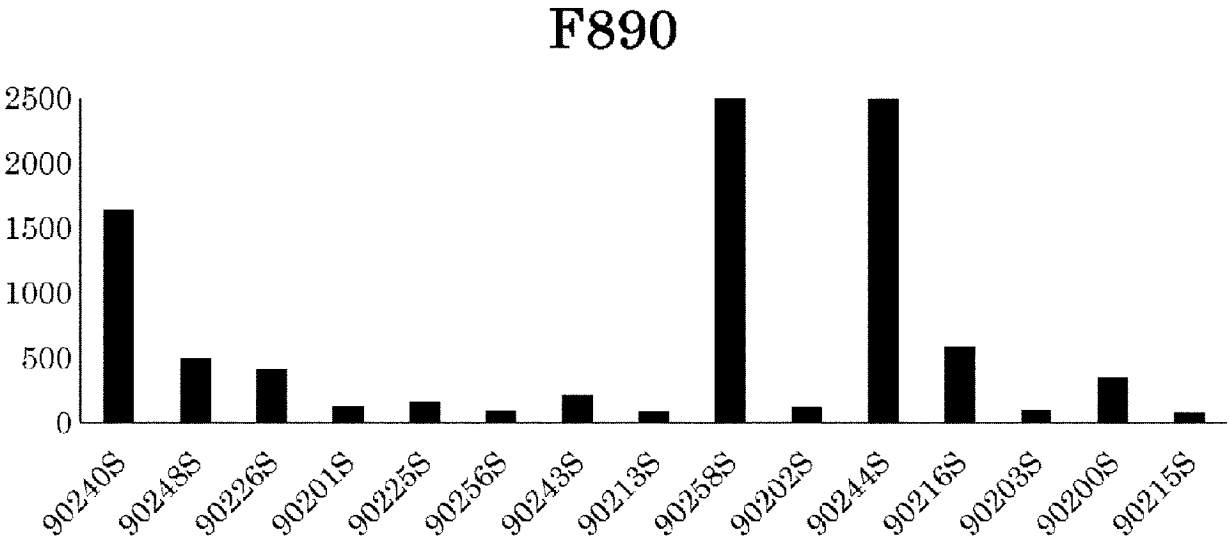
F890
2500
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S

图 31-1

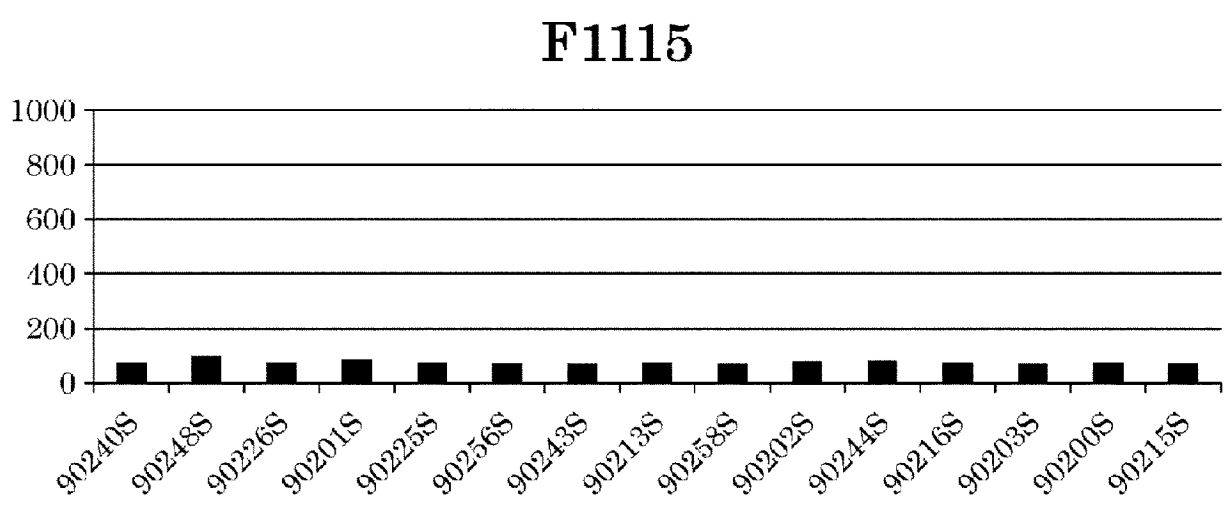
F1115
1000
800
600
400
200
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S

图 31-2

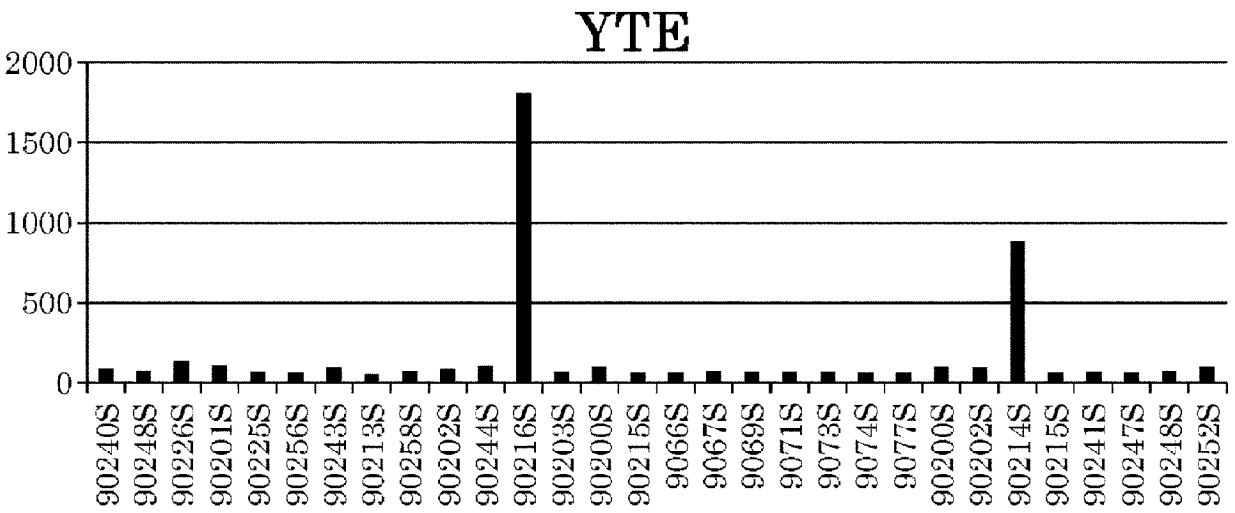
YTE
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 32-1

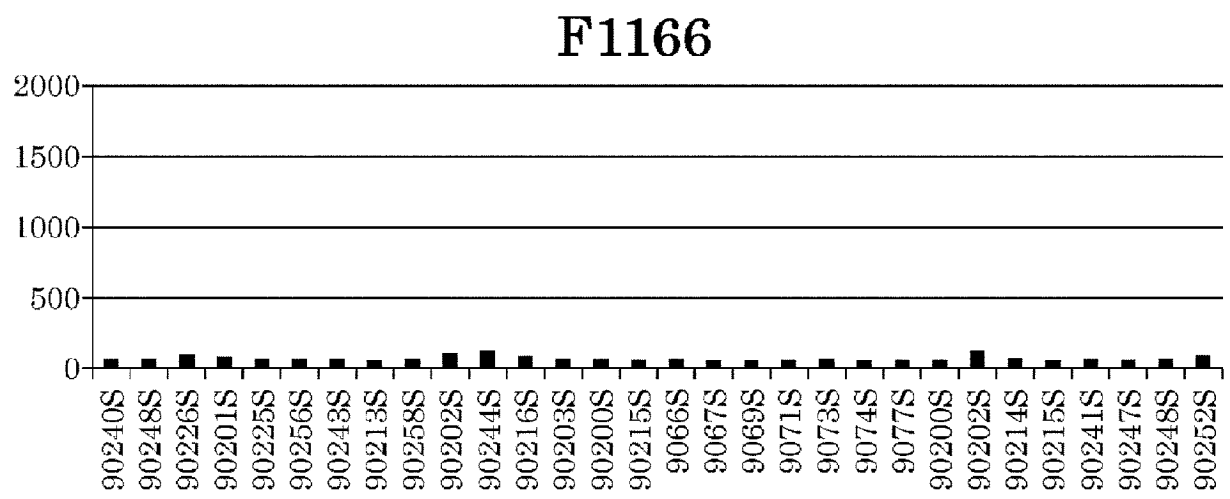
F1166
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 32-2

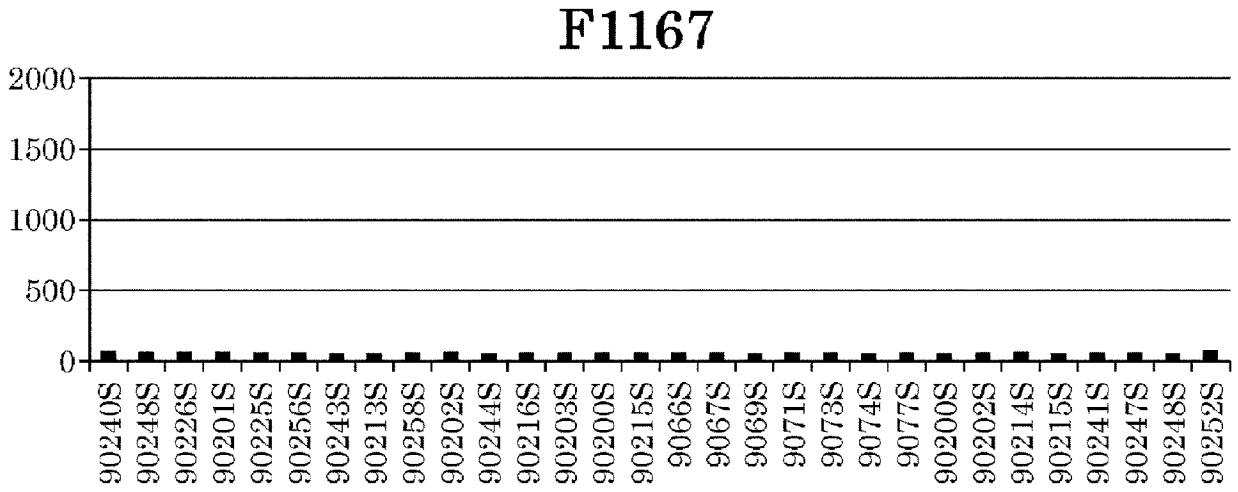
F1167
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 32-3

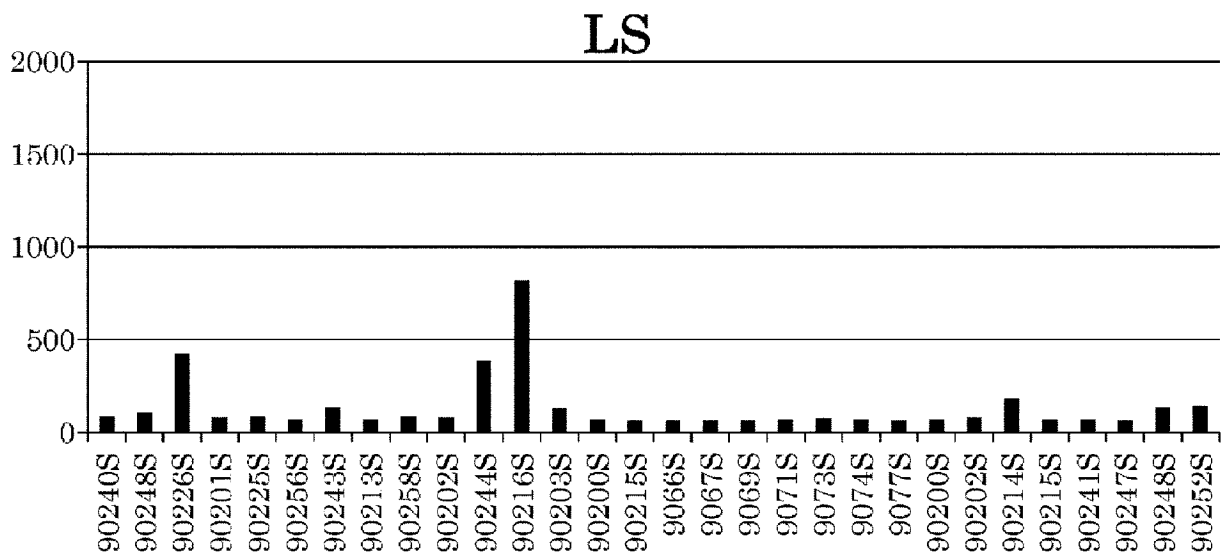
LS
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 32-4

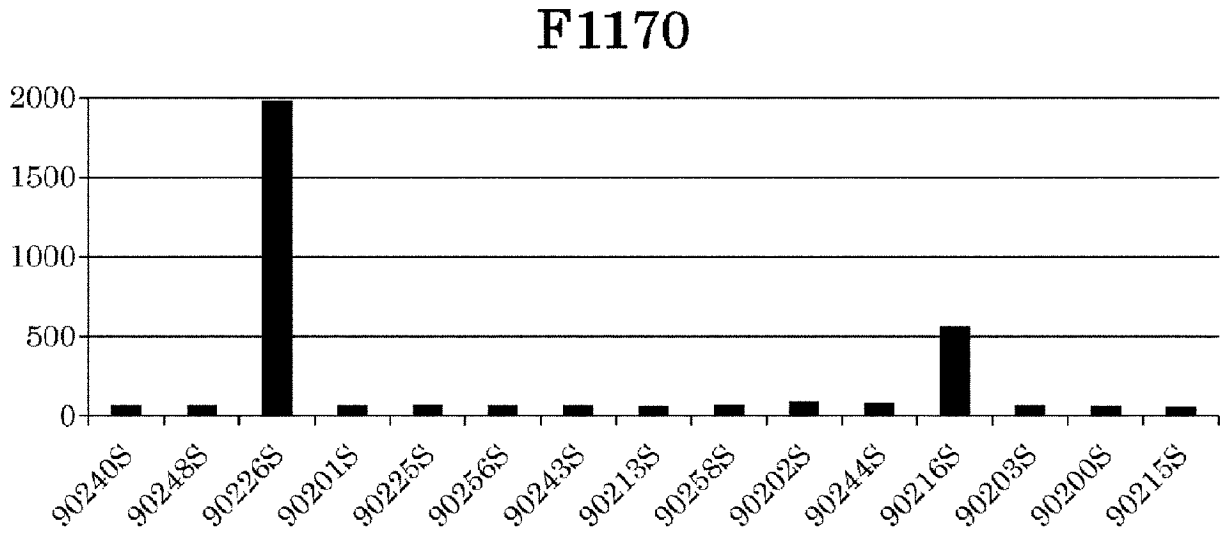
F1170
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S

图 32-5

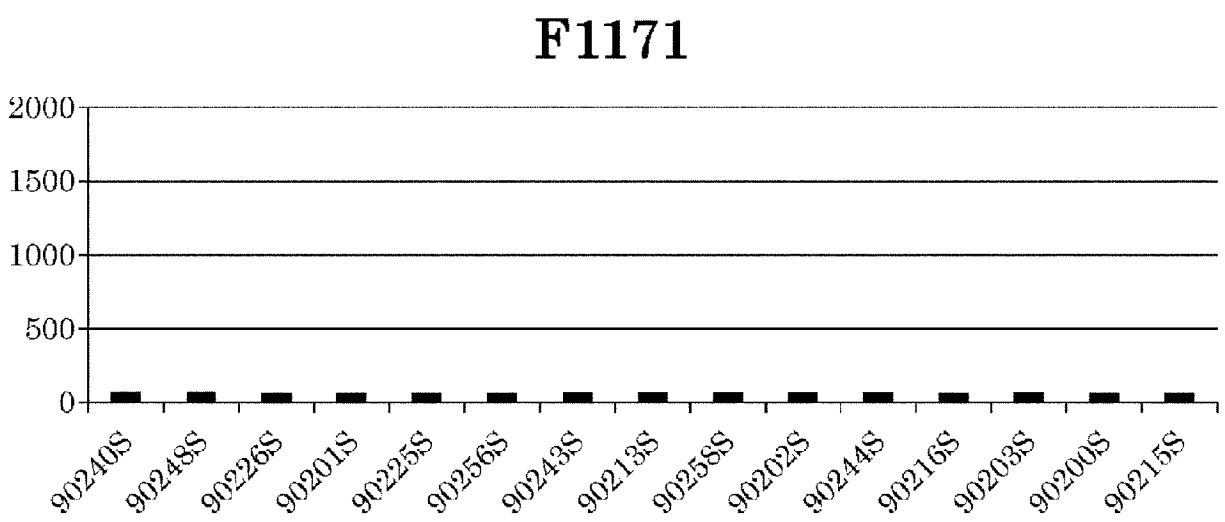
F1171
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S

图 32-6

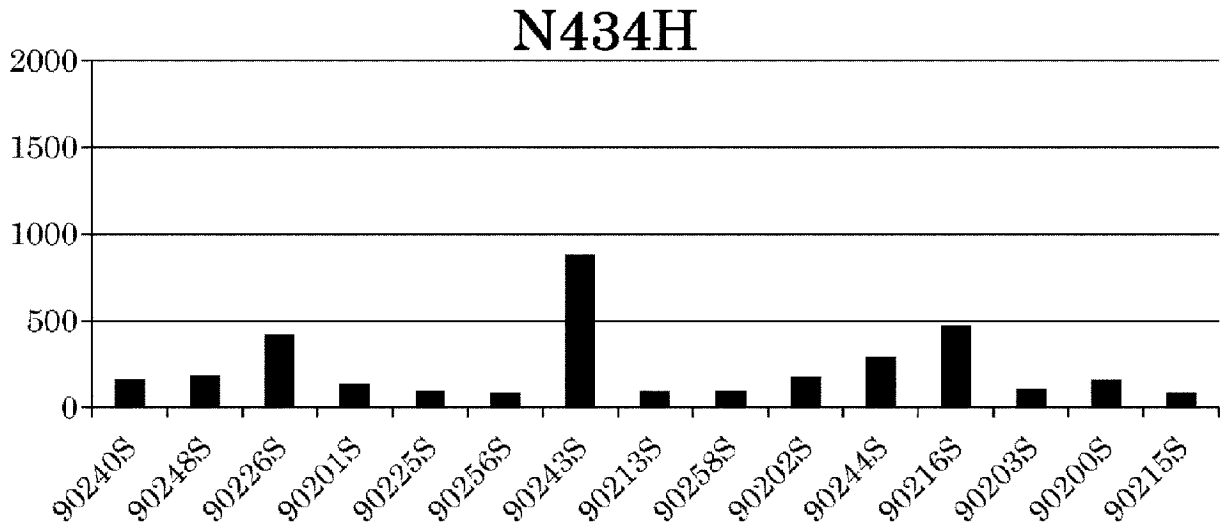
N434H
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S

图 32-7

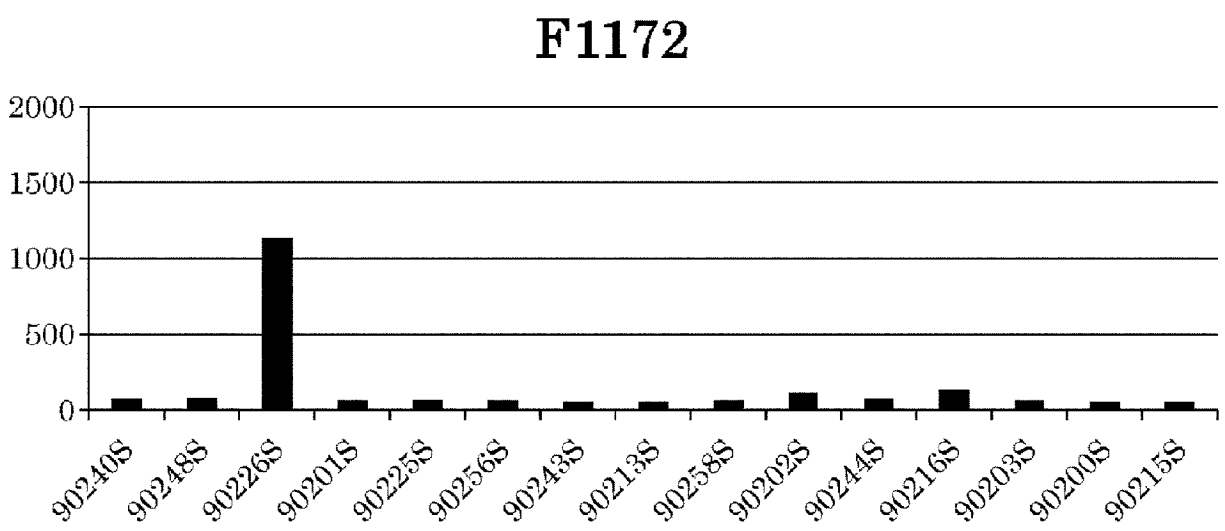
F1172
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S

图 32-8

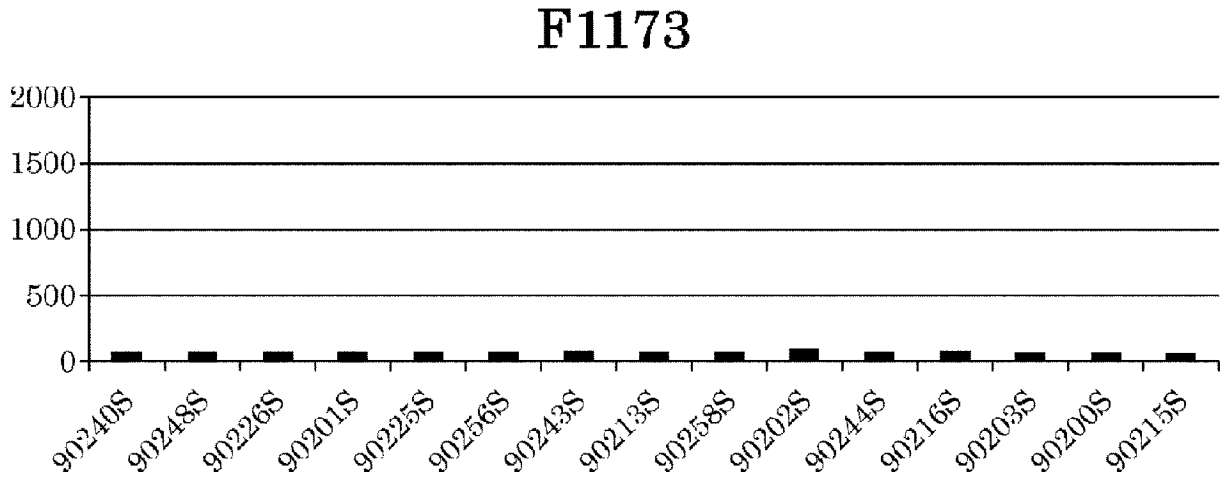
F1173
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S

图 32-9

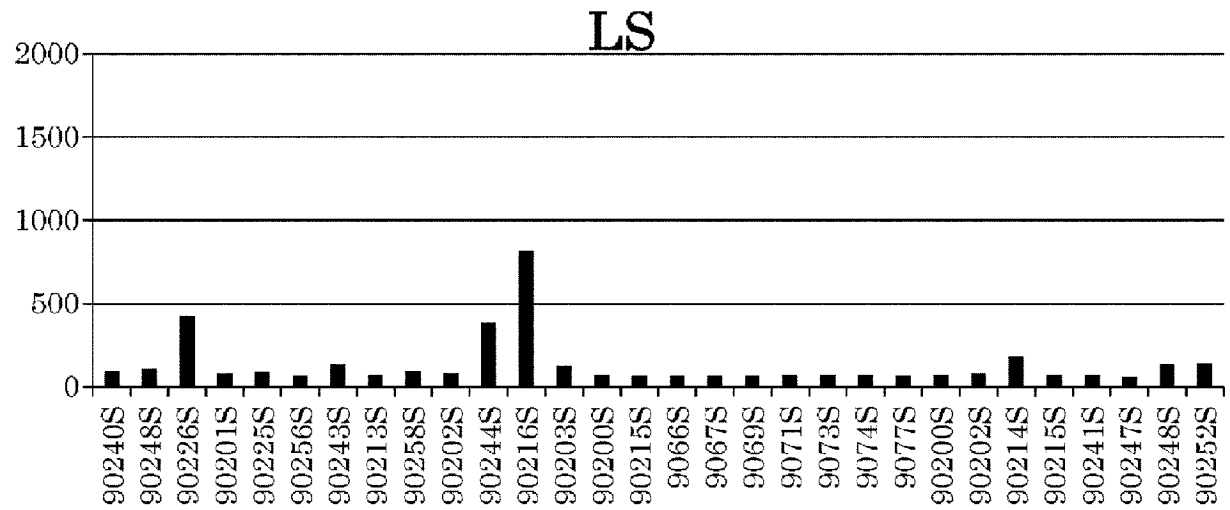
LS
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 33-1

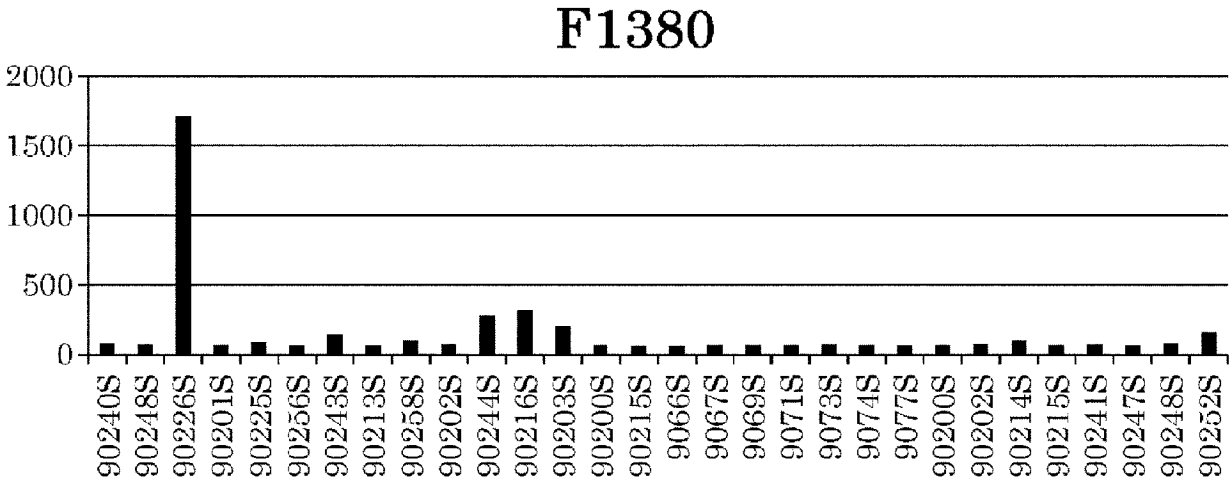
F1380
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 33-2

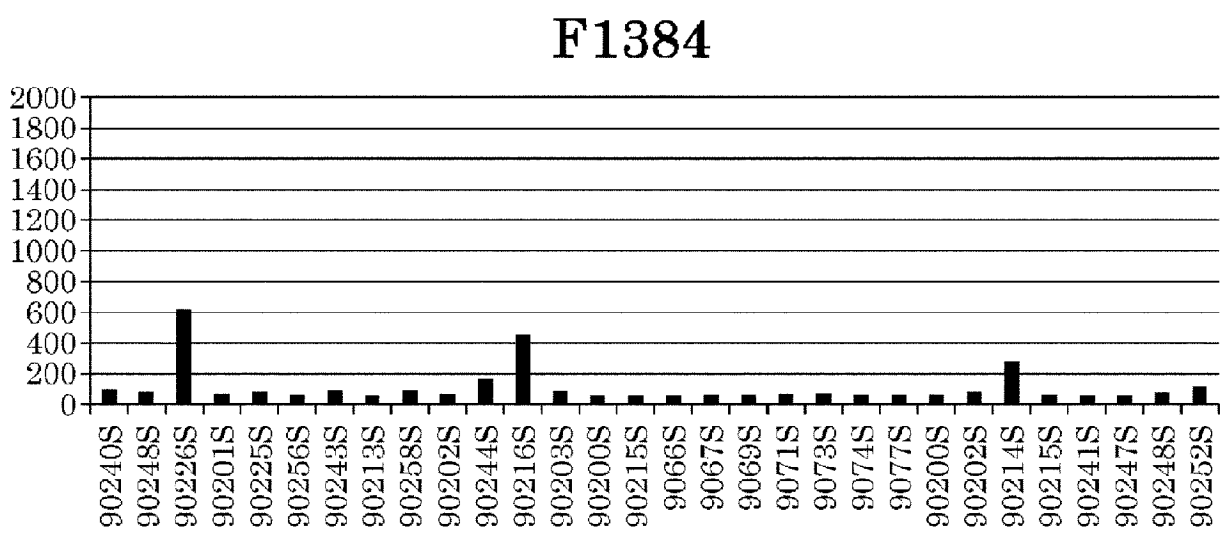
F1384
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 33-3

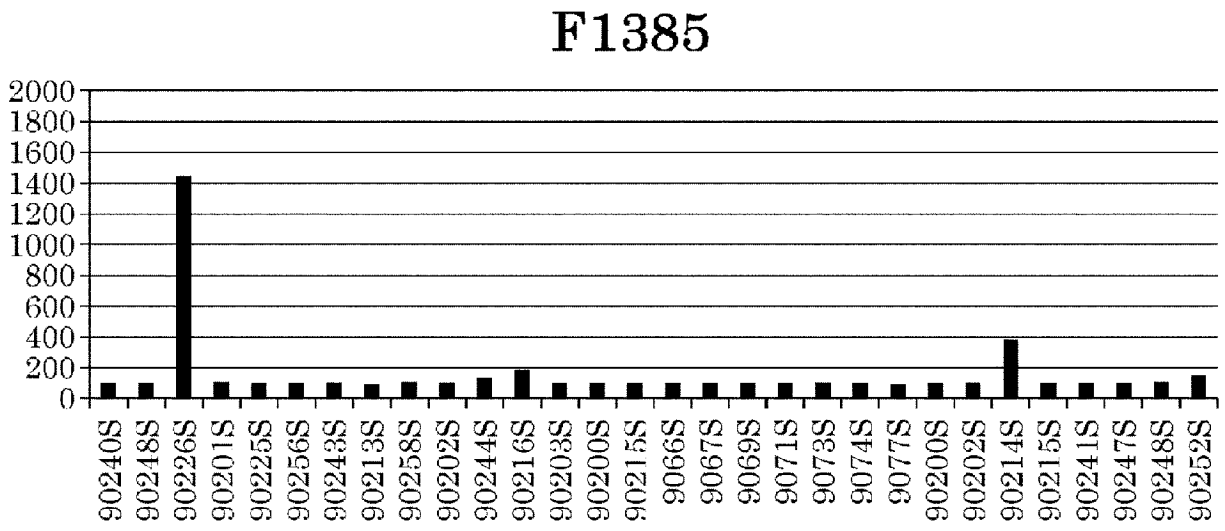
F1385
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 33-4

