



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113307868 A

(43) 申请公布日 2021.08.27

(21) 申请号 202110596518.6

(22) 申请日 2011.03.30

(30) 优先权数据

2010-079667 2010.03.30 JP

2010-250830 2010.11.09 JP

(62) 分案原申请数据

201180026699.3 2011.03.30

(71) 申请人 中外制药株式会社

地址 日本国东京都

(72) 发明人 井川智之 石井慎也 前田敦彦

中井贵士

(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 柴云峰 张莹

(51) Int.Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/42 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 47/42 (2017.01)

A61K 49/16 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

C07K 14/475 (2006.01)

C07K 14/735 (2006.01)

权利要求书8页 说明书110页

序列表57页 附图35页

(54) 发明名称

促进抗原清除的与FcRn的亲合力得到改进
的抗体

(57) 摘要

提供促进抗原结合分子介导的细胞对抗原摄入的方法、促进血浆抗原浓度降低的方法、增加单个抗原结合分子可与之结合的抗原的数目的方法、改进抗原结合分子药代动力学的方法、促进细胞对抗原摄入的改良的抗原结合分子、能促进血浆抗原浓度降低的抗原结合分子、能与抗原重复结合的抗原结合分子、具有改进的药代动力学的抗原结合分子、包含该抗原结合分子的药物组合物和产生上述这些的方法。发明人发现在血浆pH具有人FcRn结合活性且抗原结合活性在早期体内pH比在血浆pH低的抗体促进细胞对抗原的摄入；这类抗体可增加单个抗体分子可与之结合的抗原的数目；通过给予这类抗体可促进血浆抗原的降低；且通过使用这类抗体可改进抗体药代动力学。

1. 包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域的抗原结合分子,其中在中性pH范围内具有人FcRn结合活性,其中在中性pH范围内的人FcRn结合活性强于KD 3.2微摩尔。

2. 包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域的抗原结合分子,其中在中性pH范围内具有人FcRn结合活性,其中在中性pH范围内的人FcRn结合活性是完整人IgG的人FcRn结合活性的28倍。

3. 包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域的抗原结合分子,其中在中性pH范围内具有人FcRn结合活性,其中在中性pH范围内的人FcRn结合活性强于KD 2.3微摩尔。

4. 包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域的抗原结合分子,其中在中性pH范围内具有人FcRn结合活性,其中在中性pH范围内的人FcRn结合活性是完整人IgG的人FcRn结合活性的38倍。

5. 权利要求1-4中任一项的抗原结合分子,其中所述中性pH范围为pH 7.0-8.0。

6. 包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域的抗原结合分子,其中将抗原结合分子给予非人动物后的血浆总抗原浓度低于将参比抗原结合分子给予非人动物后的血浆总抗原浓度,所述参比抗原结合分子包含相同的抗原结合结构域和完整人IgG Fc结构域作为人FcRn结合结构域。

7. 抗原结合分子,其中将所述抗原结合分子给予非人动物后的血浆抗原浓度低于自未被给予抗原结合分子的非人动物所得到的血浆总抗原浓度。

8. 包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域的抗原结合分子,其中如下计算的所述抗原结合分子的抗原/抗原结合分子摩尔比率(C):

$$C=A/B,$$

低于如下计算的包含相同抗原结合结构域和完整人IgG Fc结构域作为人FcRn结合结构域的参比抗原结合分子的抗原/抗原结合分子摩尔比率(C'):

$$C'=A'/B',$$

其中;

A为将抗原结合分子给予非人动物后血浆中的总抗原浓度,

B为将抗原结合分子给予非人动物后抗原结合分子的血浆浓度,

A'为将参比抗原结合分子给予非人动物后血浆中的总抗原浓度,

B'为将参比抗原结合分子给予非人动物后抗原结合分子的血浆浓度。

9. 权利要求6-8中任一项的抗原结合分子,其中所述非人动物是人FcRn转基因小鼠。

10. 权利要求6-9中任一项的抗原结合分子,其中所述血浆抗原浓度是长期血浆总抗原浓度。

11. 权利要求6-9中任一项的抗原结合分子,其中所述血浆抗原浓度是短期血浆总抗原浓度。

12. 包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域的抗原结合分子,其在酸性和中性pH范围内具有人FcRn结合活性,且具有在酸性pH范围内比在中性pH范围内低的抗原结合活性,其中在中性pH范围内的人FcRn结合活性强于完整人IgG的人FcRn结合活性。

13. 权利要求1-11中任一项的抗原结合分子,其中所述抗原结合结构域在酸性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。

14. 权利要求12或13的抗原结合分子,其中在酸性pH范围内与在中性pH范围内的抗原

结合活性的比率以KD (在酸性pH范围内) /KD (在中性pH范围内) 值计至少为2。

15. 权利要求12-14中任一项的抗原结合分子,其包含抗原结合结构域的氨基酸突变,所述突变包含用组氨酸取代抗原结合结构域的至少一个氨基酸或插入至少一个组氨酸。

16. 权利要求12-14中任一项的抗原结合分子,其中所述抗原结合结构域获自抗原结合结构域文库。

17. 权利要求1-16中任一项的抗原结合分子,其包含因用不同氨基酸取代亲本IgG的Fc结构域中的至少一个氨基酸而产生的Fc结构域作为人FcRn结合结构域。

18. 权利要求1-17中任一项的抗原结合分子,其中所述人FcRn结合结构域是这样的人FcRn结合结构域,其包含用不同氨基酸取代选自亲本IgG的Fc结构域中的以下位置氨基酸中的至少一个氨基酸的氨基酸序列:237、238、239、248、250、252、254、255、256、257、258、265、270、286、289、297、298、303、305、307、308、309、311、312、314、315、317、325、332、334、360、376、380、382、384、385、386、387、389、424、428、433、434和436 (EU编号)。

19. 权利要求1-18中任一项的抗原结合分子,其包含在亲本IgG的Fc结构域中包含氨基酸取代的人FcRn结合结构域,其包含选自以下按EU编号的至少一个氨基酸取代:

237位上的Gly被取代为Met的氨基酸取代;

238位上的Pro被取代为Ala的氨基酸取代;

239位上的Ser被取代为Lys的氨基酸取代;

248位上的Lys被取代为Ile的氨基酸取代;

250位上的Thr被取代为Ala、Phe、Ile、Met、Gln、Ser、Val、Trp或Tyr的氨基酸取代;

252位上的Met被取代为Phe、Trp或Tyr的氨基酸取代;

254位上的Ser被取代为Thr的氨基酸取代;

255位上的Arg被取代为Glu的氨基酸取代;

256位上的Thr被取代为Asp、Glu或Gln的氨基酸取代;

257位上的Pro被取代为Ala、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr或Val的氨基酸取代;

258位上的Glu被取代为His的氨基酸取代;

265位上的Asp被取代为Ala的氨基酸取代;

270上的Asp被取代为Phe的氨基酸取代;

286位上的Asn被取代为Ala或Glu的氨基酸取代;

289位上的Thr被取代为His的氨基酸取代;

297位上的Asn被取代为Ala的氨基酸取代;

298上的Ser被取代为Gly的氨基酸取代;

303位上的Val被取代为Ala的氨基酸取代;

305位上的Val被取代为Ala的氨基酸取代;

307位上的Thr被取代为Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、Trp或Tyr的氨基酸取代;

308位上的Val被取代为Ala、Phe、Ile、Leu、Met、Pro、Gln或Thr的氨基酸取代;

309位上的Leu或Val被取代为Ala、Asp、Glu、Pro或Arg的氨基酸取代;

311位上的Gln被取代为Ala、His或Ile的氨基酸取代;

312位上的Asp被取代为Ala或His的氨基酸取代;

314位上的Leu被取代为Lys或Arg的氨基酸取代；
315位上的Asn被取代为Ala或His的氨基酸取代；
317位上的Lys被取代为Ala的氨基酸取代；
325位上的Asn被取代为Gly的氨基酸取代；
332位上的Ile被取代为Val的氨基酸取代；
334位上的Lys被取代为Leu的氨基酸取代；
360位上的Lys被取代为His的氨基酸取代；
376位上的Asp被取代为Ala的氨基酸取代；
380位上的Glu被取代为Ala的氨基酸取代；
382位上的Glu被取代为Ala的氨基酸取代；
384位上的Asn或Ser被取代为Ala的氨基酸取代；
385位上的Gly被取代为Asp或His的氨基酸取代；
386位上的Gln被取代为Pro的氨基酸取代；
387位上的Pro被取代为Glu的氨基酸取代；
389位的Asn被取代为Ala或Ser的氨基酸取代；
424位上的Ser被取代为Ala的氨基酸取代；
428位上的Met被取代为Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr的氨基酸取代；
433位上的His被取代为Lys的氨基酸取代；
434位上的Asn被取代为Ala、Phe、His、Ser、Trp或Tyr的氨基酸取代；
和436位上的Tyr被取代为His或Phe的氨基酸取代。

20. 权利要求1-18中任一项的抗原结合分子，其人FcRn结合结构域包含选自亲本IgG的Fc结构域中的以下至少一个氨基酸：

氨基酸位置237上的Met；
氨基酸位置238上的Ala；
氨基酸位置239上的Lys；
氨基酸位置248上的Ile；
氨基酸位置250上的Ala、Phe、Ile、Met、Gln、Ser、Val、Trp或Tyr；
氨基酸位置252上的Phe、Trp或Tyr；
氨基酸位置254上的Thr；
氨基酸位置255上的Glu；
氨基酸位置256上的Asp、Glu或Gln；
氨基酸位置257上的Ala、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr或Val；
氨基酸位置258上的His；
氨基酸位置265上的Ala；
氨基酸位置270上的Phe；
氨基酸位置286上的Ala或Glu；
氨基酸位置289上的His；
氨基酸位置297上的Ala；

- 氨基酸位置298上的Gly；
氨基酸位置303上的Ala；
氨基酸位置305上的Ala；
氨基酸位置307上的Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、Trp或Tyr；
氨基酸位置308上的Ala、Phe、Ile、Leu、Met、Pro、Gln或Thr；
氨基酸位置309上的Ala、Asp、Glu、Pro或Arg；
氨基酸位置311上的Ala、His或Ile；
氨基酸位置312上的Ala或His；
氨基酸位置314上的Lys或Arg；
氨基酸位置315上的Ala或His；
氨基酸位置317上的Ala；
氨基酸位置325上的Gly；
氨基酸位置332上的Val；
氨基酸位置334上的Leu；
氨基酸位置360上的His；
氨基酸位置376上的Ala；
氨基酸位置380上的Ala；
氨基酸位置382上的Ala；
氨基酸位置384上的Ala；
氨基酸位置385上的Asp或His；
氨基酸位置386上的Pro；
氨基酸位置387上的Glu；
氨基酸位置389上的Ala或Ser；
氨基酸位置424上的Ala；
氨基酸位置428上的Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr；
氨基酸位置433位置上的Lys；
氨基酸位置434上的Ala、Phe、His、Ser、Trp或Tyr；
和氨基酸位置436上的His或Phe (EU编号)。
21. 权利要求18-20中任一项的抗原结合分子，其中亲本IgG选自获自非人动物的IgG。
22. 权利要求18-20中任一项的抗原结合分子，其中亲本IgG是人IgG。
23. 权利要求1-22中任一项的抗原结合分子，其具有拮抗活性。
24. 权利要求1-23中任一项的抗原结合分子，其与膜抗原或可溶性抗原结合。
25. 权利要求1-24中任一项的抗原结合分子，其中所述抗原结合结构域包含与受体结合的人工配体。
26. 权利要求1-24中任一项的抗原结合分子，其中所述抗原结合结构域包含与配体结合的人工受体。
27. 权利要求1-24中任一项的抗原结合分子，其是抗体。

28. 权利要求27的抗原结合分子,其中所述抗体选自嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。

29. 药物组合物,其包含权利要求1-28中任一项的抗原结合分子。

30. 用于通过提高其在中性pH范围内的人FcRn结合活性而促进抗原结合分子介导的细胞对抗原摄入的方法,其中所述抗原结合分子包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域,并在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性。

31. 用于通过提高其在中性pH范围内的人FcRn结合活性且降低其在酸性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而促进抗原结合分子介导的细胞对抗原摄入的方法,其中所述抗原结合分子包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域,并在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性。

32. 用于通过提高其在中性pH范围内的人FcRn结合活性而增加单个抗原结合分子可与之结合的抗原的数目的方法,其中所述抗原结合分子包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域,并在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性。

33. 用于通过提高其在中性pH范围内的人FcRn结合活性且降低其在酸性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而增加单个抗原结合分子可与之结合的抗原的数目的方法,其中所述抗原结合分子包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域,并在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性。

34. 用于通过提高其在中性pH范围内的人FcRn结合活性而提高抗原结合分子从血浆中消除抗原的能力的方法,其中所述抗原结合分子包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域,并在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性。

35. 用于通过提高其在中性pH范围内的人FcRn结合活性并降低其在酸性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而提高抗原结合分子从血浆中消除抗原的能力的方法,其中所述抗原结合分子包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域,并在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性。

36. 用于通过提高其在中性pH范围内的人FcRn结合活性而改进抗原结合分子的药代动力学的方法,其中所述抗原结合分子包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域,并在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性。

37. 用于通过提高其在中性pH范围内的人FcRn结合活性并降低其在酸性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而改进抗原结合分子的药代动力学的方法,其中所述抗原结合分子包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域,并在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性。

38. 用于促进抗原结合分子与在细胞外与抗原结合分子结合的抗原胞内解离的方法,这通过提高其在中性pH范围内的人FcRn结合活性并降低其在酸性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来进行,其中所述抗原结合分子包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域,并在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性。

39. 用于促进以抗原结合的形式摄入细胞的抗原结合分子以无抗原形式胞外释放的方法,这通过提高其在中性pH范围内的人FcRn结合活性且降低其在酸性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来进行,其中所述抗原结合分子包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域,并在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性。

40. 用于通过提高其在中性pH范围内的人FcRn结合活性而降低血浆中总血浆抗原浓度

或游离血浆抗原浓度的方法,其中所述抗原结合分子包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域,并在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性。

41. 用于降低血浆中总血浆抗原浓度或游离血浆抗原浓度的方法,这通过提高其在中性pH范围内的人FcRn结合活性且降低其在酸性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来进行,其中所述抗原结合分子包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域,并在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性。

42. 权利要求30-41中任一项的方法,其中所述酸性pH范围为pH 5.5-6.5,所述中性pH范围为pH 7.0-8.0。

43. 权利要求30-41中任一项的方法,其中所述在中性pH范围内人FcRn结合活性的提高是通过用不同氨基酸取代人FcRn结合结构域的亲本IgG Fc结构域中的至少一个氨基酸而引起的增加。

44. 权利要求30-41中任一项的方法,其中所述在中性pH范围内人FcRn结合活性的提高是通过用不同氨基酸取代选自人FcRn结合结构域的亲本IgG Fc结构域中的以下位置氨基酸中的至少一个氨基酸而引起的增加:237、238、239、248、250、252、254、255、256、257、258、265、270、286、289、297、298、303、305、307、308、309、311、312、314、315、317、325、332、334、360、376、380、382、384、385、386、387、389、424、428、433、434和436(EU编号)。

45. 权利要求31、33、35、37-39和41中任一项的方法,其中通过用组氨酸取代抗原结合分子的至少一个氨基酸或插入至少一个组氨酸降低在酸性pH范围内抗原结合分子的抗原结合活性至低于在中性pH范围内的抗原结合活性。

46. 权利要求31、33、35、37-39和41中任一项的方法,其中所述抗原结合结构域获自抗原结合结构域文库。

47. 权利要求31、33、35、37-39和41中任一项的方法,其中所述抗原结合活性的降低用KD(在酸性pH范围内)/KD(在中性pH范围内)值的增加来表示,所述值是相对于组氨酸取代或插入之前酸性pH范围和中性pH范围内的抗原结合活性的比率。

48. 用于产生抗原结合分子的方法,所述方法包括以下步骤:

(a) 选择通过改变抗原结合分子的人FcRn结合结构域中的至少一个氨基酸获得的具有在中性pH范围内强于3.2微摩尔的人FcRn结合活性的抗原结合分子;

(b) 得到编码抗原结合分子的基因,其中在(a)中制备的人FcRn结合结构域与抗原结合结构域连接;和

(c) 使用(b)中制备的基因产生抗原结合分子。

49. 用于产生抗原结合分子的方法,所述方法包括以下步骤:

(a) 选择与在改变在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性的抗原结合分子的人FcRn结合结构域中的至少一个氨基酸之前相比,在中性pH范围内具有较强的人FcRn结合活性的抗原结合分子;

(b) 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,并选择与在酸性pH范围内相比在中性pH范围内具有较强抗原结合活性的抗原结合分子;

(c) 获得编码抗原结合分子的基因,其中在(a)和(b)中制备的人FcRn结合结构域与抗原结合结构域连接;和

(d) 使用在(c)中制备的基因产生抗原结合分子。

50. 用于产生抗原结合分子的方法,所述方法包括以下步骤:

(a) 选择与在改变在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性的抗原结合分子的人FcRn结合结构域中的至少一个氨基酸之前相比,在中性pH范围内具有较强的人FcRn结合活性的抗原结合分子;

(b) 选择与在酸性pH范围内相比在中性pH范围内具有较强抗原结合活性的抗原结合分子;

(c) 获得编码抗原结合分子的基因,其中在(a)和(b)中制备的人FcRn结合结构域与抗原结合结构域连接;和

(d) 使用在(c)中制备的基因产生抗原结合分子。

51. 通过权利要求48-50中任一项的生产方法产生的抗原结合分子。

52. 用于筛选抗原结合分子的方法,所述方法包括以下步骤:

(a) 选择通过改变抗原结合分子的人FcRn结合结构域中的至少一个氨基酸获得的具有在中性pH范围内强于3.2微摩尔的人FcRn结合活性的抗原结合分子;

(b) 得到编码抗原结合分子的基因,其中在(a)中制备的人FcRn结合结构域与抗原结合结构域连接;和

(c) 使用(b)中制备的基因产生抗原结合分子。

53. 用于筛选抗原结合分子的方法,所述方法包括以下步骤:

(a) 选择与在改变在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性的抗原结合分子的人FcRn结合结构域中的至少一个氨基酸之前相比,在中性pH范围内具有较强的人FcRn结合活性的抗原结合分子;

(b) 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,并选择与在酸性pH范围内相比在中性pH范围内具有较强抗原结合活性的抗原结合分子;

(c) 获得编码抗原结合分子的基因,其中在(a)和(b)中制备的人FcRn结合结构域与抗原结合结构域连接;和

(d) 使用在(c)中制备的基因产生抗原结合分子。

54. 用于筛选抗原结合分子的方法,所述方法包括以下步骤:

(a) 选择与在改变在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性的抗原结合分子的人FcRn结合结构域中的至少一个氨基酸之前相比,在中性pH范围内具有较强的人FcRn结合活性的抗原结合分子;

(b) 选择与在酸性pH范围内相比在中性pH范围内具有较强抗原结合活性的抗原结合分子;

(c) 获得编码抗原结合分子的基因,其中在(a)和(b)中制备的人FcRn结合结构域与抗原结合结构域连接;和

(d) 使用在(c)中制备的基因产生抗原结合分子。

55. 权利要求30-54中任一项的方法,其中所述抗原结合结构域包含与受体结合的人工配体。

56. 权利要求30-54中任一项的方法,其中所述抗原结合结构域包含与配体结合的人工受体。

57. 权利要求30-54中任一项的方法,其中所述抗原结合分子为抗体。

58. 用于产生包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域的抗原结合分子的方法,所述抗原结合分子在中性pH范围内具有人FcRn结合活性,其中在中性pH范围内的人FcRn结合活性强于KD 2.3微摩尔。

促进抗原清除的与FcRn的亲合力得到改进的抗体

[0001] 本申请是国际申请号PCT/JP2011/001888,国际申请日2011年3月30日,中国申请号201180026699.3,发明名称为“促进抗原清除的与FcRn的亲合力得到改进的抗体”的专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及:

[0003] 用于促进抗原结合分子介导的细胞对抗原摄入的方法;

[0004] 用于增加单个抗原结合分子可与之结合的抗原的数目的方法;

[0005] 用于通过给予抗原结合分子促进血浆抗原浓度降低的方法;

[0006] 用于改进抗原结合分子的药代动力学的方法;

[0007] 用于降低血浆的总抗原浓度或游离抗原浓度的方法;

[0008] 提高细胞对抗原摄入的抗原结合分子;

[0009] 结合抗原的数目增加的抗原结合分子;

[0010] 通过给予所述分子能够促进血浆抗原浓度降低的抗原结合分子;

[0011] 具有改进的药代动力学的抗原结合分子;

[0012] 包含所述抗原结合分子的药物组合物;

[0013] 用于产生上述这些的方法等。

[0014] 优先权

[0015] 本发明要求2010年3月30日提交的日本专利申请号2010-079667和2010年11月9日提交的日本专利申请号2010-250830的权益,所述申请的整个内容通过引用结合到本文中。

背景技术

[0016] 抗体作为药物正引起注意,因为它们在血浆中十分稳定,少有副作用。目前,市场上可获得许多IgG型抗体药物,且许多抗体药物目前正在开发之中(NPL 1和2)。同时,已报告了适用于第二代抗体药物的各种技术,包括提高效应子功能、抗原结合能力、药代动力学和稳定性的技术,以及降低免疫原性风险的技术(NPL 3)。总的说来,抗体药物的必需剂量很高。这又产生了问题,例如高生产成本以及生产皮下制剂的困难。理论上,可通过改进抗体药代动力学或改进抗体与抗原之间的亲合力来减少抗体药物的剂量。

[0017] 文献报告了在恒定区采用氨基酸的人工取代来改进抗体药代动力学的方法(NPL 4和5)。同样地,报告了亲合力成熟作为提高抗原结合能力或抗原中和活性的技术(NPL 6)。该技术能够通过将氨基酸突变引入可变区的CDR区或这样的区来提高抗原结合活性。抗原结合能力的提高能够使体外生物活性提高或使剂量降低,还能够使体内功效提高(NPL 7)。

[0018] 单个抗体分子的抗原中和能力取决于其亲合力。通过提高亲合力,抗原可被较少量的抗体中和。可采用多种方法提高抗体亲合力(NPL 6)。此外,如果可通过使抗体与抗原共价结合以使亲合力无限,则单个抗体分子可中和一个抗原分子(二价抗体可中和两个抗原分子)。然而,一个抗体针对一个抗原(一个二价抗体针对两个抗原)的化学计算量中和是

现有方法的极限值,因此不可能用比抗原的量少的抗体的量来完全中和抗原。换句话说,亲和力和提高作用具有极限值(NPL9)。为了延长中和抗体的中和作用持续一定时间,必须以比同期机体所产生的抗原的量高的剂量给予抗体。仅凭上述抗体药代动力学或亲和力成熟技术的改进,在降低所需抗体剂量方面仍存在如此限制。因此,为了用比抗原量少的抗体量来保持抗体的抗原中和作用持续目标时间,单个抗体必须中和多个抗原。已报告了以pH依赖性方式与抗原结合的抗体作为实现上述目的的新方法(PTL 1)。在血浆中的中性条件下与抗原牢固结合且在体内中的酸性条件下与抗原解离的pH依赖性抗原结合抗体,可在体内中与抗原解离。当与抗原解离的pH依赖性抗原结合抗体通过FcRn再循环至血浆时,它可再次与另一抗原结合。因此,单个pH依赖性抗原结合抗体可与许多抗原重复结合。

[0019] 此外,与通过FcRn结合再循环的抗体相比,抗原的血浆滞留非常短。当具有这种长期血浆滞留的抗体与抗原结合时,抗原-抗体复合体的血浆滞留时间与抗体的血浆滞留时间一样延长。因此,抗原的血浆滞留通过与抗体结合而延长,因此血浆抗原浓度增加。

[0020] IgG抗体由于FcRn结合而具有较长的血浆滞留时间。只在酸性条件(pH 6.0)下观察到IgG与FcRn之间的结合。相比之下,在中性条件(pH 7.4)下,几乎未检出结合。IgG抗体以非特异性方式被摄入细胞中。抗体通过在体内酸性条件下与体内FcRn结合而返回细胞表面,然后在血浆中性条件下与FcRn解离。如果通过将突变引入IgG Fc结构域以使在酸性条件下丧失FcRn结合,则从体内再循环至血浆的抗体不存在,这明显减少血浆中的抗体滞留时间。一种已报告的用于改进IgG抗体血浆滞留的方法是提高酸性条件下的FcRn结合。将氨基酸突变引入IgG抗体的Fc结构域以改进酸性条件下的FcRn结合。这提高了从体内再循环至血浆的效率,导致血浆滞留改进。氨基酸取代的重要需求是不增加在中性条件下的FcRn结合。如果IgG抗体在中性条件下与FcRn结合,则通过在体内酸性条件下与FcRn结合而返回细胞表面的抗体,在血浆中性条件下不与FcRn解离。在这种情况下,在一定程度上丧失血浆滞留,因为IgG抗体不再循环至血浆中。例如如J Immunol. (2002) 169 (9):5171-80所述,据报告,通过引入氨基酸取代使得所得抗体能够在中性条件(pH7.4)下与小鼠FcRn结合的修饰IgG1抗体,当给予小鼠时,具有非常差的血浆滞留。此外,如J Immunol. (2009) 182 (12):7663-71;J Biol Chem.2007年1月19日;282 (3):1709-17;以及J Immunol.2002年11月1日;169 (9):5171-80中所述,通过引入氨基酸取代对IgG1抗体进行修饰,使得所得抗体在酸性条件(pH6.0)下具有改进的人FcRn结合,同时变得能够在中性条件(pH 7.4)下与人FcRn结合。据报告,当给予食蟹猴(cynomolgus monkey)时,所得抗体在血浆滞留方面既未显示改进,也未显示变化。因此,用于改进抗体功能的抗体工程技术只集中在通过提高在酸性条件下的人FcRn结合而非提高在中性条件(pH 7.4)下的结合而对抗体血浆滞留进行改进。迄今,没有报告描述通过将氨基酸取代引入IgG抗体的Fc结构域而改进中性条件(pH 7.4)下的人FcRn结合的优势。即使抗体的抗原亲和力得到改进,血浆中的抗原消除也不可提高。据报告,与典型的抗体相比,上述pH依赖性抗原结合抗体作为用于提高抗原从血浆中消除的方法更有效(PTL 1)。

[0021] 因此,与典型的抗体相比,单个pH依赖性抗原结合抗体与许多抗原结合,并能够促进从血浆中消除抗原。因此,pH依赖性抗原结合抗体具有通过典型抗体无法实现的作用。然而,迄今,有关用于进一步改进pH依赖性抗原结合抗体与抗原重复结合的能力并提高抗原从血浆中消除的作用的抗体工程改造方法尚无报告。

[0022] 下面给出与本发明有关的现有技术文献:

[0023] 引用列表

[0024] 专利文献

[0025] [PTL 1]WO 2009/125825,ANTIGEN-BINDING MOLECULE CAPABLE OF BINDING TO TWO OR MORE ANTIGEN MOLECULES REPEATEDLY(能够与两个或更多个抗原分子重复结合的抗原结合分子)

[0026] 非专利文献

[0027] [NPL 1]Monoclonal antibody successes in the clinic(临床中单克隆抗体的成功应用),Janice M Reichert,Clark J Rosensweig,Laura B Faden和Matthew C Dewitz,Nature Biotechnology 23,1073-1078(2005)

[0028] [NPL 2]Pavlou AK,Belsey MJ.,The therapeutic antibodies market to 2008(2008年的治疗性抗体市场),Eur J Pharm Biopharm.2005年4月;59(3):389-96

[0029] [NPL 3]Kim SJ,Park Y,Hong HJ.,Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies(用于治疗性抗体开发的抗体工程改造),Mol Cells.2005年8月31日;20(1):17-29.综述

[0030] [NPL 4]Hinton PR,Xiong JM,Johlf M,Tang MT,Keller S,Tsurushita N.,An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life(具有较长血清半衰期的工程改造的人IgG1抗体),J Immunol.2006年1月1日;176(1):346-56

[0031] [NPL 5]Ghetie V,Popov S,Borvak J,Radu C,Matesoi D,Medesan C,Ober RJ,Ward ES.,Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis(通过随机诱变增加IgG片段的血清存留),Nat Biotechnol.1997年7月;15(7):637-40

[0032] [NPL 6]Proc Natl Acad Sci U S A.2005年6月14日;102(24):8466-71.Epub 2005年6月6日.A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries(通过利用组合文库大大改进抗体亲和力的通用方法).Rajpal A,Beyaz N,Haber L,Cappuccilli G,Yee H,Bhatt RR,Takeuchi T,Lerner RA,Crea R

[0033] [NPL 7]Wu H,Pfarr DS,Johnson S,Brewah YA,Woods RM,Patel NK,White WI,Young JF,Kiener PA.Development of Motavizumab,an Ultra-potent Antibody for the Prevention of Respiratory Syncytial Virus Infection in the Upper and Lower Respiratory Tract(预防上下呼吸道的呼吸道合胞体病毒感染的超效抗体莫他珠单抗的开发).J Mol Biol.(2007) 368:652-665

[0034] [NPL 8]Hanson CV,Nishiyama Y,Paul S.Catalytic antibodies and their applications(催化抗体及其应用).Curr Opin Biotechnol.2005年12月;16(6):631-6

[0035] [NPL9]Rathanaswami P,Roalstad S,Roskos L,Su QJ,Lackie S,Babcook J.Demonstration of an in vivo generated sub-picomolar affinity fully human monoclonal antibody to interleukin-8(体内产生的对抗白介素-8的亚皮摩尔亲和力完全人单克隆抗体的论证).Biochem Biophys Res Commun.2005年9月;334(4):1004-13

[0036] 发明概述

[0037] 技术问题

[0038] 鉴于上述情况实现了本发明。本发明的目的是提供：用于通过使用抗原结合分子促进细胞对抗原摄入的方法、用于增加单个抗原结合分子可与之结合的抗原的数目的方法、用于通过给予抗原结合分子促进血浆抗原浓度降低的方法、用于改进抗原结合分子的药代动力学的方法、促进细胞对抗原摄入的抗原结合分子、结合抗原的数目增加的抗原结合分子、通过给药能够促进血浆抗原浓度降低的抗原结合分子、具有改进的药代动力学的抗原结合分子、包含所述抗原结合分子的药物组合物和用于产生上述这些的方法。

[0039] 问题的解决方案

[0040] 本发明人对以下方法进行了专心致志的研究：用于通过抗原结合分子(具有抗原结合能力的分子,例如多肽)促进细胞对抗原摄入的方法、用于让抗原结合分子与抗原重复结合的方法、用于通过给予抗原结合分子促进血浆抗原浓度降低的方法,和用于改进抗原结合分子的血浆滞留的方法。因此,本发明人发现在早期内体pH(early endosomal pH)下具有人FcRn结合能力且在血浆pH下具有高于完整人TgG型免疫球蛋白活性的人FcRn结合活性的抗原结合分子可促进细胞对抗原的摄入。本发明人还发现,通过使用与在血浆pH下相比,在早期内体pH下具有较弱抗原结合活性的抗原结合分子,可进一步提高抗原结合分子介导的细胞对抗原的摄入,且可增加可与单个抗原结合分子结合的抗原数目;通过给予这类抗原结合分子,可促进血浆抗原浓度的降低;且可改进抗原结合分子的药代动力学。

[0041] 具体地讲,本发明涉及:

[0042] 用于促进抗原结合分子介导的细胞对抗原摄入的方法;

[0043] 用于增加单个抗原结合分子可与之结合的抗原的数目的方法;

[0044] 用于通过给予抗原结合分子促进血浆抗原浓度降低的方法;

[0045] 用于改进抗原结合分子的药代动力学的方法;

[0046] 用于降低血浆的总抗原浓度或游离抗原浓度的方法;

[0047] 提高细胞对抗原摄入的抗原结合分子;

[0048] 结合抗原的数目增加的抗原结合分子;

[0049] 通过给予所述分子能够促进血浆抗原浓度降低的抗原结合分子;

[0050] 具有改进的药代动力学的抗原结合分子;

[0051] 包含所述抗原结合分子的药物组合物;

[0052] 用于产生上述这些的方法等。更具体地讲,本发明提供:

[0053] [1]包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域的抗原结合分子,其在酸性和中性pH范围内具有人FcRn结合活性,其中在中性pH范围内人FcRn结合活性强于3.2微摩尔;

[0054] [2]包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域的抗原结合分子,其中性pH范围内具有人FcRn结合活性,其中在中性pH范围内的人FcRn结合活性是完整人IgG的28倍;

[0055] [3]包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域的抗原结合分子,其中性pH范围内具有人FcRn结合活性,其中在中性pH范围内的人FcRn结合活性强于2.3微摩尔;

[0056] [4]包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域的抗原结合分子,其中性pH范围内具有人FcRn结合活性,其中在中性pH范围内的人FcRn结合活性是完整人IgG的38倍;

[0057] [5][1]-[4]中任一个的抗原结合分子,其中中性pH范围为pH7.0-8.0;

[0058] [6]包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域的抗原结合分子,其中将抗原结合

分子给予非人动物后的血浆总抗原浓度低于将参比抗原结合分子给予非人动物后的血浆总抗原浓度,所述参比抗原结合分子包含相同的抗原结合结构域和完整人IgG Fc结构域作为人FcRn结合结构域;

[0059] [7]抗原结合分子,其中将抗原结合分子给予非人动物后的血浆抗原浓度低于自未被给予抗原结合分子的非人动物得到的血浆总抗原浓度;

[0060] [8]包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域的抗原结合分子,其中如下计算的所述抗原结合分子的抗原/抗原结合分子摩尔比率(C):

[0061] $C=A/B$,

[0062] 低于如下计算的抗原结合分子(其包含相同抗原结合结构域和完整人IgG Fc结构域作为人FcRn结合结构域)的抗原/抗原结合分子摩尔比率(C');

[0063] $C'=A'/B'$,

[0064] 其中;

[0065] A为将抗原结合分子给予非人动物后血浆中的总抗原浓度,

[0066] B为将抗原结合分子给予非人动物后抗原结合分子的血浆浓度,A'为将参比抗原结合分子给予非人动物后血浆中的总抗原浓度,

[0067] B'为将参比抗原结合分子给予非人动物后抗原结合分子的血浆浓度;

[0068] [9][6]-[8]中任一个的抗原结合分子,其中非人动物是人FcRn转基因小鼠;

[0069] [10][6]-[9]中任一个的抗原结合分子,其中血浆抗原浓度是长期血浆总抗原浓度;

[0070] [11][6]-[9]中任一个的抗原结合分子,其中血浆抗原浓度是短期血浆总抗原浓度;

[0071] [12]包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域的抗原结合分子,其在酸性和中性pH范围内具有人FcRn结合活性,其中在中性pH范围内的人FcRn结合活性强于完整人IgG的结合活性;

[0072] [13][1]-[11]中任一个的抗原结合分子,其中在酸性pH范围内抗原结合结构域的抗原结合活性低于在中性pH范围内的抗原结合活性;

[0073] [14][12]或[13]的抗原结合分子,其中以KD(在酸性pH范围内)/KD(在中性pH范围内)的值计,酸性pH范围和中性pH范围内的抗原结合活性的比率至少为2;

[0074] [15][12]-[14]中任一个的抗原结合分子,其包含抗原结合结构域的氨基酸突变,其包含用组氨酸取代抗原结合结构域的至少一个氨基酸或插入至少一个组氨酸;

[0075] [16][12]-[14]中任一个的抗原结合分子,其中抗原结合结构域获自抗原结合结构域文库;

[0076] [17][1]-[16]中任一个的抗原结合分子,其包含因用不同氨基酸取代亲本IgG的Fc结构域中的至少一个氨基酸而产生的Fc结构域作为人FcRn结合结构域;

[0077] [18][1]-[17]中任一个的抗原结合分子,其中人FcRn结合结构域是这样的人FcRn结合结构域,其包含用不同氨基酸取代选自亲本IgG的Fc结构域中的以下位置氨基酸中的至少一个氨基酸的氨基酸序列:237、238、239、248、250、252、254、255、256、257、258、265、270、286、289、297、298、303、305、307、308、309、311、312、314、315、317、325、332、334、360、376、380、382、384、385、386、387、389、424、428、433、434和436(EU编号);

[0078] [19][1]-[18]中任一个的抗原结合分子,其包含在亲本IgG的Fc结构域中包含氨基酸取代的人FcRn结合结构域,其包含选自以下的至少一个氨基酸取代(EU编号):

[0079] 237位上的Gly被取代为Met的氨基酸取代;

[0080] 238位上的Pro被取代为Ala的氨基酸取代;

[0081] 239位上的Ser被取代为Lys的氨基酸取代;

[0082] 248位上的Lys被取代为Ile的氨基酸取代;

[0083] 250位上的Thr被取代为Ala、Phe、Ile、Met、Gln、Ser、Val、Trp或Tyr的氨基酸取代;

[0084] 252位上的Met被取代为Phe、Trp或Tyr的氨基酸取代;

[0085] 254位上的Ser被取代为Thr的氨基酸取代;

[0086] 255位上的Arg被取代为Glu的氨基酸取代;

[0087] 256位上的Thr被取代为Asp、Glu或Gln的氨基酸取代;

[0088] 257位上的Pro被取代为Ala、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr或Val的氨基酸取代;

[0089] 258位上的Glu被取代为His的氨基酸取代;

[0090] 265位上的Asp被取代为Ala的氨基酸取代;

[0091] 270上的Asp被取代为Phe的氨基酸取代;

[0092] 286位上的Asn被取代为Ala或Glu的氨基酸取代;

[0093] 289位上的Thr被取代为His的氨基酸取代;

[0094] 297位上的Asn被取代为Ala的氨基酸取代;

[0095] 298上的Ser被取代为Gly的氨基酸取代;

[0096] 303位上的Val被取代为Ala的氨基酸取代;

[0097] 305位上的Val被取代为Ala的氨基酸取代;

[0098] 307位上的Thr被取代为Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、Trp或Tyr的氨基酸取代;

[0099] 308位上的Val被取代为Ala、Phe、Ile、Leu、Met、Pro、Gln或Thr的氨基酸取代;

[0100] 309位上的Leu或Val被取代为Ala、Asp、Glu、Pro或Arg的氨基酸取代;

[0101] 311位上的Gln被取代为Ala、His或Ile的氨基酸取代;

[0102] 312位上的Asp被取代为Ala或His的氨基酸取代;

[0103] 314位上的Leu被取代为Lys或Arg的氨基酸取代;

[0104] 315位上的Asn被取代为Ala或His的氨基酸取代;

[0105] 317位上的Lys被取代为Ala的氨基酸取代;

[0106] 325位上的Asn被取代为Gly的氨基酸取代;

[0107] 332位上的Ile被取代为Val的氨基酸取代;

[0108] 334位上的Lys被取代为Leu的氨基酸取代;

[0109] 360位上的Lys被取代为His的氨基酸取代;

[0110] 376位上的Asp被取代为Ala的氨基酸取代;

[0111] 380位上的Glu被取代为Ala的氨基酸取代;

[0112] 382位上的Glu被取代为Ala的氨基酸取代;

[0113] 384位上的Asn或Ser被取代为Ala的氨基酸取代;

[0114] 385位上的Gly被取代为Asp或His的氨基酸取代;

- [0115] 386位上的Gln被取代为Pro的氨基酸取代；
- [0116] 387位上的Pro被取代为Glu的氨基酸取代；
- [0117] 389位的Asn被取代为Ala或Ser的氨基酸取代；
- [0118] 424位上的Ser被取代为Ala的氨基酸取代；
- [0119] 428位上的Met被取代为Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr的氨基酸取代；
- [0120] 433位上的His被取代为Lys的氨基酸取代；
- [0121] 434位上的Asn被取代为Ala、Phe、His、Ser、Trp或Tyr的氨基酸取代；
- [0122] 和436位上的Tyr被取代为His或Phe的氨基酸取代；
- [0123] [20][1]-[18]中任一个的抗原结合分子，其人FcRn结合结构域包含选自亲本IgG的Fc结构域中的以下至少一个氨基酸(EU编号)：
- [0124] 氨基酸位置237上的Met；
- [0125] 氨基酸位置238上的Ala；
- [0126] 氨基酸位置239上的Lys；
- [0127] 氨基酸位置248上的Ile；
- [0128] 氨基酸位置250上的Ala、Phe、Ile、Met、Gln、Ser、Val、Trp或Tyr；
- [0129] 氨基酸位置252上的Phe、Trp或Tyr；
- [0130] 氨基酸位置254上的Thr；
- [0131] 氨基酸位置255上的Glu；
- [0132] 氨基酸位置256上的Asp、Glu或Gln；
- [0133] 氨基酸位置257上的Ala、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr或Val；
- [0134] 氨基酸位置258上的His；
- [0135] 氨基酸位置265上的Ala；
- [0136] 氨基酸位置270上的Phe；
- [0137] 氨基酸位置286上的Ala或Glu；
- [0138] 氨基酸位置289上的His；
- [0139] 氨基酸位置297上的Ala；
- [0140] 氨基酸位置298上的Gly；
- [0141] 氨基酸位置303上的Ala；
- [0142] 氨基酸位置305上的Ala；
- [0143] 氨基酸位置307上的Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、Trp或Tyr；
- [0144] 氨基酸位置308上的Ala、Phe、Ile、Leu、Met、Pro、Gln或Thr；
- [0145] 氨基酸位置309上的Ala、Asp、Glu、Pro或Arg；
- [0146] 氨基酸位置311上的Ala、His或Ile；
- [0147] 氨基酸位置312上的Ala或His；
- [0148] 氨基酸位置314上的Lys或Arg；
- [0149] 氨基酸位置315上的Ala或His；
- [0150] 氨基酸位置317上的Ala；

- [0151] 氨基酸位置325上的Gly；
- [0152] 氨基酸位置332上的Val；
- [0153] 氨基酸位置334上的Leu；
- [0154] 氨基酸位置360上的His；
- [0155] 氨基酸位置376上的Ala；
- [0156] 氨基酸位置380上的Ala；
- [0157] 氨基酸位置382上的Ala；
- [0158] 氨基酸位置384上的Ala；
- [0159] 氨基酸位置385上的Asp或His；
- [0160] 氨基酸位置386上的Pro；
- [0161] 氨基酸位置387上的Glu；
- [0162] 氨基酸位置389上的Ala或Ser；
- [0163] 氨基酸位置424上的Ala；
- [0164] 氨基酸位置428上的Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr；
- [0165] 氨基酸位置433位置上的Lys；
- [0166] 氨基酸位置434上的Ala、Phe、His、Ser、Trp或Tyr；
- [0167] 和氨基酸位置436上的His或Phe；
- [0168] [21][18]-[20]中任一个的抗原结合分子，其中亲本IgG选自获自非人动物的IgG；
- [0169] [22][18]-[20]中任一个的抗原结合分子，其中亲本IgG是人IgG；
- [0170] [23][1]-[22]中任一个的抗原结合分子，其具有拮抗活性；
- [0171] [24][1]-[23]的抗原结合分子，其与膜抗原或可溶性抗原结合；
- [0172] [25][1]-[24]中任一个的抗原结合分子，其中抗原结合结构域包含与受体结合的人工配体；
- [0173] [26][1]-[24]中任一个的抗原结合分子，其中抗原结合结构域包含与配体结合的人工受体；
- [0174] [27][1]-[24]中任一个的抗原结合分子，其是抗体；
- [0175] [28][27]的抗原结合分子，其中抗体选自嵌合抗体、人源化抗体或人抗体；
- [0176] [29]药物组合物，其包含[1]-[28]中任一个的抗原结合分子；
- [0177] [30]用于通过提高其中性pH范围内的人FcRn结合活性而促进抗原结合分子介导的细胞对抗原摄入的方法，其中抗原结合分子包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域，并在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性；
- [0178] [31]用于通过提高其中性pH范围内的人FcRn结合活性和降低其在酸性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而促进抗原结合分子介导的细胞对抗原摄入的方法，其中抗原结合分子包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域，并在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性；
- [0179] [32]用于通过提高其中性pH范围内的人FcRn结合活性而增加单个抗原结合分子可与之结合的抗原的数目的方法，其中抗原结合分子包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域，并在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性；

[0180] [33]用于通过提高其在中性pH范围内的人FcRn结合活性且降低其在酸性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而增加单个抗原结合分子可与之结合的抗原的数目的方法,其中抗原结合分子包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域,并在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性;

[0181] [34]用于通过提高其在中性pH范围内的人FcRn结合活性而提高抗原结合分子从血浆中消除抗原的能力的方法,其中抗原结合分子包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域,并在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性;

[0182] [35]用于通过提高其在中性pH范围内的人FcRn结合活性并降低其在酸性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而提高抗原结合分子从血浆中消除抗原的能力的方法,其中抗原结合分子包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域,并在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性;

[0183] [36]用于通过提高其在中性pH范围内的人FcRn结合活性而改进抗原结合分子的药代动力学的方法,其中抗原结合分子包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域,并在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性;

[0184] [37]用于通过提高其在中性pH范围内的人FcRn结合活性并降低其在酸性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而改进抗原结合分子的药代动力学的方法,其中抗原结合分子包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域,并在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性;

[0185] [38]用于促进抗原结合分子与在细胞外与抗原结合分子结合的抗原胞内解离的方法,这通过提高其在中性pH范围内的人FcRn结合活性且降低其在酸性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来进行,其中抗原结合分子包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域,并在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性;

[0186] [39]用于促进以抗原结合的形式摄入细胞的抗原结合分子以无抗原形式胞外释放的方法,这通过提高其在中性pH范围内的人FcRn结合活性且降低其在酸性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来进行,其中抗原结合分子包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域,并在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性;

[0187] [40]用于通过提高其在中性pH范围内的人FcRn结合活性而降低血浆中总血浆抗原浓度或游离血浆抗原浓度的方法,其中抗原结合分子包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域,并在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性;

[0188] [41]用于降低血浆中总血浆抗原浓度或游离血浆抗原浓度的方法,这通过提高其在中性pH范围内的人FcRn结合活性且降低其在酸性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来进行,其中抗原结合分子包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域,并在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性;

[0189] [42] [30] - [41]中任一个的方法,其中酸性pH范围为pH 5.5-pH6.5,中性pH范围为pH 7.0-pH 8.0;

[0190] [43] [30] - [41]中任一个的方法,其中在中性pH范围内人FcRn结合活性的提高是通过用不同氨基酸取代人FcRn结合结构域的亲本IgG Fc结构域中的至少一个氨基酸而引起的增加;

[0191] [44] [30] - [41]中任一个的方法,其中在中性pH范围内人FcRn结合活性的提高是

通过用不同氨基酸取代选自人FcRn结合结构域的亲本IgG Fc结构域中的以下位置氨基酸中的至少一个氨基酸而引起的增加：237、238、239、248、250、252、254、255、256、257、258、265、270、286、289、297、298、303、305、307、308、309、311、312、314、315、317、325、332、334、360、376、380、382、384、385、386、387、389、424、428、433、434和436 (EU编号)；

[0192] [45] [31]、[33]、[35]、[37] - [39]和[41]中任一个的方法，其中通过用组氨酸取代抗原结合分子的至少一个氨基酸或插入至少一个组氨酸，将酸性pH范围内抗原结合分子的抗原结合活性降低至低于在中性pH范围内的抗原结合活性；

[0193] [46] [31]、[33]、[35]、[37] - [39]和[41]中任一个的方法，其中抗原结合结构域获自抗原结合结构域文库；

[0194] [47] [31]、[33]、[35]、[37] - [39]和[41]中任一个的方法，其中抗原结合活性的降低通过KD(在酸性pH范围内)/KD(在中性pH范围内)的值的增加来表示，所述值是相对于组氨酸取代或插入之前酸性pH范围和中性pH范围内的抗原结合活性的比率；

[0195] [48]用于产生抗原结合分子的方法，所述方法包括以下步骤：

[0196] (a) 选择通过改变抗原结合分子的人FcRn结合结构域中的至少一个氨基酸获得的具有在中性pH范围内强于3.2微摩尔的人FcRn结合活性的抗原结合分子；

[0197] (b) 得到编码抗原结合分子的基因，其中在(a)中制备的人FcRn结合结构域与抗原结合结构域连接；和

[0198] (c) 使用(b)中制备的基因产生抗原结合分子；

[0199] [49]用于产生抗原结合分子的方法，所述方法包括以下步骤：

[0200] (a) 选择与在改变在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性的抗原结合分子的人FcRn结合结构域中的至少一个氨基酸之前相比，在中性pH范围内具有较强的人FcRn结合活性的抗原结合分子；

[0201] (b) 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，并选择与在酸性pH范围内相比在中性pH范围内具有较强抗原结合活性的抗原结合分子；

[0202] (c) 获得编码抗原结合分子的基因，其中在(a)和(b)中制备的人FcRn结合结构域与抗原结合结构域连接；和

[0203] (d) 使用在(c)中制备的基因产生抗原结合分子；和

[0204] [50]用于产生抗原结合分子的方法，所述方法包括以下步骤：

[0205] (a) 选择与在改变在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性的抗原结合分子的人FcRn结合结构域中的至少一个氨基酸之前相比，在中性pH范围内具有较强的人FcRn结合活性的抗原结合分子；

[0206] (b) 选择与在酸性pH范围内相比在中性pH范围内具有较强抗原结合活性的抗原结合分子；

[0207] (c) 获得编码抗原结合分子的基因，其中在(a)和(b)中制备的人FcRn结合结构域与抗原结合结构域连接；和

[0208] (d) 使用在(c)中制备的基因产生抗原结合分子；

[0209] [51]通过[48] - [50]中任一个的生产方法产生的抗原结合分子；

[0210] [52]用于筛选抗原结合分子的方法，所述方法包括以下步骤：

[0211] (a) 选择通过改变抗原结合分子的人FcRn结合结构域中的至少一个氨基酸获得的

具有在中性pH范围内强于3.2微摩尔的人FcRn结合活性的抗原结合分子；

[0212] (b) 得到编码抗原结合分子的基因，其中在 (a) 中制备的人FcRn结合结构域与抗原结合结构域连接；和

[0213] (c) 使用 (b) 中制备的基因产生抗原结合分子；

[0214] [53] 用于筛选抗原结合分子的方法，所述方法包括以下步骤：

[0215] (a) 选择与在改变在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性的抗原结合分子的人FcRn结合结构域中的至少一个氨基酸之前相比，在中性pH范围内具有较强的人FcRn结合活性的抗原结合分子；

[0216] (b) 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，并选择与在酸性pH范围内相比在中性pH范围内具有较强抗原结合活性的抗原结合分子；

[0217] (c) 获得编码抗原结合分子的基因，其中在 (a) 和 (b) 中制备的人FcRn结合结构域与抗原结合结构域连接；和

[0218] (d) 使用在 (c) 中制备的基因产生抗原结合分子；

[0219] [54] 用于筛选抗原结合分子的方法，所述方法包括以下步骤：

[0220] (a) 选择与在改变在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性的抗原结合分子的人FcRn结合结构域中的至少一个氨基酸之前相比，在中性pH范围内具有较强的人FcRn结合活性的抗原结合分子；