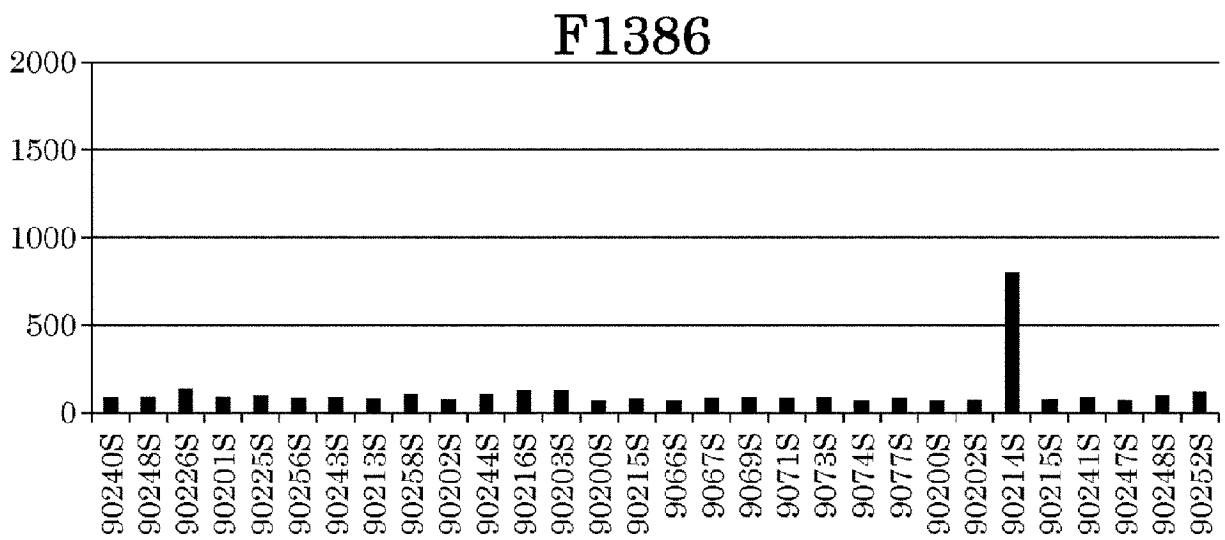
F1386
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 33-5

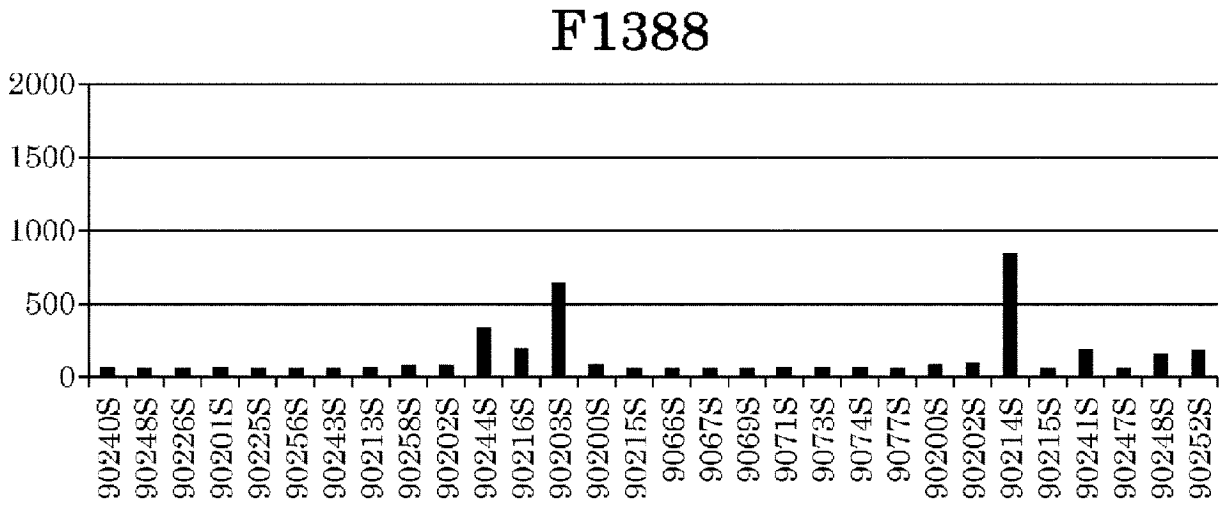
F1388
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 33-6

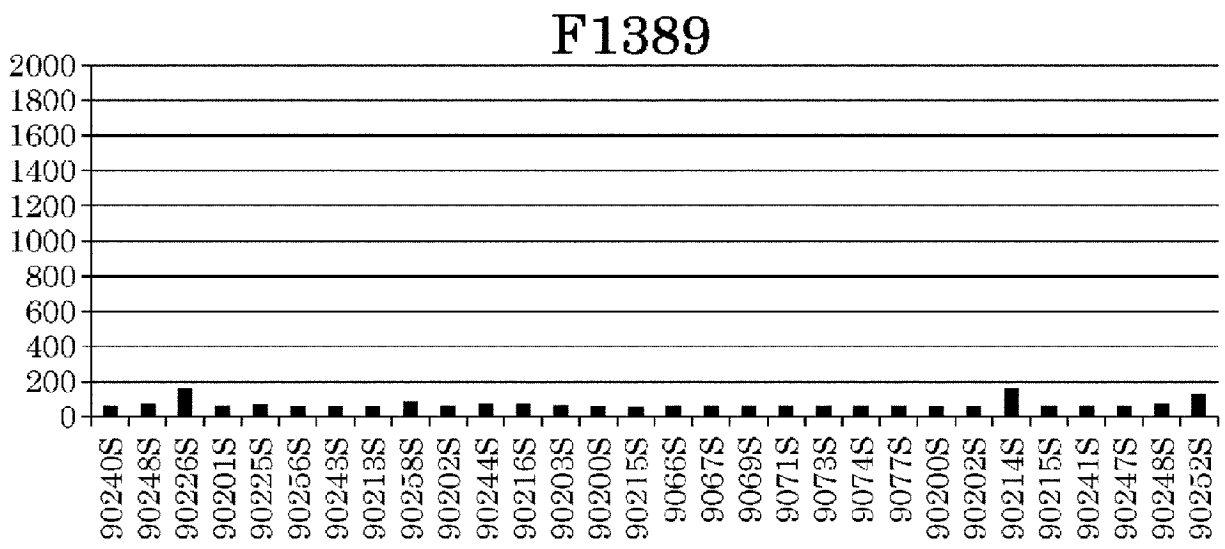
F1389
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 33-7

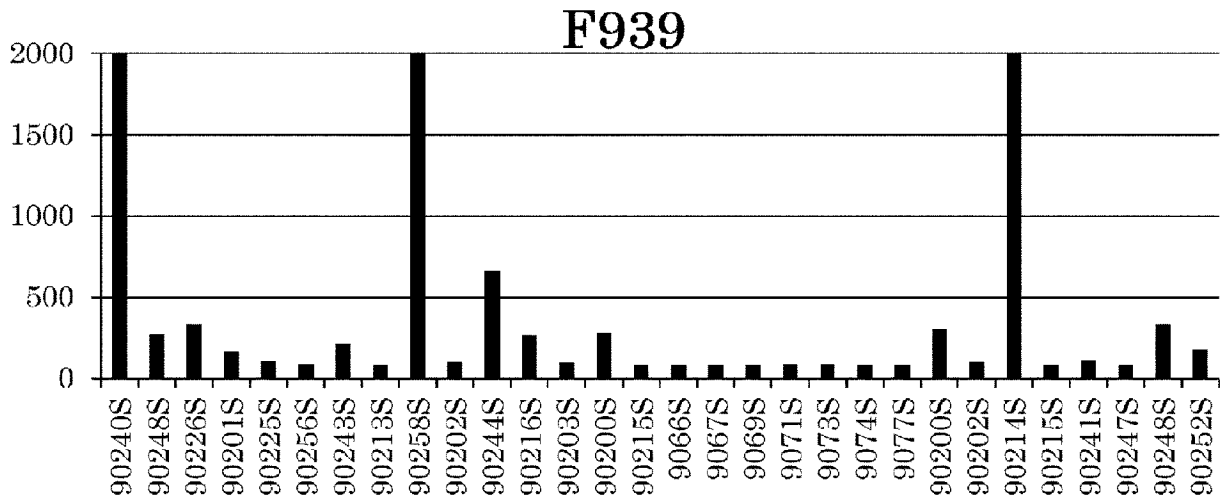
F939
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 34

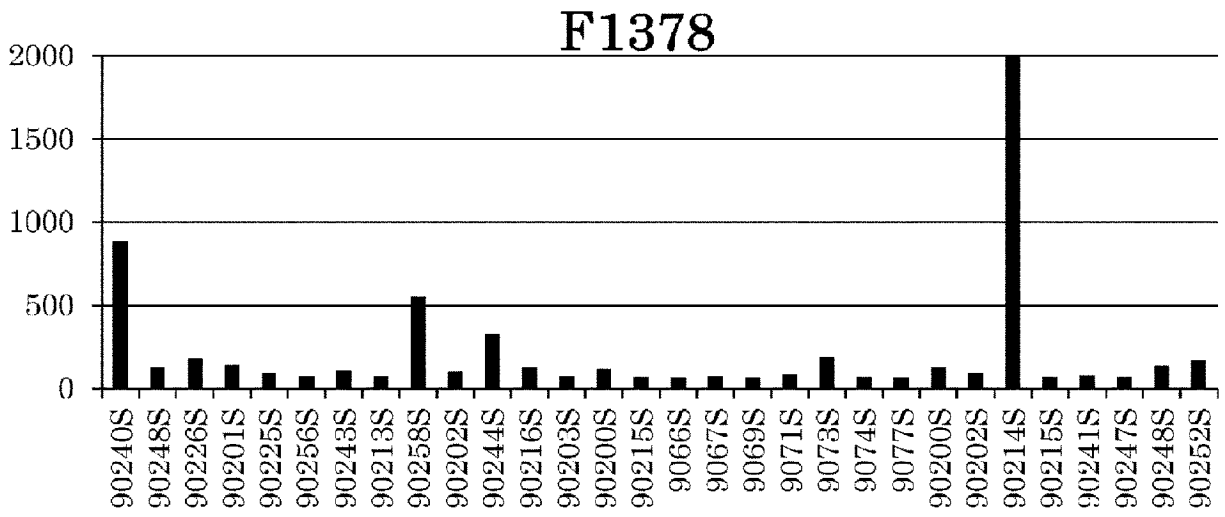
F1378
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 35

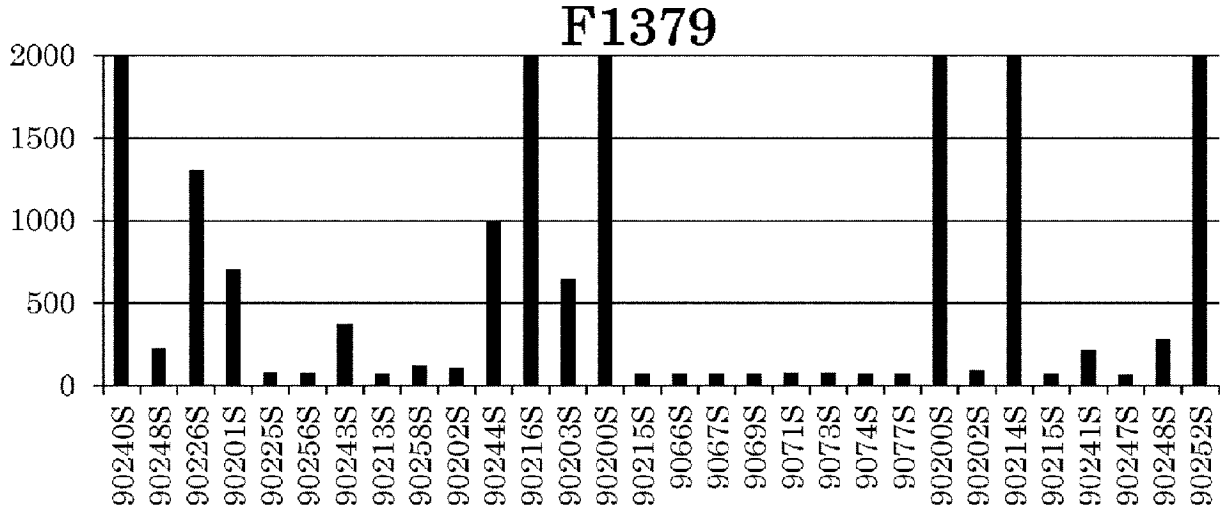
F1379
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 36

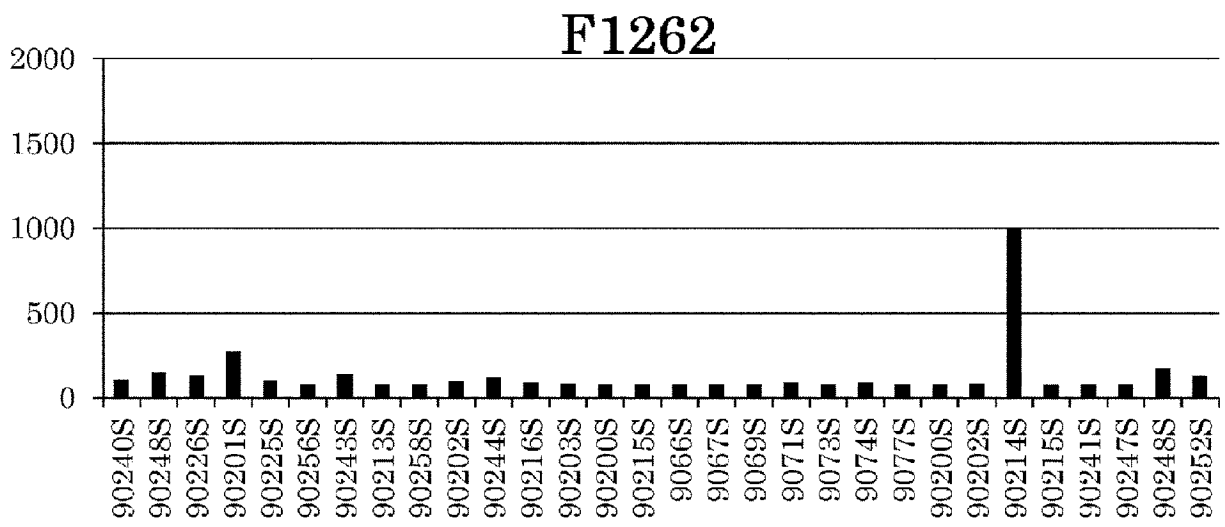
F1262
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 37

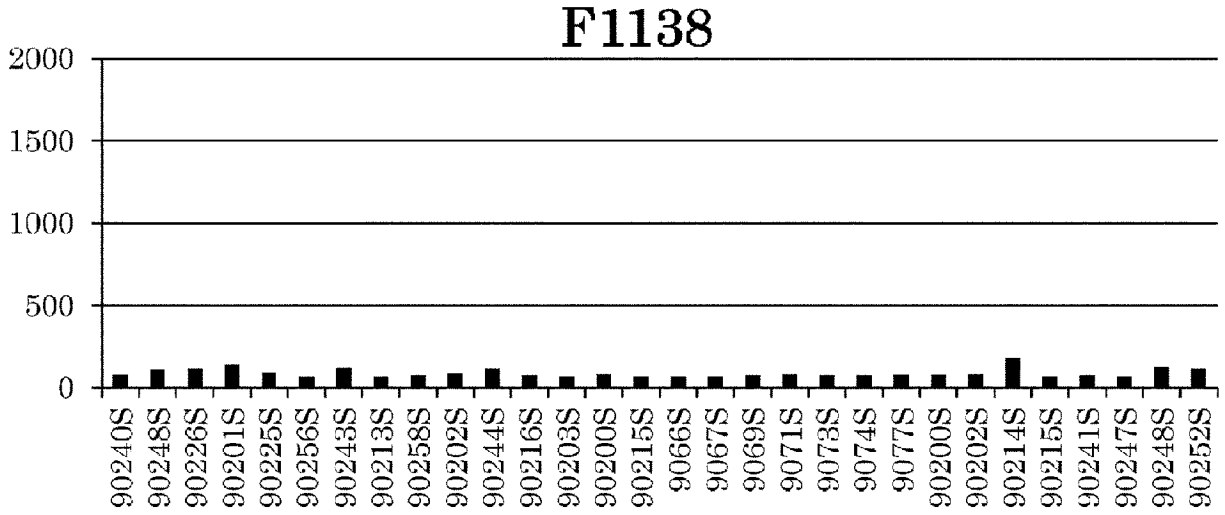
F1138
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 38

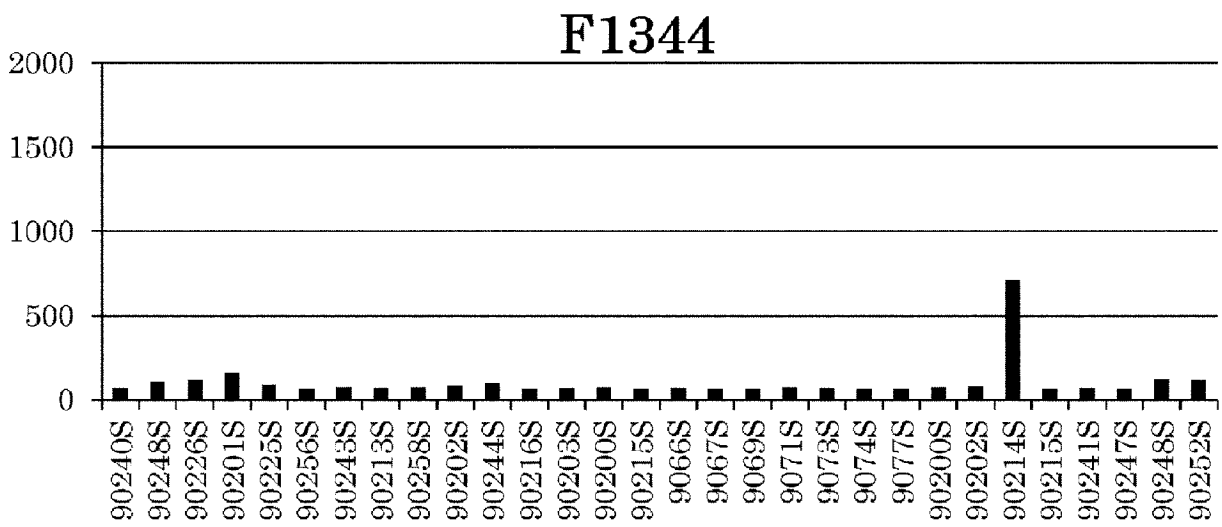
F1344
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 39

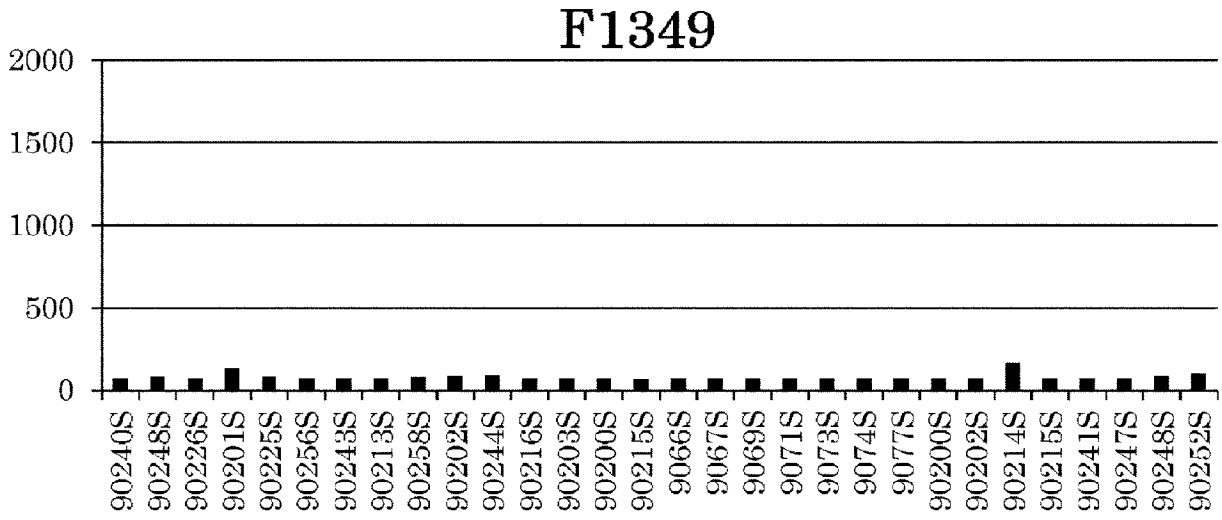
F1349
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 40

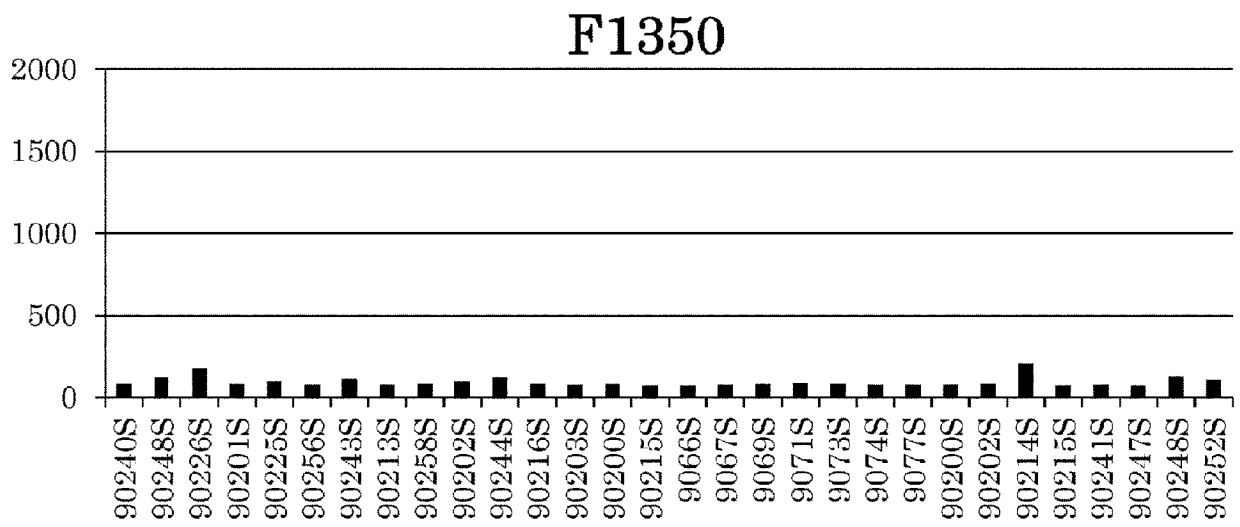
F1350
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 41

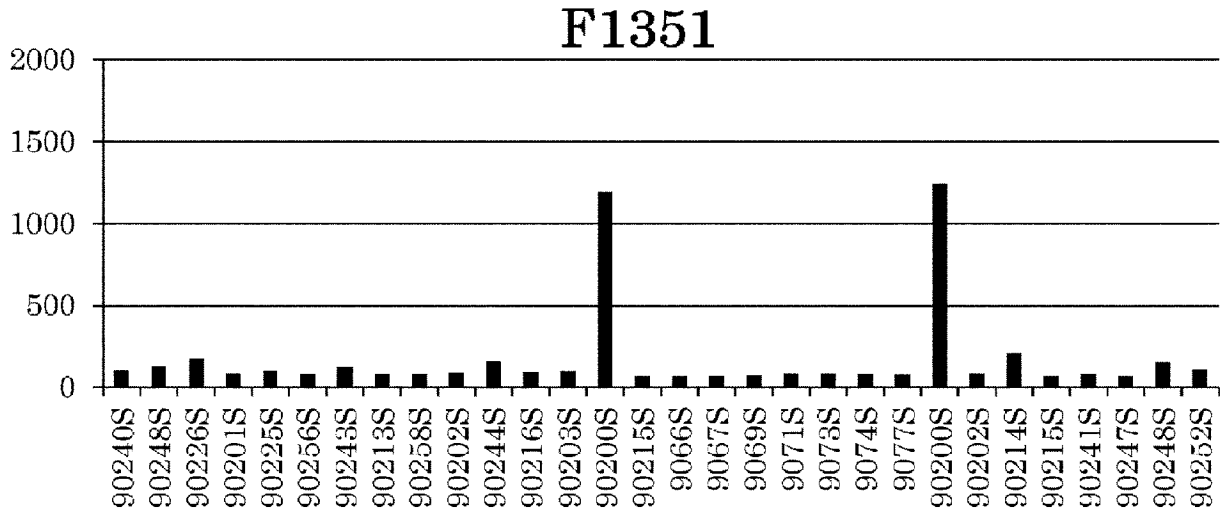
F1351
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 42

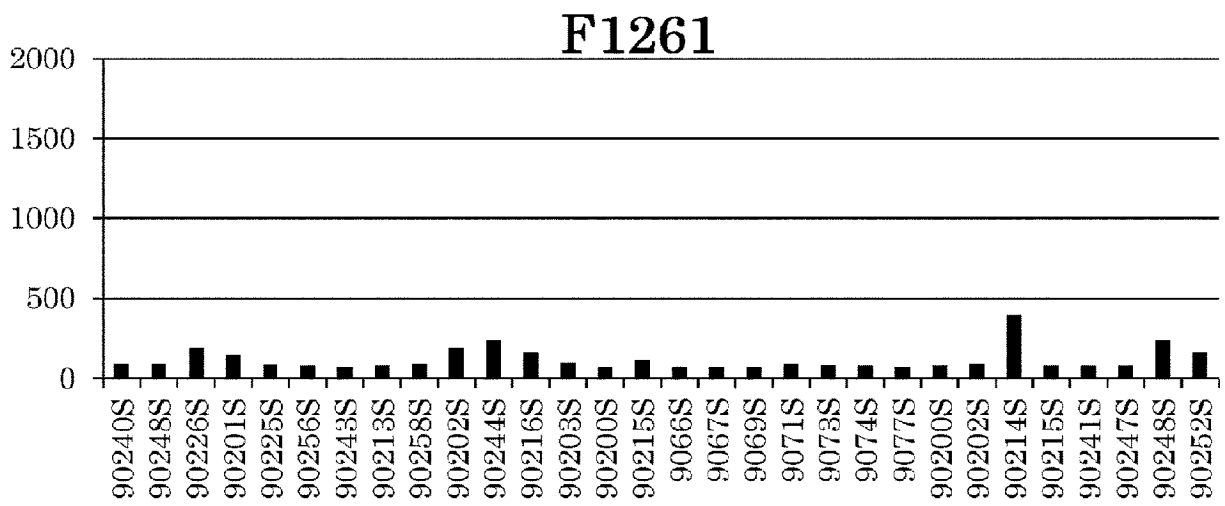
F1261
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 43

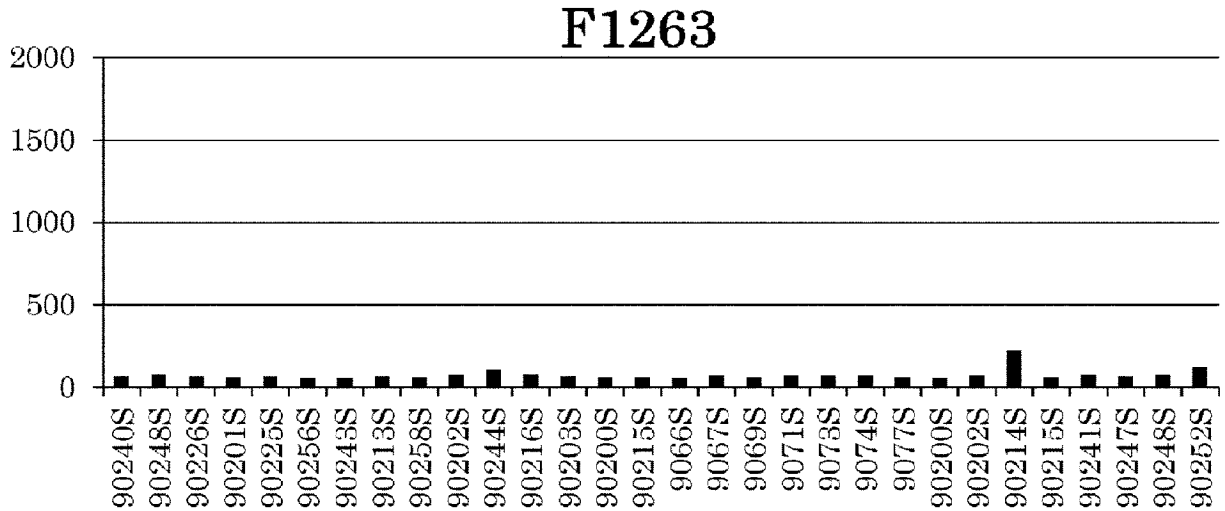
F1263
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 44

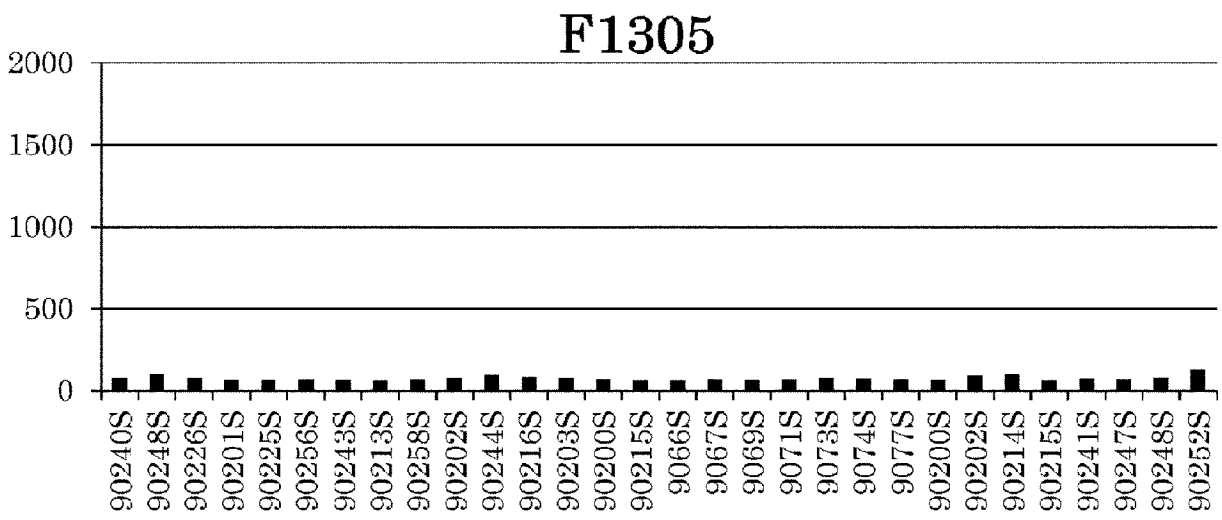
F1305
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 45

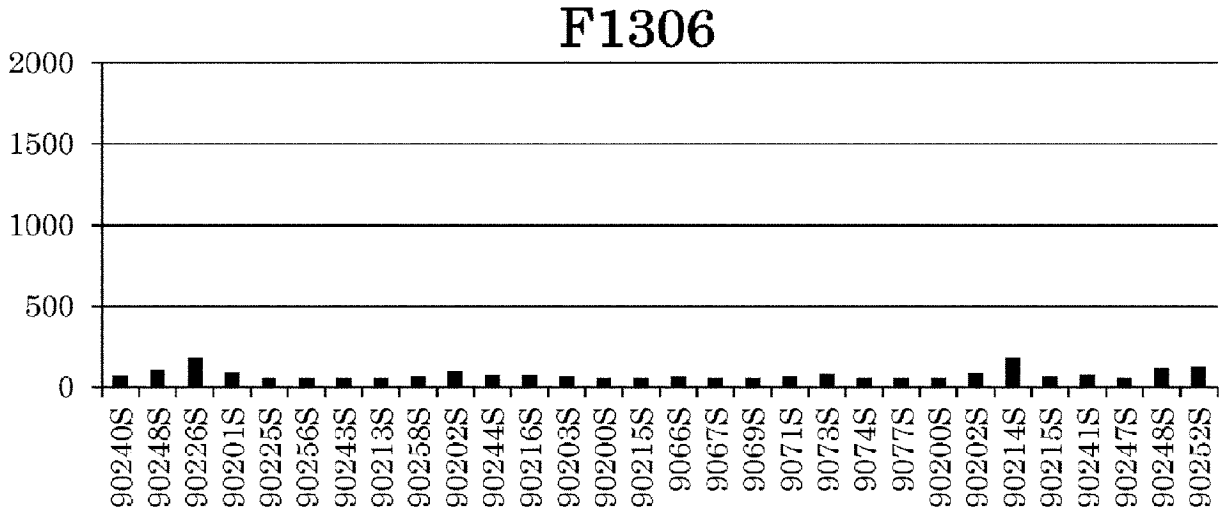
F1306
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 46