[0221] (b) 选择与在酸性pH范围内相比在中性pH范围内具有较强抗原结合活性的抗原结合分子；

[0222] (c) 获得编码抗原结合分子的基因，其中在 (a) 和 (b) 中制备的人FcRn结合结构域与抗原结合结构域连接；和

[0223] (d) 使用在 (c) 中制备的基因产生抗原结合分子；

[0224] [55] [30] - [54] 中任一个的方法，其中抗原结合结构域包含与受体结合的人工配体；

[0225] [56] [30] - [54] 中任一个的方法，其中抗原结合结构域包含与配体结合的人工受体；和

[0226] [57] [30] - [54] 中任一个的方法，其中抗原结合分子为抗体。

[0227] 发明的有益效果

[0228] 本发明提供：

[0229] 用于促进抗原结合分子介导的细胞对抗原摄入的方法；用于增加单个抗原结合分子可与之结合的抗原的数目的方法；和用于通过给予抗原结合分子促进血浆抗原浓度降低的方法。当抗原结合分子介导的细胞对抗原的摄入受促进时，可通过给予这类抗原结合分子来促进血浆抗原浓度的降低，并且可改进抗原结合分子的药代动力学以增加单个抗原结合分子可与之结合的抗原的数目。因此，抗原结合分子可产生比普通抗原结合分子更优良的体内作用。

[0230] 附图简述

[0231] 图1在图中显示将抗人IL-6受体抗体给予人FcRn转基因小鼠 (品系276) 后可溶形式的人IL-6受体的血浆浓度的时程，其中可溶形式人IL-6受体的血浆浓度是恒定的 (稳态输注模型)。

[0232] 图2是显示IgG抗体分子与内体中可溶性抗原的解离引起抗原消除加强,导致与另一抗原新一轮结合的示意图。

[0233] 图3在图中显示人FcRn转基因小鼠中血浆抗体浓度的时程。

[0234] 图4在图中显示人FcRn转基因小鼠中可溶形式的人IL-6受体的血浆浓度的时程。

[0235] 图5在图中显示正常小鼠中血浆抗体浓度的时程。

[0236] 图6在图中显示正常小鼠中可溶形式的人IL-6受体的血浆浓度的时程。

[0237] 图7在图中显示正常小鼠中人IL-6受体的未结合可溶形式的血浆浓度的时程。

[0238] 图8在图中显示人FcRn转基因小鼠中可溶形式的人IL-6受体的血浆浓度的时程。

[0239] 图9在图中显示以低剂量(0.01mg/kg)或1 m.g/kg给予Fv4-IgG1-F14后可溶形式的人IL-6受体的血浆浓度的时程。

[0240] 图10在图中显示以低剂量(0.01mg/kg)或1mg/kg给予Fv4-IgG1-F14后血浆抗体浓度的时程。

[0241] 图11在图中显示在将抗人IL-6受体抗体给予正常小鼠(其中可溶形式人IL-6受体的血浆浓度是恒定的)后,可溶形式的人IL-6受体的血浆浓度的时程。

[0242] 图12在图中显示将hsIL-6R和抗人IL-6受体抗体共注射给人FcRn转基因小鼠(品系276)后血浆抗体浓度的时程。

[0243] 图13在图中显示将hsIL-6R和抗人IL-6受体抗体共注射给人FcRn转基因小鼠(品系276)后,可溶形式的人IL-6受体的血浆浓度的时程。

[0244] 图14描述了在pH 7.0下Fc变体与人FcRn的结合亲和力之间的关系以及将hsIL-6R和抗人IL-6受体抗体共注射给人FcRn转基因小鼠(品系276)后第1天的血浆hsIL-6R浓度。

[0245] 图15描述了在pH 7.0下Fc变体与人FcRn的结合亲和力之间的关系以及将hsIL-6R和抗人IL-6受体抗体共注射给人FcRn转基因小鼠(品系276)后第1天的血浆抗体浓度。

[0246] 图16描述了将hsIL-6R和抗人IL-6受体抗体共注射给人FcRn转基因小鼠(品系276)后,抗原/抗体摩尔比率(C值)的时程。

[0247] 图17描述了在pH 7.0下Fc变体与人FcRn的结合亲和力之间的关系以及将hsIL-6R和抗人IL-6受体抗体共注射给人FcRn转基因小鼠(品系276)后第1天的抗原/抗体摩尔比率(C值)的时程。

[0248] 图18在图中显示在以低剂量(0.01或0.2mg/kg)或1mg/kg将Fv4-IgG1-F14给予人FcRn转基因小鼠(品系276)(其中hsIL-6R的血浆浓度是恒定的)(稳态输注模型)后hsIL-6R的血浆浓度的时程。

[0249] 图19描述了在将hsIL-6R和抗人IL-6受体抗体共注射给人FcRn转基因小鼠(品系276和32)后,人FcRn转基因小鼠品系276和品系32中血浆hsIL-6R浓度的时程。

[0250] 图20描述了在将hsIL-6R和抗人IL-6受体抗体共注射给人FcRn转基因小鼠(品系276和32)后,人FcRn转基因小鼠品系276和品系32中血浆抗体浓度的时程。

[0251] 图21在图中显示在将抗人IL-6受体抗体给予人FcRn转基因小鼠(品系32)(其中hsIL-6R的血浆浓度是恒定的)(稳态输注模型)后,hsIL-6R的血浆浓度的时程。

[0252] 图22在图中显示在将抗人IL-6受体抗体给予人FcRn转基因小鼠(品系32)(其中hsIL-6R的血浆浓度是恒定的)(稳态输注模型)后,抗体血浆浓度的时程。

[0253] 图23描述了在将抗人IL-6受体抗体给予人FcRn转基因小鼠(品系32)(其中hsIL-

6R的血浆浓度是恒定的)(稳态输注模型)后,抗原/抗体摩尔比率(C值)的时程。

[0254] 图24描述了在pH7.0下Fc变体与人FcRn的结合亲和力之间的关系以及在将抗人IL-6受体抗体给予人FcRn转基因小鼠(品系32)(其中hsIL-6R的血浆浓度是恒定的)(稳态输注模型)后第1天抗原/抗体摩尔比率(C值)。

[0255] 图25在图中显示在将具有F11、F39、F48和F264的Fc变体的抗人IL-6受体抗体给予人FcRn转基因小鼠(品系32)(其中hsIL-6R的血浆浓度是恒定的)(稳态输注模型)后血浆抗体浓度的时程。

[0256] 图26在图中显示在将具有F11、F39、F48和F264的Fc变体的抗人IL-6受体抗体给予给予人FcRn转基因小鼠(品系32)(其中hsIL-6R的血浆浓度是恒定的)(稳态输注模型)后hsIL-6R的血浆浓度的时程。

[0257] 图27在图中显示在将具有F157、F196和F262的Fc变体的抗人IL-6受体抗体给予人FcRn转基因小鼠(品系32)(其中hsIL-6R的血浆浓度是恒定的)(稳态输注模型)后血浆抗体浓度的时程。

[0258] 图28在图中显示在将具有F157、F196和F262的Fc变体的抗人IL-6受体抗体给予人FcRn转基因小鼠(品系32)(其中hsIL-6R的血浆浓度是恒定的)(稳态输注模型)后hsIL-6R的血浆浓度的时程。

[0259] 图29描述了用于常规抗体和抗原消除性抗体的计算机模拟研究(in silico study)的药代动力学模型。

[0260] 图30在图中显示在给正常小鼠共注射人IL-6和抗人IL-6抗体后人IL-6的血浆浓度的时程。

[0261] 图31在图中显示在给正常小鼠共注射人IL-6和抗人IL-6抗体后抗体的血浆浓度的时程。

[0262] 图32示出了采用Biacore在pH 7.4和pH 6.0下与CD89-Fc融合蛋白结合的人IgA的传感图。

[0263] 图33在图中显示在给正常小鼠共注射人IgA和CD89-Fc融合蛋白后人IgA的血浆浓度的时程。

[0264] 图34在图中显示在给正常小鼠共注射人IgA和CD89-Fc融合蛋白后抗体的血浆浓度的时程。

[0265] 图35在图中显示在给正常小鼠共注射可溶性人从蛋白A1和抗人从蛋白A1抗体后7小时可溶性人从蛋白A1的血浆浓度。

[0266] 实施方案的描述

[0267] 本发明提供用于促进抗原结合分子介导的细胞对抗原摄入的方法。更具体地讲,本发明提供通过在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性的抗原结合分子促进细胞对抗原摄入的方法,所述方法基于增加抗原结合分子在中性pH范围内的人FcRn结合活性。本发明还提供通过在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性的抗原结合分子提高细胞对抗原摄入的方法,其基于改变抗原结合分子的人FcRn结合结构域中的至少一个氨基酸。

[0268] 本发明还提供通过在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性的抗原结合分子促进细胞对抗原摄入的方法,所述方法基于使用包含具有取代的氨基酸序列的人FcRn结合结构域,所述取代为用不同氨基酸取代选自包含亲本IgG的Fc结构域的人FcRn结合结构域的亲

本IgG Fc结构域中的以下位置氨基酸中的至少一个氨基酸：237、238、239、248、250、252、254、255、256、257、258、265、270、286、289、297、298、303、305、307、308、309、311、312、314、315、317、325、332、334、360、376、380、382、384、385、386、387、389、424、428、433、434和436 (EU编号)。

[0269] 本发明还提供用于促进抗原结合分子介导的细胞对抗原摄入的方法，其通过降低上述抗原结合分子在酸性pH范围内的抗原结合活性(结合能力)至小于其在中性pH范围内的抗原结合活性来进行；并且这促进细胞对抗原的摄入。本发明还提供用于促进抗原结合分子介导的细胞对抗原摄入的方法，所述方法基于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，其促进细胞对抗原的摄入。本发明还提供用于促进抗原结合分子介导的细胞对抗原摄入的方法，所述方法基于用组氨酸取代至少一个氨基酸或将至少一个组氨酸插入上述抗原结合分子的抗原结合结构域，其促进细胞对抗原的摄入。

[0270] 在本文中，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，在本文中，“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、或在增加在酸性pH范围内抗原结合分子的人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。优选与完整人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，可通过例如通过给予抗原结合分子，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摄入。

[0271] 在本文中，“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即“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”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。

[0272] 本文所用的“完整人IgG”意指未修饰的人IgG，且不限于IgG的特定类别。这意味着人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4均可用作“完整人IgG”，只要在酸性pH范围内可与人FcRn结合。优选“完整人IgG”可以是人IgG1。

[0273] 本发明还提供用于增加单个抗原结合分子可与之结合的抗原的数目的方法。更具体地讲，本发明提供通过提高在中性pH范围内抗原结合分子的人FcRn结合活性，而提高在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性的单一抗原结合分子可与之结合的抗原的数目的方法。本发明还提供通过改变抗原结合分子的人FcRn结合结构域中的至少一个氨基酸，而提高在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性的单一抗原结合分子可与之结合的抗原的数目的方法。

[0274] 本发明还提供增加在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性的单一抗原结合分子可与之结合的抗原的数目的方法，所述方法通过使用包含这样氨基酸序列的人FcRn结合结构

域来进行,在所述氨基酸序列中,选自包含亲本IgG Fc结构域的人FcRn结合结构域的亲本IgG Fc结构域中的以下位置氨基酸中的至少一个氨基酸被不同氨基酸取代:237、238、239、248、250、252、254、255、256、257、258、265、270、286、289、297、298、303、305、307、308、309、311、312、314、315、317、325、332、334、360、376、380、382、384、385、386、387、389、424、428、433、434和436(EU编号)。

[0275] 本文所用的“亲本IgG”意指未修饰的IgG,其随后被修饰以产生变体,只要亲本IgG的修饰变体可在酸性pH范围内与人FcRn结合(因此,在酸性条件下,亲本IgG不必需要与人FcRn结合活性)。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。应注意,亲本IgG”包括下文概述的已知市售的重组产生的IgG。“亲本IgG”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IgG”也可获自食蟹猴(cynomologous)、狨猴、猕猴、黑猩猩或人。优选“亲本IgG”获自人IgG1,但不限于IgG的特定类别。这意味着人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4均可适当地用作“亲本IgG”。类似地,上述任何生物的IgG的任何类别或亚类可优选用作“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;WO 2009/086320、WO 2008/092117、WO 2007/041635和WO 2006/105338,但不限于这些。

[0276] 此外,本发明提供通过降低上述抗原结合分子(其抗原结合事件的数目增加)在酸性pH范围内的抗原结合活性(结合能力)至小于其在中性pH范围内的抗原结合活性,而增加单个抗原结合分子可与之结合的抗原的数目的方法。本发明还提供通过改变上述抗原结合分子(其抗原结合事件的数目增加)的抗原结合结构域的至少一个氨基酸,而增加单个抗原结合分子可与之结合的抗原的数目的方法。本发明还提供通过用组氨酸取代至少一个氨基酸或将至少一个组氨酸插入具有上述抗原结合分子(其抗原结合事件的数目增加)的抗原结合结构域,而增加单个抗原结合分子可与之结合的抗原的数目的方法。

[0277] 在本文中,“单个抗原结合分子可与之结合的抗原的数目”意指单个抗原结合分子可与之结合直到该分子因降解而被消除的抗原的数目。在本文中,“增加单个抗原结合分子可与之结合的抗原的数目”意指直到抗原结合分子因降解而被消除时所实现的循环数目增加,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。这意味着与在提高抗原结合分子在中性pH范围内的人FcRn结合活性之前,或在提高在酸性pH范围内抗原结合分子的人FcRn结合活性且降低在酸性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。

[0278] 本发明还提供用于促进自细胞外与抗原结合的抗原结合分子上胞内解离出抗原的方法。更具体地讲,本发明提供促进自细胞外与抗原结合的抗原结合分子上胞内解离出抗原的方法,所述方法如下进行:通过提高在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性的抗原结合分子在中性pH范围内的人FcRn结合活性,并降低其在酸性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。本发明还提供用于促进自细胞外与抗原结合的抗原结合分子上胞内解离出抗原的方法,其基于改变抗原结合分子的抗原结合结构域的至少一个氨基酸,且同时改变在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性的抗原结合分子的人FcRn结合结构域的至少一个氨基酸。本发明还提供用于促进自细胞外与抗原结合的抗原结合分子上胞内解离出抗原的方法,所述方法如下进行:通过用组氨酸取代至少一个氨基酸或将至少一个组氨酸插入抗原结合分子的抗原结合结构域,同时用不同氨基酸取代选自人FcRn结合结构域的亲本IgG Fc结构域中的以下位置氨基酸中的至少一个氨基酸:237、238、239、248、250、252、254、255、256、257、258、265、270、286、289、297、298、303、305、307、308、309、311、312、314、315、317、325、332、334、360、376、380、382、384、385、386、387、389、424、428、433、434和436(EU编号)。

[0279] 在本发明中,抗原可自细胞内的任何位置处的抗原结合分子上解离;然而,优选的解离位点是早期内体。在本文中,“自抗原结合分子上胞内解离出在细胞外与抗原结合分子结合的抗原”不一定意味着通过与抗原结合分子结合摄入细胞的全部抗原都在细胞内自抗原结合分子上解离。因此,可以接受的是,与在降低在酸性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且同时提高在中性pH范围内的人FcRn结合活性之前相比,在细胞内自抗原结合分子上解离的抗原的比例增加。用于促进自细胞外与抗原结合的抗原结合分子上胞内解离出抗原的这类方法与以下方法同义:通过促进与抗原结合的抗原结合分子的摄取而赋予抗原结合分子促进自抗原结合分子上胞内解离出抗原的性质方法。

[0280] 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的方法。更具体地讲,本发明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的方法,所述方法如下进行:通过提高在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性的抗原结合分子在中性pH范围内的人FcRn结合活性并降低其在酸性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。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的方法,所述方法基于改变抗原结合分子中的至少一个氨基酸,且同时改变人FcRn结合结构域中的至少一个氨基酸。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的方法,所述方法如下进行:通过用组氨酸取代至少一个氨基酸或将至少一个组氨酸插入抗原结合分子,同时用不同氨基酸取代选自人FcRn结合结构域的亲本IgG Fc结构域中的以下位置氨基酸中的至少一个氨基酸:237、238、239、248、250、252、254、255、256、257、258、265、270、286、289、297、298、303、305、307、308、309、311、312、314、315、317、325、332、334、360、376、380、382、384、385、386、387、389、424、428、433、434和436(EU编号)。

[0281] 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”不一定意味着摄入细胞中的与抗原结合的全部抗原结合分子以不含抗原的形式在细胞外释放。可以接受的是,与在降低在酸性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的抗原结合分子的比例增加。释放到细胞外的抗原结合分子优选保持抗原结合活性。用于促进以抗原结合的形式摄入细胞的不含抗原的抗原结合分子在胞外释放的这类方法与以下方法同义:通过促进与抗原结合的抗原结合分子摄入细胞中而赋

予抗原结合分子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性质的方法。

[0282] 本发明还提供用于通过给予抗原结合分子而提高消除血浆抗原的能力的方法。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，本发明提供用于提高由在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性的抗原结合分子消除血浆抗原的能力的方法，所述方法通过提高在中性pH范围内抗原结合分子的人FcRn结合活性来进行。本发明还提供用于提高由在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性的抗原结合分子消除血浆抗原的能力的方法，所述方法基于改变抗原结合分子的人FcRn结合结构域中的至少一个氨基酸。

[0283] 本发明还提供用于提高由在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性的抗原结合分子消除血浆抗原的能力的方法，所述方法通过使用包含具有取代的氨基酸序列的人FcRn结合结构域来进行，所述取代为用不同氨基酸取代选自包含亲本IgG的Fc结构域的人FcRn结合结构域的亲本IgG Fc结构域中的以下位置氨基酸中的至少一个氨基酸：237、238、239、248、250、252、254、255、256、257、258、265、270、286、289、297、298、303、305、307、308、309、311、312、314、315、317、325、332、334、360、376、380、382、384、385、386、387、389、424、428、433、434和436 (EU编号)。

[0284] 本发明还提供用于提高抗原结合分子消除血浆抗原的能力的方法，所述方法如下进行：与在中性pH范围内的抗原结合活性相比，降低消除血浆抗原的能力得到改进的上述抗原结合分子在酸性pH范围内的抗原结合活性。本发明还提供用于提高抗原结合分子消除血浆抗原的能力的方法，所述方法如下进行：通过改变消除血浆抗原的能力得到改进的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。本发明还提供用于通过给予抗原结合分子以提高消除血浆抗原的能力的方法，所述方法如下进行：通过用组氨酸取代至少一个氨基酸或将至少一个组氨酸插入消除血浆抗原的能力得到改进的上述抗原结合分子的抗原结合结构域。

[0285] 在本文中，“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中消除抗原的能力。因此，“抗原结合分子消除血浆抗原的能力的提高”在本文中意指与在提高抗原结合分子在中性pH范围内的人FcRn结合活性之前或在增加人FcRn结合活性且同时降低其在酸性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，给予抗原结合分子时从血浆中消除抗原的速率加快。可通过例如体内给予可溶性抗原和抗原结合分子，并测量给予后血浆中可溶性抗原的浓度，来评价抗原结合分子从血浆中消除抗原的活性的提高。当通过提高在中性pH范围内抗原结合分子的人FcRn结合活性，或通过提高其人FcRn结合活性且同时降低其在酸性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，在给予可溶性抗原和抗原结合分子后血浆中的可溶性抗原浓度降低时，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，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。

[0286] 本发明还提供用于改进抗原结合分子的药代动力学的方法。更具体地讲,本发明提供用于通过提高在中性pH范围内抗原结合分子的人FcRn结合活性,而改进在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性的抗原结合分子的药代动力学的方法。此外,本发明提供用于通过改变抗原结合分子的人FcRn结合结构域中的至少一个氨基酸,而改进在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性的抗原结合分子的药代动力学。

[0287] 本发明还提供用于改进在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性的抗原结合分子的药代动力学,其通过使用包含具有取代的氨基酸序列的人FcRn结合结构域来进行,所述取代为用不同氨基酸取代选自包含IgG的Fc结构域的人FcRn结合结构域的亲本IgG Fc结构域中的以下位置氨基酸中的至少一个氨基酸:237、238、239、248、250、252、254、255、256、257、258、265、270、286、289、297、298、303、305、307、308、309、311、312、314、315、317、325、332、334、360、376、380、382、384、385、386、387、389、424、428、433、434和436(EU编号)。

[0288] 此外,本发明提供用于改进抗原结合分子的药代动力学的方法,所述方法如下进行:通过降低药代动力学得到改进的上述抗原结合分子在酸性pH范围内的抗原结合活性至小于其在中性pH范围内的抗原结合活性。本发明还提供用于改进在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性的抗原结合分子的药代动力学的方法,所述方法如下进行:通过改变药代动力学得到改进的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。本发明还提供用于改进药代动力学的方法,所述方法如下进行:通过用组氨酸取代至少一个氨基酸或将至少一个组氨酸插入药代动力学得到改进的上述抗原结合分子的抗原结合结构域。

[0289] 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”。这些术语是同义的。

[0290] 在本文中,“药代动力学的改进”不仅仅是指在将抗原结合分子给予人或非人动物例如小鼠、大鼠、猴、兔和狗后直到从血浆中消除(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)的时间延长,而且还指在给药期至因降解所致消除期间,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。完整人IgG可与非人动物的FcRn结合。例如,可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本文下述本发明的抗原结合分子的性质。具体而言,“药代动力学的改进”还包括时间延长直到由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)降解所致消除。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,抗原结合分子未与抗原结合的时间越长,它可与新抗原结合的时间越长(与另一抗原结合的机会越高)。这在体内能够缩短抗原游离于抗原结合分子的时间,并且延长抗原与抗原结合分子结合的时间。可通过给予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时间。具体而言,本文中,“抗原结合分子的药代动力学的改进”包括在给予抗原结合分子后,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

浆清除削弱中的任一个)、抗原与抗原结合分子结合的时间延长,以及血浆中抗原结合分子介导的抗原消除加快。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),通过例如非无房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。

[0291] 在本文中,“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浓度的比率所需时间,来认定延长。

[0292] 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。

[0293] 游离抗原的血浆浓度和血浆中游离抗原的量与血浆中的抗原总量的比率的测定、体内标志物测定和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,“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。

[0294] 与给予包含完整人IgG Fc结构域作为人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。

[0295] 可如下计算抗原/抗原结合分子的摩尔比率:

[0296] A值:各时间点的抗原摩尔浓度

[0297] B值:各时间点的抗原结合分子摩尔浓度

[0298] 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)

[0299] $C=A/B$ 。

[0300] 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。

[0301] 抗原/抗原结合分子摩尔比率可如上述计算。

[0302] 与包含完整人IgG Fc结构域作为人FcRn结合结构域的参比抗原结合分子相比,给予本发明的抗原结合分子可降低抗原/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。

[0303] 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完整人IgG Fc结构域作为人FcRn结合结构域。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。

[0304] 可按实施例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,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),当抗原结合分子不与小鼠对应抗原交叉反应时,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。以相同的剂量给予试验抗原结合分子。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。

[0305] 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。

[0306] 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。

[0307] 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。

[0308] 在本发明中,优选在人中药代动力学的改进。如果难以确定人中的血浆滞留,则其可根据小鼠(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)中的血浆滞留来预测。

[0309] 在本文中,酸性pH范围通常是指pH 4.0-pH 6.5。酸性pH范围优选为由pH 5.5-pH 6.5内的任何pH值表示的范围,优选选自5.5、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pH 5.8-pH6.0,这接近于体内早期内体的pH。同时,本文的中性pH范围通常是

指pH 6.7-pH 10.0。中性pH范围优选为由pH 7.0-pH 8.0内的任何pH值表示的范围,优选选自pH 7.0、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pH 7.4,这与体内血浆(血液)pH接近。如果由于其在pH 7.4的低亲和力所致,难以评价人FcRn结合结构域与人FcRn之间的结合亲和力,则可使用pH 7.0替代pH 7.4。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之间的结合亲和力。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。更优选还采用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。实施例5中所述的25℃温度是本发明的实施方案的一个实例。

[0310] 因此,本文中“降低酸性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pH 6.7-pH 10.0下的抗原结合活性相比,抗原结合分子在pH 4.0-pH 6.5下的抗原结合活性减弱。优选上述表述意指与在pH 7.0-pH 8.0下的抗原结合活性相比,抗原结合分子在pH 5.5-pH 6.5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pH 7.4下抗原结合分子的抗原结合活性相比,在pH 5.8-pH 6.0下抗原结合分子的抗原结合活性减弱。

[0311] 同时,本文的表述“降低酸性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”亦可表述为“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(pH 5.8)/KD(pH 7.4)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、增加其在中性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。

[0312] 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。

[0313] 在本文中,在酸性pH范围内的人FcRn结合活性意指在pH 4.0-pH6.5下的人FcRn结合活性,优选在pH 5.5-pH 6.5下的人FcRn结合活性,特别优选在pH 5.8-pH 6.0下的人FcRn结合活性,pH 5.8-pH 6.0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pH 6.7-pH 10.0下的人FcRn结合活性,优选在pH7.0-pH 8.0下的人FcRn结合活性,特别优选在pH 7.4下的人FcRn结合活性,pH 7.4与体内血浆pH相当。

[0314] 本发明的抗原结合分子具有人FcRn结合结构域。人FcRn结合结构域不受特别限制,只要抗原结合分子在酸性和中性pH范围内具有人FcRn结合活性。或者,结构域可具有直接或间接的人FcRn结合活性。这类结构域包括例如IgG型免疫球蛋白、白蛋白、白蛋白结构域3、抗人FcRn抗体、抗人FcRn肽和抗人FcRn支架分子的Fc结构域,所有这些都具有与人FcRn直接结合的活性;以及与IgG或白蛋白结合的分子,其具有与人FcRn间接结合的活性。本发明的这类优选结构域在酸性和中性pH范围内具有人FcRn结合活性。可在没有任何改变的情况下使用该结构域,只要它们在酸性和中性pH范围内已具有人FcRn结合活性。如果该结构域在酸性和/或中性pH范围内只有弱的人FcRn结合活性或没有人FcRn结合活性,则可

通过改变抗原结合分子中的氨基酸使之具有人FcRn结合活性。然而,优选通过改变人FcRn结合结构域的氨基酸,使之在酸性和/或中性pH范围内具有人FcRn结合活性。或者,可改变在酸性和/或中性pH范围内已具有人FcRn结合活性的结构域中的氨基酸以提高人FcRn结合活性。可通过比较氨基酸改变前后的酸性和/或中性pH范围内的人FcRn结合活性,来选择人FcRn结合结构域中所需的氨基酸改变。

[0315] 优选的人FcRn结合结构域是与人FcRn直接结合的区域。这类优选的人FcRn结合区包括例如抗体Fc结构域。同时,能够与多肽例如白蛋白或IgG(其具有人FcRn结合活性)结合的区域,可通过白蛋白、IgG等与人FcRn间接结合。因此,本发明的这类人FcRn结合区可以是与具有人FcRn结合活性的多肽结合的区域。

[0316] 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。这类优选的抗原结合结构域包含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和可变区。当抗体的抗原结合区是CDR时,它可含有完整抗体的全部6个CDR,或1、2或更多个CDR。当含有CDR作为抗体的结合区时,它们可包含氨基酸缺失、取代、添加和/或插入,或者可以是CDR的部分。

[0317] 另一方面,用于本发明方法的抗原结合分子包含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(激动性抗原结合分子)和具有细胞毒性的分子。在优选的实施方案中,抗原结合分子包含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。

[0318] 在本发明中,目标抗原结合分子不受特别限制,可以是任何抗原结合分子。本发明的抗原结合分子优选包括抗原结合活性(抗原结合结构域)和人FcRn结合结构域两者。具体地讲,优选的本发明抗原结合分子包括与人FcRn结合的结构域。包括抗原结合结构域和人FcRn结合结构域两者的抗原结合分子包括例如抗体。在本发明的情况下优选的抗体包括例如IgG抗体。当要使用的抗体为IgG抗体时,IgG的类型不受限制;可以使用属于任何同种型(亚类)的IgG例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。此外,本发明的抗原结合分子可包括抗体恒定区,并可将氨基酸突变引入恒定区。待引入的氨基酸突变包括例如强化或消弱与Fc γ 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,还可通过选择合适的恒定区例如IgG2的恒定区,来改变pH依赖性结合。

[0319] 当本发明的目标抗原结合分子是抗体时,它可以是来源于任何动物的抗体,例如小鼠抗体、人抗体、大鼠抗体、兔抗体、山羊抗体或骆驼抗体。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抗体等。抗体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括抗体片段的多肽。

[0320] “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。

[0321] “人源化抗体”,亦称为经改造的人抗体,是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)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EP 125023和WO 96/02576)。

[0322] 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,或识别相同抗原上的两个或更多个不同表位的抗体。

[0323] 此外,包括抗体片段的多肽包括例如Fab片段、F(ab')₂片段、scFvs (Nat Biotechnol.2005年9月;23(9):1126-36)、结构域抗体(dAbs)(WO2004/058821、WO 2003/002609)、scFv-Fc(WO 2005/037989)、dAb-Fc和Fc融合蛋白。当分子包括Fc结构域时,Fc结构域可用作人FcRn结合结构域。或者,可将FcRn结合结构域与这些分子融合。

[0324] 此外,适于本发明的抗原结合分子可为抗体样分子。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出功能的分子(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),包括例如DARPin(WO 2002/020565)、亲和体(Affibody)(WO 1995/001937)、Avimer(WO2004/044011;WO 2005/040229)和Adnectin(WO 2002/032925)。如果这些抗体样分子可以pH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,则可通过抗原结合分子促进细胞对抗原摄入,通过给予抗原结合分子促进血浆抗原浓度降低,并改进抗原结合分子的药代动力学,提高单个抗原结合分子可与之结合的抗原的数目。

[0325] 此外,抗原结合分子可以由人FcRn结合结构域和与靶标结合的受体蛋白(包括配体)之间融合而产生的蛋白质,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(Nat Med.2003年1月;9(1):47-52;BioDrugs. (2006) 20(3):151-60)。如果这些受体-人FcRn结合结构域融合蛋白以pH依赖性方式与靶分子(包括配体)结合和/或在中性pH范围内具有人FcRn结合活性,则可通过抗原结合分子促进细胞对抗原摄入,通过给予抗原结合分子促进血浆抗原浓度降低,并改进抗原结合分子的药代动力学,和增加单个抗原结合分子可与之结合的抗原的数目。受体蛋白经适当设计和修饰,使得包括与靶标(包括配体)结合的受体蛋白的结构域。如上文中提及的包括TNFR-Fc融合蛋白、IL1R-Fc融合蛋白、VEGFR-Fc融合蛋白和CTLA4-Fc融合蛋白的实例,本发明中优选使用这样的可溶性受体分子,其包含与所述靶标(包括配体)结合所需要的所述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。设计和修饰受体分子以构建人工受体分子所采用的方法是本领域已知的。

[0326] 此外,抗原结合分子可为融合蛋白,其中使与靶标结合并具有中和作用的人工配体蛋白与人FcRn结合结构域融合,且人工配体蛋白包括例如突变型IL-6(EMBO J.1994年12月15日;13(24):5863-70)。如果这类人工配体融合蛋白可以pH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,则可通过抗原结合分子促进细胞对抗原摄入,通过给予抗原结合分子促进血浆抗原浓度降低,并改进抗原结合分子的药代动力学,和增加单个抗原结合分子可与之结合的抗原的数目。

[0327] 此外,本发明的抗体可包括修饰糖链。具有修饰糖链的抗体包括例如具有修饰的糖基化的抗体(WO 99/54342)、缺乏加至糖链的岩藻糖的抗体(WO 00/61739、WO 02/31140、WO 2006/067847、WO2006/067913)和具有带二等分G1cNAc的糖链的抗体(WO 02/79255)。

[0328] 本领域技术人员可适当选择除pH以外用于抗原结合或人FcRn结合活性的测定所

使用的条件,所述条件不受特别限制。例如,按WO 2009/125825中所述采用MES缓冲液在37℃下的条件,可用来测定活性。在另一个实施方案中,可采用实施例4或5中所述在25℃下的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。如果抗原是可溶性抗原,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,如果抗原是膜型抗原,则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。

[0329] 在本发明中,在酸性pH范围内抗原结合活性与在中性pH范围内抗原结合活性之间的比率不受特别限制,只要在酸性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。然而, $KD(pH5.8)/KD(pH7.4)$ 的值,其是抗原在pH 5.8和pH7.4下的解离常数(KD)的比率,优选为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,只要可采用本领域技术人员已知技术生产。

[0330] 如果抗原是可溶性抗原,抗原结合活性的值可用解离常数(KD)表示。另一方面,如果抗原是膜型抗原,则活性可用表观解离常数(表观KD)表示。可通过本领域技术人员已知方法,采用例如Biacore (GE Healthcare)、Scatchard曲线、流式细胞仪等,测定解离常数(KD)和表观解离常数(表观KD)。

[0331] 在本发明中,表示在酸性和中性pH范围之间的抗原结合活性的比率的其它参数包括例如解离速率常数 k_d 。如果使用解离速率常数(k_d)而非解离常数(KD)作为代表结合活性比率的参数,则 k_d (在酸性pH范围内)/ k_d (在中性pH范围内)的值(其是抗原在酸性pH范围内和中性pH范围的 k_d (解离速率常数)的比率),优选为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。 k_d (在酸性pH范围内)/ k_d (在中性pH范围内)值的上限不受特别限制,可以是任何值,例如50、100或200,只要可采用本领域技术人员已知技术生产。

[0332] 如果抗原是可溶性抗原,则抗原结合活性的值可使用解离速率常数(k_d)表示。或者,如果抗原是膜型抗原,则C值可用表观 k_d (表观解离速率常数)表示。可通过本领域技术人员已知方法,例如采用Biacore (GE Healthcare)、流式细胞仪等,来测定解离速率常数(k_d)和表观解离速率常数(表观 k_d)。

[0333] 在本发明中,当在不同pH下测定抗原结合分子的抗原结合活性时,优选pH以外的测量条件是不变的。

[0334] 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,可通过任何方法实现。具体而言,如WO 2009/125825中所述,该方法包括例如通过用组氨酸取代抗原结合分子中的氨基酸或将组氨酸插入抗原结合分子中,以降低(减弱)在酸性pH范围内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。已知可通过用组氨酸取代抗体中的氨基酸赋予抗体pH依赖性抗原结合活性(FEBS Letter(1992) 309(1):85-88)。这类组氨酸突变(取代)或插入位点不受特别限制;可用组氨酸取代任何位点上的氨基酸或插入任何位点。组氨酸突变(取代)或插入的优选位点包括例如其中突变或插入对抗原结合分子的

抗原结合活性有影响的区域。这类区域包括这样的位点,其中与突变或插入之前相比,突变或插入降低(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(KD(在酸性pH范围内)/KD(在中性pH范围内)值增加)。如果抗原结合分子是抗体,则这类区域包括例如抗体可变区和CDR。待引入(实现)的组氨酸突变或插入的数目可由本领域技术人员适当地确定。组氨酸取代可在唯一的单一位点或者在两个或更多个位点引入。或者,组氨酸可在唯一的单一位点或者在两个或更多个位点插入。此外,除组氨酸突变以外,可引入组氨酸突变以外的突变(具有非组氨酸的氨基酸的突变(缺失、添加、插入和/或取代))。或者,组氨酸突变可与组氨酸插入联合。可通过随机方法实现这类组氨酸取代或插入,例如组氨酸扫描,其通过使用组氨酸而非本领域技术人员已知的丙氨酸扫描中的丙氨酸来进行。然后,可从用随机组氨酸突变或插入而引入的抗原结合分子文库中,选择具有比引入突变之前大的KD(在酸性pH范围内)/KD(在中性pH范围内)值的抗原结合分子。

[0335] 如果用组氨酸取代抗原结合分子中的氨基酸或将组氨酸插入抗原结合分子中,则在组氨酸取代或插入后在中性pH范围内抗原结合分子的抗原结合活性优选等于在组氨酸取代或插入前在中性pH范围内抗原结合分子的抗原结合活性,但对此没有特别限制。在本文中,“在组氨酸取代或插入后在中性pH范围内抗原结合分子的抗原结合活性等于在组氨酸取代或插入前在中性pH范围内抗原结合分子的抗原结合活性”意指在组氨酸取代或插入后抗原结合分子保持在组氨酸取代或插入前抗原结合分子的抗原结合活性的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。如果抗原结合分子的抗原结合活性由于组氨酸取代或插入而降低,则可通过使抗原结合分子的一个或更多个氨基酸被取代、缺失、将一个或更多个氨基酸添加和/或插入至抗原结合分子来调整抗原结合活性,使得抗原结合活性变得等于在组氨酸取代或插入前的抗原结合活性。本发明还包含这类抗原结合分子,其结合活性因在组氨酸取代或插入后使抗原结合分子的一个或更多个氨基酸被取代、缺失、将一个或更多个氨基酸添加和/或插入至抗原结合分子而使之相等。

[0336] 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其它方法包括用非天然氨基酸取代抗原结合分子中的氨基酸或将非天然氨基酸插入抗原结合分子的方法。已知可通过使用非天然氨基酸,来人工调节pKa (Angew.Chem.Int.Ed.2005,44,34;Chem Soc Rev.2004年9月10日,33(7):422-30;Amino Acids.(1999)16(3-4):345-79)。因此,在本发明中,可使用非天然氨基酸代替上述的组氨酸。引入非天然氨基酸的位点不受特别限制,可在任何位点进行非天然氨基酸的取代或插入。非天然氨基酸取代或插入的优选位点包括例如其中取代或插入对抗原结合分子的抗原结合活性产生影响的区域。例如,如果抗原结合分子是抗体,则这类区域包括抗体可变区和互补决定区(CDR)。同时,待引入的非天然氨基酸的数目不受特别限制;可在唯一的单一位点或者两个或更多个位点上用非天然氨基酸取代。或者,可将非天然氨基酸插入唯一的单一位点或者两个或更多个位点。此外,除了非天然氨基酸的取代或插入以外,可缺失、添加、插入和/或取代其它氨基酸。此外,可与上述组氨酸取代和/或插入组合进行非天然氨基酸的取代和/或插入。在本发明中可使用任何非天然的氨基酸。可使用本领域技术人员已知的非天然氨基酸。

[0337] 在本发明中,如果抗原结合分子是抗体,则组氨酸或非天然氨基酸取代的可能位点包括例如CDR序列和负责抗体的CDR结构的序列,包括例如WO 2009/125825中所述位点。

按照Kabat编号标注氨基酸位置(Kabat EA等(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH)。

[0338] 当提及可变结构域的残基时(大致轻链的残基1-107和重链的残基1-113),一般使用Kabat编号系统(例如Kabat等, Sequences of Immunological Interest. 第5版. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。当提及免疫球蛋白重链恒定区的残基时,一般使用“EU编号系统”或“EU指数”(例如Kabat等人报道的EU指数, 同上)。“按照Kabat的EU指数”是指人IgG₁ EU抗体的残基编号。除非本文中另有说明, 否则提及抗体可变结构域的残基编号意指通过Kabat编号系统的残基编号。除非本文中另有说明, 否则提及抗体恒定结构域的残基编号意指通过EU编号系统的残基编号(参见例如W0 2006073941)。

[0339] 重链:H27、H31、H32、H33、H35、H50、H58、H59、H61、H62、H63、H64、H65、H99、H100b和H102

[0340] 轻链:L24、L27、L28、L32、L53、L54、L56、L90、L92和L94

[0341] 这些改变位点中,H32、H61、L53、L90和L94被假定为是最通用的改变位点。

[0342] 如果抗原是IL-6受体(例如人IL-6受体), 优选的改变位点包括下列位点。然而, 改变位点在此不受特别限制。

[0343] 重链:H27、H31、H32、H35、H50、H58、H61、H62、H63、H64、H65、H100b和H102

[0344] 轻链:L24、L27、L28、L32、L53、L56、L90、L92和L94

[0345] 具体而言, 组氨酸或非天然氨基酸取代位点的优选组合包括例如H27、H31和H35的组合; H27、H31、H32、H35、H58、H62和H102的组合; L32和L53的组合; 及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。

[0346] 这些位点中, 组氨酸或非天然氨基酸在唯一的单一位点或更多个位点被取代。

[0347] 同时, 当抗原结合分子是具有抗体恒定区的物质时, 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包括例如用于改变抗体恒定区中的氨基酸的方法。具体而言, 这类方法包括例如用于取代W0 2009/125825中所述恒定区(SEQ ID NO:11、12、13和14)的方法。同时, 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。这类方法还包括用于降低在酸性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)的方法, 这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)来进行。抗体恒定区中的铰链区序列在同种型(IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)之间颇为不同, 并且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, 可根据抗原或表位的类型, 选择合适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)。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, 因此认为野生型同种型氨基酸序列中优选的氨基酸取代位点在铰链区内。

[0348] 当通过上述方法等降低(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(当KD(在酸性pH范围内)/KD(在中性pH范围内)的值增加时)时, 通常优选与原始抗体相比, KD(在酸性pH范围内)/KD(在中性pH范围内)值为两倍或更多倍、优选为5倍或更多倍、更优选10倍或更多倍, 但在此不受特别限制。

[0349] 可采用上述方法,产生这样的抗原结合分子,其在酸性pH范围内的抗原结合活性通过不具有这类性质的抗原结合分子的氨基酸取代或插入,被降低(减弱)至小于在中性pH范围内的抗原结合活性(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(1lamas)、骆驼等)所获得的抗体的指示物,通过筛选来选出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(Proc Natl Acad Sci U S A.1996年7月23日;93(15):7843-8;J Immunol Methods.2006年10月20日;316(1-2):133-43;Journal of the Association for Laboratory Automation;WO 2004/106377、WO 2008/045140和WO2009/113742),其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体外提供抗原结合结构域的文库的指示物,通过筛选直接选出具有目标性质的抗体。这类文库包括人幼稚文库、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。

[0350] 本发明利用pH差异作为在血浆和内体间的环境差异,以实现在血浆和内体中抗原结合分子对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,因此可利用其浓度在血浆和内体内不同的其它因素,替代对抗原结合分子与抗原结合的pH依赖性结合性质。这类因素也可用于产生在血浆与抗原结合但在内体解离出抗原的抗体。因此,本发明还包括包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域的抗原结合分子,其在酸性和中性pH范围内具有人FcRn结合活性,且在内体中的抗原结合活性比在血浆中的低,其中在血浆中人FcRn结合活性强于完整人IgG的FcRn结合活性。

[0351] 用于提高在中性pH范围内本发明的抗原结合分子的人FcRn结合结构域的人FcRn结合活性的方法不受特别限制,可通过任何方法提高。具体而言,当IgG型免疫球蛋白的Fc结构域用作人FcRn结合结构域时,可通过改变其氨基酸来提高在中性pH范围内的人FcRn结合活性。这类待改变的优选IgG型免疫球蛋白的Fc结构域包括例如亲本人IgG(IgG1、IgG2、IgG3或IgG4及其经工程改造的变体)的Fc结构域。可将任何位点的氨基酸变成其它氨基酸,只要赋予或提高在中性pH范围内的人FcRn结合活性。当抗原结合分子具有人IgG1 Fc结构域作为人FcRn结合结构域时,优选与亲本人IgG1的相比,所述分子具有加强在中性pH范围内与人FcRn结合的改变。可实现这类改变的氨基酸包括例如以下位置的氨基酸:221-225、227、228、230、232、233-241、243-252、254-260、262-272、274、276、278-289、291-312、315-320、324、325、327-339、341、343、345、360、362、370、375-378、380、382、385-387、389、396、414、416、423、424、426-438、440和442(EU编号)。更具体地讲,这类氨基酸改变包括例如列于表1的那些。可通过使用上述改变,提高在中性pH范围内IgG型免疫球蛋白的Fc结构域的人FcRn结合。

[0352] 此外,与亲本人IgG相比,可加强在酸性pH范围内与人FcRn结合的改变如表2中的实例所示。当从上述改变中选出还可加强在中性pH范围内与人FcRn结合的适当改变时,它们可适用于本发明。同时,可加强在酸性条件下Fv4-IgG1与人FcRn结合的改变的组合见表6-1和表6-2。亲本人IgG Fc结构域中待改变的特别优选的氨基酸包括例如以下位置的氨基

酸：237、238、239、248、250、252、254、255、256、257、258、265、270、286、289、297、298、303、305、307、308、309、311、312、314、315、317、325、332、334、360、376、380、382、384、385、386、387、389、424、428、433、434和436 (EU编号)。可通过用不同氨基酸取代选自上述氨基酸的至少一个氨基酸，来提高中性pH范围内抗原结合分子的人FcRn结合活性。

[0353] 特别优选的改变包括例如亲本IgG Fc结构域中：

[0354] 237位上的Gly被取代为Met的氨基酸取代；

[0355] 238位上的Pro被取代为Ala的氨基酸取代；

[0356] 239位上的Ser被取代为Lys的氨基酸取代；

[0357] 248位上的Lys被取代为Ile的氨基酸取代；

[0358] 250位上的Thr被取代为Ala、Phe、Ile、Met、Gln、Ser、Val、Trp或Tyr的氨基酸取代；

[0359] 252位上的Met被取代为Phe、Trp或Tyr的氨基酸取代；

[0360] 254位上的Ser被取代为Thr的氨基酸取代；

[0361] 255位上的Arg被取代为Glu的氨基酸取代；

[0362] 256位上的Thr被取代为Asp、Glu或Gln的氨基酸取代；

[0363] 257位上的Pro被取代为Ala、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr或Val的氨基酸取代；

[0364] 258位上的Glu被取代为His的氨基酸取代；

[0365] 265位上的Asp被取代为Ala的氨基酸取代；

[0366] 270上的Asp被取代为Phe的氨基酸取代；

[0367] 286位上的Asn被取代为Ala或Glu的氨基酸取代；

[0368] 289位上的Thr被取代为His的氨基酸取代；

[0369] 297位上的Asn被取代为Ala的氨基酸取代；

[0370] 298上的Ser被取代为Gly的氨基酸取代；

[0371] 303位上的Val被取代为Ala的氨基酸取代；

[0372] 305位上的Val被取代为Ala的氨基酸取代；

[0373] 307位上的Thr被取代为Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、Trp或Tyr的氨基酸取代；

[0374] 308位上的Val被取代为Ala、Phe、Ile、Leu、Met、Pro、Gln或Thr的氨基酸取代；

[0375] 309位上的Leu或Val被取代为Ala、Asp、Glu、Pro或Arg的氨基酸取代；

[0376] 311位上的Gln被取代为Ala、His或Ile的氨基酸取代；

[0377] 312位上的Asp被取代为Ala或His的氨基酸取代；

[0378] 314位上的Leu被取代为Lys或Arg的氨基酸取代；

[0379] 315位上的Asn被取代为Ala或His的氨基酸取代；

[0380] 317位上的Lys被取代为Ala的氨基酸取代；

[0381] 325位上的Asn被取代为Gly的氨基酸取代；

[0382] 332位上的Ile被取代为Val的氨基酸取代；

[0383] 334位上的Lys被取代为Leu的氨基酸取代；

[0384] 360位上的Lys被取代为His的氨基酸取代；

[0385] 376位上的Asp被取代为Ala的氨基酸取代；

[0386] 380位上的Glu被取代为Ala的氨基酸取代；

- [0387] 382位上的Glu被取代为Ala的氨基酸取代；
- [0388] 384位上的Asn或Ser被取代为Ala的氨基酸取代；
- [0389] 385位上的Gly被取代为Asp或His的氨基酸取代；
- [0390] 386位上的Gln被取代为Pro的氨基酸取代；
- [0391] 387位上的Pro被取代为Glu的氨基酸取代；
- [0392] 389位的Asn被取代为Ala或Ser的氨基酸取代；
- [0393] 424位上的Ser被取代为Ala的氨基酸取代；
- [0394] 428位上的Met被取代为Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr的氨基酸取代；
- [0395] 433位上的His被取代为Lys的氨基酸取代；
- [0396] 434位上的Asn被取代为Ala、Phe、His、Ser、Trp或Tyr的氨基酸取代；
- [0397] 和436位上的Tyr被取代为His或Phe的氨基酸取代(EU编号)。同时,待改变的氨基酸的数目不受特别限制;可在唯一的单一位点上或者在两个或更多个位点上改变氨基酸。两个或更多个氨基酸改变的组合包括例如表3所列的那些。同时,与亲本人IgG相比,可加强在酸性pH范围内与人FcRn结合的改变的组合见表4-1至4-5。当也可加强在中性pH范围内与人FcRn结合的改变的合适组合选自上述改变时,它们可适用于本发明。此外,可加强在中性条件下FV4-IgG1与人FcRn结合的改变的组合见表6-1和6-2。
- [0398] 表中的符号“~”表示在按EU编号所示的编号之后插入氨基酸。例如,~281S意指将S插入按EU编号的281位与282位之间。

[0399] [表1]

[0400]	位置	氨基酸改变
	256	P
	280	K
	339	T
	385	H
	428	L
	434	W,Y,F,A,H

[0401] [表2]

[0402]

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

[0403]

[表3]

[0404]

氨基酸改变的组合
M252Y/S254T/T256E
M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F/Y436H
H433K/N434F/Y436H

T307A/E380A
T307A/E380A/N434H
T307A/E380A/N434A
N434H/N315H
N434H/T289H
N434H/T370A/E380A
T250Q/M428L
T250Q/N434A
M252W/N434A
M252Y/N434A
T256A/N434A
T256D/N434A
T256E/N434A
T256S/N434A
P257I/Q311I
T307A/N434A
T307E/N434A
T307Q/N434A
V308P/N434A
L309G/N434A
Q311H/N434A
Q311R/N434A
N315D/N434A
A378V/N434A
E380S/N434A
E382V/N434A
S424E/N434A
M428L/N434A
N434A/Y436I
T437Q/N434A
T437R/N434A

[0405] [表4-1]

[0406]

氨基酸改变的组合
L234I/L235D
G236A/V308F/I332E
G236R/L328R
G236A/I332E/N434S
S239E/V264I/A330Y/I332E
S239E/V264I/I332E

S239E/V264I/S298A/A330Y/I332E
S239D/D265H/N297D/I332E
S239D/E272Y/I332E
S239D/E272S/I332E
S239D/E272I/I332E
S239D/N297D/I332E
S239D/K326T/I332E
S239Q/I332Q
S239Q/I332N
S239D/I332D
S239D/I332E
S239Q/I332E
S239E/I332E
F241W/F243W
F241Y/F243Y/V262T/V264T
F241W/F243W/V262A/V264A
F241L/V262I
F243L/V262I/V264W
F243L/K288D/R292P/Y300L/V305I/P396L/H435K
F243L/K288D/R292P/Y300L/H435K
F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L/H435K
P245G/V308F
T250I/V259I/V308F
T250I/V308F
T250I/V308F/N434S
T250Q/V308F/M428L
T250Q/M428L
L251I/N434S
L251N/N434S
L251F/N434S
L251V/N434S
L251M/N434S
T252L/T254S/T256F
M252Y/S254T/T256E/N434M
M252Y/S254T/T256E/M428L/N434S
M252Y/S254T/T256E
M252Y/S254T/T256E/V308F
M252Y/S254T/T256E/N434S
M252Y/S254T/T256E/N434A