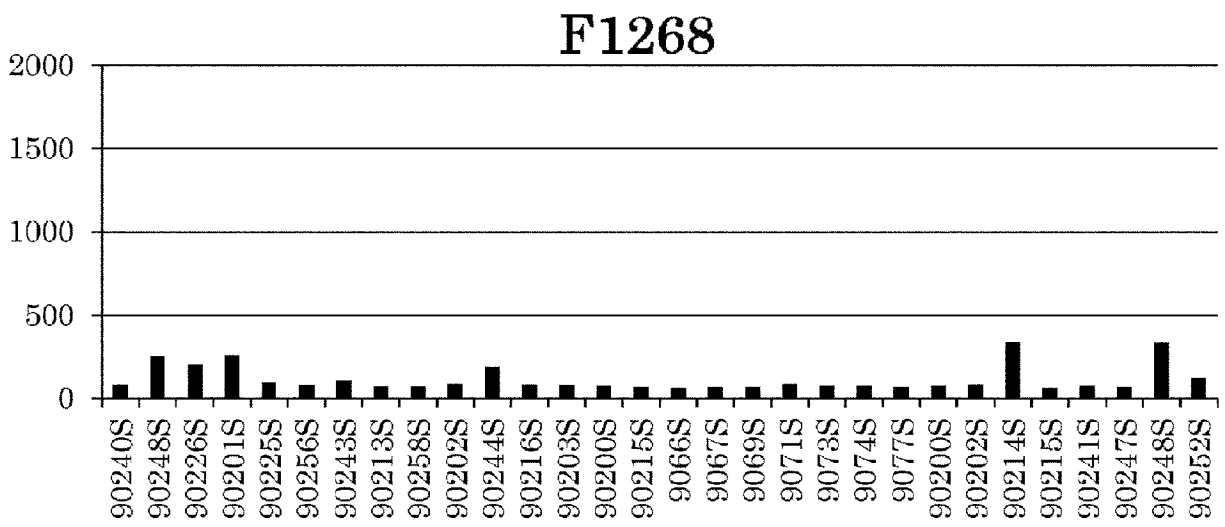
F1268
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 47

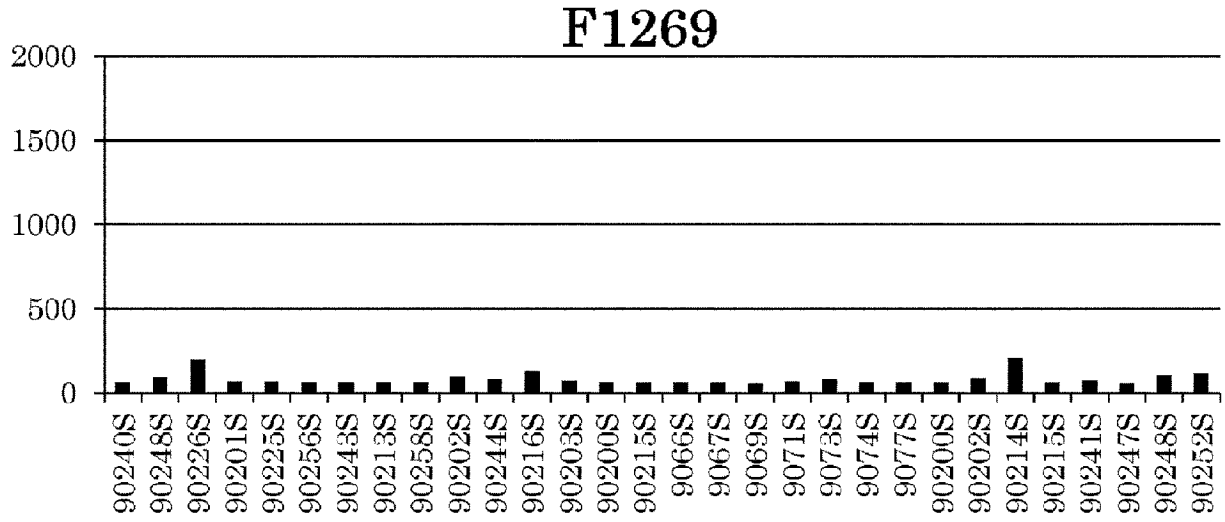
F1269
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 48

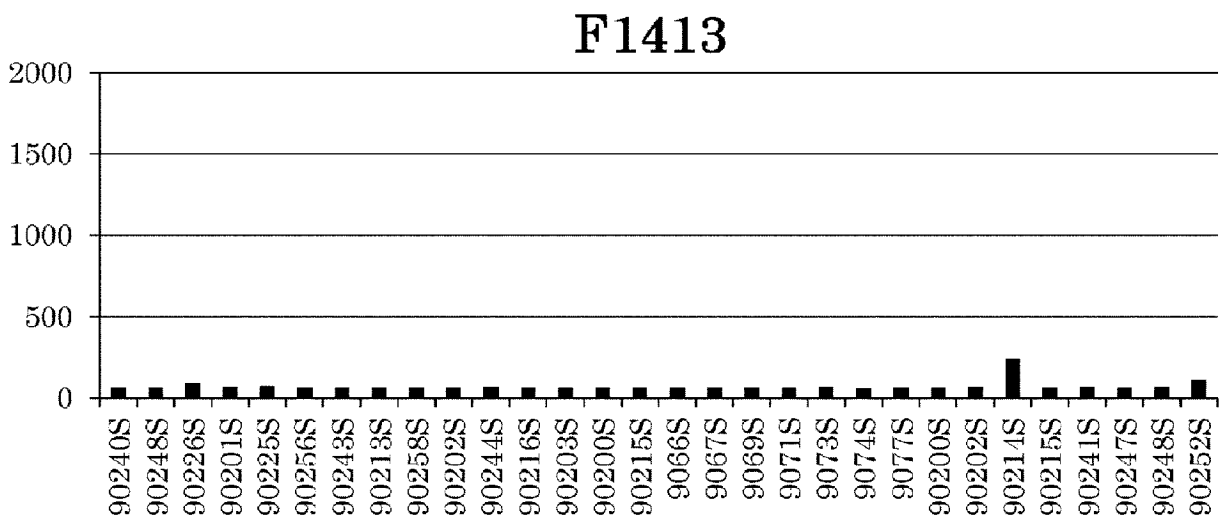
F1413
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 49

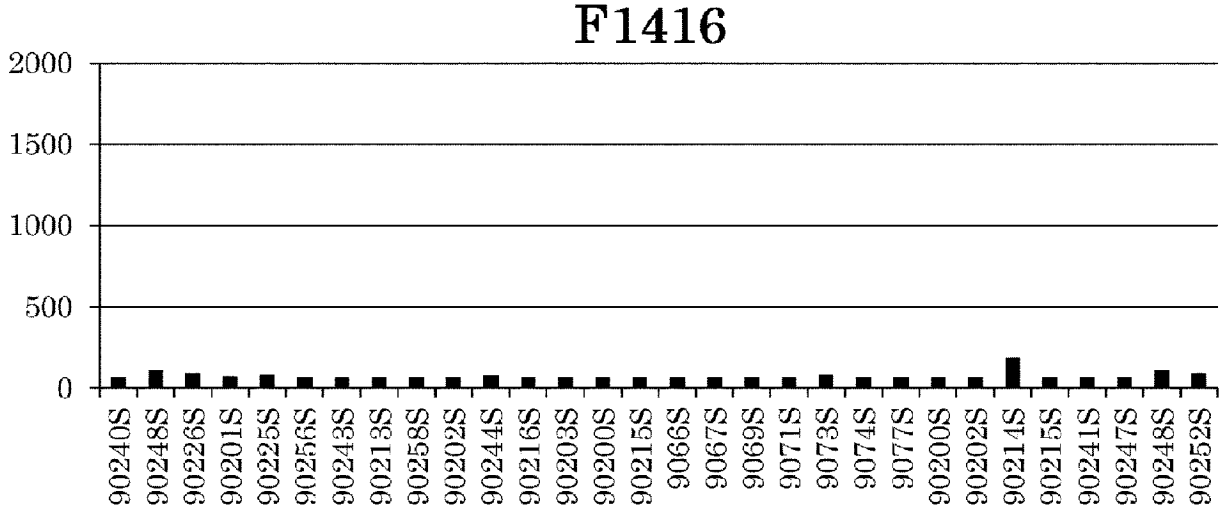
F1416
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 50

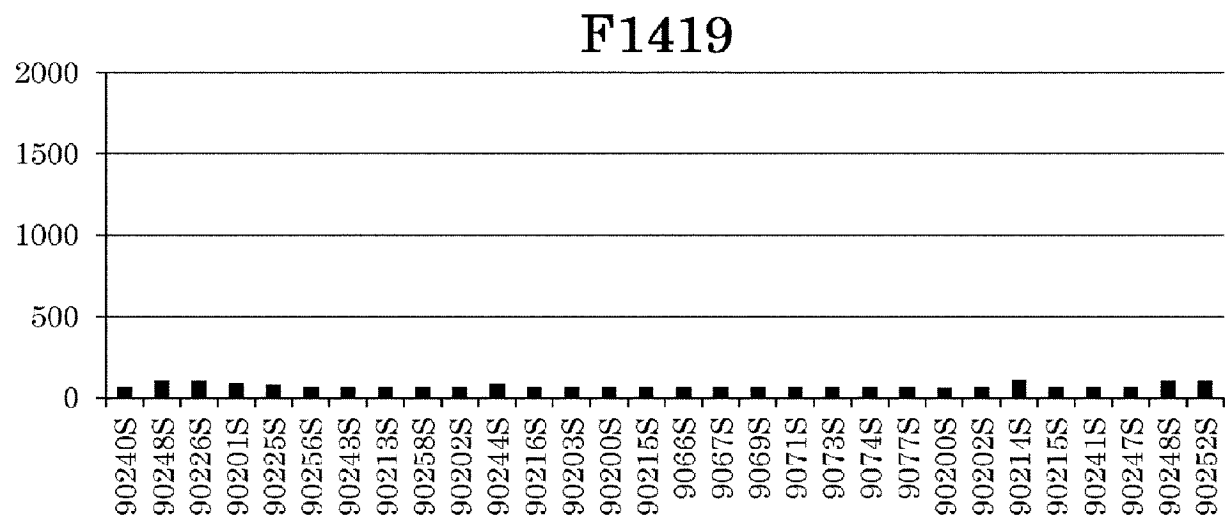
F1419
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 51

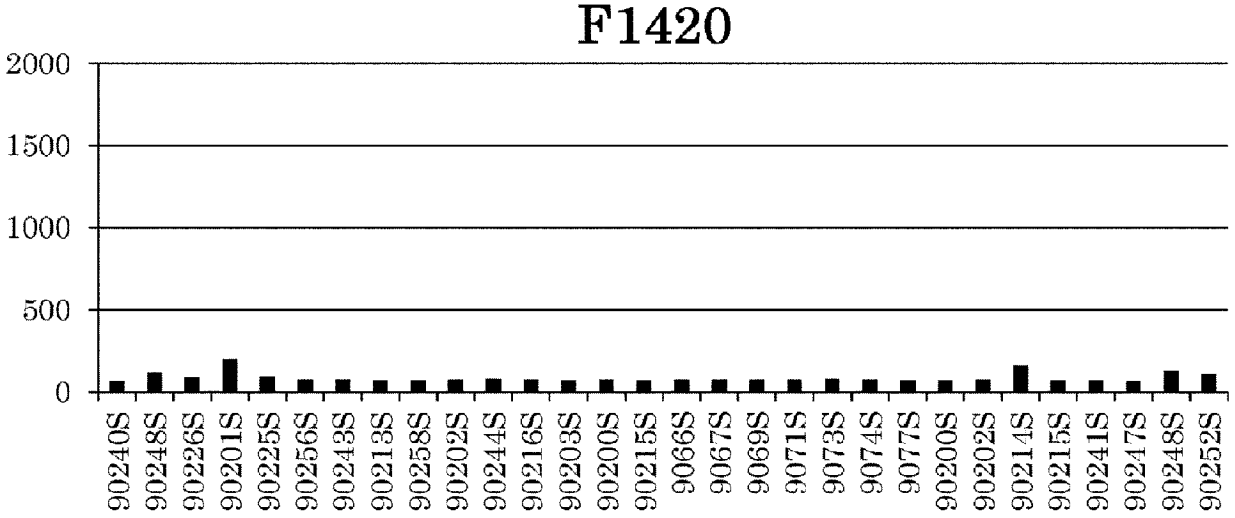
F1420
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 52

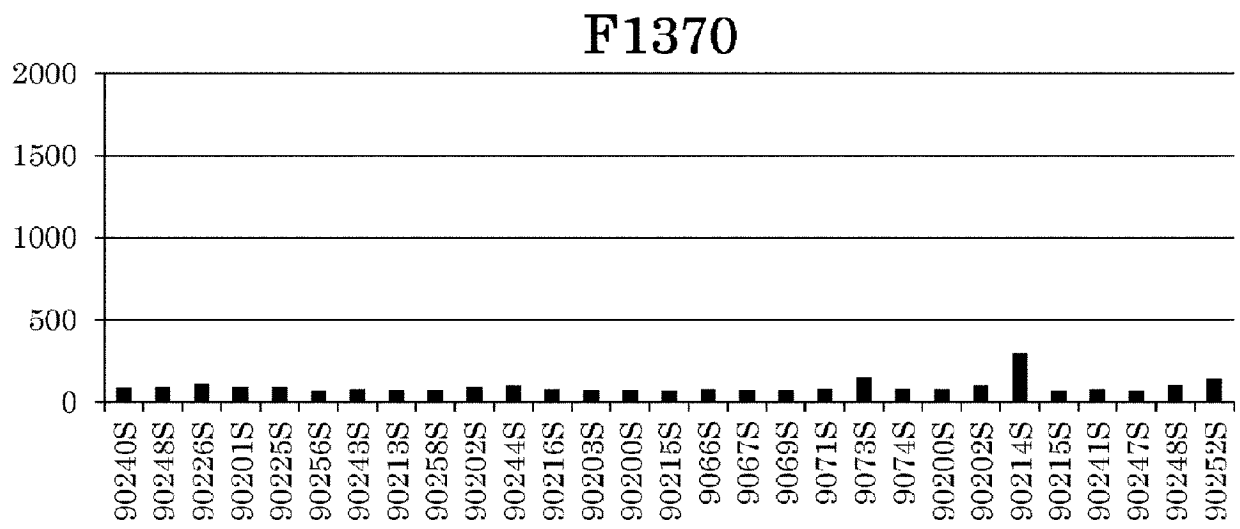
F1370
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 53

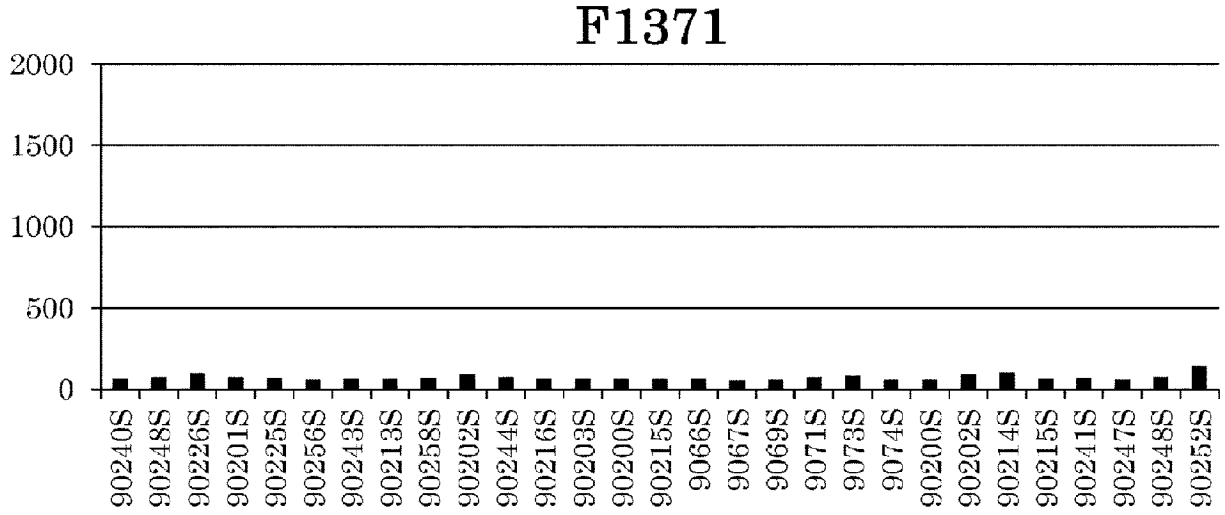
F1371
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 54

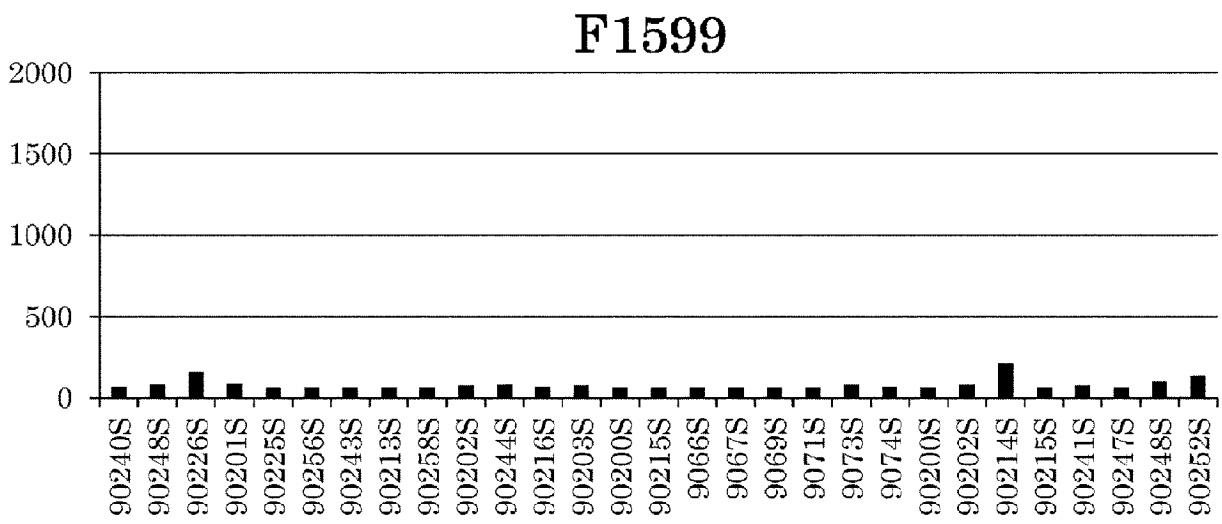
F1599
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 55

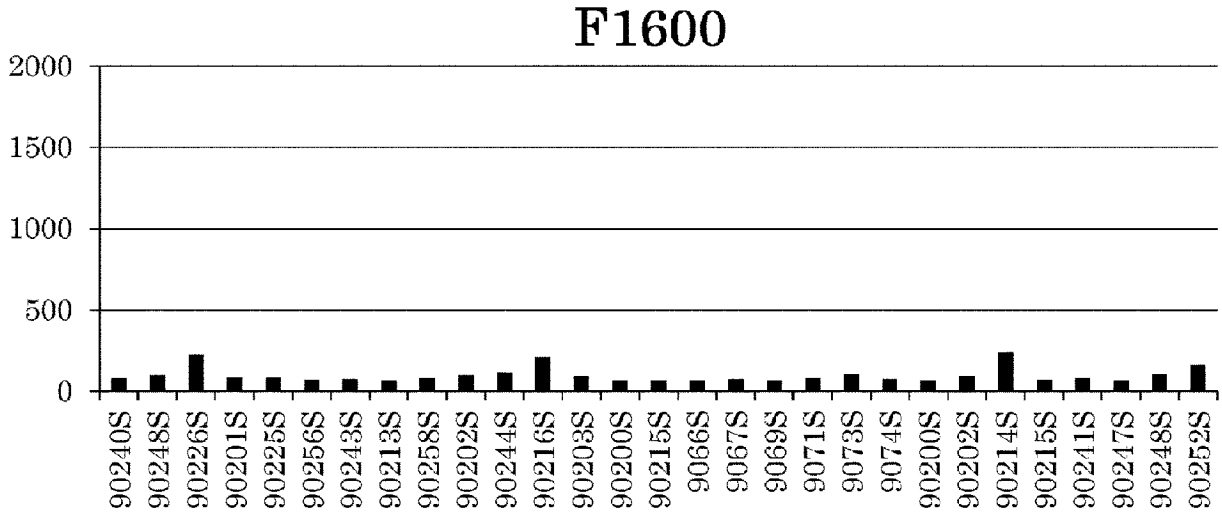
F1600
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 56

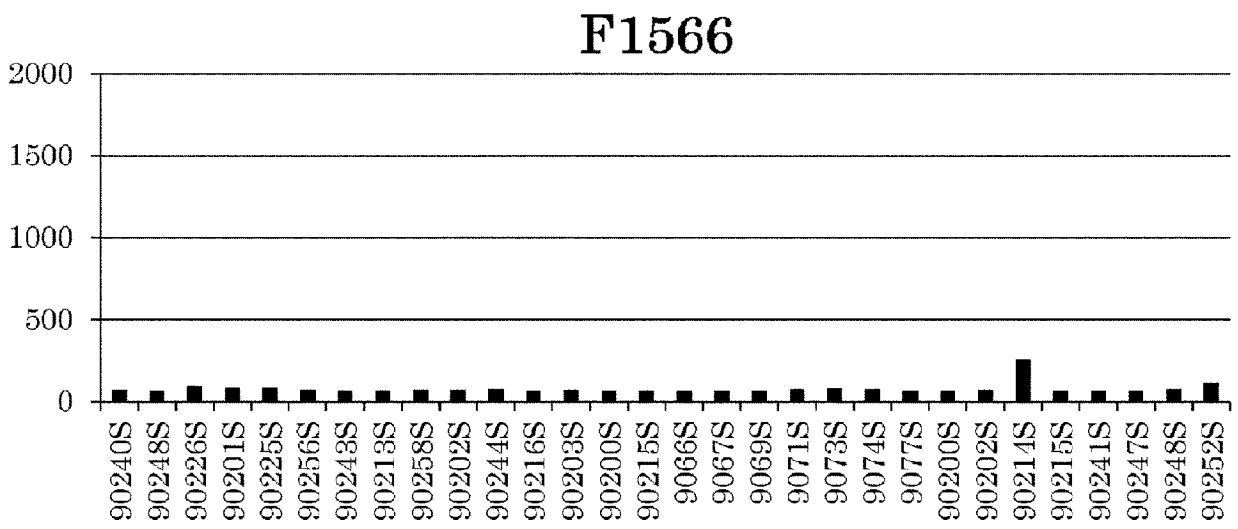
F1566
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 57

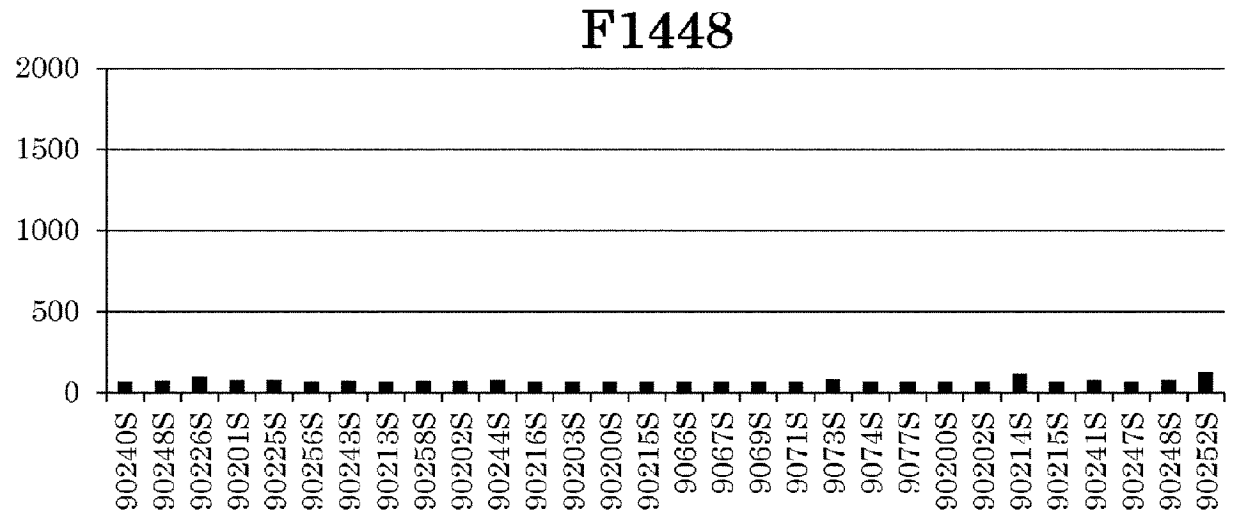
F1448
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 58

F1601
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 59

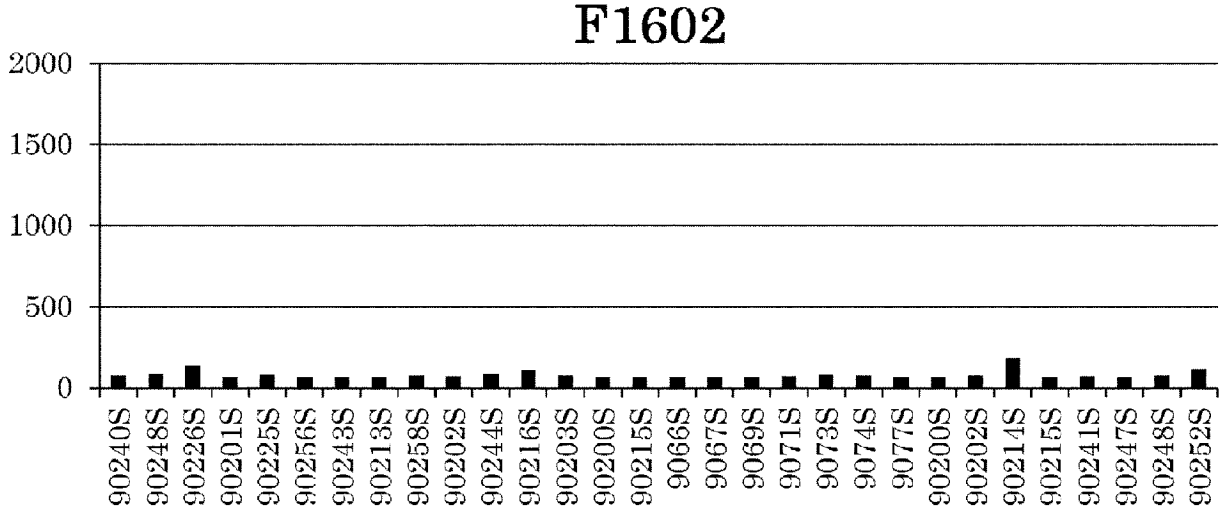
F1602
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
9077S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 60

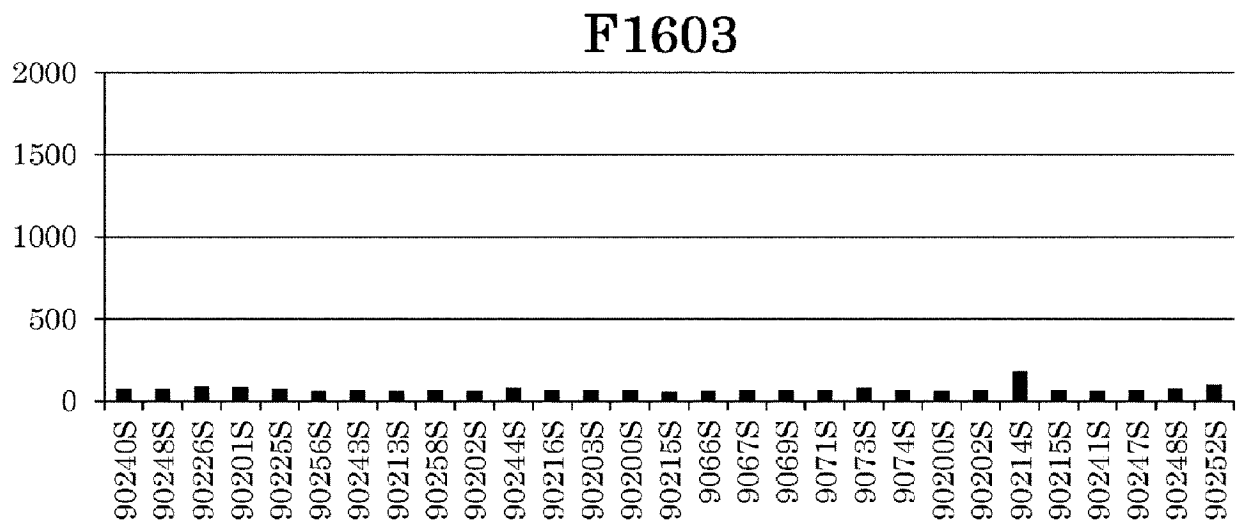
F1603
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 61

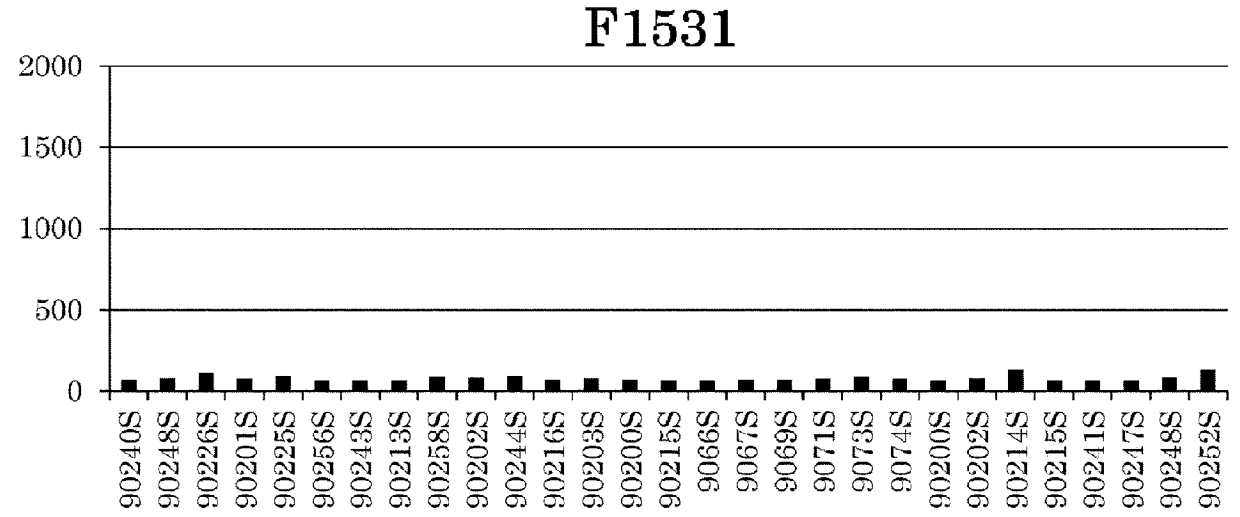
F1531
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 62