M252Y/S254T/T256E/M428L

M252Y/S254T/T256E/T307Q

M252F/T256D

M252Y/T256Q

M252Y/P257L

M252Y/P257N

M252Y/V259I

M252Y/V279Q

M252Y/V308P/N434Y

M252Q/V308F

M252Y/V308F

[0407] 表4-2为表4-1的续表。

[0408] [表4-2]

[0409]

M252Q/V308F/N434S

M252Y/V308F/M428L

M252Y/V308F/N434M

M252Y/V308F/N434S

M252Y/Y319I

M252Q/M428L/N434S

M252Y/M428L

M252Y/N434M

M252Y/N434S

M252Y/N434A

M252Y/N434Y

S254T/V308F

R255H/N434A

R255Q/N434S

R255H/N434S

T256V/V308F

T256P/Q311I

T256P/I332E

T256P/I332E/S440Y

T256P/E430Q

T256P/N434H

T256E/N434Y

T256P/S440Y

P257Y/V279Q

P257L/V279E

P257N/V279Q

P257N/V279E
P257N/V279Y
P257L/V279Q
P257N/^281S
P257L/^281S
P257N/V284E
P257N/L306Y
P257L/V308Y
P257L/V308F
P257N/V308Y
P257I/Q311I/N434H
P257L/Q311V
P257L/G385N
P257L/M428L
P257I/E430Q
P257I/N434H
P257L/N434Y
E258H/N434A
E258H/N434H
V259I/T307Q/V308F
V259I/V308F
V259I/V308F/Y319L
V259I/V308F/Y319I
V259A/V308F
V259I/V308F/N434M
V259I/V308F/N434S
V259I/V308F/M428L/N434S
V259I/V308F/M428L
V259I/Y319I
V259I/Y319I/N434S
V259I/M428L
V259I/M428L/N434S
V259I/N434S

[0410] 表4-3为表4-2的续表。

[0411] [表4-3]

[0412]

V259I/N434Y
V264I/A330L/I332E
V264I/I332E
D265F/N297E/I332E

S267L/A327S
E272R/V279L
V279E/V284E
V279Q/L306Y
V279Y/V308F
V279Q/V308F
V279Q/G385H
\wedge 281S/V308Y
\wedge 281S/V308F
\wedge 281S/N434Y
E283F/V284E
V284E/V308F
V284E/G385H
K288A/N434A
K288D/H435K
K288V/H435D
T289H/N434A
T289H/N434H
L306I/V308F
T307P/V308F
T307Q/V308F/N434S
T307Q/V308F/Y319L
T307S/V308F
T307Q/V308F
T307A/E310A/N434A
T307Q/E380A/N434A
T307Q/M428L
T307Q/N434M
T307I/N434S
T307V/N434S
T307Q/N434S
T307Q/N434Y
V308T/L309P/Q311S
V308F/L309Y
V308F/Q311V
V308F/Y319F
V308F/Y319I/N434M
V308F/Y319I
V308F/Y319L

V308F/Y319I/M428L
V308F/Y319I/M428L/N434S
V308F/Y319L/N434S
V308F/I332E
V308F/G385H
V308F/M428L/N434M
V308F/M428L
V308F/M428L/N434S
V308P/N434Y
V308F/N434M
V308F/N434S
V308F/N434Y
Q311G/N434S
Q311D/N434S
Q311E/N434S
Q311N/N434S

[0413] 表4-4为表4-3的续表。

[0414] [表4-4]

[0415]

Q311Y/N434S
Q311F/N434S
Q311W/N434S
Q311A/N434S
Q311K/N434S
Q311T/N434S
Q311R/N434S
Q311L/N434S
Q311M/N434S
Q311V/N434S
Q311I/N434S
Q311A/N434Y
D312H/N434A
D312H/N434H
L314Q/N434S
L314V/N434S
L314M/N434S
L314F/N434S
L314I/N434S
N315H/N434A
N315H/N434H

Y319I/V308F
Y319I/M428L
Y319I/M428L/N434S
Y319I/N434M
Y319I/N434S
L328H/I332E
L328N/I332E
L328E/I332E
L328I/I332E
L328Q/I332E
L328D/I332E
L328R/M428L/N434S
A330L/I332E
A330Y/I332E
I332E/D376V
I332E/N434S
P343R/E345D
D376V/E430Q
D376V/E430R
D376V/N434H
E380A/N434A
G385R/Q386T/P387R/N389P
G385D/Q386P/N389S
N414F/Y416H
M428L/N434M
M428L/N434S
M428L/N434A
M428L/N434Y
H429N/N434S
E430D/N434S
E430T/N434S
E430S/N434S
E430A/N434S
E430F/N434S
E430Q/N434S
E430L/N434S
E430I/N434S
A431T/N434S

[0416] 表4-5为表4-4的续表。

[0417] [表4-5]

[0418]

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

N434S/T437I

[0419] 可采用已知方法适当地引入这类氨基酸改变。例如,完整人IgG1的Fc结构域的改变描述于Drug Metab Dispos.2007年1月.35(1):86-94;Int Immunol.2006年12月18日,(12):1759-69;J Biol Chem.2001年3月2日,276(9):6591-604;J Biol Chem.(2007)282(3):1709-17;J Immunol.(2002)169(9):5171-80;J Immunol.(2009)182(12):7663-71;Molecular Cell,第7卷,867-877,2001年4月;Nat Biotechnol.1997年7月15日,(7):637-40;Nat Biotechnol.2005年10月23日,(10):1283-8;Proc Natl Acad Sci U S A.2006年12月5日,103(49):18709-14;EP2154157、US 20070141052、WO 2000/042072、WO 2002/060919、WO2006/020114、WO 2006/031370、WO 2010/033279、WO 2006/053301和WO 2009/086320。

[0420] 按照Journal of Immunology (2009) 182:7663-7671,在酸性pH范围内(pH 6.0),完整人IgG1的人FcRn结合活性为KD 1.7微摩尔(microM),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,用于本发明方法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KD 20微摩尔或更强,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,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KD 2.0微摩尔或更强,而在中性pH范围内为KD 40微摩尔或更强。在甚至更优选的实施方案中,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KD 0.5微摩尔或更强,而中性pH范围内为KD 15微摩尔或更强。通过Journal of Immunology (2009) 182:7663-7671描述的方法(通过将抗原结合分子固定在芯片上,加载人FcRn作为分析物),来测定上述KD值。

[0421] 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(pH 7.4)内几乎没有人FcRn结合活性,因此难以计算作为KD的活性。用于评价在pH 7.4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pH 7.4下的反应强于将人FcRn加载到固定有完整人IgG的芯片后在pH 7.4下的反应时,将抗原结合分子的人FcRn结合活性认定为在pH 7.4下高于完整人IgG的人FcRn结合活性。

[0422] pH 7.0也可用作中性pH范围。使用pH 7.0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。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,可按实施例5所述,在pH 7.0和在25℃下,测量人FcRn与FcRn结合结构域之间的相互反应。可通过如实施例5所述的Biacore,测量抗原结合分子与人FcRn的结合亲和力。

[0423] 在更优选的实施方案中,本发明的抗原结合分子在pH 7.0和在25℃下具有人FcRn结合活性,其强于完整人IgG的结合活性。在更优选的实施方案中,在pH 7.0和在25℃下人FcRn结合活性是完整人IgG的28倍或强于KD 3.2微摩尔。在更优选的实施方案中,在pH 7.0

和在25℃下人FcRn结合活性是完整人IgG的38倍或强于KD 2.3微摩尔。

[0424] 优选使用完整人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4作为完整人IgG,目的在于针对其人FcRn结合活性或体内活性而与抗原结合分子进行比较的参比完整人IgG。优选地,可适当地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完整人IgG Fc结构域作为人FcRn结合结构域。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而与抗原结合分子进行比较的参比完整人IgG。

[0425] 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pH 7.0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。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。

[0426] 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pH 7.0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。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。

[0427] 本发明的方法适用于任何抗原结合分子,而不论靶抗原的类型如何。

[0428] 在本发明的方法中,被抗原结合分子(例如目标抗体)识别的抗原不受特别限制。这类目标抗体可识别任何抗原。其药代动力学通过本发明的方法而改进的抗体包括例如受体蛋白(膜结合受体和可溶性受体)、识别膜抗原(例如细胞表面标记)的抗体和识别可溶性抗原(例如细胞因子)的抗体。被抗体(其药代动力学通过本发明的方法而改进)识别的抗原的具体实例包括例如:17-IA、4-1 BB、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RIA ALK-2、激活素RIB ALK-4、激活素RIIA、激活素RIIB、ADAM、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17/TACE、ADAM8、ADAM9、ADAMTS、ADAMTS4、ADAMTS5、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、 α 1-抗胰凝乳蛋白酶(antichemotrypsin)、 α 1-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、apo A1、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、Bcl、BCMA、BDNF、b-ECGF、 β -2-微球蛋白、 β 内酰胺酶、bFGF、BID、Bik、BIM、BLC、BL-CAM、BLK、BB淋巴细胞刺激因子(BI γ S)、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、CKK2、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/MIP-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- β 、CXCL3/Gro- γ 、CXCL3、CXCL4/PF4、CXCL5/ENA-78、CXCL6/GCP-2、CXCL7/NAP-2、CXCL8/IL-8、CXCL9/Mig、CXCL10/IP-10、CXCR、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、半胱氨酸蛋白酶抑制剂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、Dnase、Dpp、DPPIV/CD26、Dtk、ECAD、EDA、EDA-A1、EDA-A2、EDAR、EGF、EGFR(ErbB-1)、含有蛋白质7的EGF样结构域、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、Ephrin B2/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、Fc α R、Fc ϵ RI、Fc γ IIb、Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIIa、Fc γ RIIIb、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、Gas 6、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- α 1、GFR- α 2、GFR- α 3、GF- β 1、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、Glut 4、谷氨酸羧肽酶II、糖蛋白激素受体、糖蛋白IIb/IIIa (GP IIb/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、HCC 1、HCMV gB包膜糖蛋白、HCMV UL、造血生长因子 (HGF)、Hep B gp120、类肝素酶、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、HIV MIB gp 120 V3环、HLA、HLA-DR、HM1.24、HMFG PEM、HMGB-1、HRG、Hrk、HSP47、Hsp90、HSV gD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-1 R、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-1 α 、IL-1 β 、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体、免疫球蛋白、INF- α 、INF- α 受体、INF- β 、INF- β 受体、INF- γ 、INF- γ 受体、INF I型、INF I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 α 2、整联蛋白 α 3、整联蛋白 α 4、整联蛋白 α 4/ β 1、整联蛋白 α -V/ β -3、整联蛋白 α -V/ β -6、整联蛋白 α 4/ β 7、整联蛋白 α 5/ β 1、整联蛋白 α 5/ β 3、整联蛋白 α 5/ β 6、整联蛋白 α - δ (α V)、整联蛋白 α - θ 、整联蛋白 β 1、整联蛋白 β 2、整联蛋白 β 3 (GPIIb-IIIa)、IP-10、I-TAC、JE、kallikrein、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-1 bp1、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-Y antigen)、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-1 α 、MIP-1 β 、MIP-3 α 、MIP-3 β 、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、NCA 90、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 (neroserpine)、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、Neurturin、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、p1gR、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、RLI P76、RPA2、RPK-1、RSK、RSV Fgp、S100、RON-8、SCF/KL、SCGF、Sclerostin、SDF-1、SDF1 α 、SDF1 β 、SERINE、血清淀粉样蛋白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- β Pan特异性、TGF- β RII、TGF- β RIIb、TGF- β RIII、TGF- β R1 (ALK-5)、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4、TGF- β 5、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、Tmpe、TMPRSS2、TNF受体I、TNF受体II、TNF- α 、TNF- β 、TNF- β 2、TNFc、TNF-RI、TNF-RII、TNFRSF10A (TRAIL R1 Apo-2/DR4)、TNFRSF10B (TRAIL R2 DR5/KILLER/TRICK-2A/TRICK-B)、TNFRSF10C (TRAIL R3 DcR1/LIT/TRID)、TNFRSF10D (TRAIL R4 DcR2/TRUNDD)、TNFRSF11A (RANK ODF R/TRANCE R)、TNFRSF11B (OPG OCIF/TR1)、TNFRSF12 (TWEAK R FN14)、TNFRSF12A、TNFRSF13B (TACI)、TNFRSF13C (BAFF R)、TNFRSF14 (HVEM ATAR/HveA/LIGHT R/TR2)、TNFRSF16 (NGFR p75NTR)、TNFRSF17 (BCMA)、TNFRSF18 (GITR AITR)、TNFRSF19 (TROY TAJ/TRADE)、TNFRSF19L (RELT)、TNFRSF1A (TNF R1 CD120a/p55-60)、TNFRSF1B (TNF RII CD120b/p75-80)、TNFRSF21 (DR6)、TNFRSF22 (DcTRAIL R2 TNFRH2)、TNFRSF25 (DR3Apo-3/LARD/TR-3/TRAMP/WSL-1)、TNFRSF26 (TNFRH3)、TNFRSF3 (LTbR TNF RIII/TNFC R)、TNFRSF4 (OX40 ACT35/TXGP1 R)、TNFRSF5 (CD40 p50)、TNFRSF6 (Fas Apo-1/APT1/CD95)、TNFRSF6B (DcR3 M68/TR6)、TNFRSF7 (CD27)、TNFRSF8 (CD30)、TNFRSF9 (4-1BB CD137/ILA)、TNFRST23 (DcTRAIL R1 TNFRH1)、TNFSF10 (TRAIL Apo-2配体/TL2)、TNFSF11 (TRANCE/RANK配体ODF/OPG配体)、TNFSF12 (TWEAK Apo-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- α Conectin/DIF/TNFSF2)、TNFSF1B (TNF- β 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、VEGFR-1 (f1t-1)、VEGFR-2、VEGF受体 (VEGFR)、VEGFR-3 (f1t-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/淋巴细胞趋化肤、XCR1、XEDAR、XIAP和XPD。

[0429] 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消除血浆病毒、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。

[0430] 虽然本发明的方法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范围内的抗原结合活性和/或提高(增加)中性pH范围内的人FcRn结合活性与单个抗原结合分子可与之结合的抗原数的增加之间的关系。

[0431] 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。

[0432] 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的作用所致。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。

[0433] 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,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。

[0434] 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(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。

[0435] 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(pH 7.4)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,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,抗原消除中的决速步骤是通过非特异性胞吞被摄入细胞中。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。

[0436] 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介导的掺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,通过在中性pH范围内赋予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,并再与另一抗原结合,通过FcRn被摄入细胞。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中消除的速率。此外,可通过降低酸性pH范围内抗原结合分子的抗原结合活性至小于中性pH范围内的结合活性以进一步提高效率。此外,假定单一抗原结合分子可与之结合的抗原的数目随单一抗原结合分子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。

[0437] <用作抗原结合分子的物质>

[0438] 此外,本发明提供在酸性和中性pH范围内具有人FcRn结合活性且其在酸性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抗原结合分子。抗原结合分子的具体实例包括在pH 5.8-pH6.0和pH 7.4下具有人FcRn结合活性的那些,其分别假定为早期内体和血浆的体内pH,且其在pH 5.8下的抗原结合活性低于在pH 7.4下的抗原结合活性。

在pH 5.8下抗原结合活性低于在pH 7.4下的抗原结合活性的抗原结合分子亦可称为在pH 7.4下的抗原结合活性强于在pH 5.8下的抗原结合活性的抗原结合分子。

[0439] 在酸性和中性pH范围内具有人FcRn结合活性的本发明的抗原结合分子优选为在酸性pH范围内也具有人FcRn结合活性且在中性pH范围内具有比完整人IgG强的人FcRn结合活性的抗原结合分子。结合活性比率不受限制,只要其人FcRn结合活性在pH 7.4下甚至略微较强。

[0440] 按照Journal of Immunology (2009) 182:7663-7671,在酸性pH范围 (pH 6.0) 内,完整人IgG1的人FcRn结合活性为KD 1.7微摩尔,而在中性pH范围内几乎无法检出活性。因此,在优选的实施方案中,在酸性和中性pH范围内具有人FcRn结合活性的本发明的抗原结合分子包括在酸性pH范围内具有KD 20微摩尔或更强的人FcRn结合活性的抗原结合分子,该活性等于或强于在中性pH范围内完整人IgG的人FcRn结合活性。在更优选的实施方案中,本发明的抗原结合分子包括在酸性pH范围内其人FcRn结合活性为KD 2.0微摩尔或更强且在中性pH范围内为KD 40微摩尔或更强的抗原结合分子。在甚至更优选的实施方案中,本发明的抗原结合分子包括在酸性pH范围内其人FcRn结合活性为KD 0.5微摩尔或更强且在中性pH范围内为KD15微摩尔或更强的抗原结合分子。上述KD值通过Journal of Immunology (2009) 182:7663-7671中所述方法 (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) 测定。

[0441] 本发明提供包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域的抗原结合分子,其在酸性和中性pH范围内具有人FcRn结合活性,其中在酸性pH范围内低于在中性pH范围内的人FcRn的抗原结合活性强于KD 3.2微摩尔。本发明还提供包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域的抗原结合分子,其中在中性pH范围内具有人FcRn结合活性,其中在中性pH范围内的人FcRn结合活性是完整人IgG的28倍。本发明的抗原结合分子在pH 7.0和在25℃下具有人FcRn结合活性,其强于完整人IgG的人FcRn结合活性。在更优选的实施方案中,在pH 7.0和在25℃下的人FcRn结合活性是完整人IgG的28倍或强于KD 3.2微摩尔。

[0442] 本发明提供包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域的抗原结合分子,其中在中性pH范围内具有人FcRn结合活性,其中在中性pH范围内的人FcRn结合活性强于KD 2.3微摩尔。本发明还提供包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域的抗原结合分子,其中在中性pH范围内具有人FcRn结合活性,其中在中性pH范围内的人FcRn结合活性是完整人IgG的38倍。

[0443] 在本文中,酸性pH范围通常是指pH 4.0-pH 6.5。酸性pH范围优选为由pH 5.5-pH 6.5内的任何pH值表示的范围,优选选自5.5、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pH 5.8-pH6.0,这接近于体内早期内体的pH。同时,本文的中性pH范围通常是指pH 6.7-pH 10.0。中性pH范围优选为由pH 7.0-pH 8.0内的任何pH值表示的范围,优选选自pH 7.0、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pH 7.4,这与体内血浆(血液) pH接近。如果由于其在pH 7.4的低亲和力所致,难以评价人FcRn结合结构域与人FcRn之间的结合亲和力,则可使用pH 7.0替代pH 7.4。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之间的结合亲和力。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之间的结合亲和力。实施例5中所述的25℃温度是本

发明的实施方案的一个实例。

[0444] 在更优选的实施方案中,在pH 7.0和在25℃下,人FcRn结合活性是完整人IgG的38倍或强于KD 2.3微摩尔。完整人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4用作完整人IgG,目的在于针对其人FcRn结合活性而与抗原结合分子进行比较的参比完整人IgG。更优选使用完整人IgG1,目的在于针对其人FcRn结合活性而与抗原结合分子进行比较的参比完整人IgG。

[0445] 本发明提供包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域的抗原结合分子,其中将抗原结合分子给予非人动物后的血浆总抗原浓度低于将参比抗原结合分子给予非人动物后的血浆总抗原浓度。

[0446] 本发明还提供这样的抗原结合分子,其中将抗原结合分子给予非人动物后的血浆抗原浓度低于未将抗原结合分子给予非人动物所得到的血浆总抗原浓度。

[0447] 与给予包含完整人IgG Fc结构域作为人FcRn结合结构域的参比抗原结合分子相比,或者与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倍和1,000倍或甚至更高。

[0448] 在另一个实施方案中,本发明提供包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域的抗原结合分子,其中如下计算的该抗原结合分子的抗原/抗原结合分子摩尔比率:

[0449] $C=A/B$,

[0450] 低于如下计算的抗原结合分子(其包含相同抗原结合结构域和完整人IgG Fc结构域作为人FcRn结合结构域)的抗原/抗原结合分子摩尔比率(C');

[0451] $C'=A'/B'$,

[0452] 其中;

[0453] A为将抗原结合分子给予非人动物后血浆中的总抗原浓度,

[0454] B为将抗原结合分子给予非人动物后抗原结合分子的血浆浓度,

[0455] A'为将参比抗原结合分子给予非人动物后血浆中的总抗原浓度,

[0456] B'为将参比抗原结合分子给予非人动物后抗原结合分子的血浆浓度。

[0457] 与给予包含完整人IgG Fc结构域作为人FcRn结合结构域的抗原结合分子相比,通过给予本发明的抗原结合分子,可降低抗原/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倍和1,000倍或甚至更高。

[0458] 可按实施例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,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.),当抗原结合分子不与小鼠对应抗原交叉反应时,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,只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中,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。以相同的剂量给予试验抗原结合分子。采用本领域技术人员已知方法,在合适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。

[0459] 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。

[0460] 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pH 7.0和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。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。

[0461] 再更具体地讲,本发明所述对消除血浆抗原的活性有短期作用的抗原结合分子在pH 7.0和在25℃下具有人FcRn结合活性,其是完整人IgG的440倍或强于0.2微摩尔。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。

[0462] 此外,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本发明的抗原结合分子中,其结合活性比率不受限制,只要在酸性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。如果酸性pH范围内的抗原结合活性甚至略微较低,则抗原结合分子是可接受的。在优选的实施方案中,本发明的抗原结合分子包括在pH 7.4下的抗原结合活性是在pH 5.8下的2倍或更高倍的抗原结合分子。在更优选的实施方案中,本发明的抗原结合分子包括在pH 7.4下的抗原结合活性是在pH 5.8下的10倍或更高的抗原结合分子。在甚至更优选的实施方案中,本发明的抗原结合分子包括在pH7.4下的抗原结合活性是在pH 5.8下的40倍或更高的抗原结合分子。

[0463] 具体而言,本发明的抗原结合分子包括例如W0 2009/125825中描述的实施方案。更具体地讲,在优选的实施方案中,本发明的抗原结合分子在pH 5.8下的抗原结合活性低于在pH 7.4下的抗原结合活性,其中KD (pH5.8)/KD (pH7.4) 的值(其是抗原在pH 5.8下的KD与在pH 7.4下的KD的比例) 优选为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,只要可采用本领域技术人员已知技术生产。

[0464] 在另一个优选的实施方案中,在pH 5.8下的抗原结合活性低于在pH 7.4下的抗原结合活性的本发明的抗原结合分子具有 k_d (pH5.8)/ k_d (pH7.4) 的值(其是抗原在pH 5.8下的 k_d 和抗原在pH 7.4下的 k_d 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。 k_d (pH5.8)/ k_d (pH7.4) 值的上限不受特别限制,可以是任何值,例如50、100或200,只要可采用本领域技术人员已知技术生产。

[0465] 本领域技术人员可适当地选择pH以外的测量抗原结合活性和人FcRn结合活性的条件,所述条件不受特别限制;然而,可在例如实施例中描述的MES缓冲液和37℃的条件下进行测量。此外,可通过本领域技术人员已知方法,采用例如实施例中所述的Biacore T100 (GE Healthcare) 等,来测定抗原结合分子的抗原结合活性。

[0466] 本发明的抗原结合分子促进细胞对抗原的摄入。在内体中分子容易自抗原上解离,然后通过与人FcRn结合释放到细胞外。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是中和抗原结合分子时,可通过给予该

分子来促进血浆抗原浓度的降低。因此,在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性的抗原结合分子在酸性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;在中性pH范围内具有人FcRn结合活性的抗原结合分子可能是具有优良药代动力学且每分子可与更多抗原结合的抗原结合分子。

[0467] 在优选的实施方案中,在酸性和中性pH范围内具有人FcRn结合活性的这类抗原结合分子包括含有具有与人FcRn直接或间接结合的能力的人FcRn结合结构域的抗原结合分子。如果该结构域在酸性和中性pH范围内已具有人FcRn结合能力,则可原样使用。或者,即使该结构域在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性但在中性pH范围内仅显示出弱或无人FcRn结合活性,则在将该结构域的氨基酸改变成在中性pH范围内具有人FcRn结合活性后方可使用。或者,可通过改变在酸性和中性pH范围内已具有人FcRn结合能力的结构域中的氨基酸,来提高人FcRn结合活性。这类抗原结合分子包括例如具有含有至少一个氨基酸改变的IgG Fc结构域的氨基酸序列的那些。氨基酸改变不受特别限制;且可在任何位点进行改变,只要在中性pH范围内的人FcRn结合活性强于改变之前的人FcRn结合活性。

[0468] 具体而言,在酸性和中性pH范围内的产生人FcRn结合活性的氨基酸改变包括例如上述亲本IgG Fc结构域中的以下位置的氨基酸改变:221-225、227、228、230、232、233-241、243-252、254-260、262-272、274、276、278-289、291-312、315-320、324、325、327-339、341、343、345、360、362、370、375-378、380、382、385-387、389、396、414、416、423、424、426-438、440和442(EU编号)。更具体地讲,氨基酸改变包括表1、表2、表6-1、表6-2和表9所示位点(按EU编号)处的改变。优选的抗原结合分子包括包含由改变选自以下位置处的至少一个氨基酸所得到的氨基酸序列的抗原结合分子:237、238、239、248、250、252、254、255、256、257、258、265、270、286、289、297、298、303、305、307、308、309、311、312、314、315、317、325、332、334、360、376、380、382、384、385、386、387、389、424、428、433、434和436(按EU编号)。

[0469] 在优选的实施方案中,这类氨基酸改变包括:

[0470] 237位上的Gly被取代为Met的氨基酸取代;

[0471] 238位上的Pro被取代为Ala的氨基酸取代;

[0472] 239位上的Ser被取代为Lys的氨基酸取代;

[0473] 248位上的Lys被取代为Ile的氨基酸取代;

[0474] 250位上的Thr被取代为Ala、Phe、Ile、Met、Gln、Ser、Val、Trp或Tyr的氨基酸取代;

[0475] 252位上的Met被取代为Phe、Trp或Tyr的氨基酸取代;

[0476] 254位上的Ser被取代为Thr的氨基酸取代;

[0477] 255位上的Arg被取代为Glu的氨基酸取代;

[0478] 256位上的Thr被取代为Asp、Glu或Gln的氨基酸取代;

[0479] 257位上的Pro被取代为Ala、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr或Val的氨基酸取代;

[0480] 258位上的Glu被取代为His的氨基酸取代;

[0481] 265位上的Asp被取代为Ala的氨基酸取代;

[0482] 270上的Asp被取代为Phe的氨基酸取代;

[0483] 286位上的Asn被取代为Ala或Glu的氨基酸取代;

[0484] 289位上的Thr被取代为His的氨基酸取代;

[0485] 297位上的Asn被取代为Ala的氨基酸取代;

- [0486] 298上的Ser被取代为Gly的氨基酸取代；
- [0487] 303位上的Val被取代为Ala的氨基酸取代；
- [0488] 305位上的Val被取代为Ala的氨基酸取代；
- [0489] 307位上的Thr被取代为Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、Trp或Tyr的氨基酸取代；
- [0490] 308位上的Val被取代为Ala、Phe、Ile、Leu、Met、Pro、Gln或Thr的氨基酸取代；
- [0491] 309位上的Leu或Val被取代为Ala、Asp、Glu、Pro或Arg的氨基酸取代；
- [0492] 311位上的Gln被取代为Ala、His或Ile的氨基酸取代；
- [0493] 312位上的Asp被取代为Ala或His的氨基酸取代；
- [0494] 314位上的Leu被取代为Lys或Arg的氨基酸取代；
- [0495] 315位上的Asn被取代为Ala或His的氨基酸取代；
- [0496] 317位上的Lys被取代为Ala的氨基酸取代；
- [0497] 325位上的Asn被取代为Gly的氨基酸取代；
- [0498] 332位上的Ile被取代为Val的氨基酸取代；
- [0499] 334位上的Lys被取代为Leu的氨基酸取代；
- [0500] 360位上的Lys被取代为His氨基酸取代；
- [0501] 376位上的Asp被取代为Ala的氨基酸取代；
- [0502] 380位上的Glu被取代为Ala的氨基酸取代；
- [0503] 382位上的Glu被取代为Ala的氨基酸取代；
- [0504] 384位上的Asn或Ser被取代为Ala的氨基酸取代；
- [0505] 385位上的Gly被取代为Asp或His的氨基酸取代；
- [0506] 386位上的Gln被取代为Pro的氨基酸取代；
- [0507] 387位上的Pro被取代为Glu的氨基酸取代；
- [0508] 389位的Asn被取代为Ala或Ser的氨基酸取代；
- [0509] 424位上的Ser被取代为Ala的氨基酸取代；
- [0510] 428位上的Met被取代为Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr的氨基酸取代；
- [0511] 433位上的His被取代为Lys的氨基酸取代；
- [0512] 434位上的Asn被取代为Ala、Phe、His、Ser、Trp或Tyr的氨基酸取代；
- [0513] 和436位上的Tyr被取代为His或Phe的氨基酸取代(按EU编号)。
- [0514] 待改变的氨基酸的数目不受特别限制；可在唯一的单一位点或者两个或更多个位点上改变氨基酸。两个或更多个氨基酸改变的组合包括例如表3、表4-1至4-5、表6-1、表6-2和表9所列的那些。
- [0515] 同时，在酸性和中性pH范围内已具有人FcRn结合能力的结构域包括例如包含选自亲本IgG Fc结构域中的以下至少一个氨基酸的人FcRn结合结构域：
- [0516] 氨基酸位置237上的Met；
- [0517] 氨基酸位置238上的Ala；
- [0518] 氨基酸位置239上的Lys；
- [0519] 氨基酸位置248上的Ile；

- [0520] 氨基酸位置250上的Ala、Phe、Ile、Met、Gln、Ser、Val、Trp或Tyr；
- [0521] 氨基酸位置252上的Phe、Trp或Tyr；
- [0522] 氨基酸位置254上的Thr；
- [0523] 氨基酸位置255上的Glu；
- [0524] 氨基酸位置256上的Asp、Glu或Gln；
- [0525] 氨基酸位置257上的Ala、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr或Val；
- [0526] 氨基酸位置258上的His；
- [0527] 氨基酸位置265上的Ala；
- [0528] 氨基酸位置270上的Phe；
- [0529] 氨基酸位置286上的Ala或Glu；
- [0530] 氨基酸位置289上的His；
- [0531] 氨基酸位置297上的Ala；
- [0532] 氨基酸位置298上的Gly；
- [0533] 氨基酸位置303上的Ala；
- [0534] 氨基酸位置305上的Ala；
- [0535] 氨基酸位置307上的Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、Trp或Tyr；
- [0536] 氨基酸位置308上的Ala、Phe、Ile、Leu、Met、Pro、Gln或Thr；
- [0537] 氨基酸位置309上的Ala、Asp、Glu、Pro或Arg；
- [0538] 氨基酸位置311上的Ala、His或Ile；
- [0539] 氨基酸位置312上的Ala或His；
- [0540] 氨基酸位置314上的Lys或Arg；
- [0541] 氨基酸位置315上的Ala或His；
- [0542] 氨基酸位置317上的Ala；
- [0543] 氨基酸位置325上的Gly；
- [0544] 氨基酸位置332上的Val；
- [0545] 氨基酸位置334上的Leu；
- [0546] 氨基酸位置360上的His；
- [0547] 氨基酸位置376上的Ala；
- [0548] 氨基酸位置380上的Ala；
- [0549] 氨基酸位置382上的Ala；
- [0550] 氨基酸位置384上的Ala；
- [0551] 氨基酸位置385上的Asp或His；
- [0552] 氨基酸位置386上的Pro；
- [0553] 氨基酸位置387上的Glu；
- [0554] 氨基酸位置389上的Ala或Ser；
- [0555] 氨基酸位置424上的Ala；
- [0556] 氨基酸位置428上的Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr；

[0557] 氨基酸位置433上的Lys;

[0558] 氨基酸位置434上的Ala、Phe、His、Ser、Trp或Tyr;

[0559] 和氨基酸位置436上的His或Phe (EU编号)。

[0560] 一个位点上的氨基酸或者两个或更多个位点上的氨基酸可具有这些氨基酸。在两个或更多个位置上的氨基酸的组合包括例如表3、表4-1至4-5、表6-1、表6-2和表9所列的那些。

[0561] 或者,在优选的实施方案中,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,或其中已插入至少一个组氨酸或非天然氨基酸。组氨酸或非天然氨基酸突变引入其中的位点不受特别限制,可以是任何位点,只要与取代前相比,在酸性pH范围内的抗原结合活性弱于在中性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 k_d (在酸性pH范围内) / k_d (在中性pH范围内) 值较大)。在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。可由本领域技术人员适当地确定被组氨酸或非天然氨基酸置换的氨基酸数和待插入的氨基酸数。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,除了组氨酸或非天然氨基酸取代或者组氨酸或非天然氨基酸的插入以外,还可同时进行这类其它氨基酸的缺失、添加、插入和/或取代。可采用例如组氨酸扫描等方法,随机地进行组氨酸或非天然氨基酸的取代或者组氨酸或非天然氨基酸的插入,该组氨酸扫描方法使用组氨酸代替本领域技术人员已知的丙氨酸扫描中的丙氨酸。与突变前相比, KD (pH5.8) / KD (pH7.4) 或 k_d (pH5.8) / k_d (pH7.4) 增加的抗原结合分子可选自随机向其中引入组氨酸或非天然氨基酸突变的抗原结合分子。

[0562] 具有突变成组氨酸或突变成非天然氨基酸且其在酸性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优选抗原结合分子包括例如在突变成组氨酸或突变成非天然氨基酸后抗原结合分子在pH 7.4下的抗原结合活性相当于在突变成组氨酸或突变成非天然氨基酸前在pH 7.4下的抗原结合活性。在本发明中,“抗原结合分子在组氨酸或非天然氨基酸突变后的抗原结合活性相当于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”意指如果将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%,则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pH 7.4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。如果抗原结合分子的抗原结合活性由于组氨酸或非天然氨基酸的取代或插入而降低,则可通过向抗原结合分子中引入一个或更多个氨基酸的取代、缺失、添加和/或插入,来调节抗原结合活性,使得抗原结合活性变得与组氨酸取代或插入前的抗原结合活性相当。本发明还包括在组氨酸取代或插入后由于一个或更多个氨基酸的取代、缺失、添加和/或插入而使其结合活性相当的这类抗原结合分子。

[0563] 此外,当抗原结合分子是包括抗体恒定区的物质时,在抗原结合分子(其在pH 5.8下的抗原结合活性低于其在pH 7.4下的抗原结合活性)的另一个优选实施方案中,本发明包括用于改变抗原结合分子中所包含的抗体恒定区的方法。改变后抗体恒定区的具体实例

包括W02009/125825实施例中描述的恒定区 (SEQ ID NO:11、12、13和14)。

[0564] 当通过上述方法和此类方法,与在pH 7.4下相比,抗原结合物质在pH 5.8下的抗原结合活性减弱(当KD (pH5.8)/KD (pH7.4)值增加)时,通常优选KD (pH5.8)/KD (pH7.4)值是相对于原始抗体的2倍或更多倍、更优选5倍或更多倍、甚至更优选10倍或更多倍,但对此没有特别限制。

[0565] 此外,本发明提供用组氨酸或非天然氨基酸取代下述位点之一处的至少一个氨基酸的抗原结合分子。按照Kabat编号 (Kabat EA等(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH) 表示氨基酸位置。

[0566] 重链:H27、H31、H32、H33、H35、H50、H58、H59、H61、H62、H63、H64、H65、H99、H100b和H102

[0567] 轻链:L24、L27、L28、L32、L53、L54、L56、L90、L92和L94这些改变位点中,H32、H61、L53、L90和L94假定为最通用的改变位点。

[0568] 具体而言,组氨酸或非天然氨基酸取代位点的优选组合包括例如H27、H31和H35的组合;H27、H31、H32、H35、H58、H62和H102的组合;L32和L53的组合;及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。

[0569] 本发明的抗原结合分子可具有其它性质,例如可以是激动性或拮抗性抗原结合分子,只要其在酸性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,并且在酸性和中性pH范围内具有人FcRn结合活性。优选的本发明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。

[0570] 同时,本发明的抗原结合分子可识别任何抗原。具体而言,被本发明的抗原结合分子识别的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(例如细胞表面标记)和可溶性抗原(例如细胞因子)。这类抗原包括例如上述抗原。

[0571] 在优选的实施方案中,本发明的抗原结合分子包括具有抗原结合结构域和人FcRn结合结构域的IgG型免疫球蛋白(IgG抗体)。当IgG抗体用作抗原结合分子时,类型不受限制;可能使用IgG1、IgG2、IgG3、IgG4等。

[0572] 本发明的抗原结合分子的来源不受特别限制,可以是任何来源。可能使用例如小鼠抗体、人抗体、大鼠抗体、兔抗体、山羊抗体、骆驼抗体以及其它抗体。此外,抗体可以是例如上述嵌合抗体,特别是具有氨基酸序列取代的经改变的抗体,例如人源化抗体。抗体还可为上述双特异性抗体、多种分子与之连接的抗体修饰产物,包括抗体片段的多肽和具有修饰糖链的抗体。

[0573] 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。双特异性或多特异性抗体可以是识别两个或更多个不同抗原的抗体,或识别相同抗原上的两个或更多个不同表位的抗体。

[0574] 此外,包括抗体片段的多肽包括例如Fab片段、F(ab')₂片段、scFvs (Nat Biotechnol. 2005年9月;23(9):1126-36)、结构域抗体(dAb) (W02004/058821、W0 2003/002609)、scFv-Fc (W0 2005/037989)、dAb-Fc和Fc融合蛋白。当分子包括Fc结构域时,Fc结构域可用作人FcRn结合结构域。或者,FcRn结合结构域可与这些分子融合。

[0575] 此外,适用于本发明的抗原结合分子可为抗体样分子。抗体样分子(支架分子、肽

分子)是通过与靶分子结合而显示出功能的分子(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),包括例如DARPin (WO 2002/020565)、亲和体 (WO 1995/001937)、Avimer (WO2004/044011; WO 2005/040229)和Adnectin (WO 2002/032925)。如果这些抗体样分子可以pH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,则可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与之结合的抗原的数目。

[0576] 此外,抗原结合分子可以由人FcRn结合结构域和与靶标(包括配体)结合的受体蛋白之间的融合产生的蛋白质,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(Nat Med. 2003年1月;9(1):47-52;BioDrugs. (2006) 20(3):151-60)。如果这些受体-人FcRn结合结构域融合蛋白以pH依赖性方式与靶分子(包括配体)结合和/或在中性pH范围内具有人FcRn结合活性,则可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降低,并改进抗原结合分子的药代动力学,增加单个抗原结合分子可与之结合的抗原的数目。适当地设计和修饰受体蛋白,使得包括与靶标(包括配体)结合的受体蛋白的结构域。如上文提供的包括TNFR-Fc融合蛋白、IL1R-Fc融合蛋白、VEGFR-Fc融合蛋白和CTLA4-Fc融合蛋白的实例一样,包含与这些靶标(包括配体)结合必需的这些受体蛋白的胞外结构域的可溶性受体分子优选用于本发明中。这些设计和修饰的受体分子在本申请中称为人工受体。用于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。

[0577] 此外,抗原结合分子可以是融合蛋白,其中与靶标结合并具有中和作用的人工配体蛋白与人FcRn结合结构域融合,人工配体蛋白包括例如突变型IL-6 (EMBO J. 1994年12月15日;13(24):5863-70)。如果这类人工配体融合蛋白可以pH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,则可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与之结合的抗原的数目。

[0578] 此外,本发明的抗体可包括修饰糖链。具有修饰糖链的抗体包括例如具有修饰糖基化的抗体 (WO 99/54342)、缺乏加至糖链的岩藻糖的抗体 (WO 00/61739、WO 02/31140、WO 2006/067847、WO2006/067913)和具有带二等分GlcNAc的糖链的抗体 (WO 02/79255)。

[0579] 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。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。

[0580] 嵌合抗体的产生是已知的。在人-小鼠嵌合抗体的情况下,例如可将编码抗体V区

的DNA与编码人抗体C区的DNA连接;这可被插入表达载体中,并导入宿主以产生嵌合抗体。

[0581] “人源化抗体”亦称为重构人抗体,并且是其中将非人哺乳动物(例如小鼠)的互补决定区(CDR)植入人抗体的CDR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)。适用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EP 125023和WO 96/02576)。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,可采用使用常规表达载体的系统,来产生人源化抗体。可使用所制备的具有与CDR和FR两者的末端区重叠的部分的若干寡核苷酸作为引物,通过PCR合成这类DNA(参见WO 98/13388中所述方法)。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,可改变抗体可变区FR中的氨基酸,使得重构人抗体的CDR可形成合适的抗原结合部位(Sato等,Cancer Res. (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结构具有作用的部分(Chothia等,J.Mol.Biol.(1987) 196:901-17)和参与VH-VL相互作用的部分(EP 239400)。

[0582] 当本发明的抗原结合分子是嵌合抗体或人源化抗体时,这些抗体的C区优选来源于人抗体。例如C- γ 1、C- γ 2、C- γ 3和C- γ 4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区以提高或降低与Fc- γ 受体的结合或者改进抗体稳定性或生产率。本发明的嵌合抗体优选包括来源于非人哺乳动物的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的抗体的CDR和来源于人抗体的FR和C区。来源于人抗体的恒定区体优选包括人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为任何同种型的抗体恒定区。优选使用来源于人IgG1的恒定区,但不限于此。用于人源化抗体的来源于人抗体的FR,也不受特别限制,可来源于任何同种型的抗体。

[0583] 可通过缺失、取代、插入和/或添加等改变本发明的嵌合和人源化抗体的可变区和恒定区,只要显示出原始抗体的结合特异性。

[0584] 由于人体中的免疫原性降低,因此认为使用来源于人的序列的嵌合和人源化抗体当给予人用于治疗目的等时,是有益的。

[0585] 本发明的这类抗原结合分子可通过任何方法获得。例如,原来在酸性pH和中性pH范围内不具有人FcRn结合活性的抗原结合分子、在酸性pH范围内具有比在中性pH范围内强的抗原结合活性的抗原结合分子或在酸性和中性pH范围内具有相当的抗原结合活性的抗原结合分子可通过上述氨基酸改变等,人工地改变成具有所需活性的抗原结合分子。或者,可通过筛选,从获自下述抗体文库或杂交瘤的许多抗体中选择具有所需活性的抗体。

[0586] 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。

[0587] 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,EMBO J. (1994) 13: 324.0-60;Vaughan等,Nature Biotechnology (1996) 14:309-14;以及日本专利Kohyo公告号 (JP-A) H20-504970 (对应于非日本国际申请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 (W0 95/15393) 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,可使用噬菌体展示方法,在噬菌体表面上表达作为单链抗体 (scFv) 的人抗体的可变区,并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W0 92/01047、W0 92/20791、W0 93/06213、W0 93/11236、W0 93/19172、W0 95/01438和W095/15388。

[0588] 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。

[0589] 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W0 98/46777) 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。

[0590] 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W0 96/34096;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融合 (例如如U266),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W093/12227、W092/03918、W094/02602、W096/34096和W096/33735)。

[0591] 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。

[0592] 可使用常规融合剂(例如聚乙二醇),使获自淋巴细胞或用所需抗原免疫的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。

[0593] 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。

[0594] 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。可使用若干个所产生的寡核苷酸,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,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EP 239400和WO 96/02576)。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)。

[0595] 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. USA* 82: 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)或相似的氨基酸残基(根据氨基酸侧链的总体性质归在同一组的氨基酸残基)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:

[0596] (1) 疏水性:丙氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸和亮氨酸;

[0597] (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;

[0598] (3) 酸性:天冬氨酸和谷氨酸;

[0599] (4) 碱性:精氨酸、组氨酸和赖氨酸;

[0600] (5) 影响链的取向的残基:甘氨酸和脯氨酸;和

[0601] (6) 芳族:酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸。

[0602] 总的说来,H链和L链可变区上存在的共6个互补决定区(CDR;超变区)彼此相互作用形成抗体的抗原结合部位。另已知仅可变区能够识别和结合抗原,但其亲和力低于完整结合部位的亲和力。因此,编码本发明的H链和L链的抗体基因可编码各包括H链或L链抗原结合部位的片段,只要由该基因编码的多肽保持与所需抗原结合的活性。

[0603] 如上所述,重链可变区一般由3个CDR和4个FR构成。在本发明优选的实施方案中,被“改变”的氨基酸残基可适当地选自例如CDR或FR中的氨基酸残基。总的说来,CDR中氨基酸残基的改变可降低抗原结合能力。因此,在本发明中,被“改变”的合适氨基酸残基优选选自FR中的氨基酸残基,但不限于此。可选择CDR中的氨基酸,只要证实改变不降低结合能力。或者,通过使用公共数据库等,本领域的技术人员可获得可用作生物(例如人或小鼠)的抗体可变区FR的合适序列。

[0604] 此外,本发明提供编码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为任何基因,并可以是DNA、RNA、核酸类似物等。

[0605] 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。

[0606] 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(J. Exp. Med. (1995) 108:94.0)、COS、HEK293、3T3、骨髓瘤、BHK(幼仓鼠肾)、HeLa和Vero;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。CHO-DG44、CHO-DX11B、COS7细胞、HEK293细胞和BHK细胞优选用来表达本发明的抗体。动物细胞中,对于大规模表达,CHO细胞是特别优选的。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。

[0607] 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。

[0608] 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。

[0609] <筛选方法>

[0610] 本发明提供筛选在酸性和中性pH范围内具有人FcRn结合活性的抗原结合分子的方法。本发明还提供筛选在酸性和中性pH范围内具有人FcRn结合活性且在酸性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抗原结合分子的方法。本发明还提供筛选能够促进细胞对抗原摄入的抗原结合分子的方法。本发明还提供筛选被修饰以使每分子能够结合更多抗原的抗原结合分子的方法。本发明还提供筛选能够促进抗原消除的抗原结合分子的方法。本发明还提供筛选具有改进的药代动力学的抗原结合分子的方法。本发明还提供筛选促进自其在细胞外结合的抗原上胞内解离的抗原结合分子的方法。本发明还提供筛选促进以抗原结合的形式被摄入细胞后以无抗原的形式胞外释放的抗原结合分子的方法。本发明还提供筛选特别用作药物组合物的抗原结合分子的方法。上述方法可用于筛选在血浆滞留中特别优良且具有自血浆消除抗原的优异能力的抗原结合分子。

[0611] 具体而言,本发明提供筛选抗原结合分子的方法,所述方法包括以下步骤:

[0612] (a) 选择这样的抗原结合分子,其与在改变在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性的抗原结合分子的人FcRn结合结构域中的至少一个氨基酸前相比,在中性pH范围内具有较强的人FcRn结合活性;和

[0613] (b) 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,并选择与在酸性pH范围内相比在中性pH范围内具有较强抗原结合活性的抗原结合分子。

[0614] 步骤(a)和(b)可按任一顺序进行。此外,每个步骤可重复两次或更多次。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。

[0615] 在本发明的筛选方法中,在中性pH范围内抗原结合分子的抗原结合活性不受特别限制,只要其为在pH 6.7-10.0的范围内的抗原结合活性。例如,包括WO 2009/125825中描述的实施方案。优选的抗原结合活性包括在pH 7.0-8.0的范围内的抗原结合活性。更优选的抗原结合活性包括在pH 7.4下的抗原结合活性。同时,在酸性pH范围内抗原结合分子的抗原结合活性不受特别限制,只要是在pH 4.0-6.5的范围内的抗原结合活性。优选的抗原结合活性包括在pH 5.5和6.5的范围内的抗原结合活性。更优选的抗原结合活性包括在pH 5.8或pH5.5的抗原结合活性。

[0616] 在中性pH范围内抗原结合分子的人FcRn结合活性不受特别限制,只要其为在pH 6.7-10.0的范围内的的人FcRn结合活性。优选的人FcRn结合活性包括在pH 7.0-8.0范围内的人FcRn结合活性。更优选的人FcRn结合活性包括在pH 7.4下的人FcRn结合活性。

[0617] 抗原结合分子在酸性pH范围内的人FcRn结合活性不受特别限制,只要其为在pH 4.0-6.5的范围内的的人FcRn结合活性。优选的人FcRn结合活性包括在pH 5.5-6.5范围内的人FcRn结合活性。更优选的人FcRn结合活性包括在pH 5.8-6.0范围内的人FcRn结合活性。

[0618] 在本文中,酸性pH范围通常是指pH 4.0-pH 6.5。酸性pH范围优选为由pH 5.5-pH 6.5内的任何pH值表示的范围,优选选自5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4或6.5,特别优选pH 5.8-pH6.0,这接近于体内早期内体的pH。同时,本文的中性pH范围通常是指pH 6.7-pH 10.0。中性pH范围优选为由pH 7.0-pH 8.0内的任何pH值表示的范围,优选选自pH 7.0、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pH 7.4,这与体内血浆(血液)pH接近。如果由于其在pH 7.4的低亲和力所致,难以评价人FcRn结合结构域与人FcRn之间的结合亲和力,则可使用pH 7.0替代pH 7.4。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之间的结合亲和力。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之间的结合亲和力。实施例5中所述的25℃温度是本发明的实施方案的一个实例。

[0619] 抗原结合分子的抗原结合活性和人FcRn结合活性可通过通过本领域技术人员已知方法测定。本领域的技术人员可选择pH以外的合适条件。可使用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,来评价抗原结合分子的抗原结合活性和人FcRn结合活性。它们可通过本领域技术人员已知方法,例如使用Biacore (GE Healthcare)、Scatchard曲线、流式细胞仪等来测定。

[0620] 按照Journal of Immunology (2009) 182:7663-7671,在酸性pH范围内 (pH 6.0) 完整人IgG1的人FcRn结合活性为KD 1.7微摩尔,而在中性pH范围内几乎检不出活性。因此,在优选的实施方案中,可筛选在酸性和中性pH范围内具有人FcRn结合活性的本发明的抗原结合分子,包括在酸性pH范围内的人FcRn结合活性为KD 20微摩尔或更强的抗原结合分子,其等于或强于在中性pH范围内完整人IgG的人FcRn结合活性。在更优选的实施方案中,可筛选本发明的抗原结合分子,包括人FcRn结合活性在酸性pH范围内为KD 2.0微摩尔或更强且在中性pH范围内为KD 40微摩尔或更强的抗原结合分子。在甚至更优选的实施方案中,可筛选本发明的抗原结合分子,包括在酸性pH范围内的人FcRn结合活性为KD 0.5微摩尔或更强且在中性pH范围内为KD 15微摩尔或更强的抗原结合分子。上述KD值通过Journal of Immunology (2009) 182:7663-7671所述方法(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)测定。

[0621] 本发明提供筛选抗原结合分子的方法,所述方法包括以下步骤:

[0622] (a) 选择这样的抗原结合分子,其具有通过改变抗原结合分子的人FcRn结合结构域中的至少一个氨基酸而获得的在中性pH范围内的大于KD 3.2微摩尔的人FcRn结合活性,