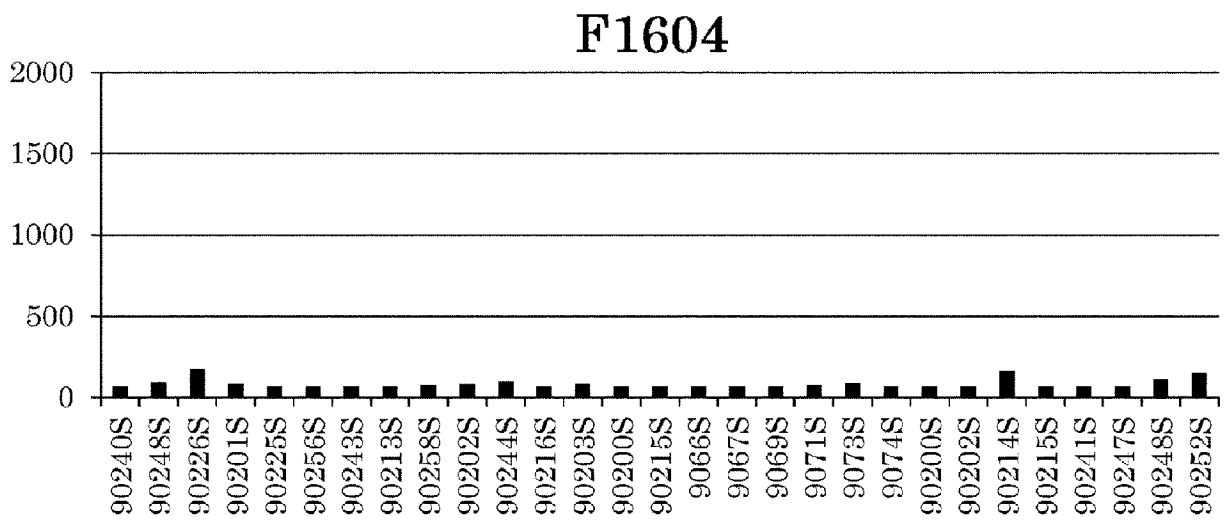
F1604
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 63

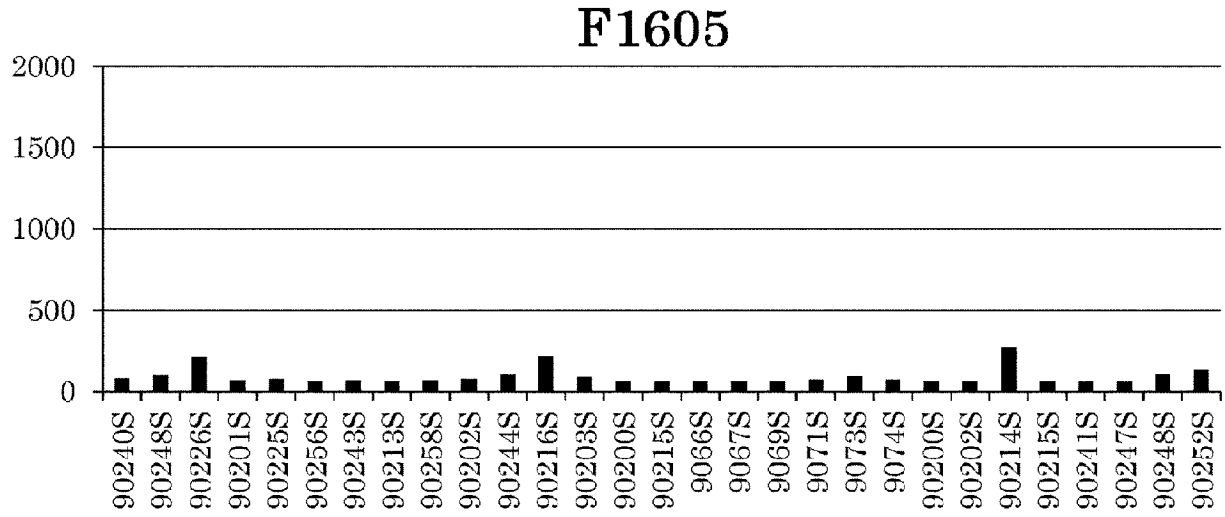
F1605
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 64

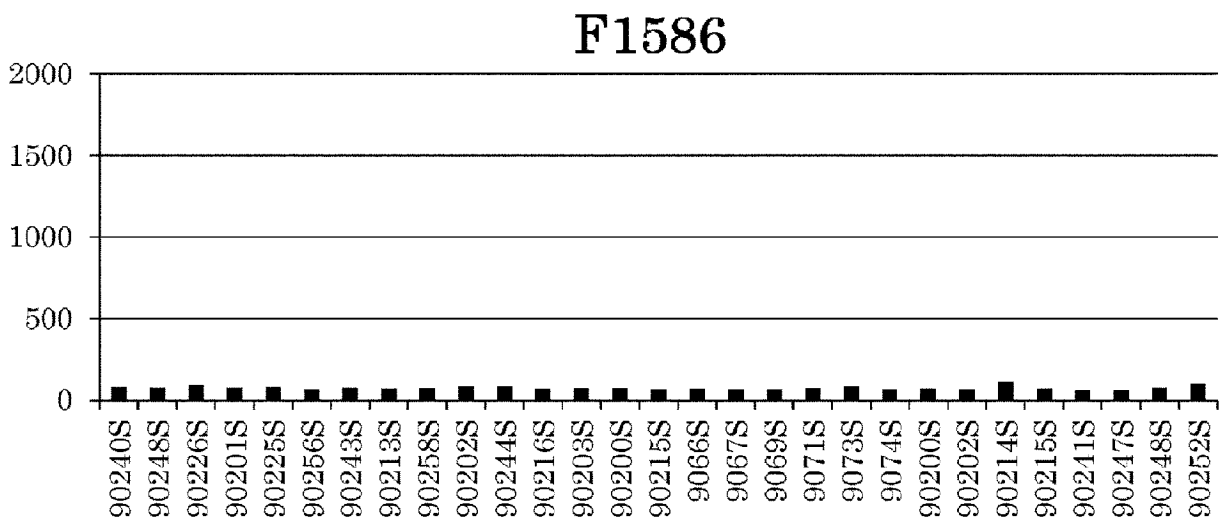
F1586
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90211S
90247S
90248S
90252S

图 65

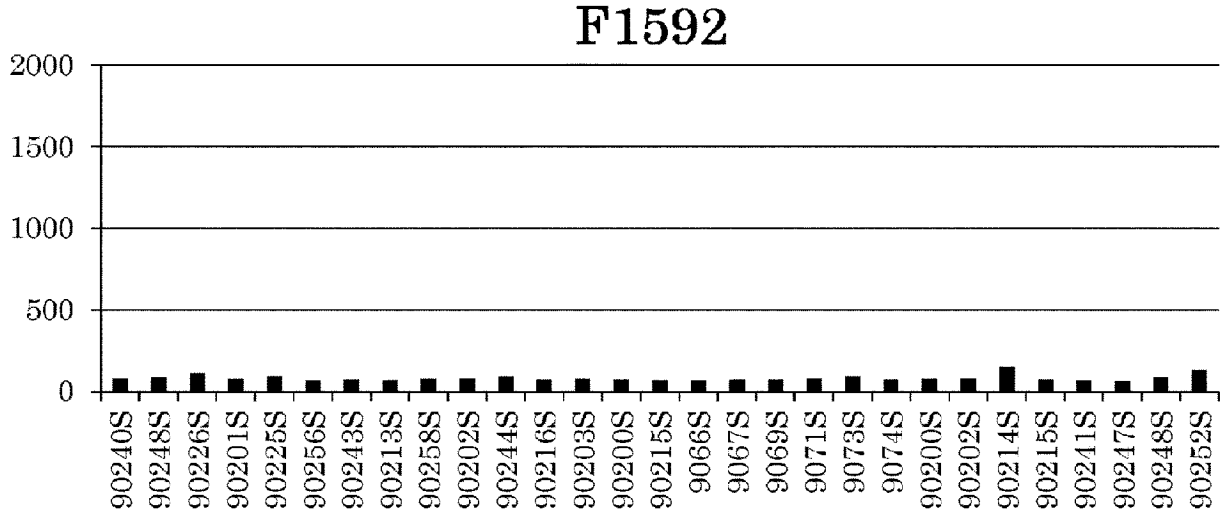
F1592
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90211S
90247S
90248S
90252S

图 66

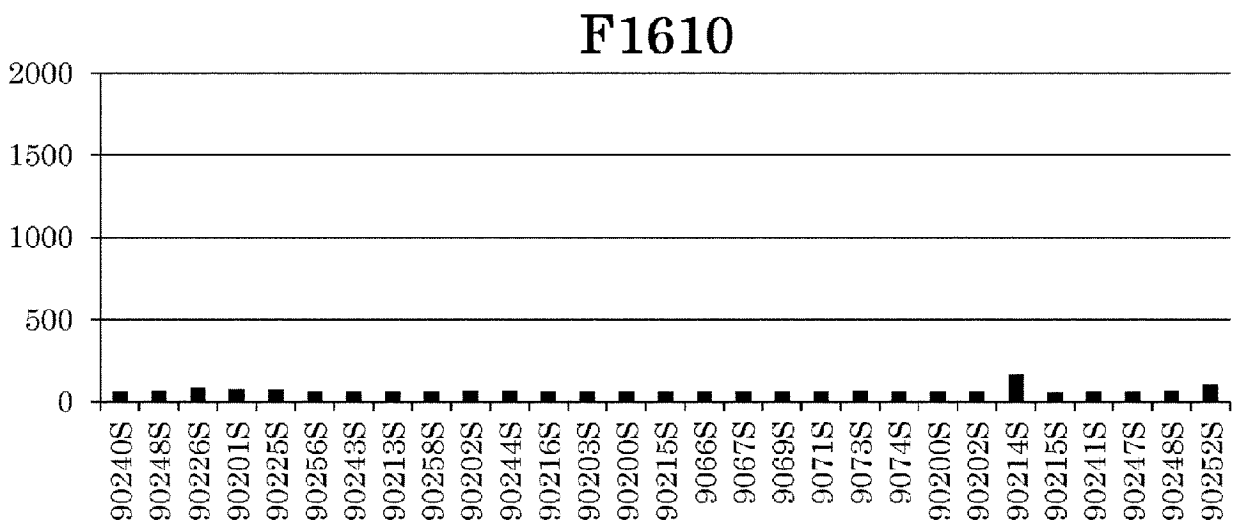
F1610
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 67

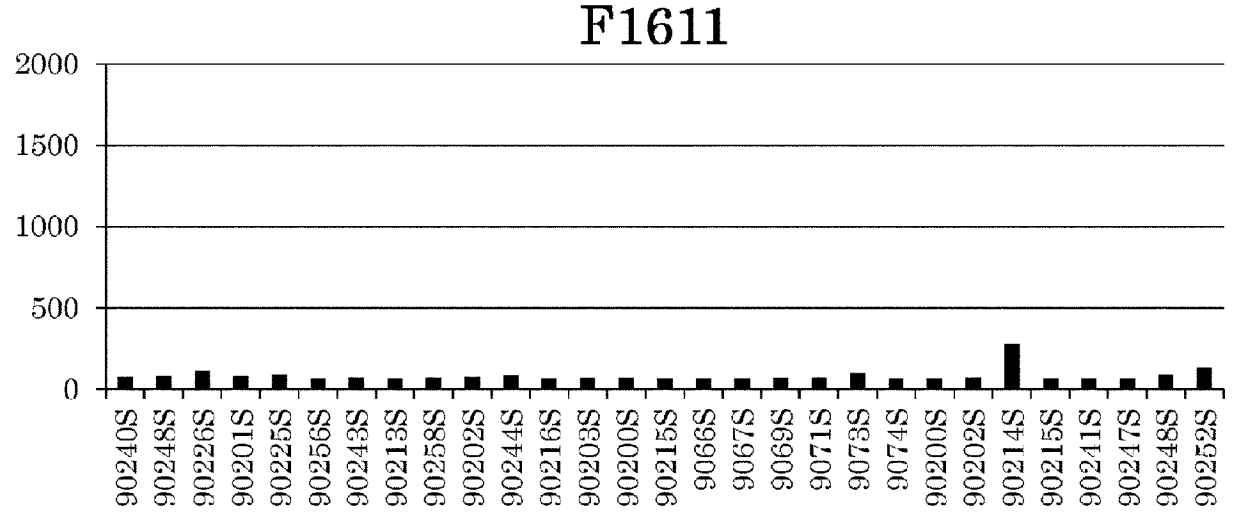
F1611
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 68

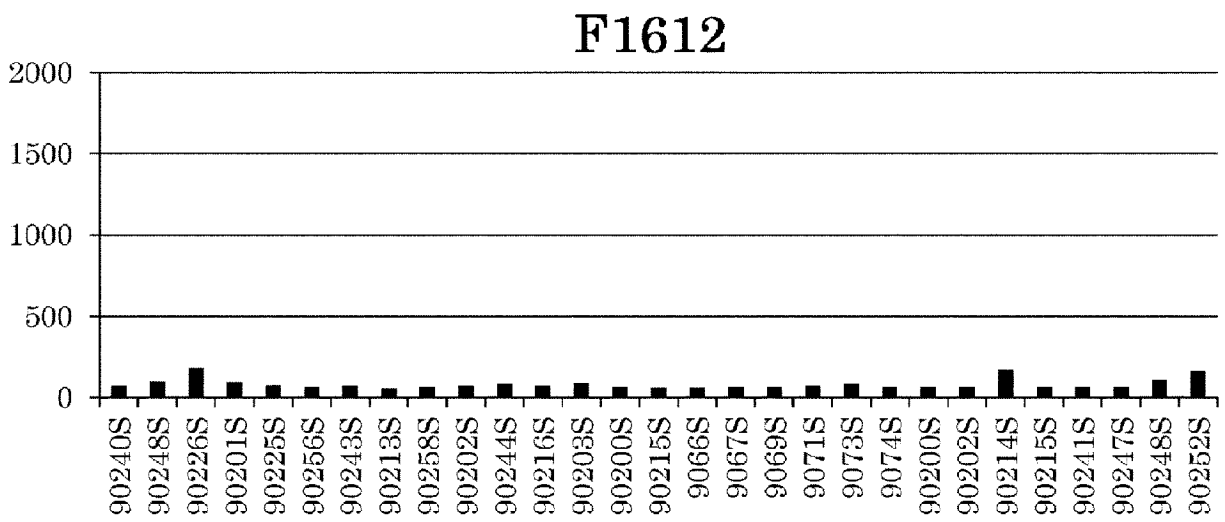
F1612
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 69

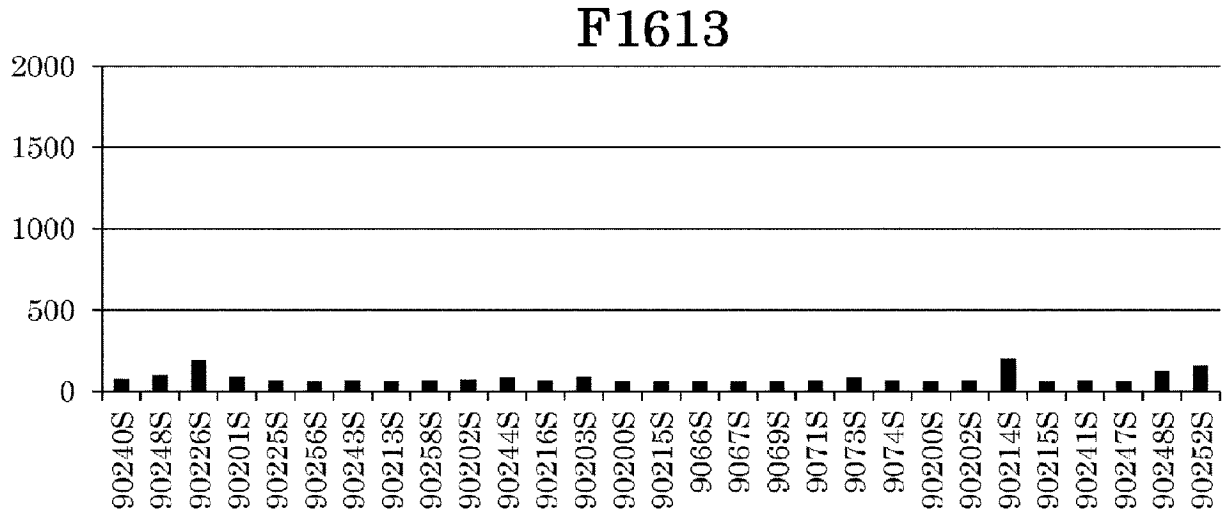
F1613
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 70

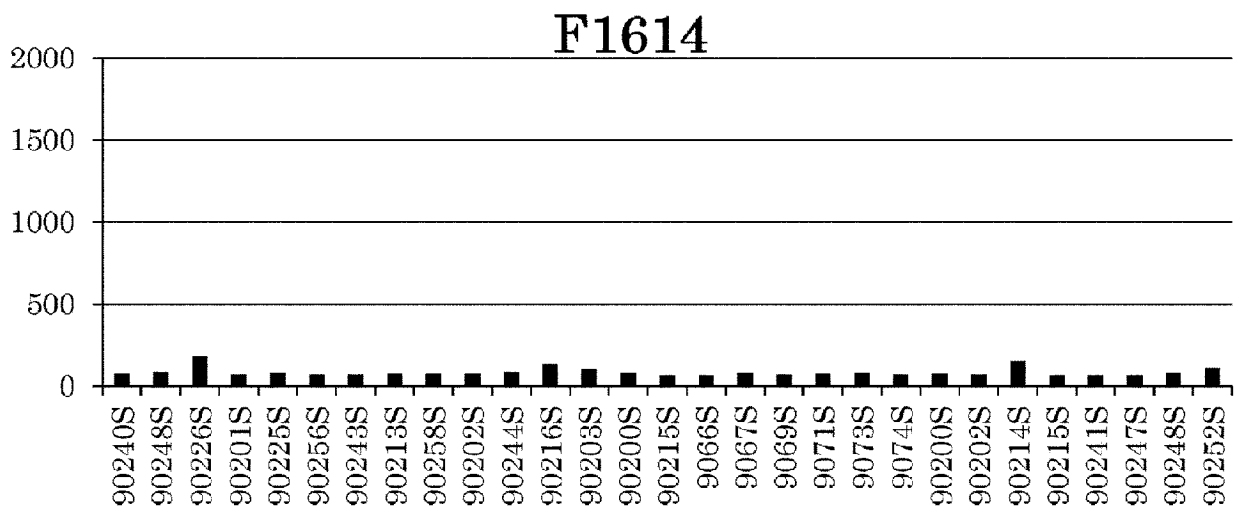
F1614
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 71

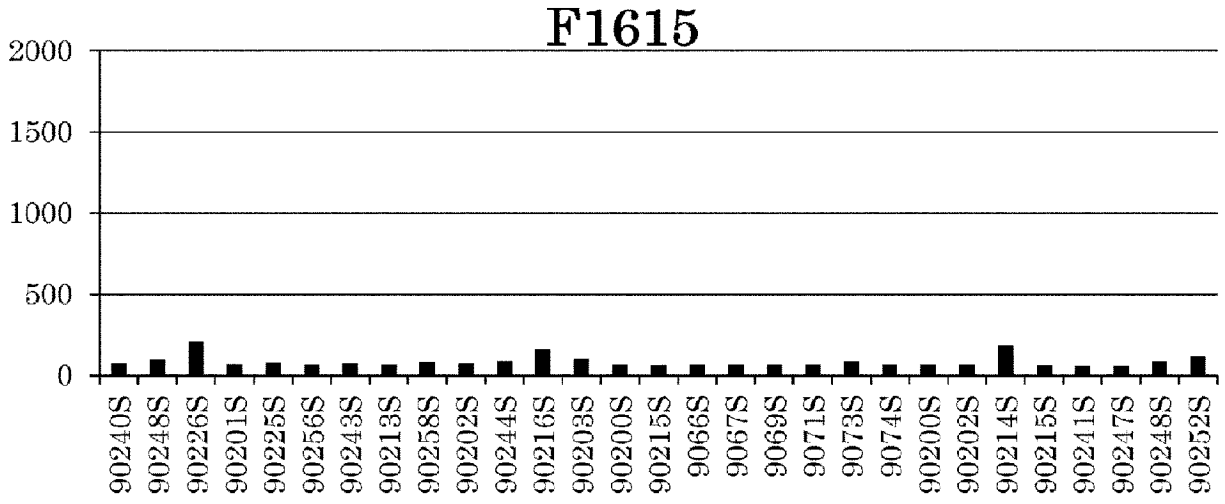
F1615
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 72

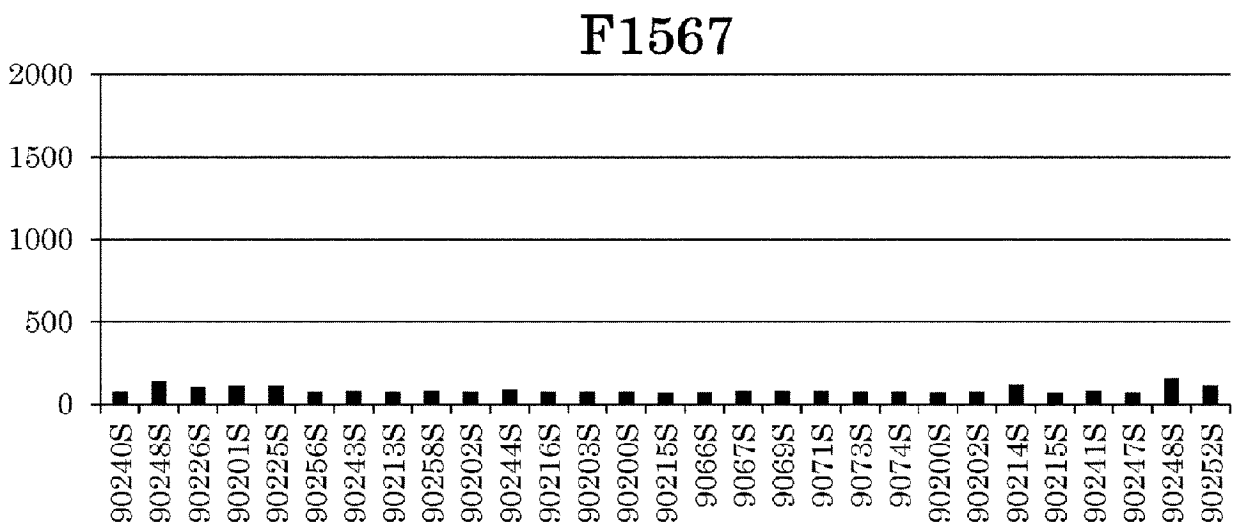
F1567
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 73

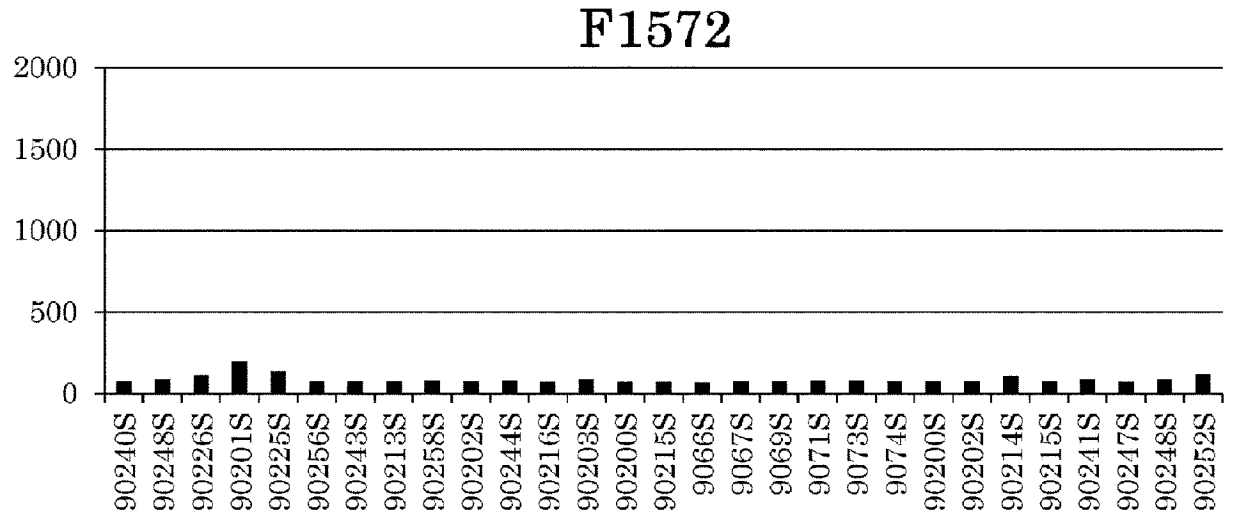
F1572
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 74

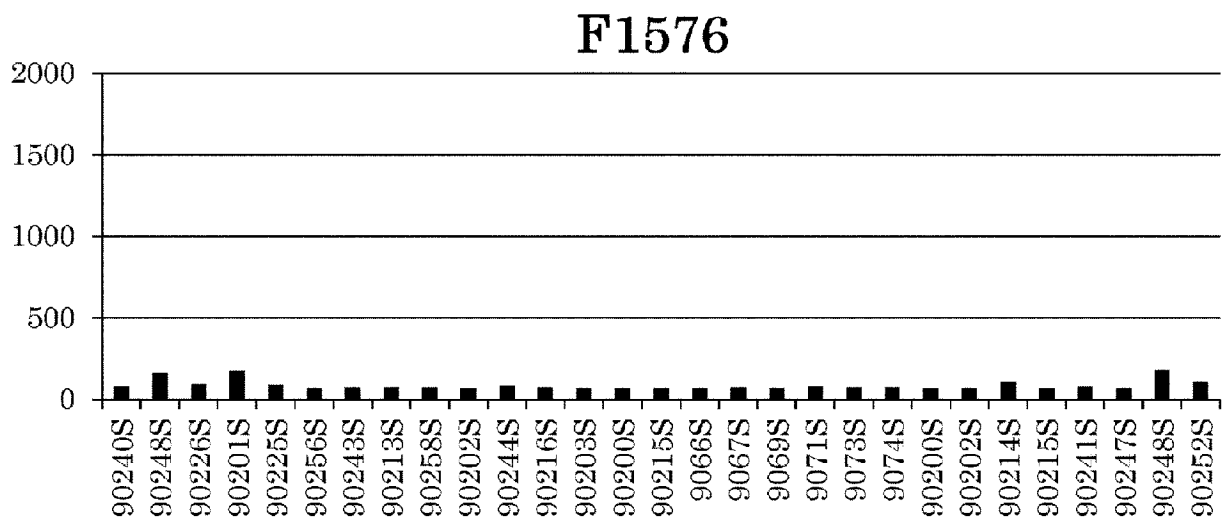
F1576
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 75

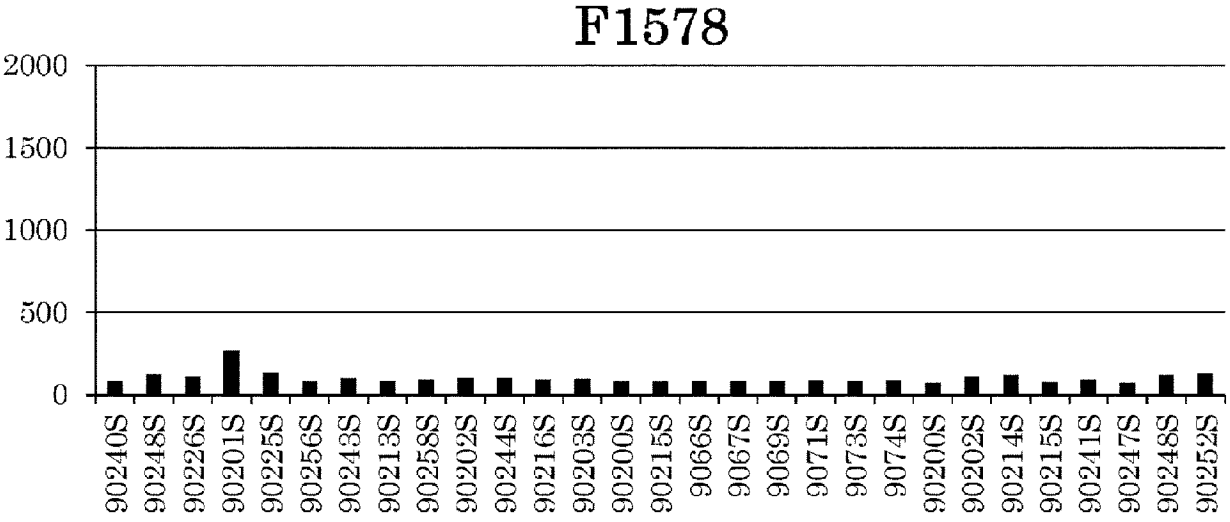
F1578
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 76

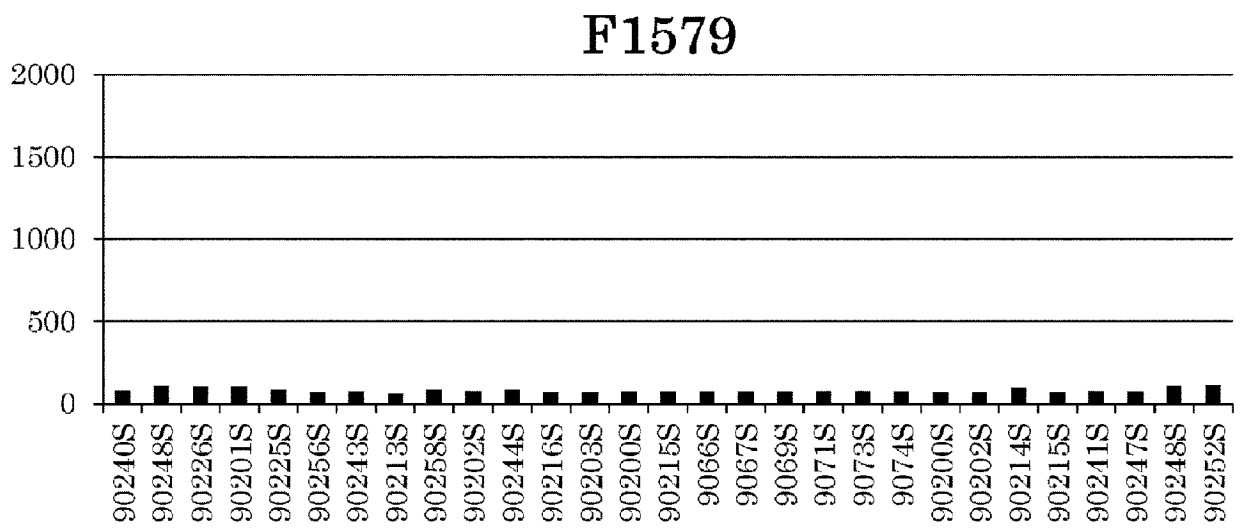
F1579
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 77

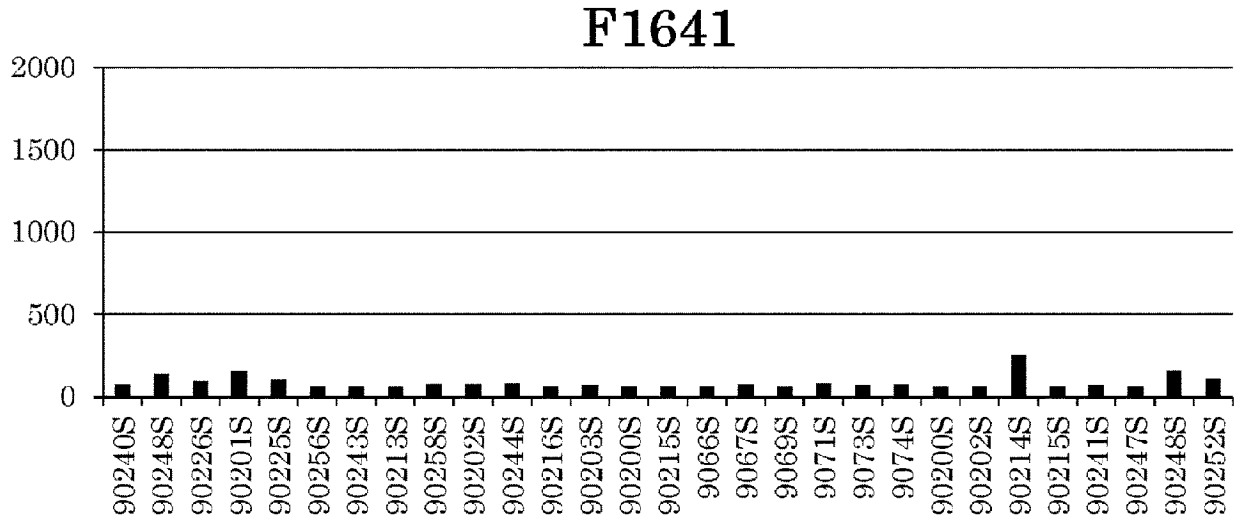
F1641
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 78

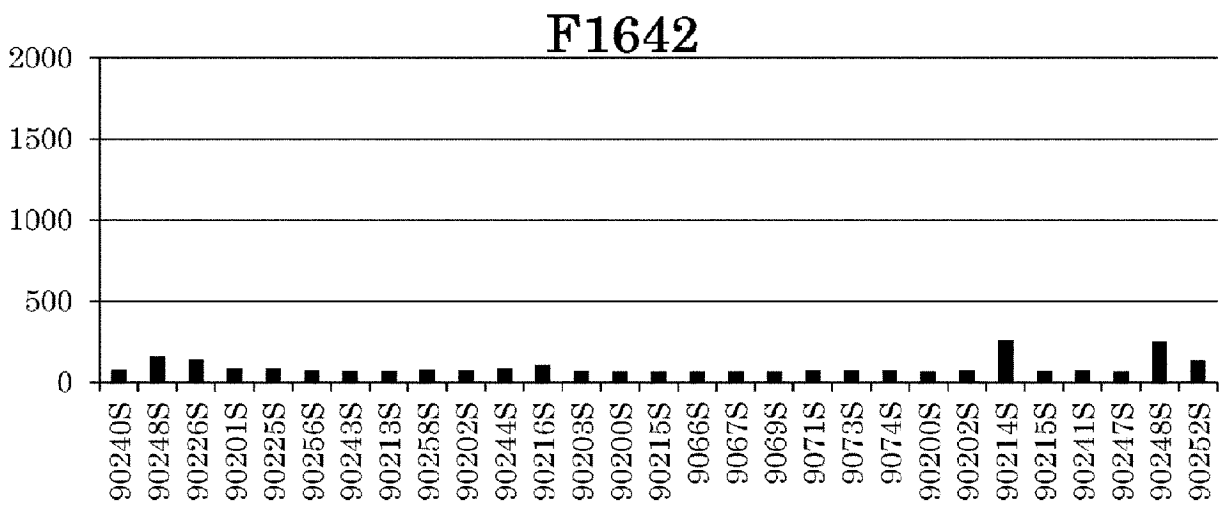
F1642
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 79

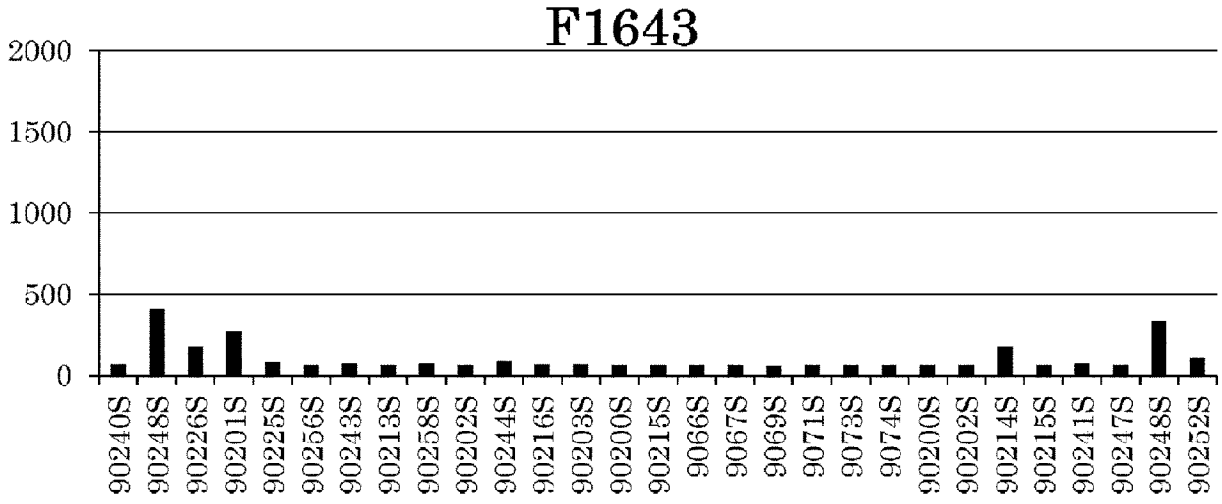
F1643
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 80

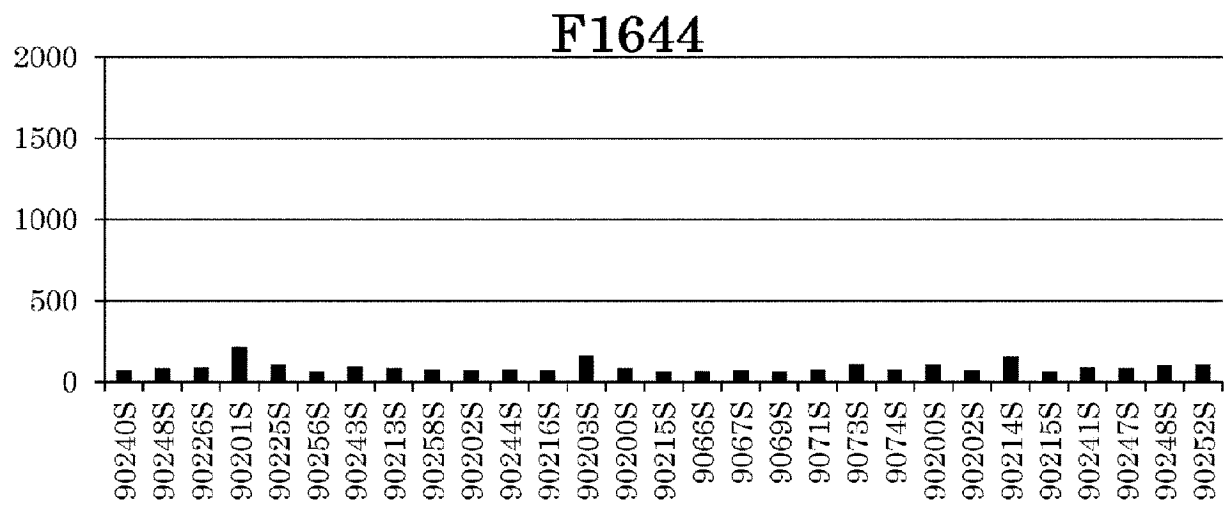
F1644
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 81

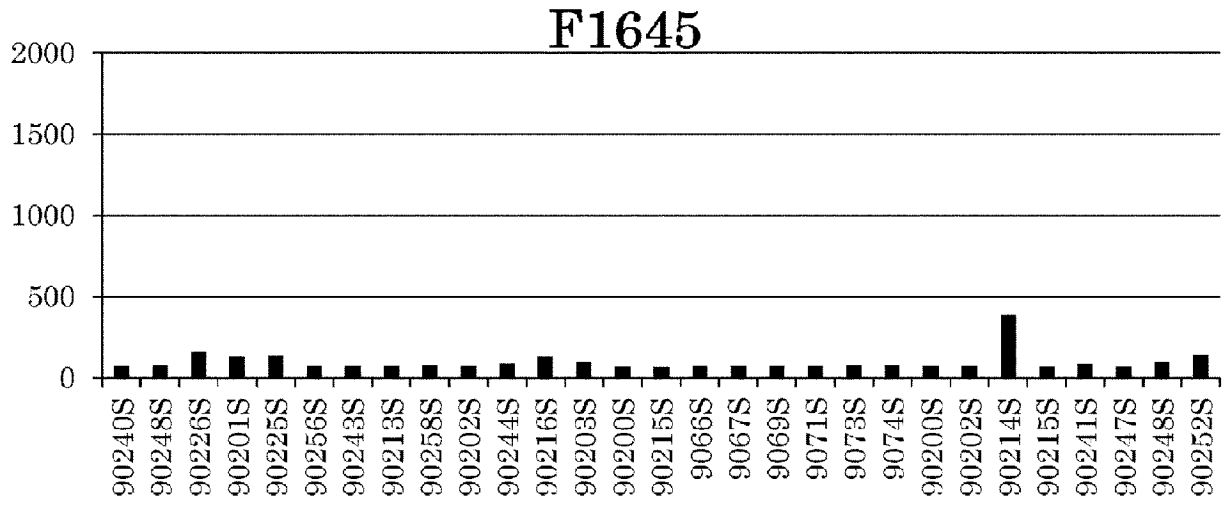
F1645
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 82

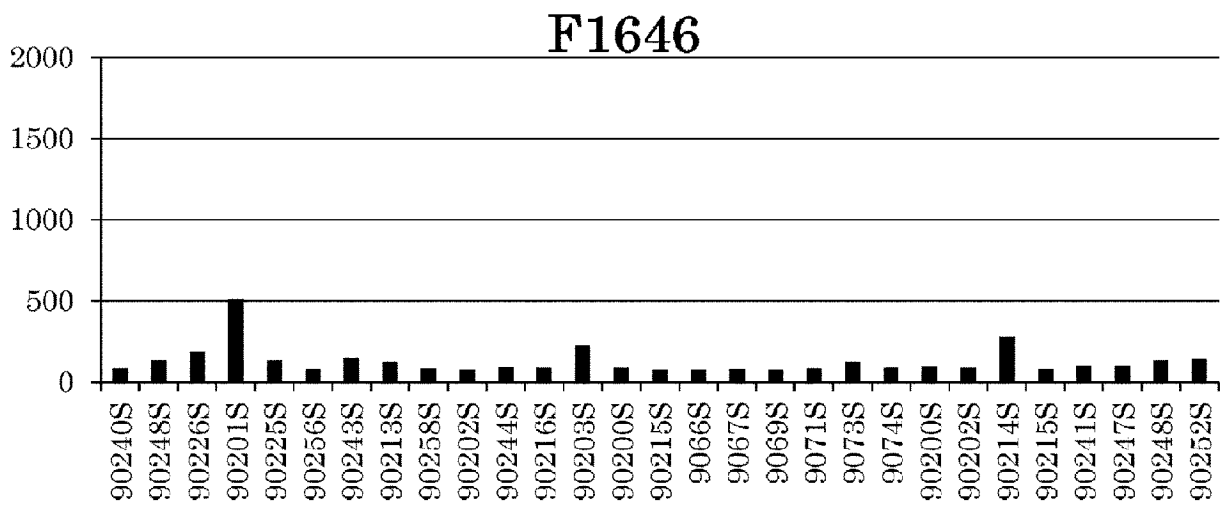
F1646
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 83

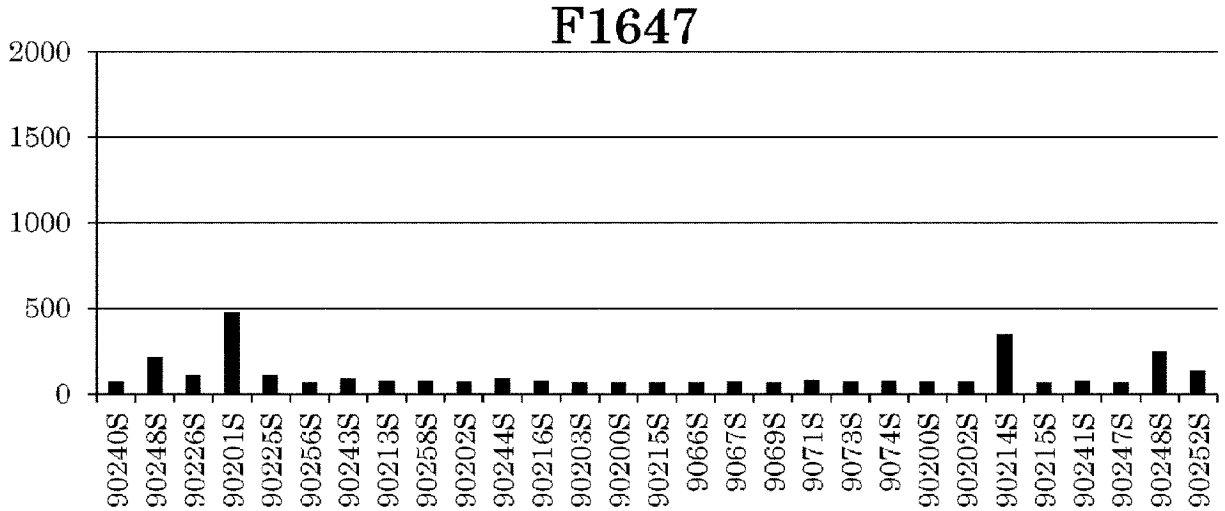
F1647
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 84

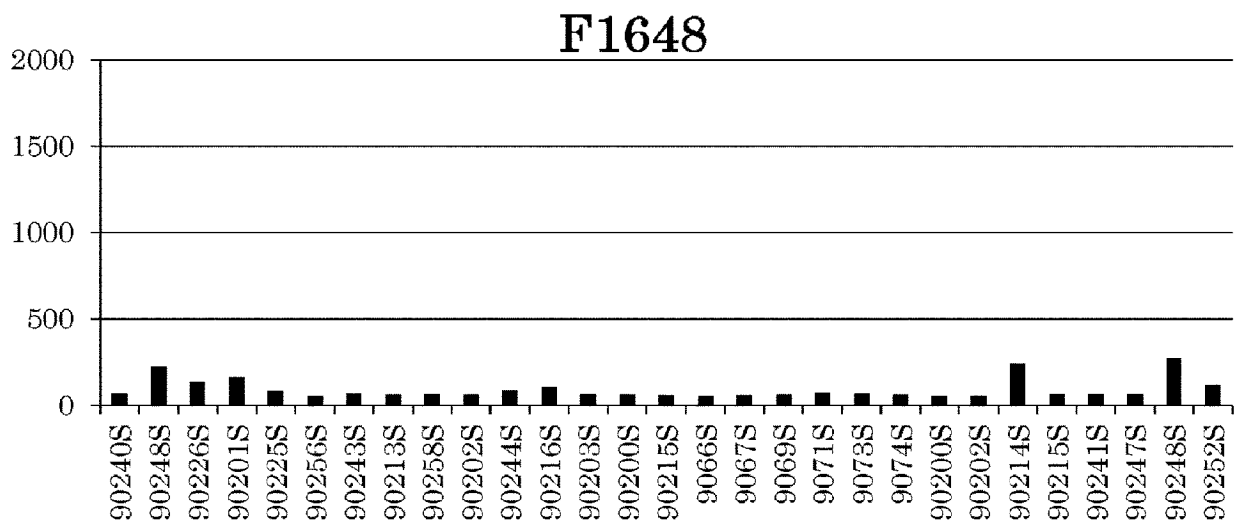
F1648
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 85

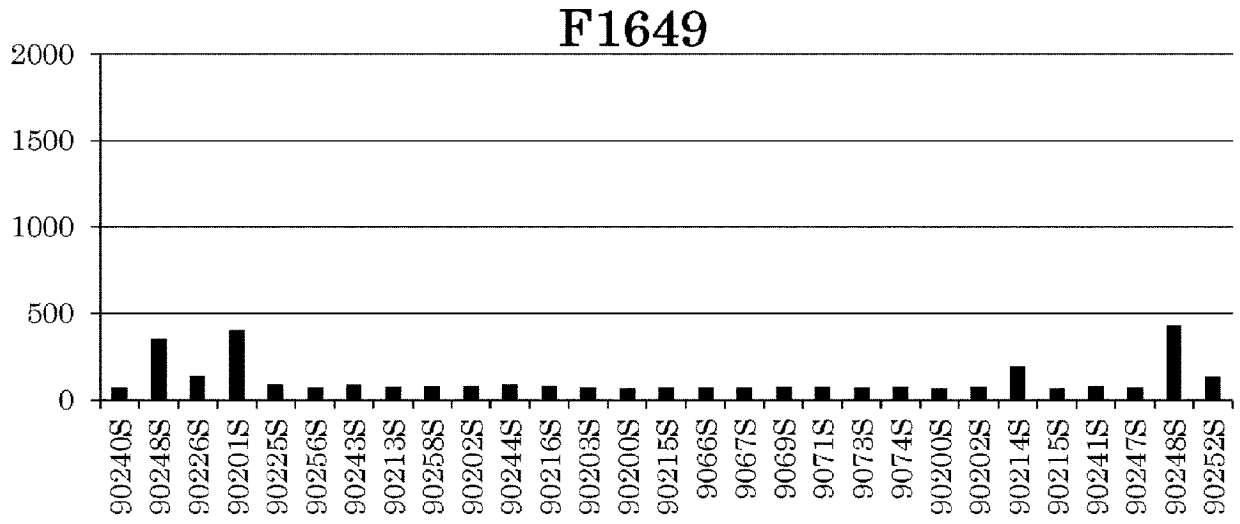
F1649
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 86

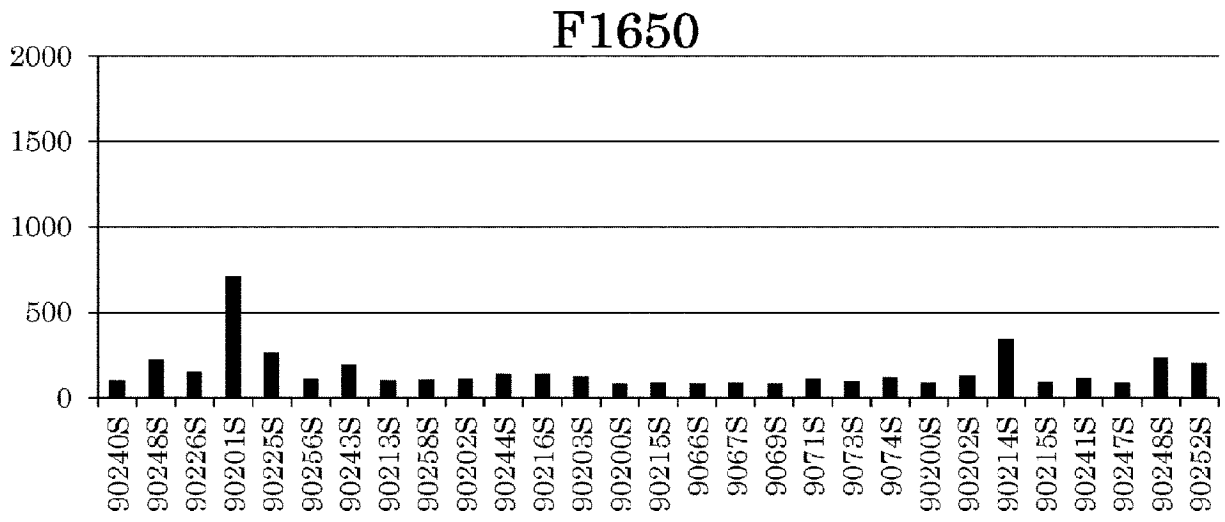
F1650
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 87

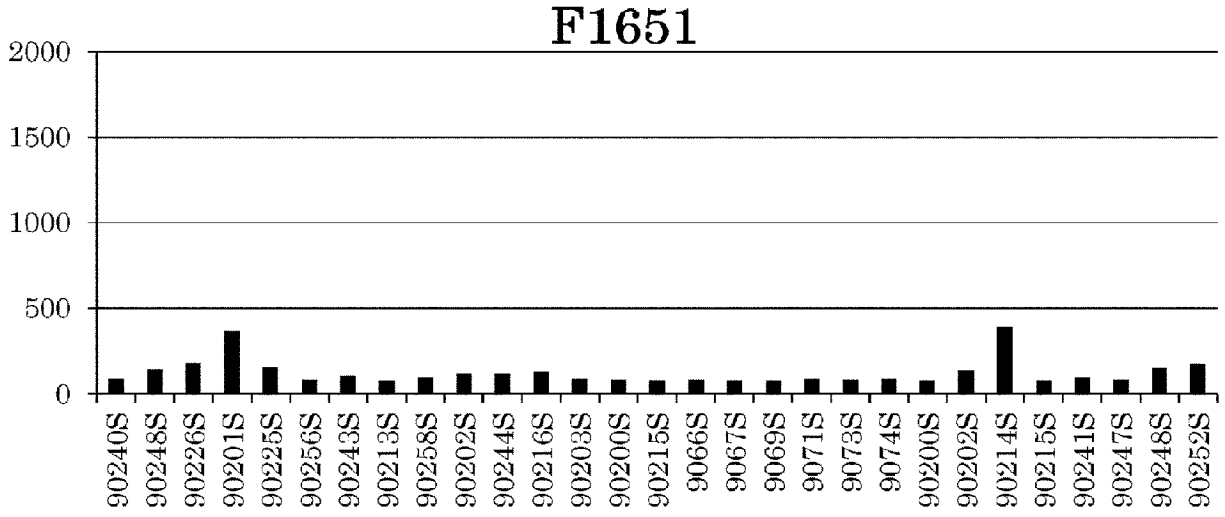
F1651
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 88

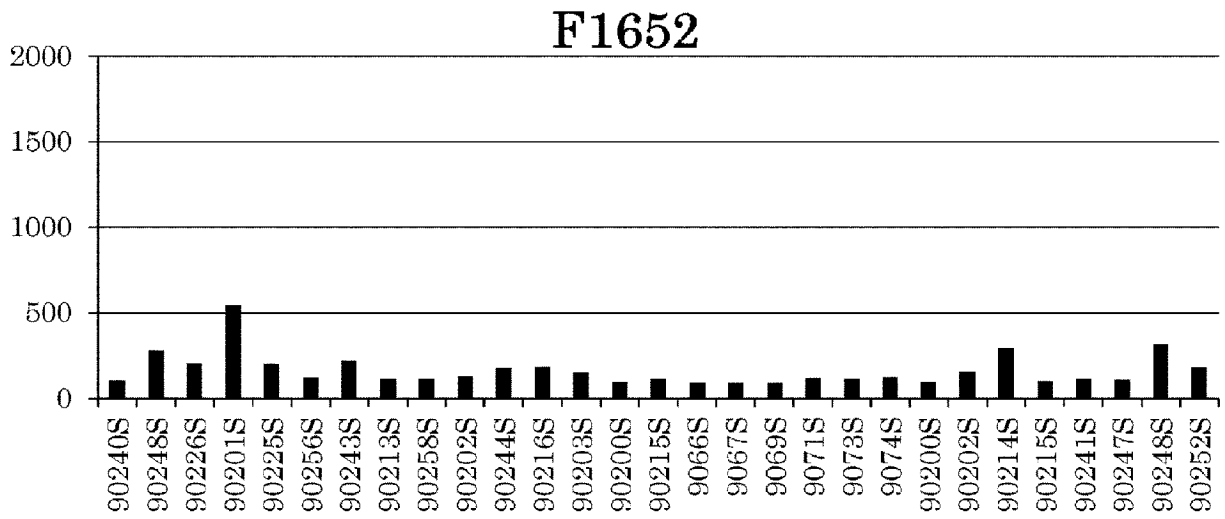
F1652
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 89

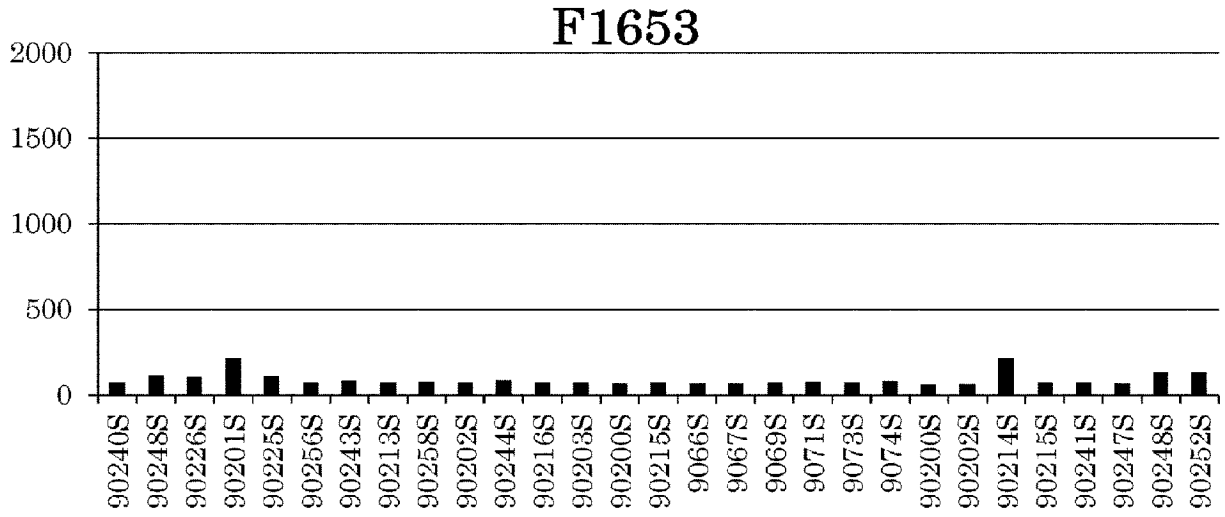
F1653
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 90

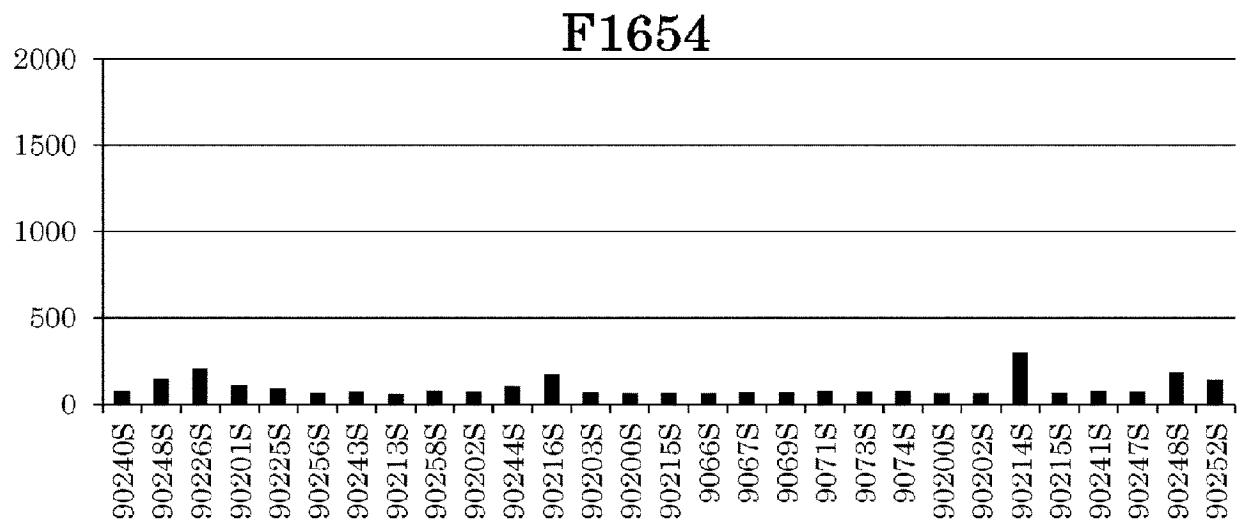
F1654
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 91

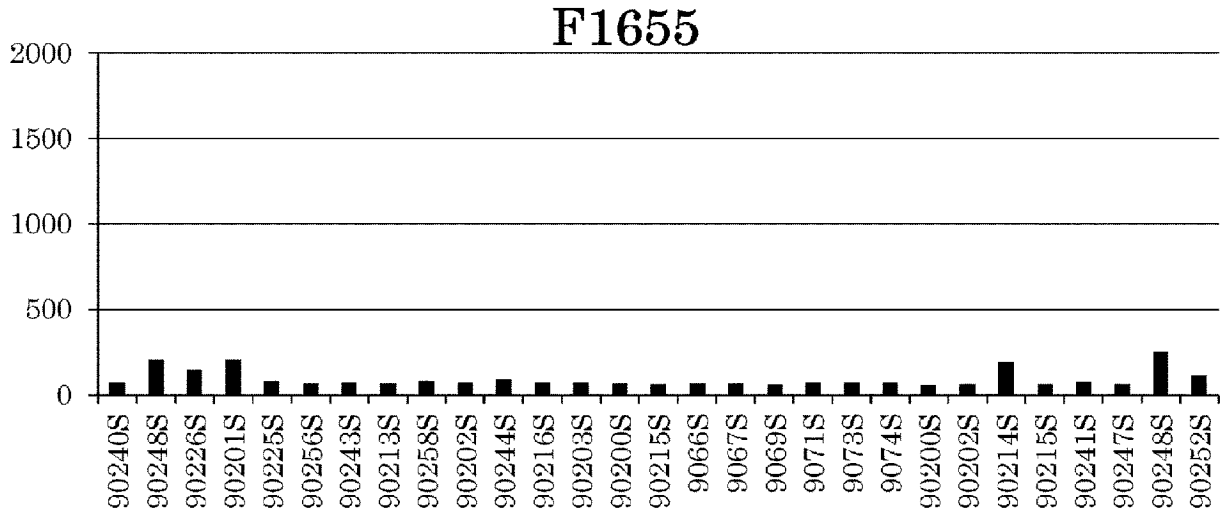
F1655
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 92

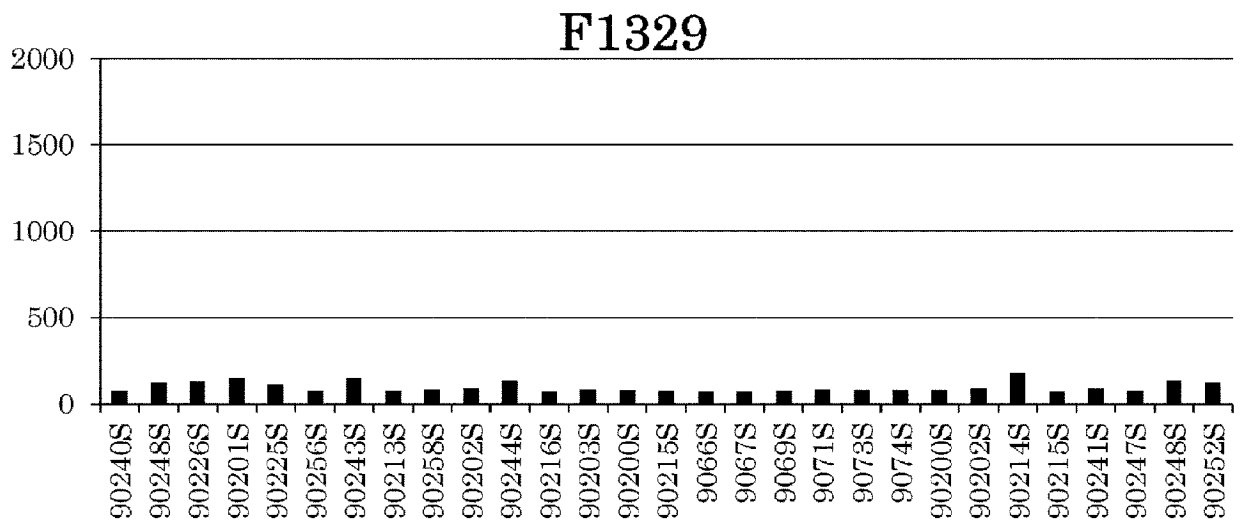
F1329
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 93