[0623] (b) 得到编码其中在(a)中制备的人FcRn结合结构域与抗原结合结构域连接的抗原结合分子的基因;和

[0624] (c) 使用(b)中产生的基因产生抗原结合分子。

[0625] 在一个实施方案中,可按照上述本领域人员采用的方法,筛选包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域的抗原结合分子,其在酸性和中性pH范围内具有人FcRn结合活性,其中在酸性pH范围内的抗原结合活性低于在中性pH范围内的人FcRn的抗原结合活性强于KD3.2微摩尔。在更优选的实施方案中,在pH 7.0和25℃下的人FcRn结合活性强于KD 3.2微摩尔。

[0626] 本发明提供筛选包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域的抗原结合分子的方法,其中在中性pH范围内具有人FcRn结合活性,其中在中性pH范围内的人FcRn结合活性强于KD 2.3微摩尔。本发明还提供筛选包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域的抗原结合分子的方法,其中在中性pH范围内具有人FcRn结合活性,其中在中性pH范围内的人FcRn结合活性是完整人IgG的38倍。

[0627] 在中性pH范围内具有人FcRn结合活性的本发明的抗原结合分子不受特别限制,只要它们在pH 6.7-10.0下具有人FcRn结合活性。然而,优选的抗原结合分子在pH 6.7-10.0下的人FcRn结合活性强于完整人IgG的人FcRn结合活性。

[0628] 在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性的本发明的抗原结合分子不受特别限制,只要它们在pH 4.0-6.5下具有人FcRn结合活性。然而,优选的抗原结合分子在pH 5.5-6.5的

人FcRn结合活性相当于或强于完整人IgG的人FcRn结合活性。

[0629] 在本文中,选择具有在中性pH范围内比在酸性pH范围内强的抗原结合活性的抗原结合分子的步骤与选择具有在酸性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分子的步骤同义。

[0630] 中性与酸性pH范围之间的抗原结合活性的比率不受特别限制,只要在中性pH范围内的抗原结合活性强于在酸性pH范围内的抗原结合活性。然而,在pH 6.7-10.0下的抗原结合活性优选为在pH 4.0-6.5下的抗原结合活性的2倍或更多倍,更优选10倍或更多倍,还更优选40倍或更多倍。

[0631] 在本发明的筛选方法中,可使用文库,例如噬菌体文库。

[0632] 在本发明的方法中,抗原和抗原结合分子可以任何状态结合在一起,因此所述状态不受特别限制。例如,可使抗原与固定化抗原结合分子接触以实现其结合。或者,可使抗原结合分子与固定化抗原接触以实现其结合。或者,可使抗原结合分子和抗原在溶液中彼此接触以实现其结合。

[0633] 待通过本发明的筛选方法筛选的抗原结合分子可通过任何方法制备。例如,可使用预先存在的抗体、预先存在的抗原结合结构域文库(噬菌体文库等)、由经免疫动物的B细胞制备的抗体或抗原结合结构域文库或通过经免疫动物制备的杂交瘤、通过将随机氨基酸改变引入上述抗体或抗原结合结构域文库而获得的抗体或抗原结合结构域文库、引入组氨酸突变或非天然氨基酸突变的抗体或抗原结合结构域文库(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突变等的抗原结合结构域文库)等。

[0634] 可通过本发明的筛选方法获得与抗原结合多次的抗原结合分子,其因此在血浆滞留方面是优良的。因此,本发明的筛选方法可用于作用于获得在血浆滞留方面是优良的抗原结合分子的筛选方法。

[0635] 此外,可通过本发明的筛选方法获得当给予动物(例如人、小鼠或猴)时可与抗原结合两次或更多次的抗原结合分子。因此,本发明的筛选方法可用于作用于获得可与抗原结合两次或更多次的抗原结合分子的筛选方法。

[0636] 此外,可通过本发明的筛选方法获得这样的抗原结合分子,当给予动物(例如人、小鼠或猴)时与其抗原结合部位的数目相比能够与更多抗原结合。因此,本发明的筛选方法可用于作用于获得与其抗原结合部位相比,能够与更多抗原结合的抗原结合分子的筛选方法。例如,当抗体是中和抗体时,本发明的筛选方法可用于作用于获得这样的抗原结合分子的筛选方法:与该抗原结合分子的抗原结合部位的数目相比,其可中和更多抗原。

[0637] 此外,可通过本发明的筛选方法获得这样的抗原结合分子,当给予动物(例如人、小鼠或猴)时,能够在细胞内自胞外结合的抗原上解离。因此,本发明的筛选方法可用于作用于获得能够在细胞内自胞外结合的抗原上解离的抗原结合分子的筛选方法。

[0638] 此外,可通过本发明的筛选方法获得这样的抗原结合分子,当给予动物(例如人、小鼠或猴)时,其与抗原结合并被摄入细胞,并以不含抗原的形式释放到细胞外。因此,本发明的筛选方法可用于作用于获得与抗原结合并被摄入细胞,并以不含抗原的形式释放到细胞外的抗原结合分子的筛选方法。

[0639] 此外,可通过本发明的筛选方法获得当给予动物(例如人、小鼠或猴)时,可快速消除血浆中的抗原的抗原结合分子。因此,本发明的筛选方法可用于作用于获得消除血浆抗原

的能力升高(高能力)的抗原结合分子的筛选方法。

[0640] 此外,预期这类抗原结合分子作为药物尤其优良,因为可降低患者的给药剂量和频率,因此可降低总剂量。因此,本发明的筛选方法可用作筛选用作药物组合物的抗原结合分子的方法。

[0641] <用于产生抗原结合分子的方法>

[0642] 本发明提供用于产生在内体pH和血浆pH下具有人FcRn结合活性,且在内体pH下的抗原结合活性低于在血浆pH下的抗原结合活性的抗原结合分子的方法。本发明还提供用于产生当给予时在药代动力学和在促进血浆抗原浓度降低方面表现优良的抗原结合分子的方法。本发明还提供用于产生当用作药物组合物时特别有益的抗原结合分子的方法。

[0643] 具体而言,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:

[0644] (a) 选择这样的抗原结合分子,其与在改变在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性的抗原结合分子的人FcRn结合结构域中的至少一个氨基酸前相比,在中性pH范围内具有较强的人FcRn结合活性;

[0645] (b) 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,并选择与在酸性pH范围内相比在中性pH范围内具有较强抗原结合活性的抗原结合分子;

[0646] (c) 获得编码其中在(a)和(b)中制备的人FcRn结合结构域与抗原结合结构域连接的抗原结合分子的基因;和

[0647] (d) 使用在(c)中制备的基因产生抗原结合分子。

[0648] 步骤(a)和(b)可按任一顺序进行。此外,每个步骤可重复两次或更多次。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。

[0649] 有效连接在(a)和(b)中制备的人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组成的接头是本领域已知的。

[0650] 用于本发明的生产方法的抗原结合分子可通过任何方法制备。例如,可使用预先存在的抗体、预先存在的文库(噬菌体文库等)、自通过免疫动物所获得的杂交瘤或自经免疫动物的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而制备的抗体和文库、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),等等。

[0651] 在上述生产方法中,在中性pH范围内抗原结合分子的人FcRn结合活性不受特别限制,只要其为在pH 6.7-10.0范围内的人FcRn结合活性。优选的人FcRn结合活性包括在pH 7.0-8.0范围内的人FcRn结合活性。更优选的人FcRn结合活性包括在pH 7.4下的人FcRn结合活性。

[0652] 抗原结合分子在酸性pH范围内的人FcRn结合活性不受特别限制,只要其为在pH 4.0-6.5的范围内的人FcRn结合活性。优选的人FcRn结合活性包括在pH 5.5-6.5范围内的人FcRn结合活性。更优选的人FcRn结合活性包括在pH 6.0下的人FcRn结合活性。

[0653] 在本文中,酸性pH范围通常是指pH 4.0-pH 6.5。酸性pH范围优选为由pH 5.5-pH 6.5内的任何pH值表示的范围,优选选自5.5、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pH 5.8-pH6.0,这接近于体内早期内体的pH。同时,本文的中性pH范围通常是指pH 6.7-pH 10.0。中性pH范围优选为由pH 7.0-pH 8.0内的任何pH值表示的范围,优选选自pH 7.0、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pH 7.4,这与体内血浆(血液)pH接近。如果由于其在pH 7.4的低亲和力所致,难以评价人FcRn结合结构域与人FcRn之间的结合亲和力,则可使用pH 7.0替代pH 7.4。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之间的结合亲和力。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之间的结合亲和力。实施例5中所述的25℃温度是本发明的实施方案的一个实例。

[0654] 本发明提供一种用于产生抗原结合分子的方法,所述方法包括以下步骤:

[0655] (a) 选择通过改变抗原结合分子的人FcRn结合结构域中的至少一个氨基酸获得的具有在中性pH范围内强于3.2微摩尔的人FcRn结合活性的抗原结合分子;

[0656] (b) 得到编码其中在(a)中制备的人FcRn结合结构域与抗原结合结构域连接的抗原结合分子的基因;和

[0657] (c) 使用(b)中制备的基因产生抗原结合分子。

[0658] 在优选的实施方案中,可以产生在酸性和中性pH范围内具有人FcRn结合活性的本发明的抗原结合分子,包括在酸性pH范围内的人FcRn结合活性为KD 20微摩尔或更强的抗原结合分子,其等于或强于在中性pH范围内完整人IgG的人FcRn结合活性。在更优选的实施方案中,还可产生这样的本发明的抗原结合分子,其包括在酸性pH范围内的人FcRn结合活性为KD 2.0微摩尔或更强且在中性pH范围内为KD 40微摩尔或更强的抗原结合分子。在甚至更优选的实施方案中,可优选产生这样的本发明的抗原结合分子,其包括在酸性pH范围内的人FcRn结合活性为KD 0.5微摩尔或更强且在中性pH范围内为KD 15微摩尔或更强的抗原结合分子。上述KD值通过Journal of Immunology (2009) 182:7663-7671中所述方法(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)测定。在一个实施方案中,可按照上述本领域技术人员采用的方法,产生包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域的抗原结合分子,其在酸性和中性pH范围内具有人FcRn结合活性,其中在酸性pH范围内低于在中性pH范围内的人FcRn的抗原结合活性强于KD 3.2微摩尔。在更优选的实施方案中,由此产生的抗原结合分子在pH 7.0和25℃下的人FcRn结合活性强于KD 3.2微摩尔。

[0659] 本发明提供用于产生包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域的抗原结合分子的方法,所述抗原结合分子在中性pH范围内具有人FcRn结合活性,其中在中性pH范围内的人FcRn结合活性强于KD 2.3微摩尔。本发明还提供用于产生包含抗原结合结构域和人FcRn结合结构域的抗原结合分子的方法,所述抗原结合分子在中性pH范围内具有人FcRn结合活性,其中在中性pH范围内的人FcRn结合活性是完整人IgG的38倍。

[0660] 在上述生产方法中,在中性pH范围内抗原结合分子的抗原结合活性不受特别限制,只要抗原结合活性是在pH介于pH 6.7与pH 10.0之间的抗原结合活性,包括例如WO 2009/125825中描述的实施方案。优选的抗原结合活性是在pH介于pH 7.0与pH 8.0之间的抗原结合活性,更优选的抗原结合活性是在pH 7.4下的抗原结合活性。或者,在酸性pH范围内抗原结合分子的抗原结合活性不受特别限制,只要抗原结合活性是在pH介于pH 4.0与pH 6.5之间的抗原结合活性。优选的抗原结合活性是在pH介于pH 5.5-pH 6.5之间的抗原结合活性,更优选的抗原结合活性是在pH 5.8或pH 5.5下的抗原结合活性。

[0661] 抗原结合分子的抗原结合活性和人FcRn结合活性可通过通过本领域技术人员已知方法测定。可由本领域技术人员适当地确定pH以外的条件。

[0662] 在本发明的生产方法中,在中性pH范围内具有人FcRn结合活性的抗原结合分子不受特别限制,只要它们在pH 6.7-10.0下具有人FcRn结合活性。然而,抗原结合分子在pH 6.7-10.0下的人FcRn结合活性优选强于完整人IgG的人FcRn结合活性。更优选抗原结合分子具有强于KD 40微摩尔、还更优选强于KD 15微摩尔的人FcRn结合活性。

[0663] 在本发明的生产方法中,在酸性pH范围内具有人FcRn结合活性的抗原结合分子不受特别限制,只要它们在pH 4.0-6.5下具有人FcRn结合活性。然而,在pH 5.5-6.5下,抗原结合分子优选具有强于KD 20微摩尔的人FcRn结合活性。人FcRn结合活性更优选相当于或强于完整人IgG1的人FcRn结合活性(强于KD 1.7微摩尔),更优选强于KD 0.5微摩尔。

[0664] 上述KD值可通过“The Journal of Immunology, (2009) 182:7663-7671”中描述的方法(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)测定。

[0665] 在本发明的生产方法中,选择在pH 6.7-pH 10.0下的抗原结合活性强于在pH 4.0-pH 6.5下的抗原结合活性的抗原结合分子的步骤与选择在pH 4.0-pH 6.5下的抗原结合活性低于在pH 6.7-pH 10.0下的抗原结合活性的抗原结合分子的步骤同义。

[0666] 在中性pH范围内与在酸性pH范围内的抗原结合活性之间的比率不受特别限制,只要在中性pH范围内的抗原结合活性强于在酸性pH范围内的抗原结合活性。在pH 6.7-pH 10.0下的抗原结合活性优选为在pH 4.0-pH 6.5下的抗原结合活性的2倍或更多倍,更优选10倍或更多倍,还更优选40倍或更多倍。

[0667] 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。

[0668] 通过上述方法产生的抗原结合分子可以是任何抗原结合分子;优选的抗原结合分子包括例如具有抗原结合结构域和人FcRn结合结构域的那些,其在人FcRn结合结构域中包含:至少一个氨基酸的改变、和一个或多个氨基酸被取代为组氨酸的取代或者至少一个组氨酸的插入。

[0669] 人FcRn结合结构域中的氨基酸改变不受特别限制,只要它们提高中性pH范围内的人FcRn结合活性。改变包括例如上述IgG Fc结构域中以下位置的氨基酸的改变:221-225、227、228、230、232、233-241、243-252、254-260、262-272、274、276、278-289、291-312、315-320、324、325、327-339、341、343、345、360、362、370、375-378、380、382、385-387、389、396、

414、416、423、424、426-438、440和442 (EU编号)。更具体地讲,氨基酸改变包括表1、表2、表6-1和表6-2中所示氨基酸位置上的改变(按EU编号)。优选可通过改变选自以下位置氨基酸的至少一个氨基酸来提高在中性pH范围内的人FcRn结合活性:237、238、239、248、250、252、254、255、256、257、258、265、270、286、289、297、298、303、305、307、308、309、311、312、314、315、317、325、332、334、360、376、380、382、384、385、386、387、389、424、428、433、434和436 (EU编号)。待改变的氨基酸的数目不受特别限制;可在唯一的单一位点或者两个或更多个位点上改变氨基酸。两个或更多个氨基酸改变的组合包括例如表3、表4-1至4-5、表6-1和表6-2所示的那些。

[0670] 同时,其中引入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在小于中性pH范围内的抗原结合活性。这类组氨酸突变可在单一位点或者两个或更多个位点上引入。

[0671] 因此,本发明的生产方法还可包括改变上述氨基酸和用组氨酸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。

[0672] 此外,在另一个实施方案中,通过上述生产方法产生的抗原结合分子包括例如包含经改变抗体恒定区的抗原结合分子。因此,本发明的生产方法还可包括改变抗体恒定区的氨基酸的步骤。

[0673] 给予由本发明的生产方法产生的抗原结合分子以促进血浆抗原浓度的降低。因此,本发明的生产方法可用作用于产生在给予时促进血浆抗原浓度降低的抗原结合分子的方法。

[0674] 或者,由本发明的生产方法产生的抗原结合分子具有改进的药代动力学。因此,本发明的生产方法可用作用于产生具有改进的药代动力学的抗原结合分子的方法。

[0675] 或者,由本发明的生产方法产生的抗原结合分子当给予动物(例如人、小鼠和猴)时可增加单个抗原结合分子可与之结合的抗原的数目。因此,本发明的生产方法可用作用于产生单个抗原结合分子可与之结合的抗原数增加的抗原结合分子的方法。

[0676] 此外,预期由本发明的生产方法产生的抗原结合分子当给予动物(例如人、小鼠或猴)时能够在细胞内自胞外结合的抗原上解离。因此,本发明的生产方法可用作用于产生能够在细胞内自胞外结合的抗原上解离的抗原结合分子的方法。

[0677] 此外,预期由本发明的生产方法产生的抗原结合分子当给予动物(例如人、小鼠或猴)时能够与抗原结合并被摄入细胞内以及以不含抗原的形式被释放到细胞外。因此,本发明的生产方法可用作用于产生能够与抗原结合并被摄入细胞并且以不含抗原的形式被释放到细胞外的抗原结合分子的方法。

[0678] 此外,因为与典型的抗原结合分子相比,这类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,因此预期它们作为药物尤其优异。因此,本发明的生产方法可用作用于产生用作药物组合物的抗原结合分子的方法。

[0679] 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。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。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)。

[0680] 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*Spodoptera* SF9)、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。

[0681] 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。

[0682] 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。

[0683] 另一方面,例如,使用动物或植物的生产系统可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。

[0684] 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。

[0685] 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)。

[0686] 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,并从体液中获得目标抗原结合分子。

[0687] 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pMON 530,然后将载体插入细菌,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*),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)。

[0688] 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。

[0689] 层析法包括例如亲和层析法、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Sephacrose F.F.(Pharmacia)。

[0690] 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。

[0691] <药物组合物>

[0692] 本发明还涉及包括本发明的抗原结合分子的药物组合物、通过本发明的筛选方法分离的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。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。

[0693] 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。

[0694] 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: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、结合剂等一起适当混合,以药物制造实践中普遍公认的所需要的单位剂量形式混合。在这类制剂中,调节活性成分的量以得到预定范围的合适量。

[0695] 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)。

[0696] 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/或抗氧化剂混合。将合适的安瓿装满所制备的注射剂。

[0697] 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。例如,它们可通过静脉内注射、肌内注射、腹膜内注射、皮下注射等全身给予或局部给予。

[0698] 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。

[0699] 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,通过焦谷氨酸化将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。

[0700] 说明书中引用的所有现有技术文献均通过引用结合到本文中。

实施例

[0701] 下文中,将参照实施例具体描述本发明,但不得理解为局限于此。

[0702] [实施例1]促进抗体的加快抗原消除作用的研究

[0703] 抗IL-6受体抗体

[0704] 在中性条件下具有FcRn结合活性的抗人IL-6受体抗体的制备

[0705] 包含W0 2009/125825中描述的H54 (SEQ ID NO:1) 和L28 (SEQ ID NO:2) 的H54/L28-IgG1是人源化抗IL-6受体抗体。将突变引入H54 (SEQ ID NO:1) 以增加在中性pH条件(pH7.4) 下的FcRn结合。具体而言,通过用Trp取代252位上的Met和用Trp取代434位上的Asn(按EU编号),由IgG1的重链恒定区制备H54-IgG1-F14 (SEQ ID NO:3)。通过参考实施例1中描述的本领域技术人员已知的方法引入氨基酸取代。

[0706] 包含H54 (SEQ ID NO:1) 和L28 (SEQ ID NO:2) 的H54/L28-IgG1和包含H54-IgG1-F14 (SEQ ID NO:3) 和L28 (SEQ ID NO:2) 的H54/L28-IgG1-F14通过参考实施例2中描述的本领域技术人员已知的方法表达和纯化。

[0707] 使用人FcRn转基因小鼠品系276通过稳态输注模型进行的抗体体内研究

[0708] 使用上述制备的H54/L28-IgG1和H54/L28-IgG1-F14,使用人FcRn转基因小鼠品系276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 MODEL 2004;alzet)植入人FcRn转基因小鼠品系276(B6.mFcRn-/-hFcRn Tg品系276 +/+小鼠(B6.mFcRn-/-hFCRN Tg276 B6.Cg-Fcgrt<tm1Dcr>Tg (FCGRT) 276Dcr (Jackson#4919)), 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14天,以20mg/kg给予单克隆抗小鼠CD4抗体(R&D),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,以1mg/kg将抗人IL-6受体抗体(H54/L28-IgG1和H54/L28-IgG1-F14) 一次给予尾静脉。在给予抗人IL-6受体抗体后15分钟、7小时、1天、2天、3天、4天、7天、14天、21天和28天采血。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。

[0709] 通过电化学发光测定法测定血浆hsIL-6R浓度

[0710] 通过电化学发光法测量小鼠血浆中的hsIL-6R浓度。调节hsIL-6R校准曲线样品至2,000、1,000、500、250、125、62.5和31.25pg/ml的浓度,制备稀释50倍或更多倍的小鼠血浆样品。将样品与用Sulfo-Tag NHS Ester (Meso Scale Discovery) 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)和WT-IgG1的溶液一起混合,然后使之在37℃下反应过夜。作为包含H(WT)(SEQ ID NO:4)和L(WT)(SEQ ID NO:5)的抗人IL-6受体抗体的WT-IgG1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分子与WT-IgG1结合。随后,将样品分配在MA400 PR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。恰在分配读数缓冲液T(Read Buffer T)(x4)(Meso Scale Discovery)后,通过Sector PR 400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。按照此方法测量的在静脉内给予H54/L28-IgG1和H54/L28-IgG1-F14后血浆hsIL-6R浓度的时程见图1。

[0711] 如图1所示,与无抗体情况下的基线hsIL-6R浓度相比,给予H54/L28-IgG1导致血浆hsIL-6R浓度显著升高。另一方面,与H54/L28-IgG1相比,给予H54/L28-IgG1-F14导致血浆hsIL-6R浓度升高的减少。与H54/L28-IgG1相比,这种升高的减少源于H54/L28-IgG1-F14在中性pH下人FcRn结合增加。这就证实,提高在中性pH下抗体对FcRn的结合亲和力可促进抗原的清除,但与H54/L28-IgG1相比,H54/L28-IgG1-F14的促进抗原清除的程度小。

[0712] [实施例2]对pH依赖性抗原结合抗体促进加快抗原消除作用的研究(抗体的制备)

[0713] 有关pH依赖性人IL-6受体结合抗体

[0714] 描述于W0 2009/125825的包含H54(SEQ ID NO:1)和L28(SEQ ID NO:2)的H54/L28-IgG1是人源化抗IL-6受体抗体。包含VH3-IgG1(SEQ ID NO:6)和VL3-CK(SEQ ID NO:7)的Fv4-IgG1是由使H54/L28-IgG1具有以pH依赖性方式与可溶性人IL-6受体结合的性质而产生的人源化抗IL-6受体抗体(其在pH 7.4下结合但在pH 5.8下解离)。W0 2009/125825描述的使用小鼠的体内试验证实,与给予H54/L28-IgG1和可溶性人IL-6受体作为抗原的混合物的组相比,在给予Fv4-IgG1和可溶性人IL-6受体作为抗原的混合物的组中,可极大地加快可溶性人IL-6受体的消除。

[0715] 与普通抗体(其与可溶性人IL-6受体结合)结合的可溶性人IL-6受体通过FcRn与抗体一起再循环至血浆。同时,以pH依赖性方式与可溶性人IL-6受体结合的抗体在内体的酸性条件下解离出已与抗体结合的可溶性人IL-6受体。解离的可溶性人IL-6受体在溶酶体中降解。这可大大加快可溶性人IL-6受体的消除。然后,以pH依赖性方式与可溶性人IL-6受体结合的抗体通过FcRn再循环到血浆中。再循环的抗体可再与其它可溶性人IL-6受体结合。通过重复该循环,单个抗体分子可与可溶性人IL-6受体重复结合多次(图2)。

[0716] 以pH依赖性方式与抗原结合的抗体加快可溶性抗原的消除。抗体通过与可溶性抗原重复结合多次产生这种作用。因此,这类抗体非常有用。对于增加在中性条件(pH 7.4)下的FcRn结合的方法进行了测试以进一步提高促抗原消除作用。

[0717] 在中性条件下具有FcRn结合活性的pH依赖性人IL-6受体结合抗体的制备

[0718] 将突变引入包含VH3-IgG1(SEQ ID NO:6)和VL3-CK(SEQ ID NO:7)的Fv4-IgG1以增加在中性条件(pH 7.4)下的FcRn结合。具体而言,通过用Tyr取代252位上的Met,用Tyr取代254位上的Ser和用Glu取代256位上的Thr(按EU编号),自IgG1的重链恒定区制备VH3-IgG1-v1(SEQ ID NO:8),同时通过用Trp取代434位上的Asn(按EU编号),自IgG1的重链恒定区构建VH3-IgG1-v2(SEQ ID NO:9)。通过参考实施例1中描述的本领域技术人员已知的方法引入氨基酸取代。

[0719] 包含H54 (SEQ ID NO:1) 和L28 (SEQ ID NO:2) 的H54/L28-IgG1、包含VH3-IgG1 (SEQ ID NO:6) 和VL3-CK (SEQ ID NO:7) 的Fv4-IgG1、包含VH3-IgG1-v1 (SEQ ID NO:8) 和VL3-CK (SEQ ID NO:7) 的Fv4-IgG1-v1及包含VH3-IgG1-v2 (SEQ ID NO:9) 和VL3-CK (SEQ ID NO:7) 的Fv4-IgG1-v2通过参考实施例2中描述的本领域技术人员已知方法表达和纯化。

[0720] [实施例3] 对pH依赖性抗原结合抗体促进加快抗原消除作用的研究 (体内试验)