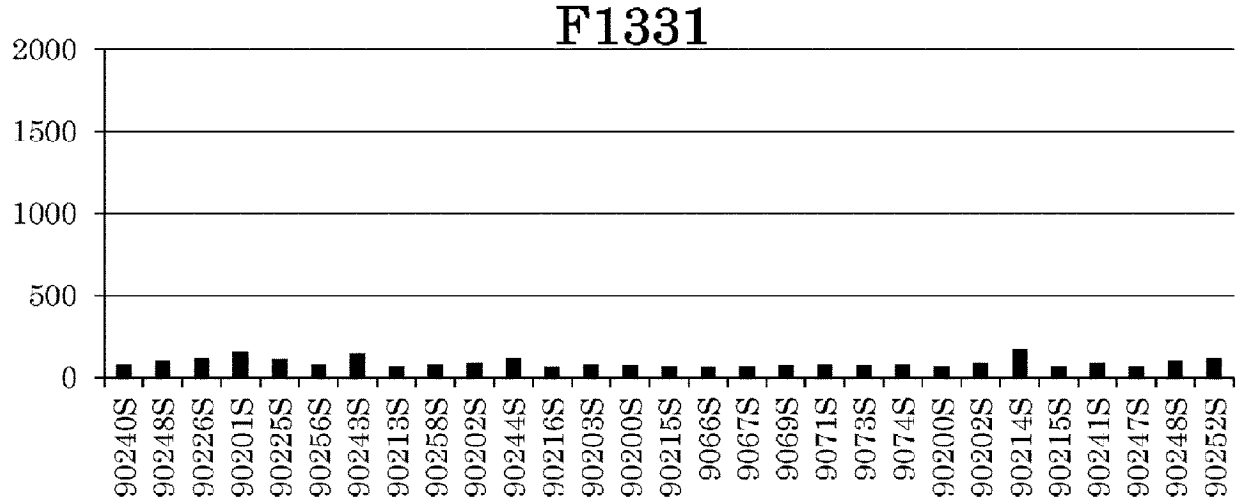
F1331
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 94

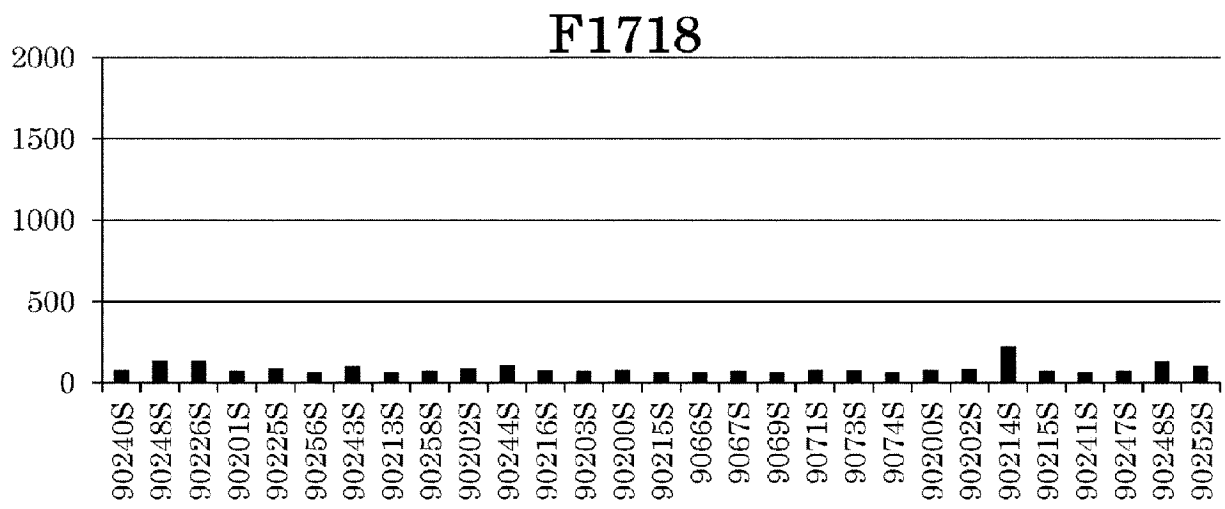
F1718
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 95

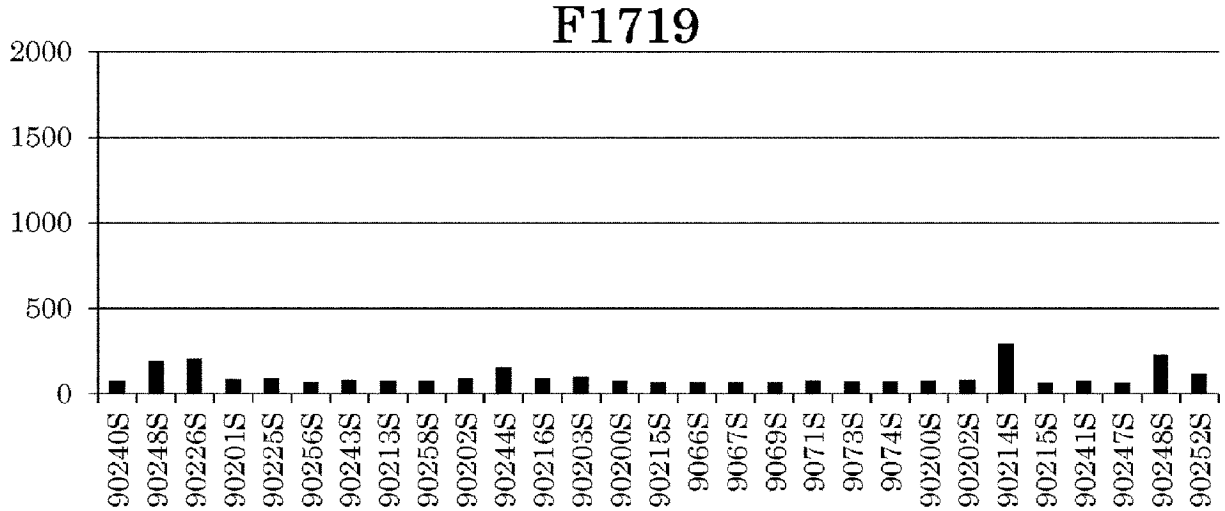
F1719
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 96

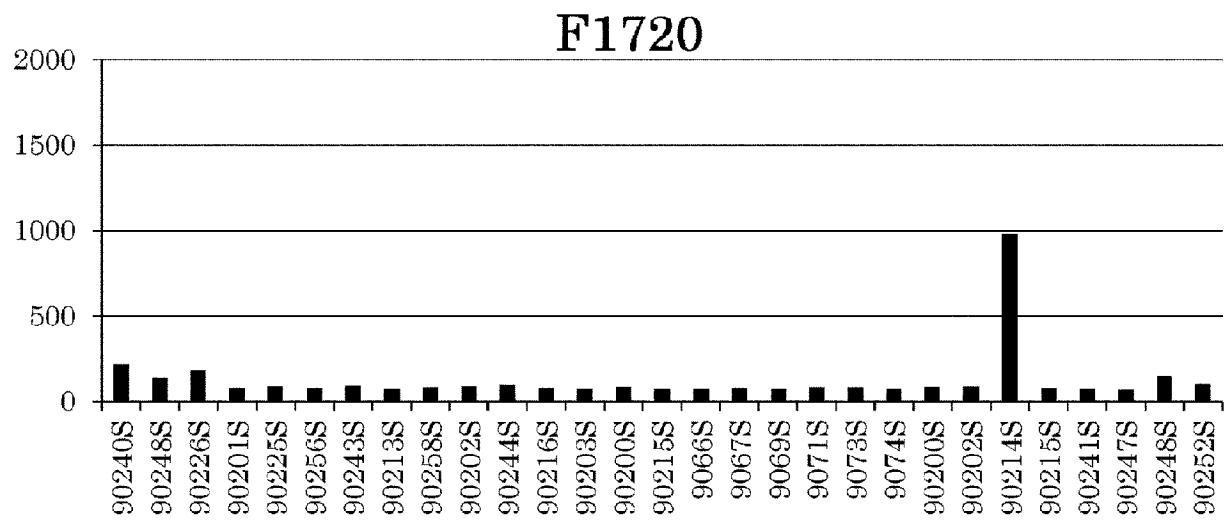
F1720
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 97

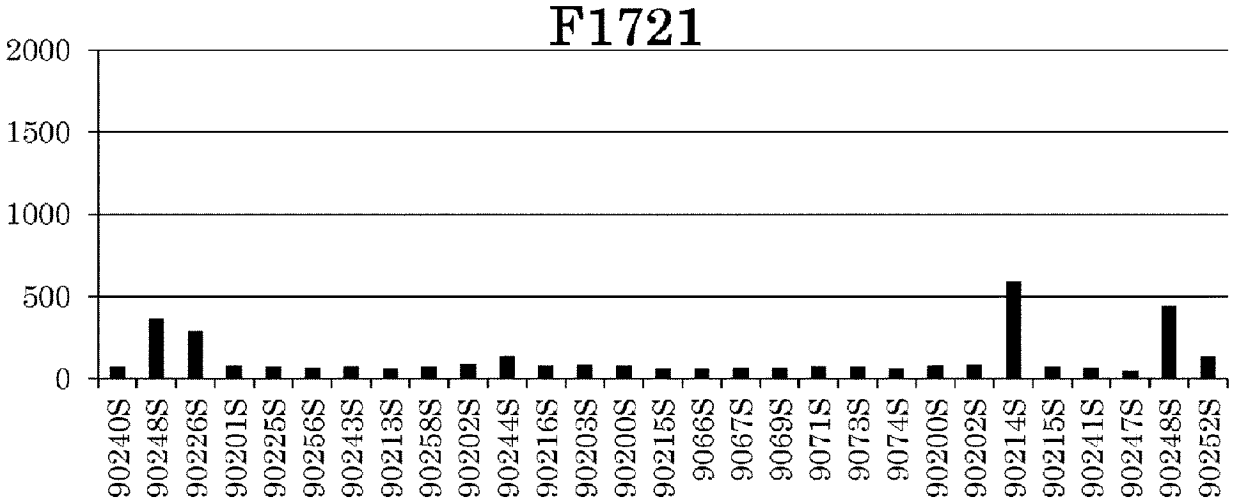
F1721
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 98

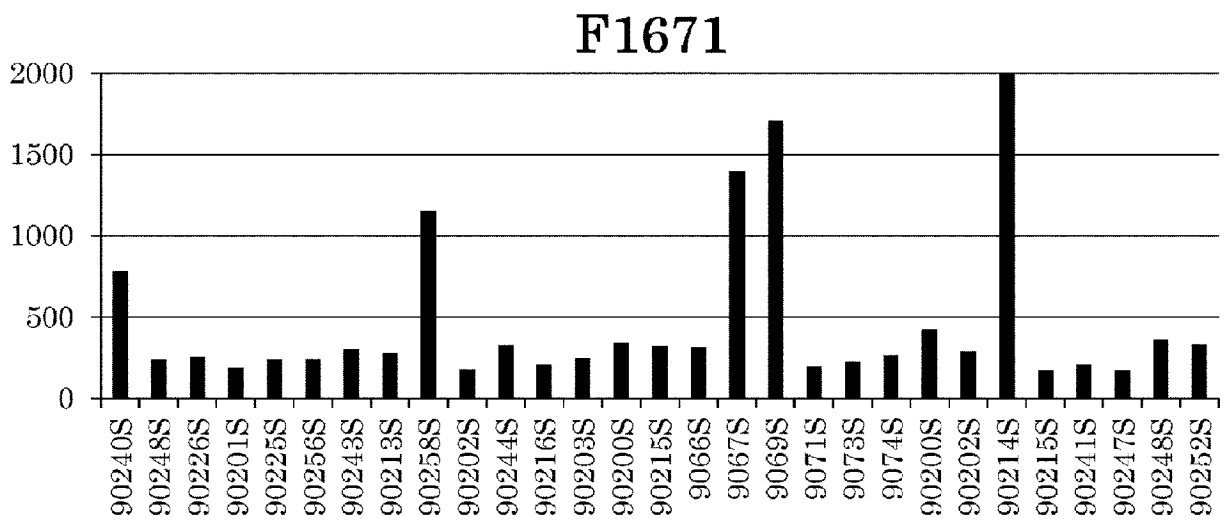
F1671
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 99

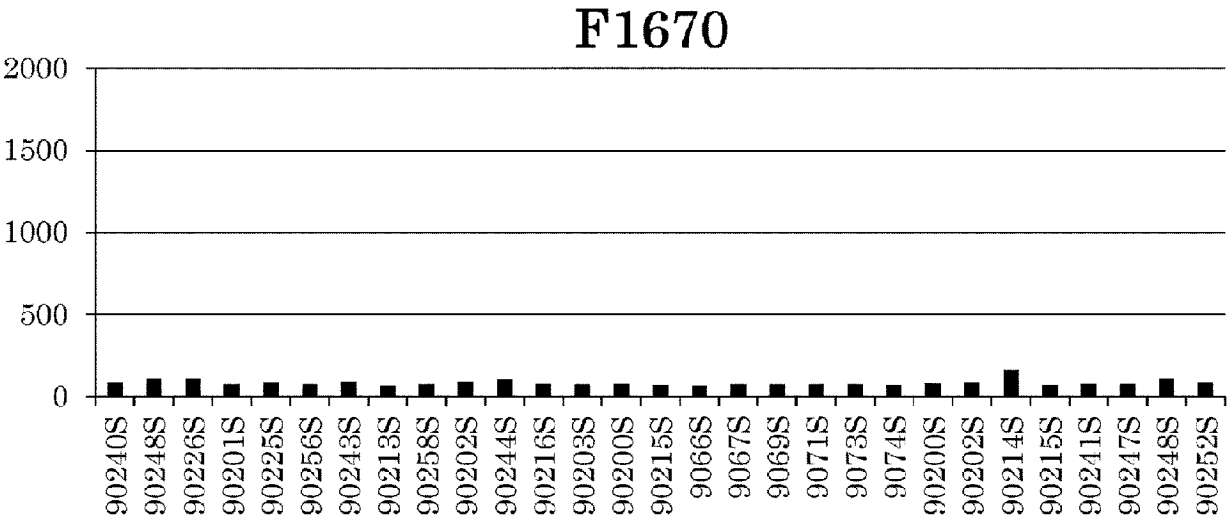
F1670
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 100

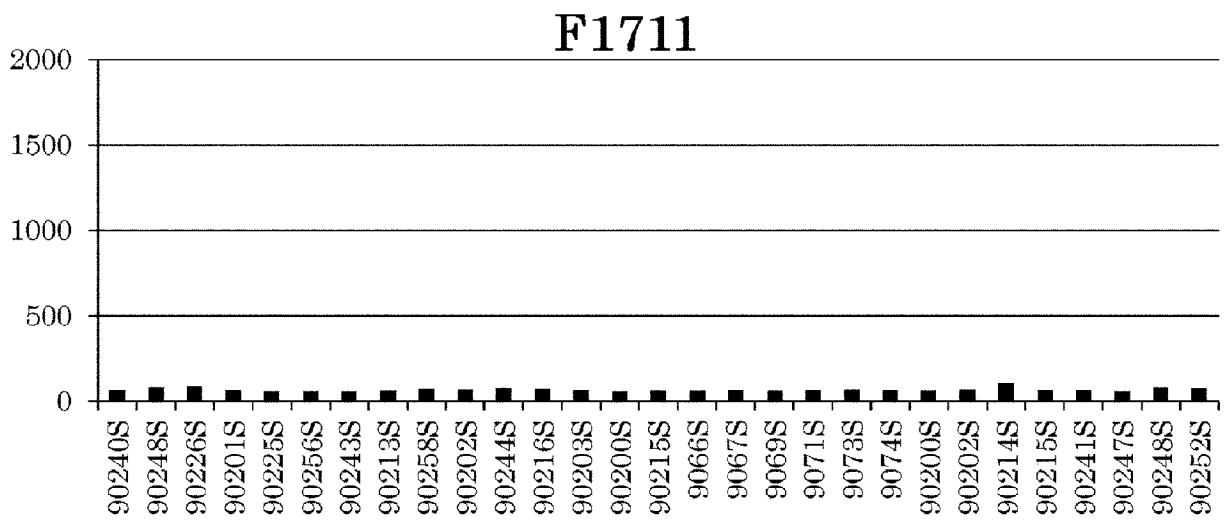
F1711
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 101

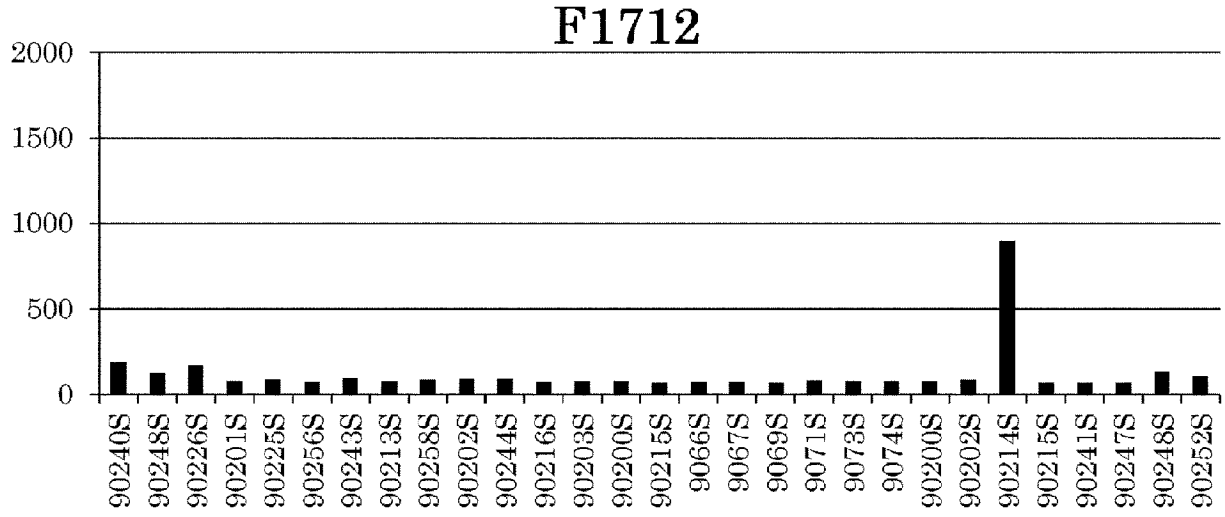
F1712
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 102

F1713
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 103

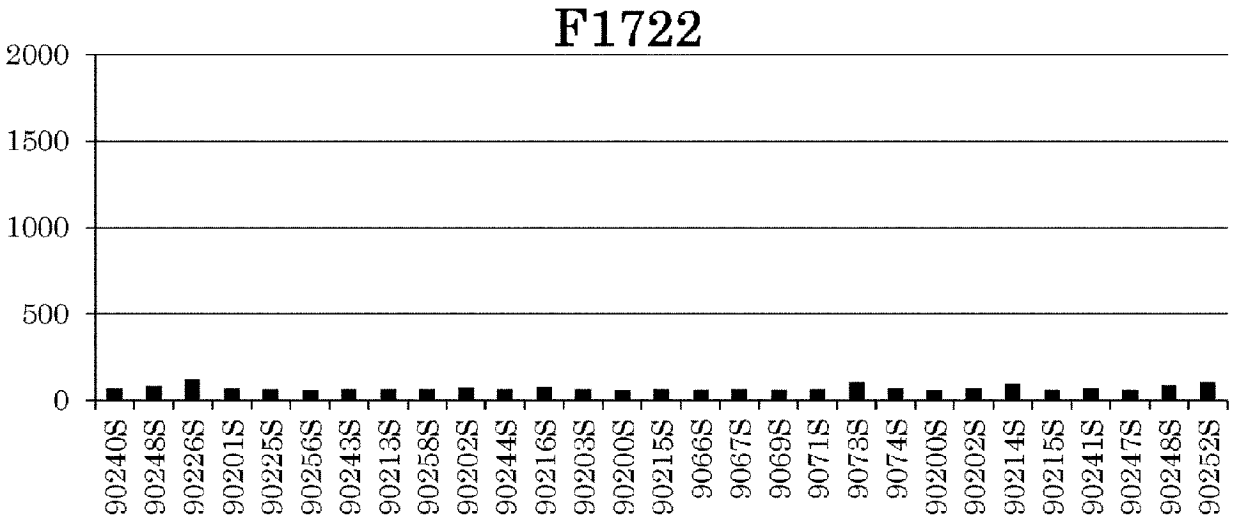
F1722
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 104

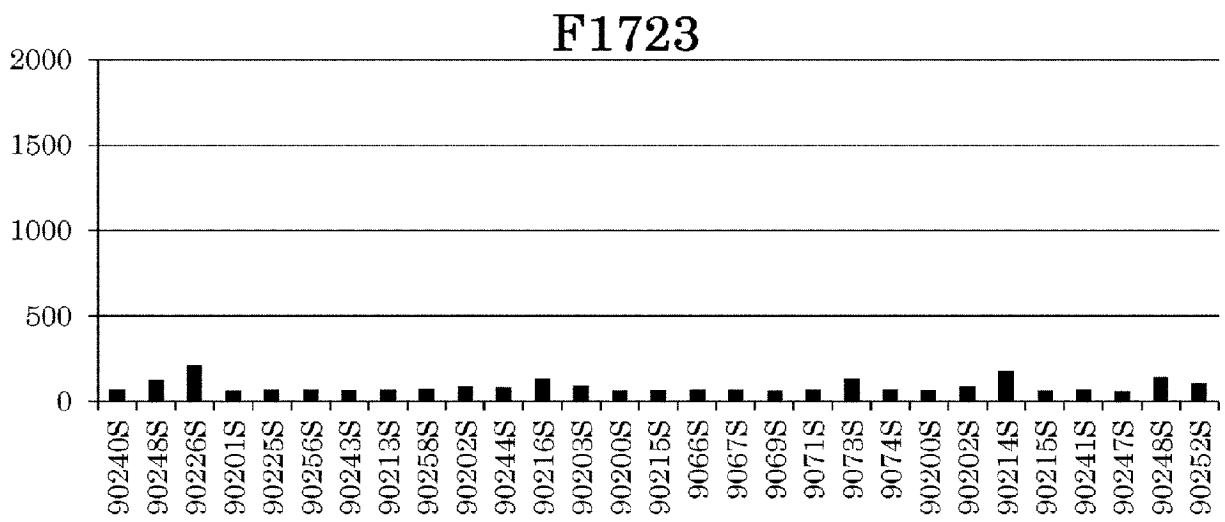
F1723
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 105

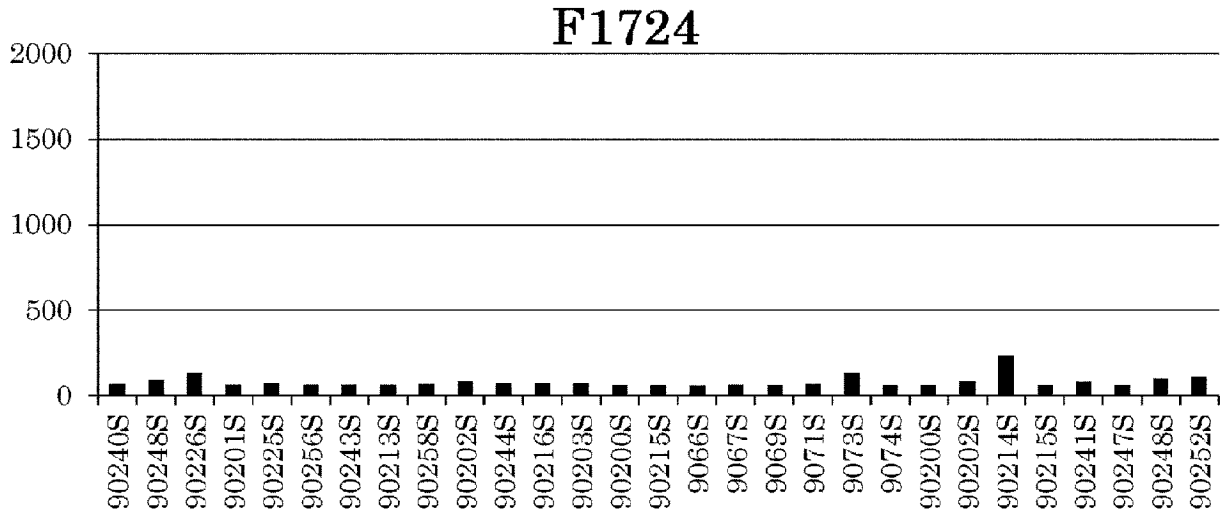
F1724
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 106

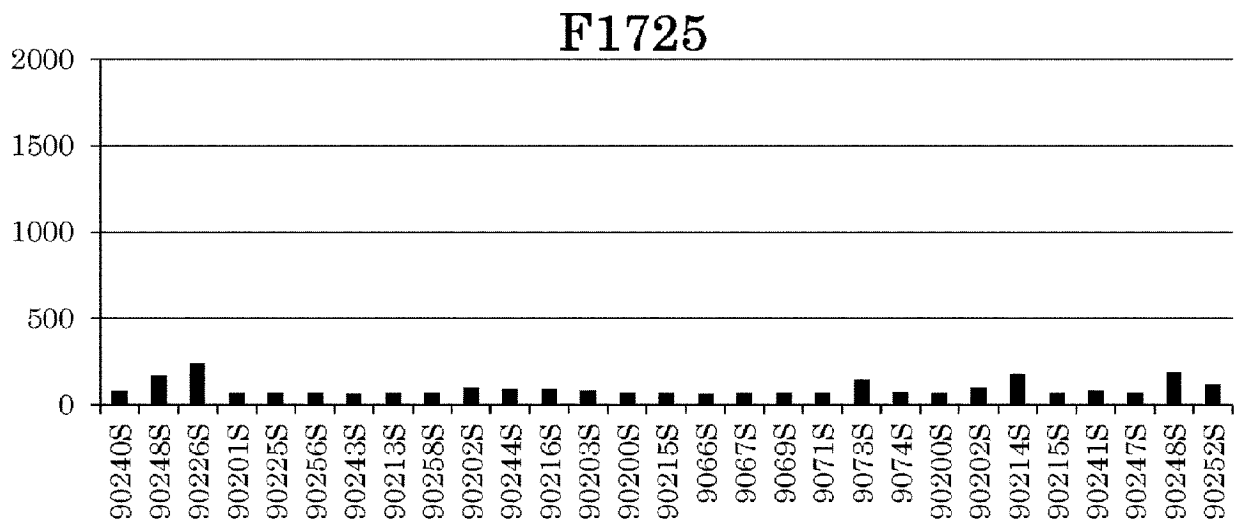
F1725
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 107

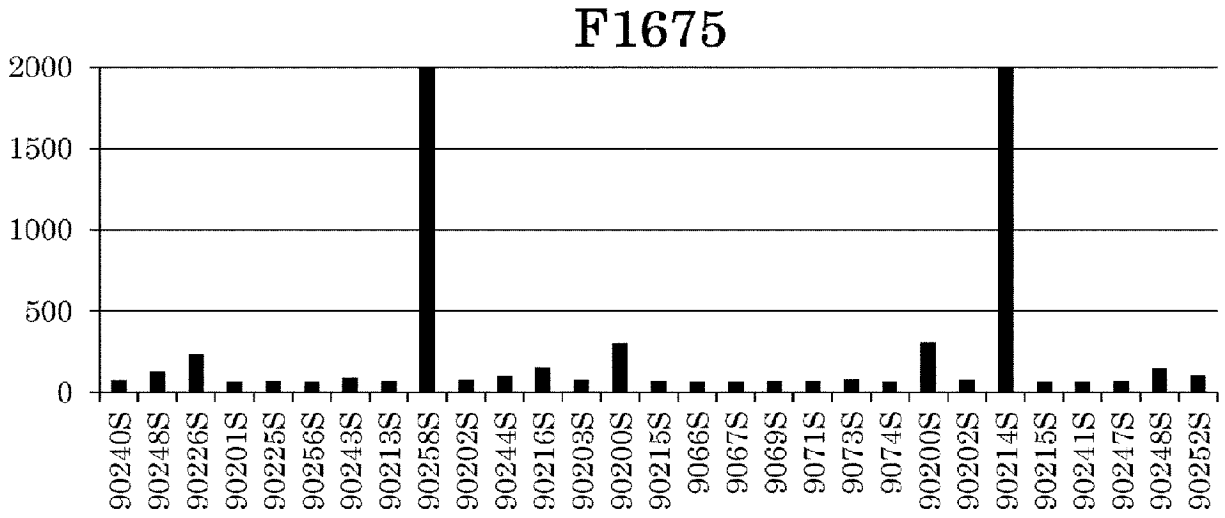
F1675
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 108

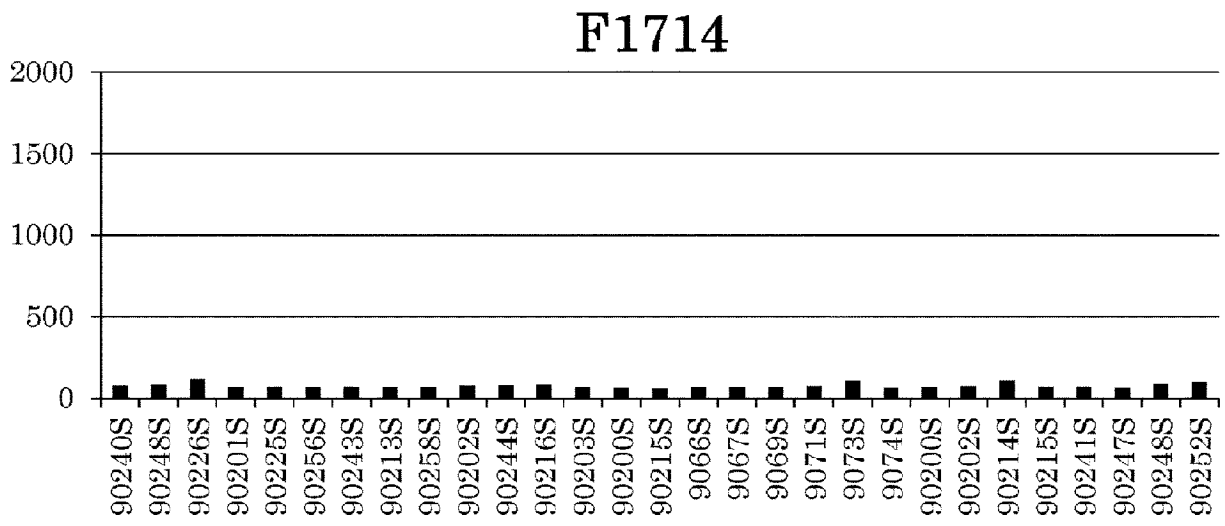
F1714
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 109

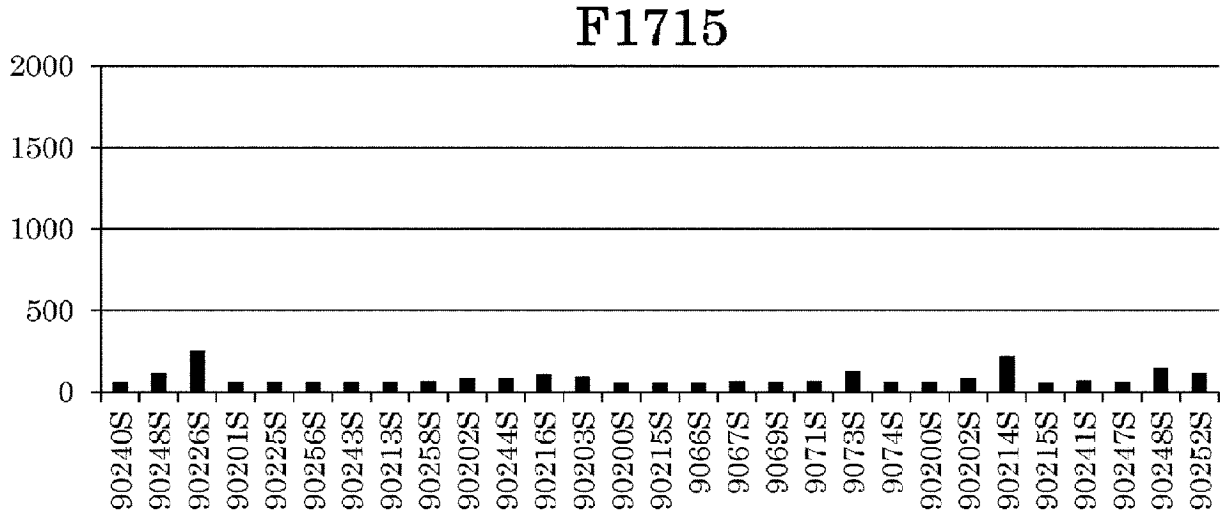
F1715
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 110

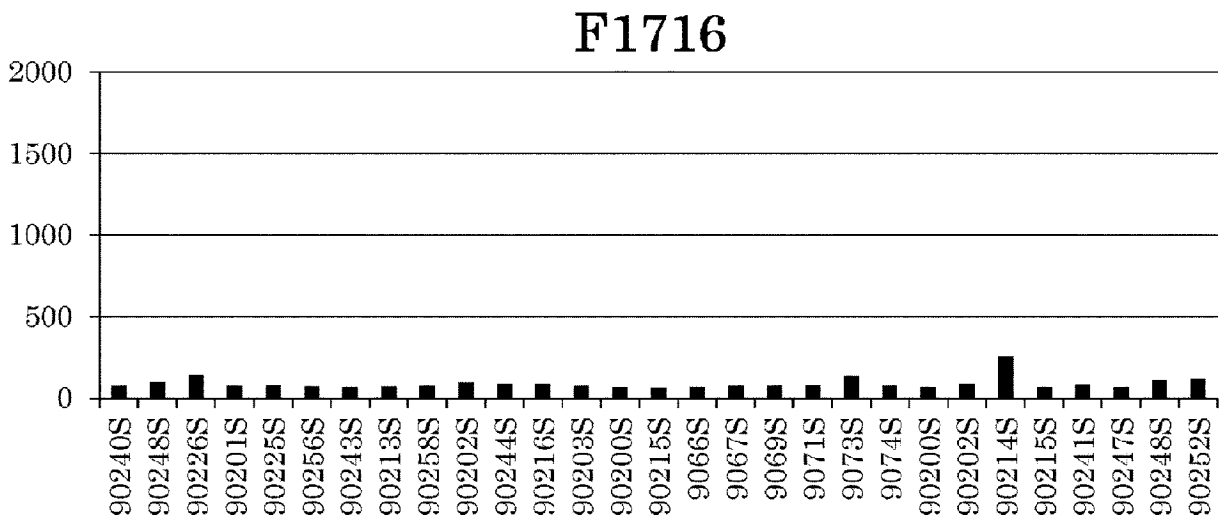
F1716
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 111

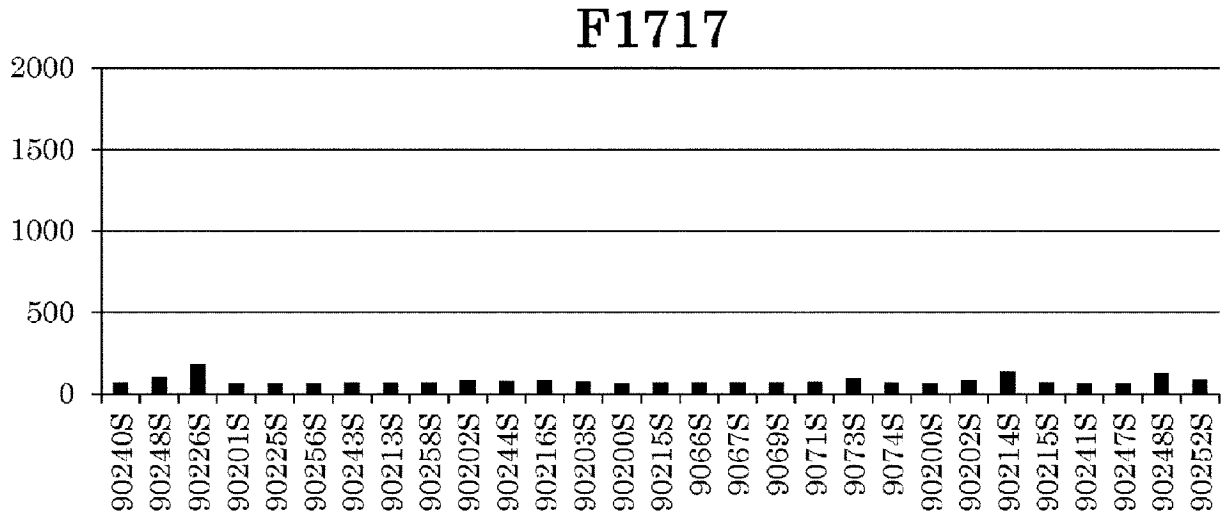
F1717
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 112

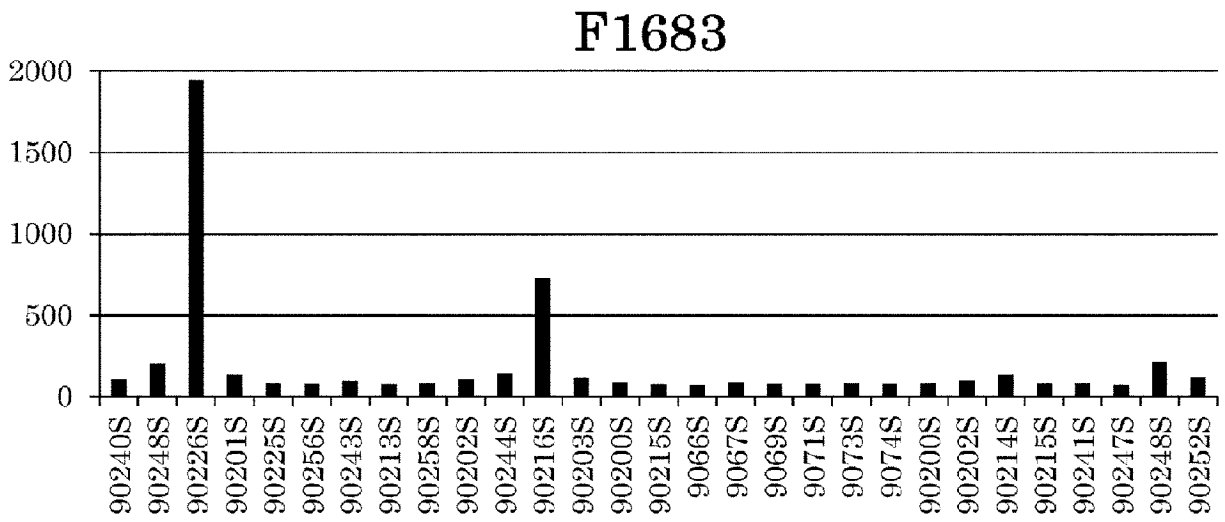
F1683
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 113

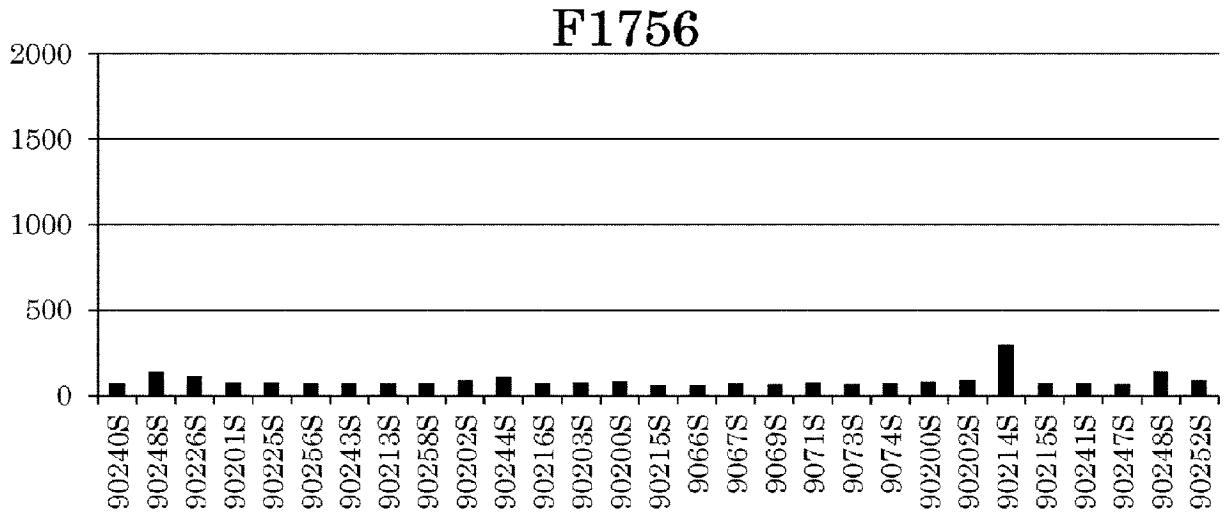
F1756
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 114

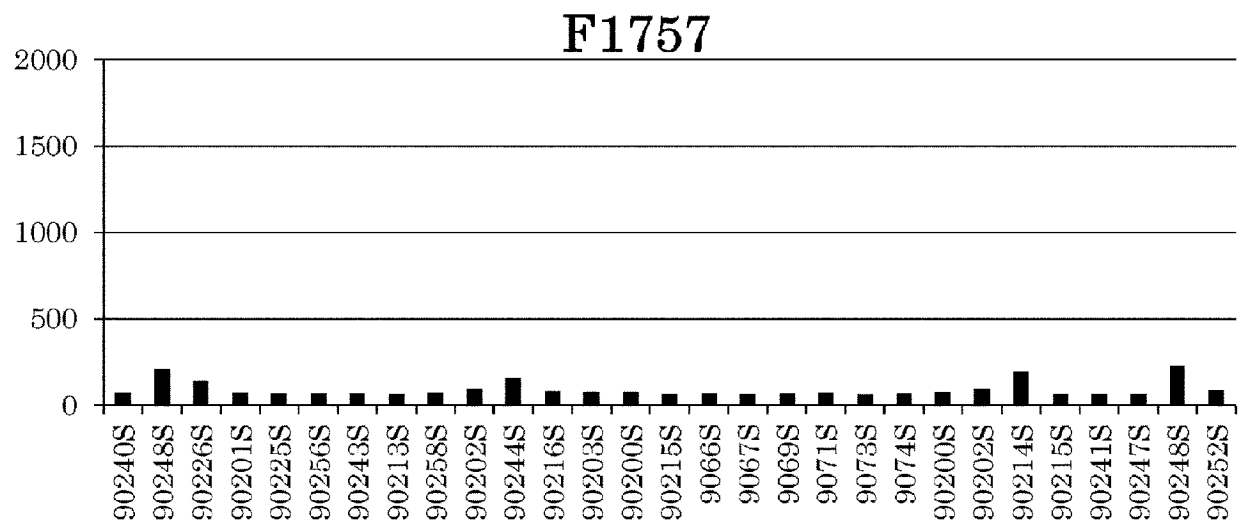
F1757
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 115

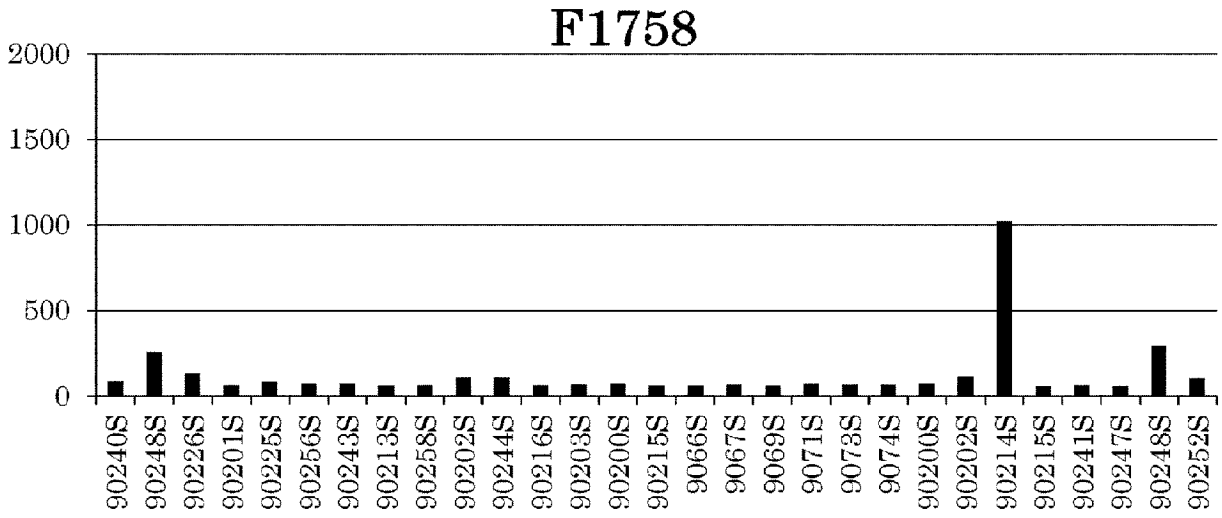
F1758
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 116

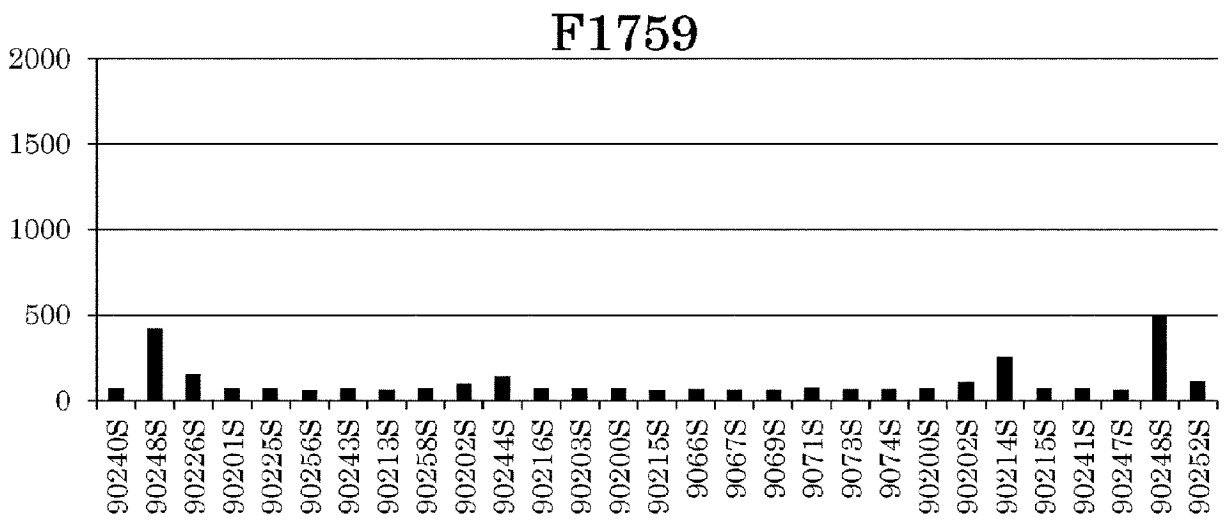
F1759
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 117

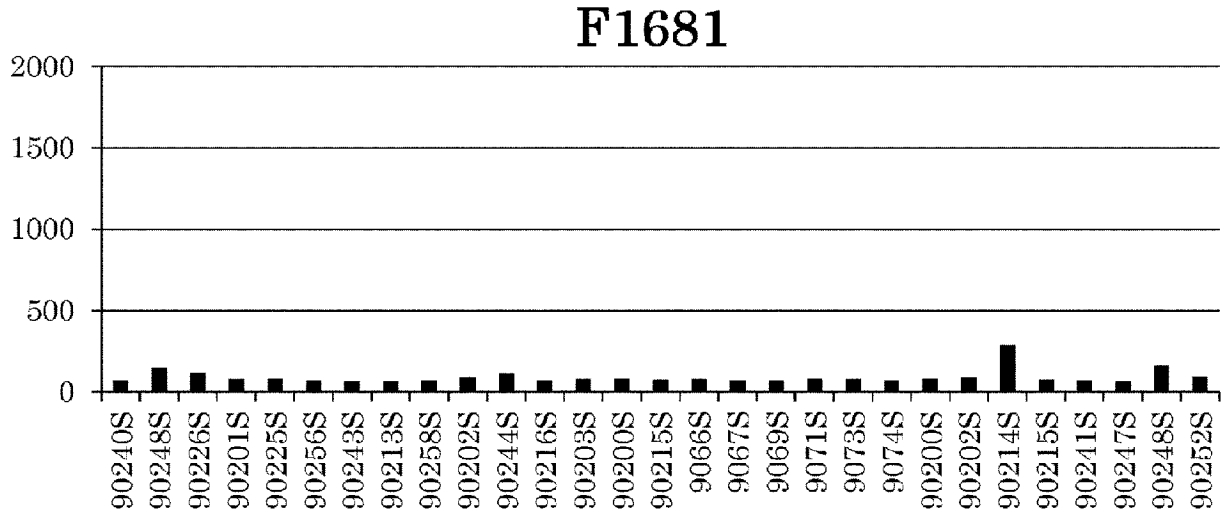
F1681
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 118

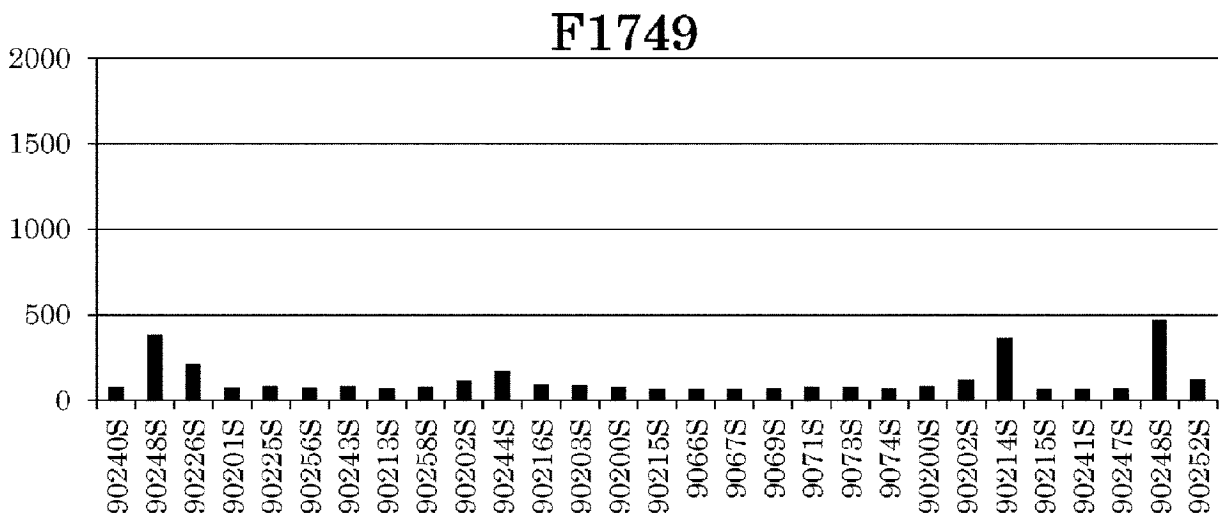
F1749
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 119

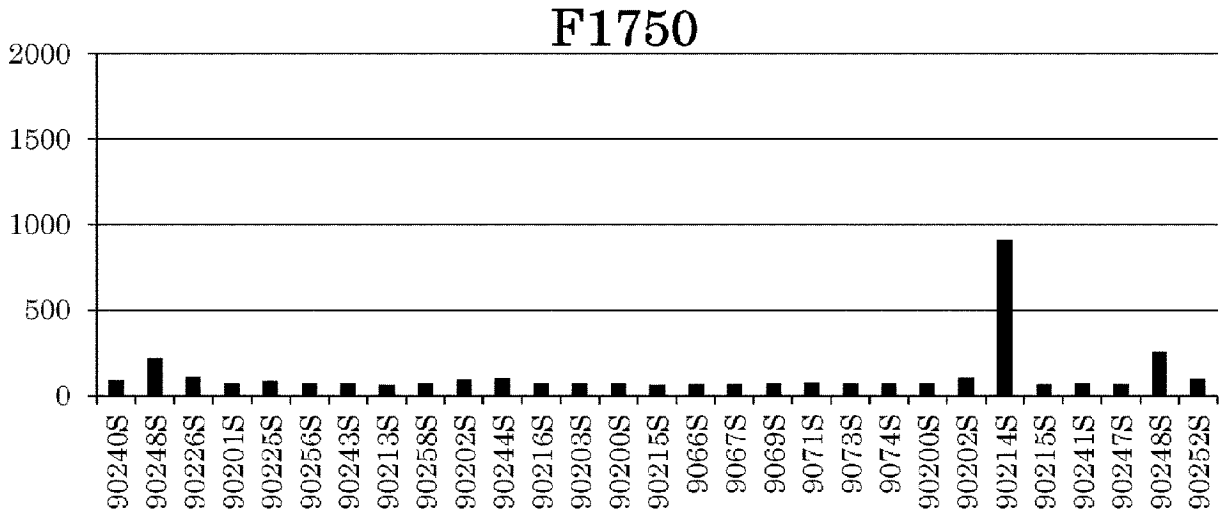
F1750
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 120

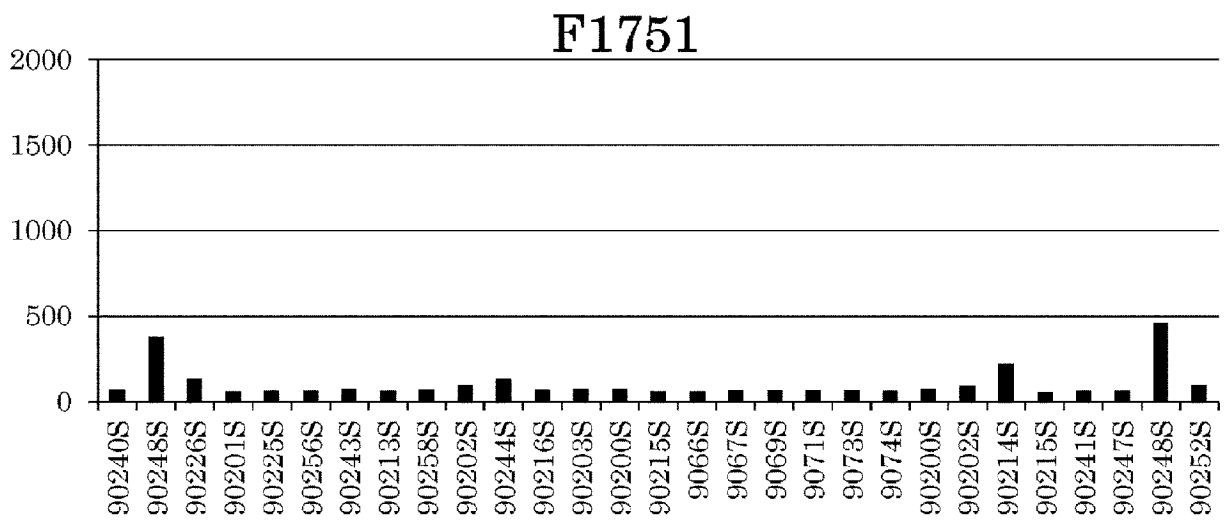
F1751
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 121

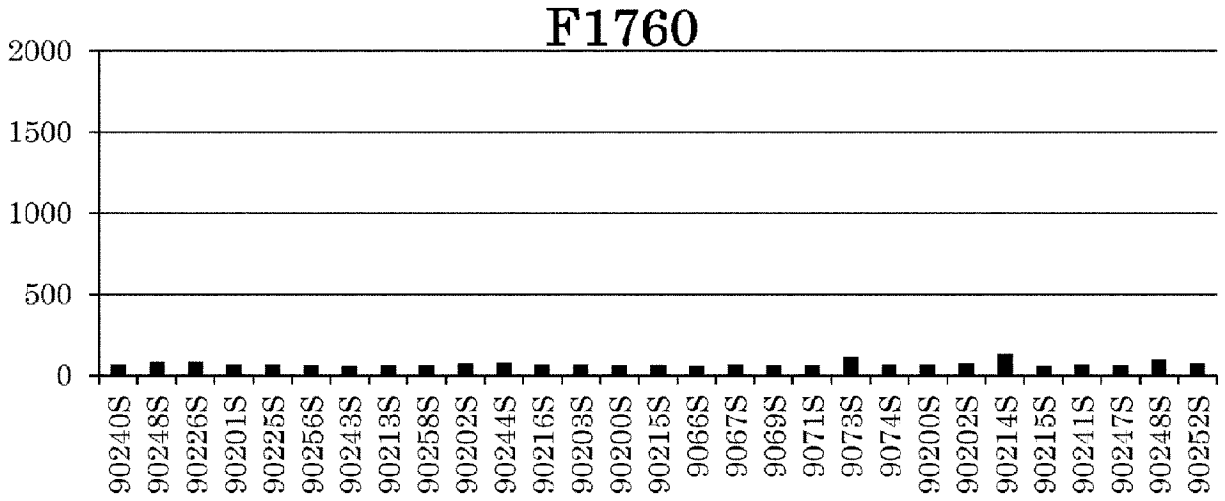
F1760
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 122

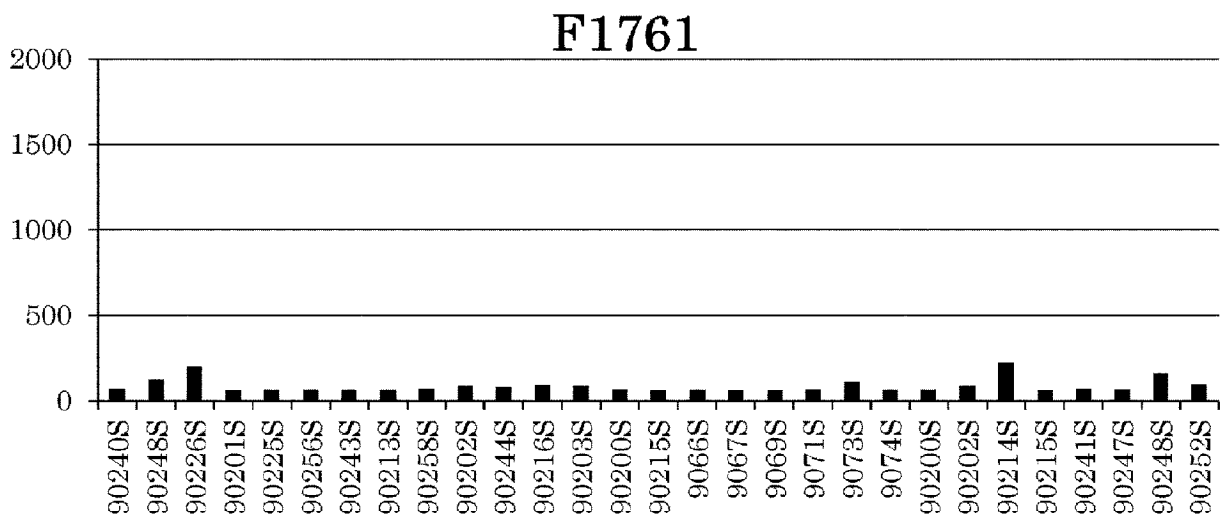
F1761
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 123

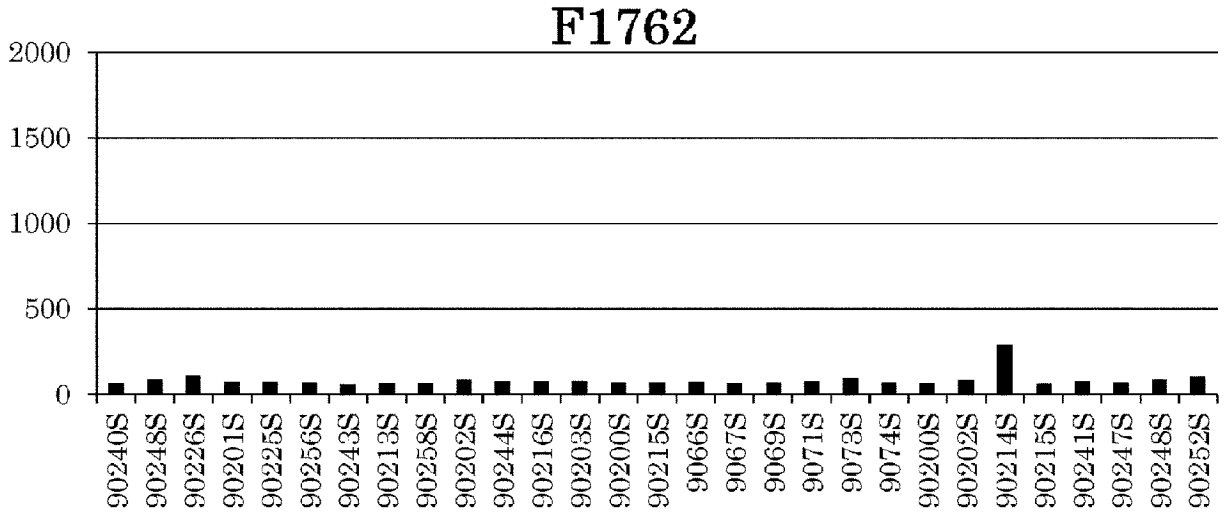
F1762
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 124

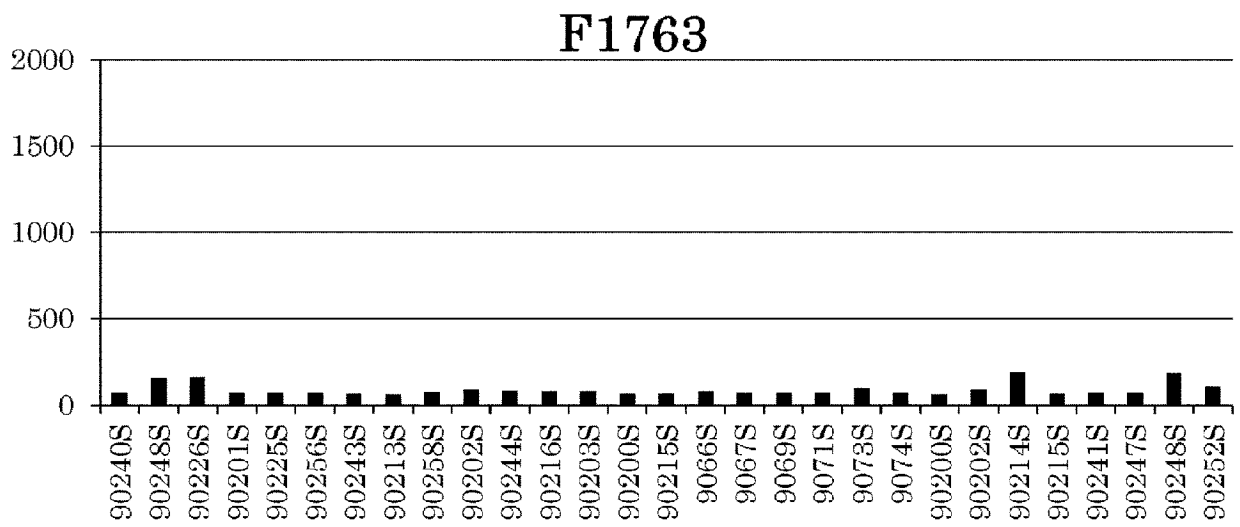
F1763
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 125

F1752
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 126

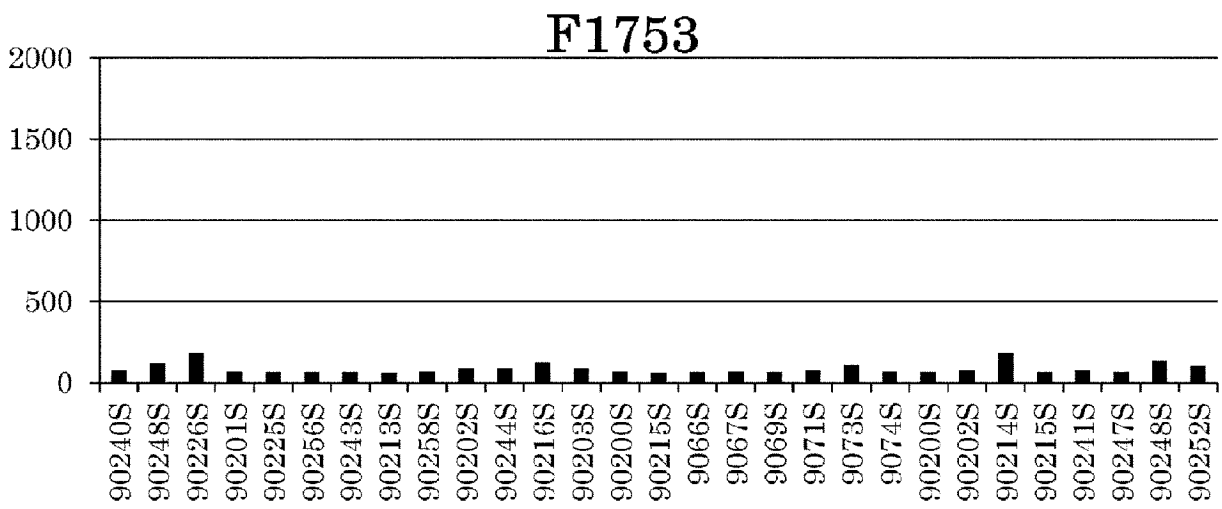
F1753
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 127

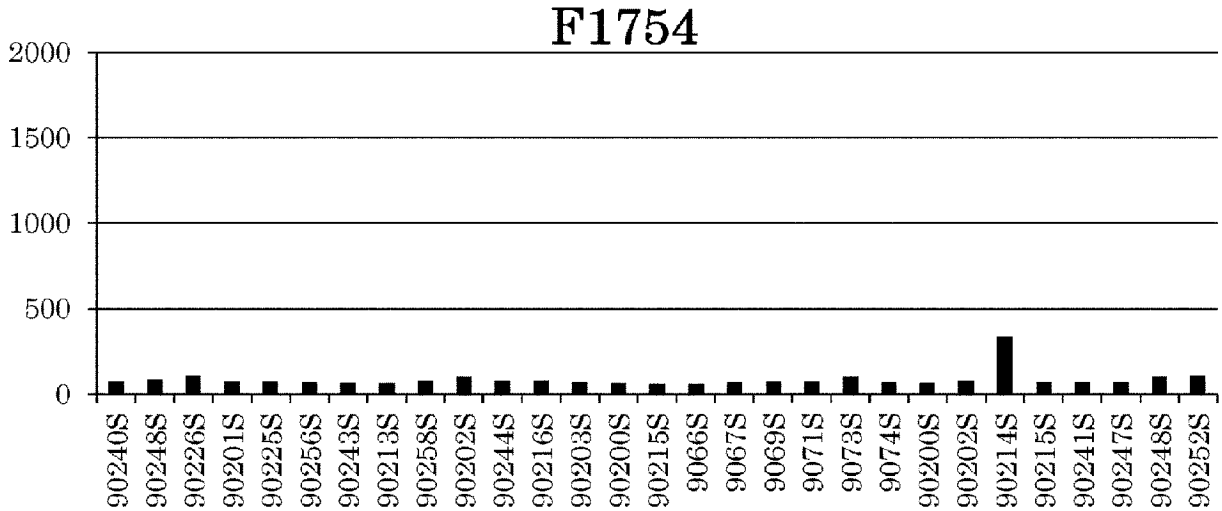
F1754
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 128

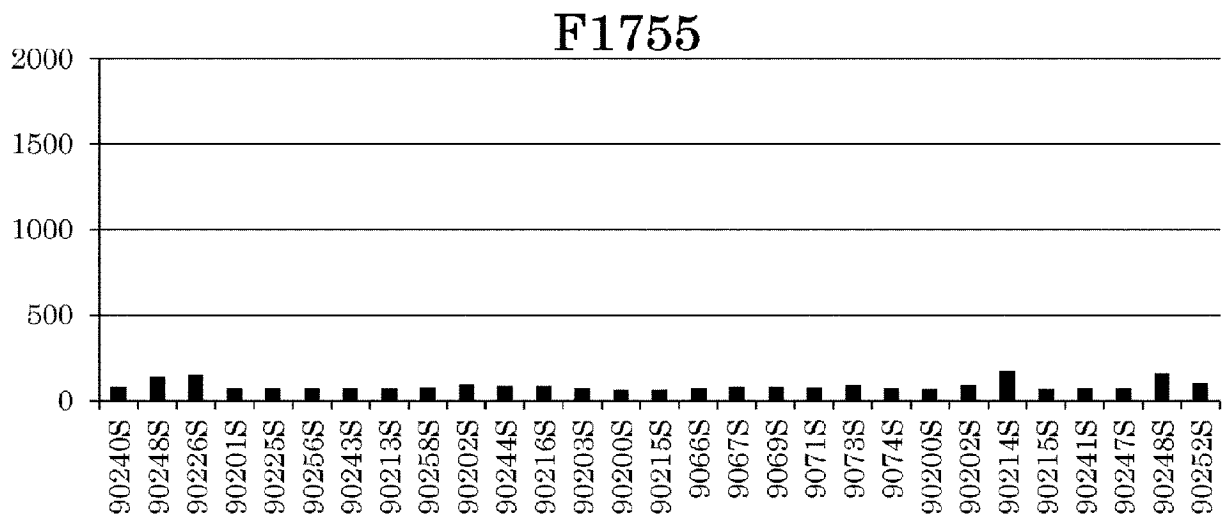
F1755
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 129

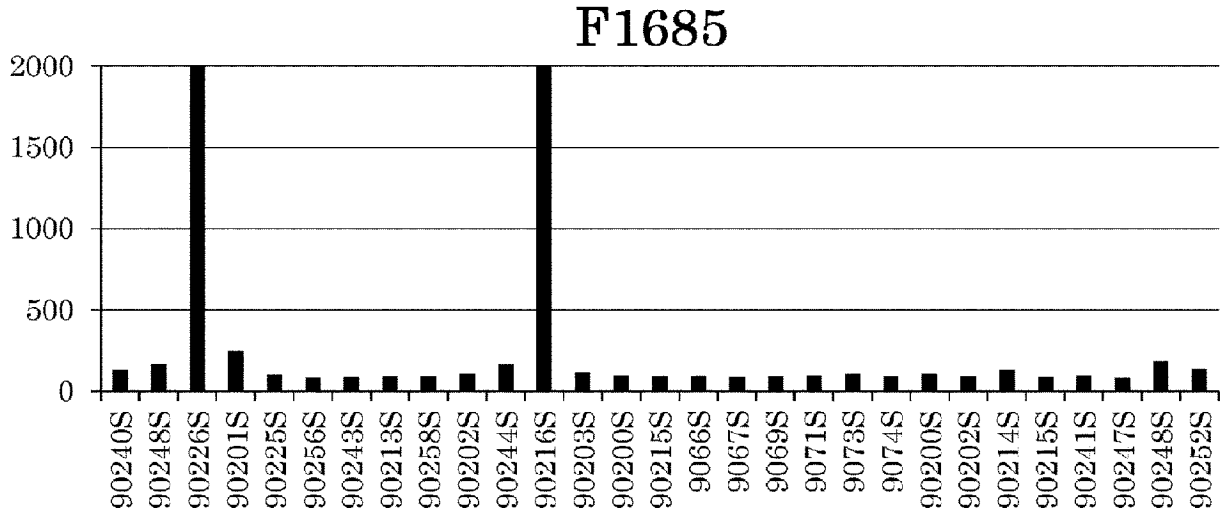
F1685
2000
1500
1000
500
0
90240S
90248S
90226S
90201S
90225S
90256S
90243S
90213S
90258S
90202S
90244S
90216S
90203S
90200S
90215S
9066S
9067S
9069S
9071S
9073S
9074S
90200S
90202S
90214S
90215S
90241S
90247S
90248S
90252S

图 130

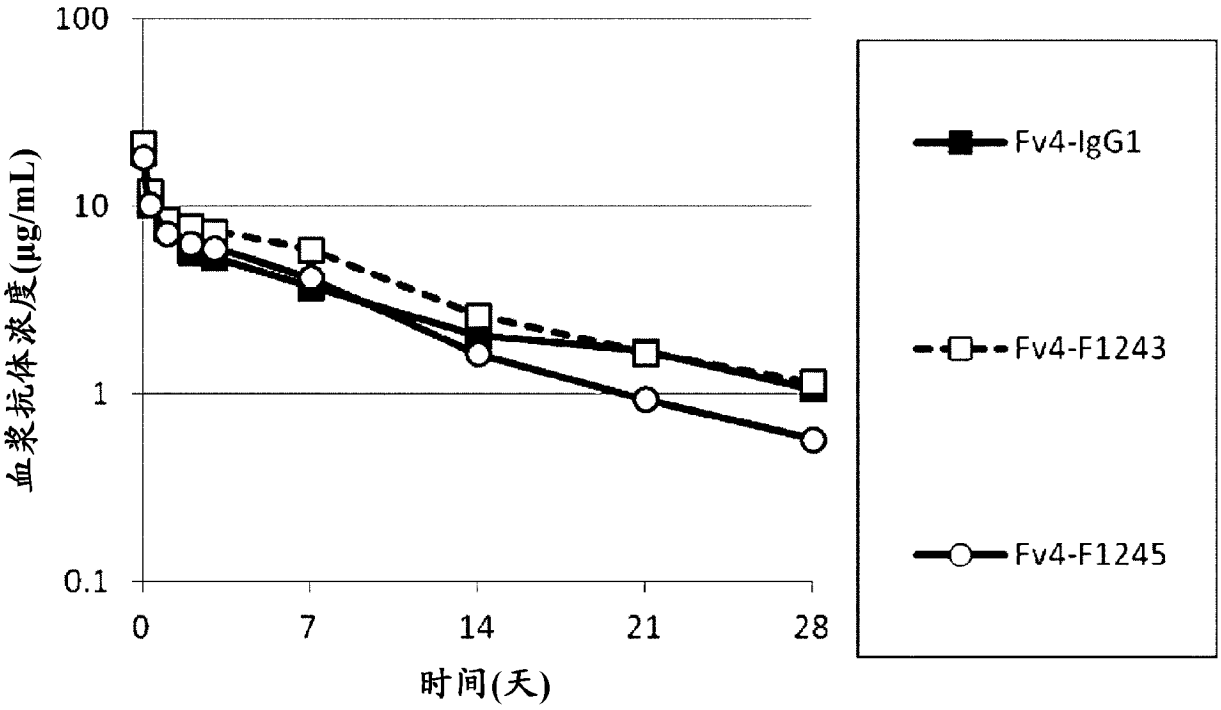
100
10
1
0.1
血浆抗体浓度(μg/mL)
0
7
14
21
28
时间(天)
Fv4-IgG1
Fv4-F1243
Fv4-F1245

图 131

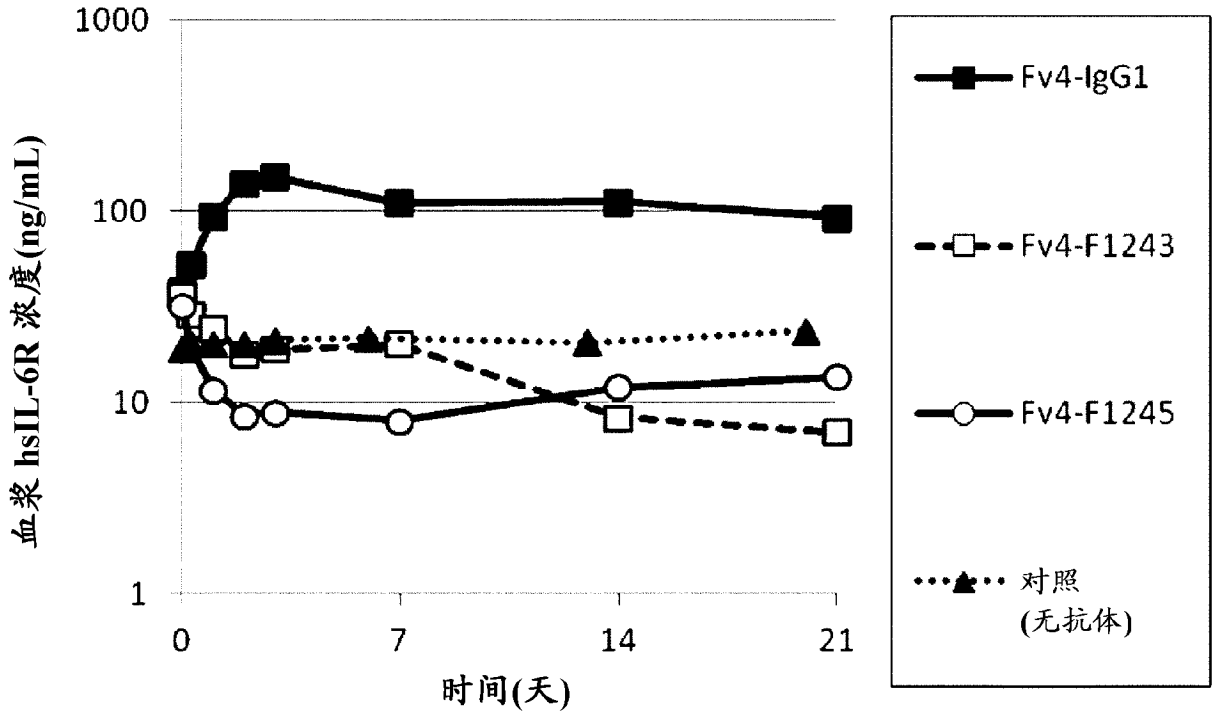
1000
100
10
1
血浆 hsIL-6R 浓度(ng/mL)
0
7
14
21
时间(天)
Fv4-IgG1
Fv4-F1243
Fv4-F1245
对照
(无抗体)

图 132

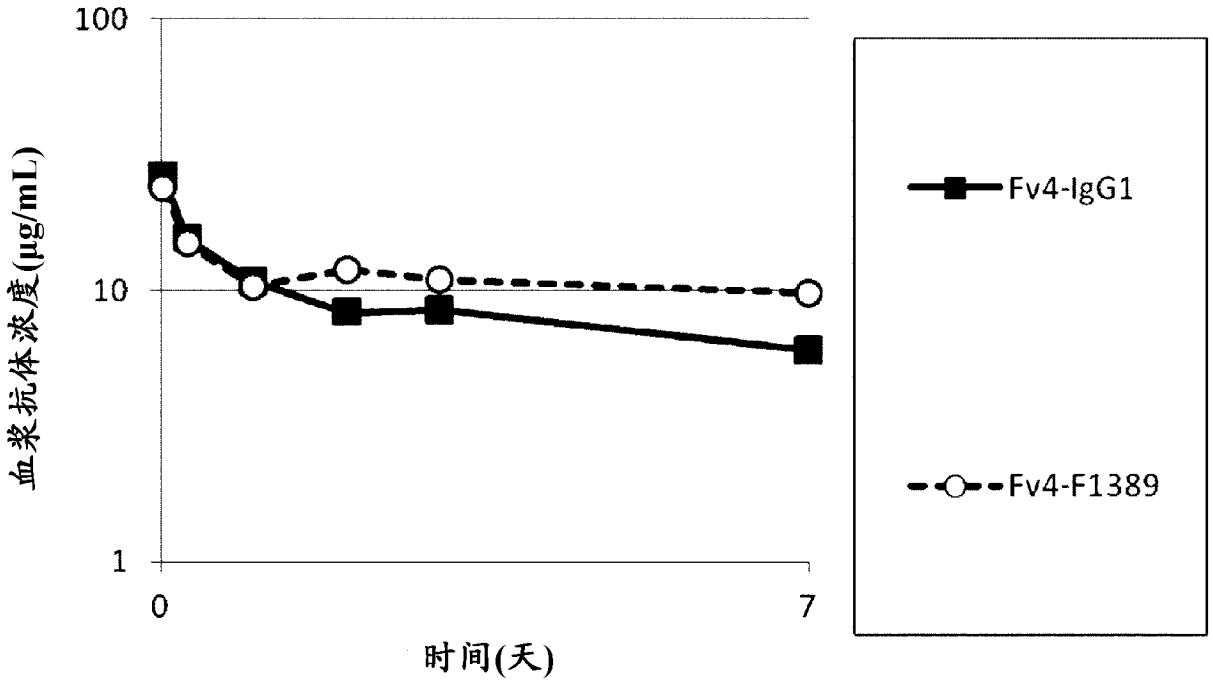
100
10
1
0
7
血浆抗体浓度(μg/mL)
时间(天)
Fv4-IgG1
Fv4-F1389

图 133

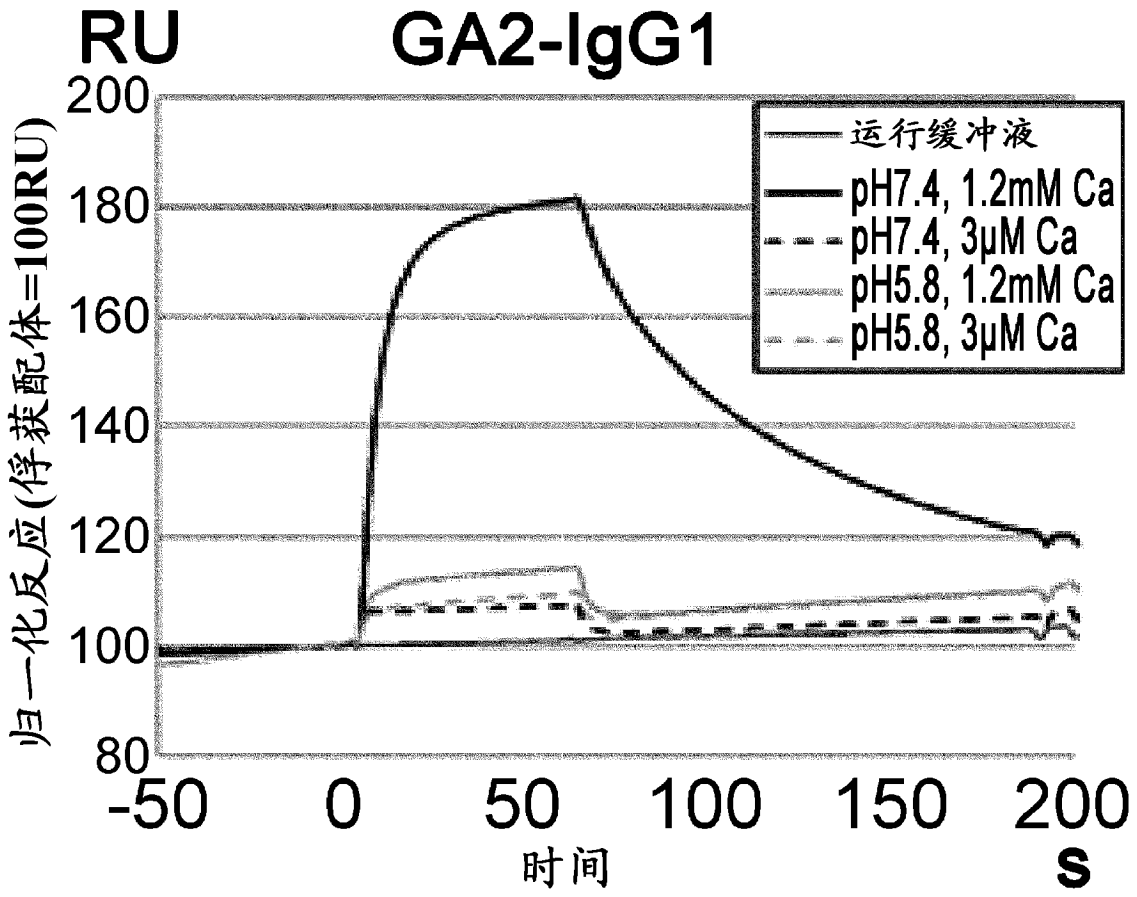
RU
GA2-IgG1
200
180
160
140
120
100
80
归一化反应(俘获配体=100RU)
-50
0
50
100
150
200
时间
S
运行缓冲液
pH7.4, 1.2mM Ca
pH7.4, 3μM Ca
pH5.8, 1.2mM Ca
pH5.8, 3μM Ca

图 134

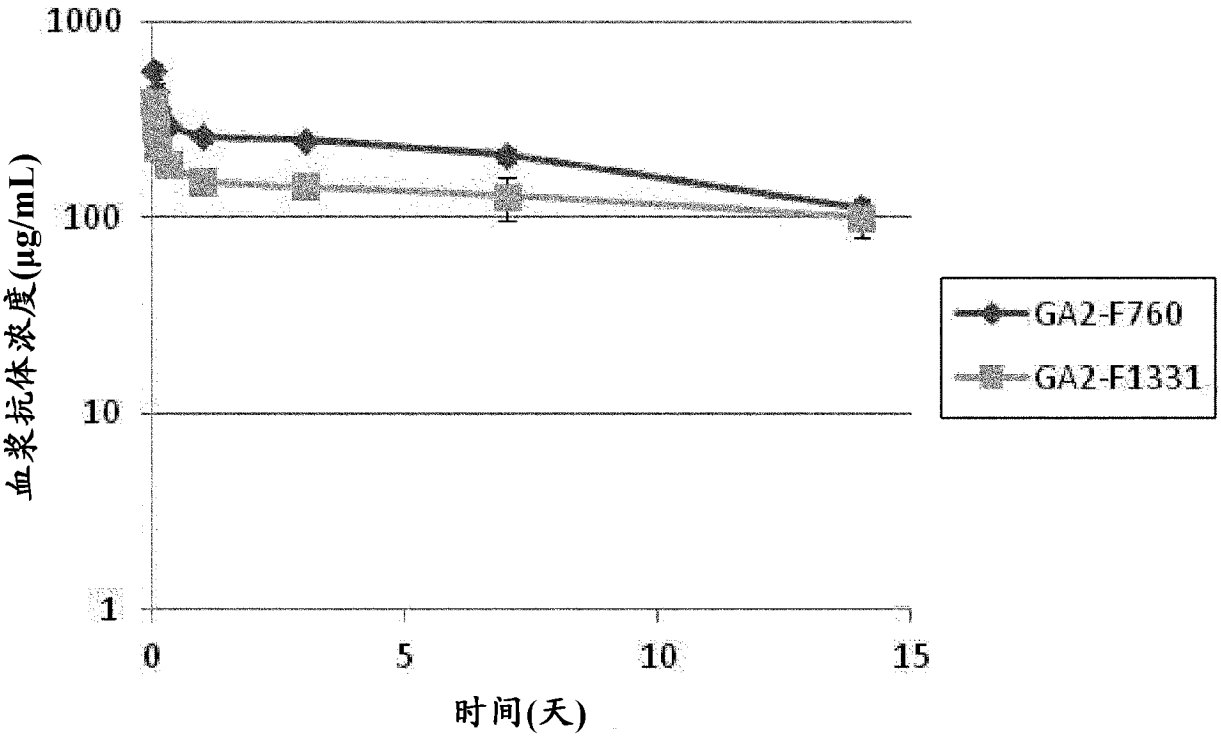
1000
100
10
1
血浆抗体浓度(μg/mL)
0
5
10
15
时间(天)
GA2-F760
GA2-F1331

图 135

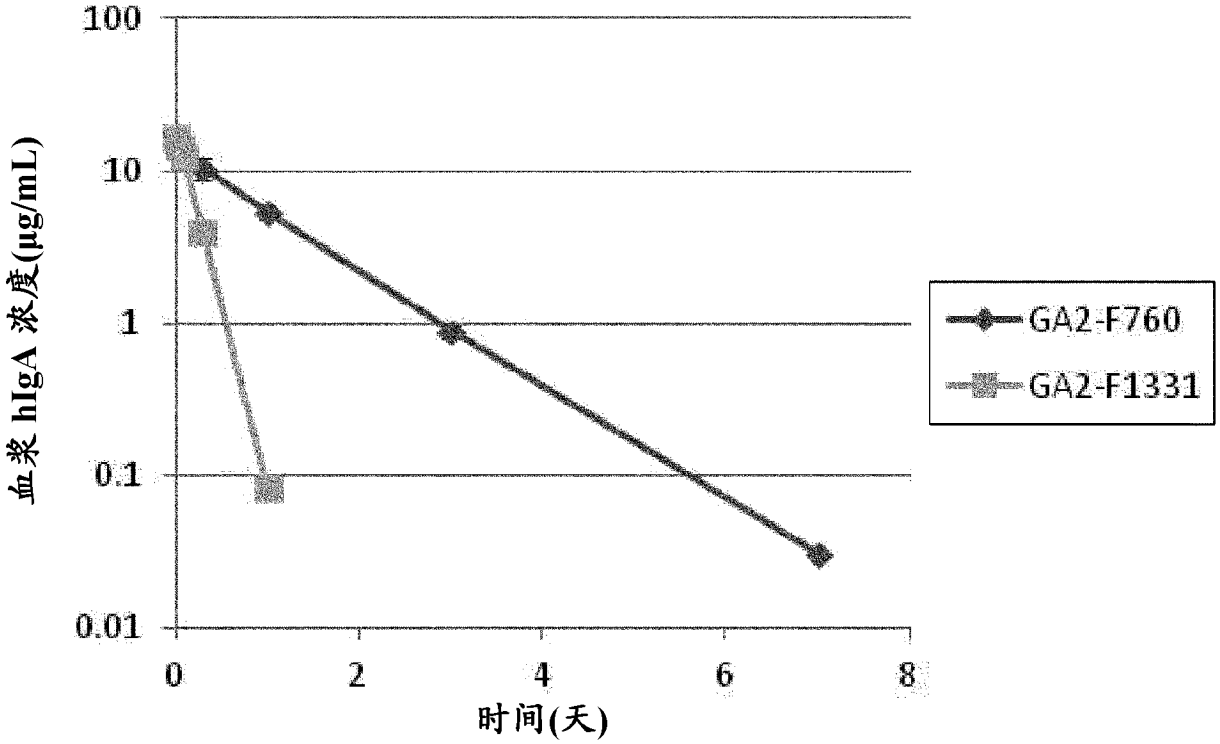
100
10
1
0.1
0.01
血浆 hIgA 浓度(μg/mL)
0
2
4
6
8
时间(天)
GA2-F760
GA2-F1331

图 136

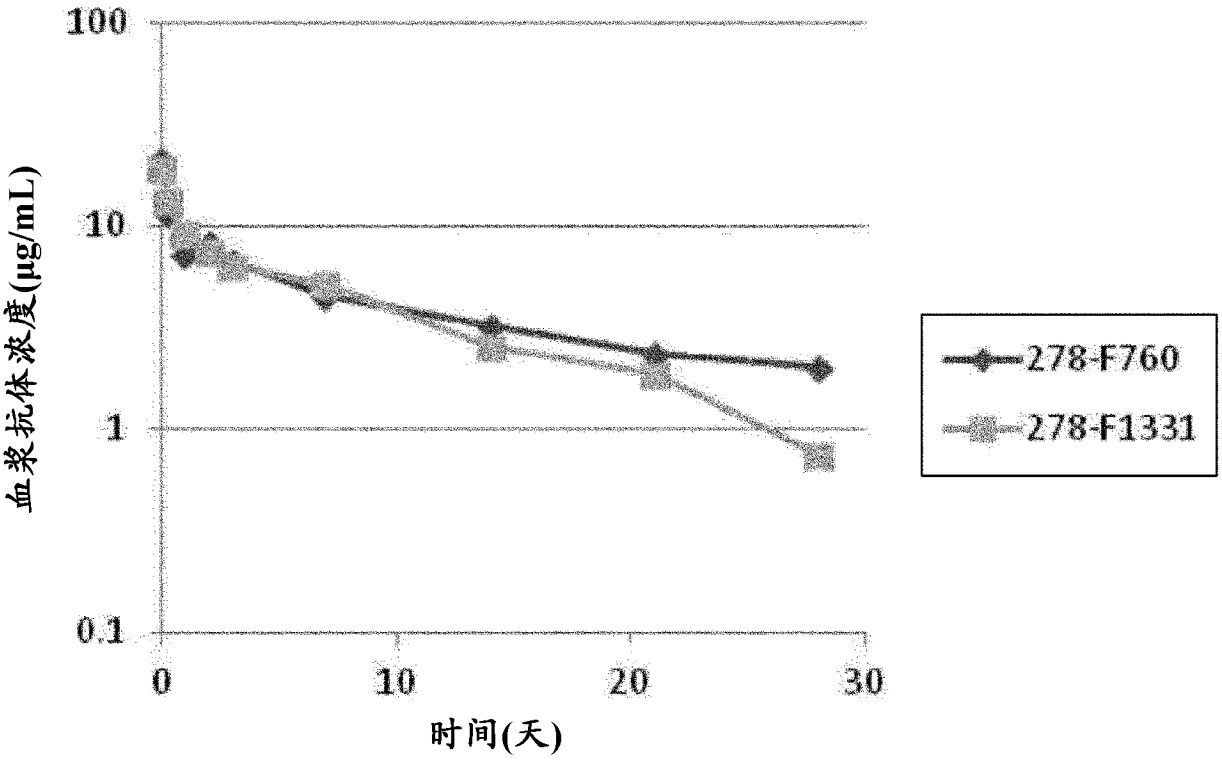
100
10
1
0.1
血浆抗体浓度(μg/mL)
0
10
20
30
时间(天)
278-F760
278-F1331

图 137

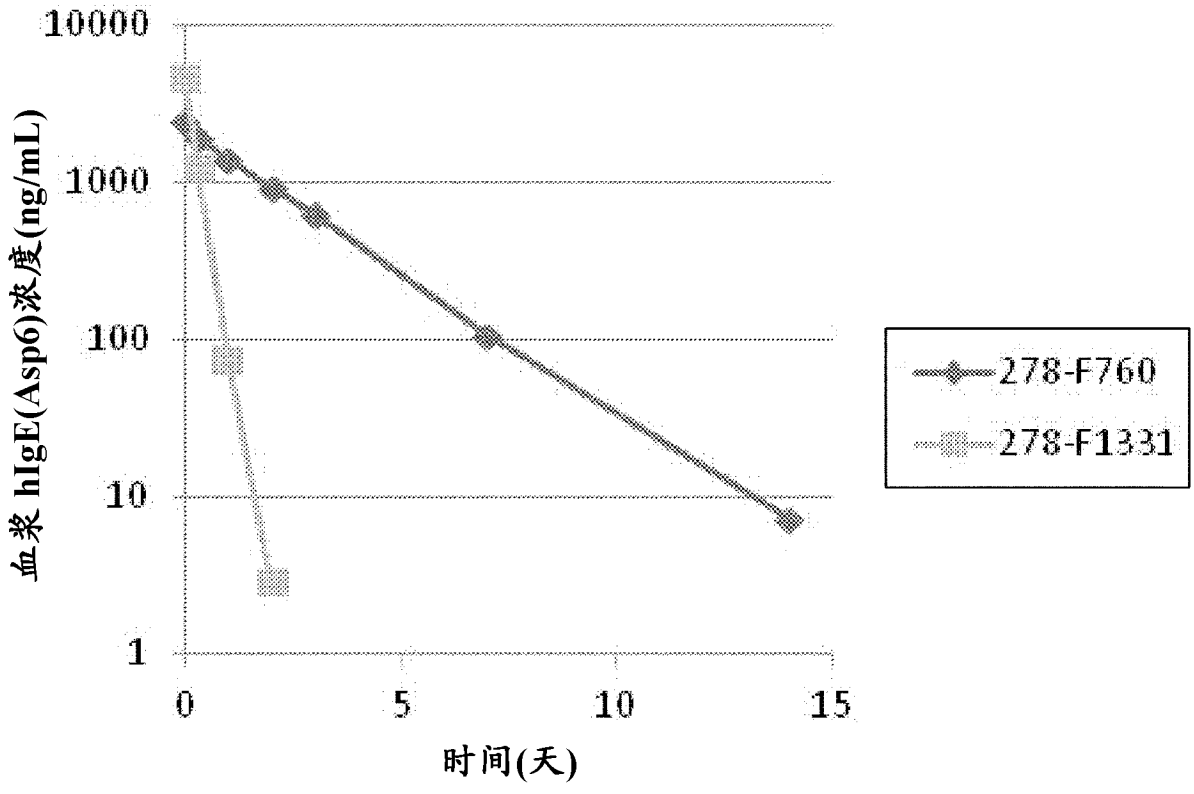
10000
1000
100
10
1
血浆 hIgE(Asp6)浓度(ng/mL)
0
5
10
15
时间(天)
278-F760
278-F1331

图 138