[0721] 使用人FcRn转基因小鼠和正常小鼠的体内试验

[0722] 在将仅hsIL-6R或hsIL-6R和抗人IL-6受体抗体的组合给予人FcRn转基因小鼠 (B6.mFcRn-/- .hFcRn Tg品系276+/+小鼠, Jackson Laboratories; Methods Mol Biol. (2010) 602:93-104) 和正常小鼠 (C57BL/6J小鼠; Charles River Japan) 后, 对hsIL-6R (可溶性人IL-6受体: 按参考实施例3中所述制备) 和抗人IL-6受体抗体的体内动力学进行了评价。将hsIL-6R溶液 (5微克/ml) 或含有hsIL-6R和抗人IL-6受体抗体 (分别为5微克/ml 和 0.1mg/ml) 的混合物的溶液以10ml/kg的剂量一次给予尾静脉。在这种情况下, 所存在的抗人IL-6受体抗体超过hsIL-6R, 因此假定几乎每个hsIL-6R都与抗体结合。在给予后15分钟、7小时、1天、2天、3天、4天、7天、14天、21天和28天采血。将所采集的血液立即在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-20℃以下的冰箱中。所用的抗人IL-6受体抗体为: 对于人FcRn转基因小鼠为上述H54/L28-IgG1、Fv4-IgG1和Fv4-IgG1-v2; 对于正常小鼠为上述H54/L28-IgG1、Fv4-IgG1、Fv4-IgG1-v1和Fv4-IgG1-v2。

[0723] 通过ELISA测量抗人IL-6受体抗体血浆浓度

[0724] 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 (microL) 的20ng/ml hsIL-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。对于人FcRn转基因小鼠, 通过该方法测量的在静脉内给药后血浆浓度的时程见图3, 正常小鼠的见图5。

[0725] 通过电化学发光测定法测量hsIL-6R血浆浓度

[0726] 通过电化学发光法测量小鼠血浆中的hsIL-6R浓度。调节hsIL-6R校准曲线样品至2,000、1,000、500、250、125、62.5和31.25pg/ml的浓度, 制备稀释50倍或更多倍的小鼠血浆样品。将样品与用Sulfo-Tag NHS Ester (Meso Scale Discovery) 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) 和WT-IgG1的溶液一起混合, 然后使之在37℃下反应过夜。作为包含H(WT) (SEQ ID NO:4) 和L(WT) (SEQ ID NO:5) 的抗人IL-6受体抗体的WT-IgG1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WT-IgG1结合。随后, 将样品分配在MA400 PR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。恰在分配读数缓冲液T(x4) (Meso Scale Discovery) 后,通过Sector PR 400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。对于人FcRn转基因小鼠,通过该方法测量的静脉内给药后血浆hsIL-6R浓度的时程见图4,对于正常小鼠的见图6。

[0727] 通过电化学发光测定法测定血浆中的游离hsIL-6R浓度

[0728] 为了评价血浆中可溶性人IL-6受体中和的程度,通过电化学发光测定法测定小鼠血浆中无抗人IL-6受体抗体(不被抗人IL-6受体抗体中和)的可溶性人IL-6受体的浓度(游离hsIL-6R浓度)。通过将以10,000、5,000、2,500、1,250、625、312.5或156.25pg/ml制备的12微升各hsIL-6R标准样品和小鼠血浆样品加入适量的在0.22微米滤杯 (Millipore) 中干燥的rProtein A Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) 树脂中,使血浆中的所有IgG型抗体(小鼠IgG、抗人IL-6受体抗体和抗人IL-6受体抗体-可溶性人IL-6受体复合体)吸附在A蛋白上。然后,使用高速离心机将杯中的溶液离心以收集穿流的 (passed through) 溶液。穿流的溶液不含A蛋白结合的抗人IL-6受体抗体-可溶性人IL-6受体复合体。因此,可通过测量穿流溶液中的hsIL-6R浓度,来测定血浆中的游离hsIL-6R浓度。然后,将穿流的溶液与用 Sulfo-Tag NHS Ester (Meso Scale Discovery) 标记的单克隆抗人IL-6R抗体 (R&D) 和生物素化抗人IL-6 R抗体 (R&D) 一起混合。使所得混合物在室温下孵育1小时,然后等分至MA400 PR链霉抗生物素板 (Meso Scale Discovery) 中。在室温下再孵育1小时后,洗板,并将读数缓冲液T(x4) (Meso Scale Discovery) 等分至其中。立即在SECTOR PR 400读数器 (Meso Scale Discovery) 对板进行测量。应用分析软件SOFTmax PRO (Molecular Devices),根据标准曲线中的反应计算hsIL-6R浓度。在静脉内给药后通过上述方法测定的正常小鼠血浆中游离hsIL-6R浓度的时程见图7。

[0729] pH依赖性地与人IL-6受体结合的作用

[0730] 体内测试以pH依赖性方式与人IL-6受体结合的H54/L28-IgG1和Fv4-IgG,并比较它们之间的结果。如图3和图5所示,血浆的抗体滞留相当。同时,如图4和图6所示,发现相比于与H54/L28-IgG1同时给予的hsIL-6R,与以pH依赖性方式与人IL-6受体结合的Fv4-IgG1同时给予的hsIL-6R加快hsIL-6R的消除。在人FcRn转基因小鼠和正常小鼠两者中观察到上述趋势;因此,通过赋予pH依赖性人IL-6受体结合能力表明,在给予后4天血浆hsIL-6R浓度可分别降低约17和34倍。

[0731] 在中性条件 (pH 7.4) 下FcRn结合的作用

[0732] 据报告,在中性条件 (pH 7.4) 下,完整人IgG1几乎不与人FcRn结合(具有极低的亲和力)。据报告,通过用Trp取代完整人IgG1中434位上的Asn (EU编号) 增加在中性条件 (pH 7.4) 下的人FcRn结合 (J Immunol. (2009) 182 (12):7663-71)。使用人FcRn转基因小鼠,通过体内试验,对由将上述氨基酸取代引入Fv4-IgG1产生的Fv4-IgG1-v2进行测试。将试验结果与Fv4-IgG1的结果进行比较。如图3所示,两者间的抗体血浆滞留相当。同时,如图4所示,发现相比于与Fv4-IgG1同时给予的hsIL-6R相比,与在中性条件 (pH 7.4) 下人FcRn结合提高的Fv4-IgG1-v2同时给予的hsIL-6R更快地消除。因此,通过使之在中性条件 (pH 7.4) 下具有与人FcRn结合的能力表明,给予后4天hsIL-6R的血浆浓度降低约4倍。

[0733] 根据人FcRn和小鼠FcRn之间的同源性,假定用Trp取代434位上的Asn (按EU编号)

增加在中性条件 (pH 7.4) 下与小鼠FcRn的结合。同时,据报道,通过用Tyr取代252位上的Met,用Tyr取代254位上的Ser,并用Glu取代256位上的Thr (按EU编号),增加在中性条件 (pH 7.4) 下与小鼠FcRn的结合 (J Immunol. (2002) 169 (9):5171-80)。使用正常小鼠,对由将上述氨基酸取代引入Fv4-IgG1而产生的Fv4-IgG1-v1和Fv4-IgG1-v2进行了体内测试。将试验结果与Fv4-IgG1的结果进行比较。如图5所示,与Fv4-IgG1相比,经改进以增加在中性条件 (pH 7.4) 下与小鼠FcRn结合的Fv4-IgG1-v1和Fv4-IgG1-v2的血浆滞留时间略微缩短 (给药后1天血浆中的中和抗体浓度分别降低约1.5和1.9倍)。

[0734] 如图6所示,相比于与Fv4-IgG1同时给予的hsIL-6R,与被改进以增加在中性条件 (pH 7.4) 下与小鼠FcRn结合的Fv4-IgG1-v1或Fv4-IgG1-v2同时给予的hsIL-6R表明显著更快地消除。给药后1天,Fv4-IgG1-v1和Fv4-IgG1-v2分别降低血浆hsIL-6R浓度达约32倍和80倍。因此,揭示了可通过使之在中性条件 (pH 7.4) 下具有小鼠FcRn结合能力,来降低血浆浓度。如上所述,通过使之在中性条件 (pH 7.4) 下具有小鼠FcRn结合能力,血浆抗体浓度略微降低;然而,产生了降低血浆hsIL-6R浓度的作用,其大大超过抗体浓度的降低。此外,发现即使当与仅给予hsIL-6R的组相比时,与Fv4-IgG1-v1或Fv4-IgG1-v2同时给予的hsIL-6R更快地消除。如图6所示,表明与仅hsIL-6R相比,与Fv4-IgG1-v1或Fv4-IgG1-v2同时给予的hsIL-6R在给予后1天可分别降低血浆hsIL-6R浓度达约4倍或11倍。具体而言,这意味着可通过给予以pH依赖性方式与可溶性IL-6受体结合且使之在中性条件 (pH 7.4) 下具有小鼠FcRn结合能力的抗体,加快可溶性IL-6受体的消除。具体而言,可通过将这类抗体给予机体而在体内降低血浆抗原浓度。

[0735] 如图7所示,在给予H54/L28-IgG1后7天,游离hsIL-6R在可检出浓度的范围内,而在给予Fv4-IgG1后1天,无法检出游离hsIL-6R。另一方面,在给予Fv4-IgG1-v1或Fv4-IgG1-v2后7小时,无法检出游离hsIL-6R。具体而言,与H54/L28-IgG1相比,在以pH依赖性方式与hsIL-6R结合的Fv4-IgG1存在下,游离hsIL-6R浓度较低,这就表明了通过赋予pH依赖性hsIL-6R结合能力而产生强的hsIL-6R中和作用。此外,Fv4-IgG1-v1或Fv4-IgG1-v2 (两者均来自Fv4-IgG1修饰以增加在pH 7.4下的FcRn结合能力) 存在下,游离hsIL-6R浓度低得多。这就证实了,可通过增加在pH 7.4下的FcRn结合能力,产生强得多的hsIL-6R中和作用。

[0736] 当给予时,普通中和抗体例如H54/L28-IgG1降低结合抗原的清除,导致抗原血浆滞留延长。所给予的抗体延长抗原 (其作用预期被抗体中和) 的血浆滞留并不是优选的。可通过赋予抗原结合的pH依赖性 (抗体在中性条件下结合,但在酸性条件下解离),来缩短抗原血浆滞留。在本发明中,可通过另外使之在中性条件 (pH 7.4) 下具有人FcRn结合能力,进一步缩短血浆的抗原滞留时间。此外,证实了与仅抗原的清除相比,可通过给予以pH依赖性方式与抗原结合且使之在中性条件 (pH 7.4) 下具有FcRn结合能力的抗体,来提高抗原清除。迄今,尚无相对于仅抗原的清除而言,通过给予抗体来增加抗原清除的可用方法。因此,按该实施例中所述建立的方法作为通过给予抗体而从血浆消除抗原的方法是非常有用的。此外,本发明人首次发现了提高在中性条件 (pH 7.4) 下的FcRn结合能力的优势。此外,具有不同氨基酸取代且提高在中性条件 (pH 7.4) 下的FcRn结合能力的v4-IgG1-v1和Fv4-IgG1-v2两者均产生相当的作用。这表明了不论氨基酸取代的类型,提高在中性条件 (pH 7.4) 下的人FcRn结合能力的每个氨基酸取代都可能具有加快抗原消除的作用。具体而言,使用下列单独的氨基酸取代或组合,可产生当给予时从血浆消除抗原的抗体分子:

[0737] 257位上的Pro被取代为Ile的氨基酸取代,311位上的Gln被取代为Ile的氨基酸取代(按EU编号),J Biol Chem.2007,282(3):1709-17中报道了这两者;434位上的Asn被取代为Ala、Tyr或Trp的氨基酸取代,252位上的Met被取代为Tyr的氨基酸取代,307位上的Thr被取代为Gln的氨基酸取代,308位上的Val被取代为Pro的氨基酸取代,250位上的Thr被取代为Gln的氨基酸取代,428位上的Met被取代为Leu的氨基酸取代,380位上的Glu被取代为Ala的氨基酸取代,378位上的Ala被取代为Val的氨基酸取代,436位上的Tyr被取代为Ile的氨基酸取代(按EU编号),J Immunol. (2009) 182(12):7663-71中报道了所有这些取代;252位上的Met被取代为Tyr的氨基酸取代,254位上的Ser被取代为Thr的氨基酸取代,256位上的Thr被取代为Glu的氨基酸取代(按EU编号),J Biol Chem.2006年8月8日,281(33):23514-24中描述了所有这些取代;433位上的His被取代为Lys的氨基酸取代,434位上的Asn被取代为Phe的氨基酸取代,436位上的Tyr被取代为His氨基酸取代(按EU编号),Nat Biotechnol.2005年10月,23(10):1283-8中报道了所有这些取代;等。

[0738] [实施例4]人FcRn结合活性的评价

[0739] J Immunol. (2009) 182(12):7663-71中报告了测试抗体与FcRn间的相互作用的基于Biacore的测定系统,一种使抗体固定在传感器芯片上和使用人FcRn作为分析物的系统。为此,如参考实施例4中所述制备人FcRn。通过采用上述系统,针对在pH 6.0和pH 7.4下的人FcRn结合活性(解离常数(KD)),对Fv4-IgG1、Fv4-IgG1-v1和Fv4-IgG1-v2进行评价。在直接固定在S系列传感器芯片CM5(Series S Sensor Chip CM5)上后,将抗体作为试验物质进行测试。按照供应商的说明手册使用氨基偶联试剂盒,将抗体固定在传感器芯片上,以确保500RU的固定量。所用运行缓冲液为含有0.05%(v/v%)表面活性剂P20的50mmol/l磷酸钠/150mmol/l NaCl(pH 6.0)。

[0740] 用所制备的传感器芯片,使用含有0.05%表面活性剂P20的50mmol/l磷酸钠/150mmol/l NaCl(pH 6.0)或含有0.05%表面活性剂P20的50mmol/l磷酸钠/150mmol/l NaCl(pH 7.4)作为运行缓冲液,进行测定。专门在25℃下进行测定。以5微升/分钟的流速注入稀释的人FcRn溶液和作为参比溶液的运行缓冲液达10分钟,以让人FcRn与芯片上的抗体相互作用。接下来,以5微升/分钟的流速注入运行缓冲液达1分钟,以监测FcRn的解离。然后,通过以30微升/分钟的流速注射两轮20mmol/l Tris-HCl/150mmol/l NaCl(pH 8.1)达15秒钟,使传感器芯片再生。

[0741] 应用Biacore T100评价软件(2.0.1版),分析测定结果。通过稳态亲和力方法,从6个不同FcRn浓度的测定结果计算解离常数(KD)。pH 6.0和pH 7.4下Fv4-IgG1、Fv4-IgG1-v1和Fv4-IgG1-v2的人FcRn结合活性(解离常数(KD))的结果见下表5。

[0742] [表5]

		KD(μ M)	
		pH6.0	pH7.4
[0743]	Fv4-IgG1	1.99	NA
	Fv4-IgG1-v1	0.32	36.55
	Fv4-IgG1-v2	0.11	11.03

[0744] 在pH 7.4下,人FcRn与Fv4-IgG1的结合太弱以致测不到KD值(NA)。同时,观察到在

pH 7.4下Fv4-IgG1-v1和Fv4-IgG1-v2与人FcRn结合,测定KD值分别为36.55和11.03微摩尔。测定在pH 6.0下人FcRn的KD值为1.99、0.32和0.11微摩尔。如图3所示,当与Fv4-IgG1相比时,Fv4-IgG1-v2在人FcRn转基因小鼠中加快hsIL-6R的消除。因此,可通过改变人IgG1以提高在pH 7.4下的人FcRn结合至少强于11.03微摩尔,来预测抗原消除加快。同时,如J Immunol. (2002) 169 (9):5171-80中所述,人IgG1与小鼠FcRn结合是与人FcRn结合的约10倍于。为此,还预测在pH 7.4下Fv4-IgG1-v1和Fv4-IgG1-v2与小鼠FcRn结合是与人FcRn结合的约10倍。图6中所示正常小鼠中Fv4-IgG1-v1或Fv4-IgG1-v2对hsIL-6R消除的加快比图4所示人FcRn转基因小鼠中Fv4-IgG1-v2对该消除的加快更显著。这表明取决于在pH 7.4下FcRn结合的强度而增加hsIL-6R消除的加快程度。

[0745] [实施例5]在中性条件下人FcRn结合提高的pH依赖性人IL-6受体结合抗体的制备

[0746] 将提高在中性条件下人FcRn结合的各种改变引入Fv4-IgG1以进一步提高人FcRn转基因小鼠中pH依赖性人IL-6受体结合抗体的抗原消除作用。具体而言,将表6-1和表6-2所示氨基酸改变引入Fv4-IgG1的重链恒定区以产生各种突变型(按照EU编号提供突变位点的氨基酸编号)。通过参考实施例1中所述的本领域技术人员已知的方法引入氨基酸取代。

[0747] [表6-1]

[0748]

突变型名称	KD (M)	氨基酸改变
IgG1	ND	NONE
IgG1-v1	3.2E-06	M252Y/S254T/T256E
IgG1-v2	8.1E-07	N434W
IgG1-F3	2.5E-06	N434Y
IgG1-F4	5.8E-06	N434S
IgG1-F5	6.8E-06	N434A
IgG1-F7	5.6E-06	M252Y
IgG1-F8	4.2E-06	M252W
IgG1-F9	1.4E-07	M252Y/S254T/T256E/N434Y
IgG1-F10	6.9E-08	M252Y/S254T/T256E/N434W
IgG1-F11	3.1E-07	M252Y/N434Y
IgG1-F12	1.7E-07	M252Y/N434W
IgG1-F13	3.2E-07	M252W/N434Y
IgG1-F14	1.8E-07	M252W/N434W
IgG1-F19	4.6E-07	P257L/N434Y
IgG1-F20	4.6E-07	V308F/N434Y
IgG1-F21	3.0E-08	M252Y/V308P/N434Y
IgG1-F22	2.0E-06	M428L/N434S
IgG1-F25	9.2E-09	M252Y/S254T/T256E/V308P/N434W
IgG1-F26	1.0E-06	I332V
IgG1-F27	7.4E-06	G237M
IgG1-F29	1.4E-06	I332V/N434Y
IgG1-F31	2.8E-06	G237M/V308F

IgG1-F32	8.0E-07	S254T/N434W
IgG1-F33	2.3E-06	S254T/N434Y
IgG1-F34	2.8E-07	T256E/N434W
IgG1-F35	8.4E-07	T256E/N434Y
IgG1-F36	3.6E-07	S254T/T256E/N434W
IgG1-F37	1.1E-06	S254T/T256E/N434Y
IgG1-F38	1.0E-07	M252Y/S254T/N434W
IgG1-F39	3.0E-07	M252Y/S254T/N434Y
IgG1-F40	8.2E-08	M252Y/T256E/N434W
IgG1-F41	1.5E-07	M252Y/T256E/N434Y
IgG1-F42	1.0E-06	M252Y/S254T/T256E/N434A
IgG1-F43	1.7E-06	M252Y/N434A
IgG1-F44	1.1E-06	M252W/N434A
IgG1-F47	2.4E-07	M252Y/T256Q/N434W
IgG1-F48	3.2E-07	M252Y/T256Q/N434Y
IgG1-F49	5.1E-07	M252F/T256D/N434W
IgG1-F50	1.2E-06	M252F/T256D/N434Y
IgG1-F51	8.1E-06	N434F/Y436H
IgG1-F52	3.1E-06	H433K/N434F/Y436H
IgG1-F53	1.0E-06	I332V/N434W
IgG1-F54	8.4E-08	V308P/N434W
IgG1-F56	9.4E-07	I332V/M428L/N434Y
IgG1-F57	1.1E-05	G385D/Q386P/N389S
IgG1-F58	7.7E-07	G385D/Q386P/N389S/N434W
IgG1-F59	2.4E-06	G385D/Q386P/N389S/N434Y
IgG1-F60	1.1E-05	G385H
IgG1-F61	9.7E-07	G385H/N434W
IgG1-F62	1.9E-06	G385H/N434Y
IgG1-F63	2.5E-06	N434F
IgG1-F64	5.3E-06	N434H

[0749] 表6-2是表6-1的续表。

[0750] [表6-2]

[0751]

IgG1-F65	2.9E-07	M252Y/S254T/T256E/N434F
IgG1-F66	4.3E-07	M252Y/S254T/T256E/N434H
IgG1-F67	6.3E-07	M252Y/N434F
IgG1-F68	9.3E-07	M252Y/N434H
IgG1-F69	5.1E-07	M428L/N434W
IgG1-F70	1.5E-06	M428L/N434Y
IgG1-F71	8.3E-08	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434W

IgG1-F72	2.0E-07	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434Y
IgG1-F73	1.7E-07	M252Y/M428L/N434W
IgG1-F74	4.6E-07	M252Y/M428L/N434Y
IgG1-F75	1.4E-06	M252Y/M428L/N434A
IgG1-F76	1.0E-06	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434A
IgG1-F77	9.9E-07	T256E/M428L/N434Y
IgG1-F78	7.8E-07	S254T/M428L/N434W
IgG1-F79	5.9E-06	S254T/T256E/N434A
IgG1-F80	2.7E-06	M252Y/T256Q/N434A
IgG1-F81	1.6E-06	M252Y/T256E/N434A
IgG1-F82	1.1E-06	T256Q/N434W
IgG1-F83	2.6E-06	T256Q/N434Y
IgG1-F84	2.8E-07	M252W/T256Q/N434W
IgG1-F85	5.5E-07	M252W/T256Q/N434Y
IgG1-F86	1.5E-06	S254T/T256Q/N434W
IgG1-F87	4.3E-06	S254T/T256Q/N434Y
IgG1-F88	1.9E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434W
IgG1-F89	3.6E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434Y
IgG1-F90	1.9E-08	M252Y/T256E/V308P/N434W
IgG1-F91	4.8E-08	M252Y/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F92	1.1E-08	M252Y/S254T/T256E/V308P/M428L/N434W
IgG1-F93	7.4E-07	M252W/M428L/N434W
IgG1-F94	3.7E-07	P257L/M428L/N434Y
IgG1-F95	2.6E-07	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434F
IgG1-F99	6.2E-07	M252Y/T256E/N434H

[0752] 通过参考实施例2中所述的本领域技术人员已知方法,表达和纯化各包含所制备的重链和L(WT)(SEQ ID NO:5)的变体。

[0753] 人FcRn结合的评价

[0754] 采用Biacore T100 (GE Healthcare), 对抗体与人FcRn之间的结合进行动力学分析。为此, 如参考实施例4中所述制备人FcRn。通过氨基偶联方法, 将适量的L蛋白 (ACTIGEN) 固定在传感器芯片CM4 (GEHealthcare) 上, 让芯片俘获目标抗体。然后, 注入稀释的FcRn溶液和运行缓冲液 (作为参比溶液), 以让人FcRn与传感器芯片上俘获的抗体相互作用。所用运行缓冲液包含50mmol/l磷酸钠、150mmol/l NaCl和0.05% (w/v) 吐温20 (pH 7.0)。FcRn用各缓冲液稀释。使用10mmol/l甘氨酸-HCl (pH 1.5) 使芯片再生。专门在25℃下进行测定。根据测定法中获得的传感图计算缔合速率常数 k_a (1/Ms) 和解离速率常数 k_d (1/s), 其两者均为动力学参数, 从这些值求出各抗体对于人FcRn的 K_D (M)。应用Biacore T100评价软件 (GE Healthcare) 计算各参数。

[0755] 通过Biacore得到的有关在中性条件 (pH 7.0) 下人FcRn结合的评价结果见表6-1和表6-2。无法计算完整IgG1的 K_D , 因为它只具有非常弱的结合。因此, 在表6-1中 K_D 表示为

ND。

[0756] [实施例6]在中性条件下人FcRn结合提高的pH依赖性人IL-6受体结合抗体的体内试验

[0757] 使用按实施例4中所述制备的在中性条件下具有人FcRn结合能力的重链,产生在中性条件下具有人FcRn结合能力的pH依赖性人IL-6受体结合抗体。针对其体内抗原消除作用,对抗体进行评价。具体而言,通过参考实施例2中所述的本领域技术人员已知方法,表达和纯化下列抗体:

[0758] 包含VH3-IgG1和VL3-CK的Fv4-IgG1;

[0759] 包含VH3-IgG1-v2和VL3-CK的Fv4-IgG1-v2;

[0760] 包含VH3-IgG1-F14和VL3-CK的Fv4-IgG1-F14;

[0761] 包含VH3-IgG1-F20和VL3-CK的Fv4-IgG1-F20;

[0762] 包含VH3-IgG1-F21和VL3-CK的Fv4-IgG1-F21;

[0763] 包含VH3-IgG1-F25和VL3-CK的Fv4-IgG1-F25;

[0764] 包含VH3-IgG1-F29和VL3-CK的Fv4-IgG1-F29;

[0765] 包含VH3-IgG1-F35和VL3-CK的Fv4-IgG1-F35;

[0766] 包含VH3-IgG1-F48和VL3-CK的Fv4-IgG1-F48;

[0767] 包含VH3-IgG1-F93和VL3-CK的Fv4-IgG1-F93;和

[0768] 包含VH3-IgG1-F94和VL3-CK的Fv4-IgG1-F94。

[0769] 通过实施例3中描述的相同方法,使用人FcRn转基因小鼠 (B6.mFcRn-/- .hFcRn Tg 品系276+/+小鼠, Jackson Laboratories; Methods Mol Biol. (2010) 602:93-104), 体内测试所制备的pH依赖性人IL-6受体结合抗体。

[0770] 静脉内给予人FcRn转基因小鼠后可溶性人IL-6受体血浆浓度的时程见图8。试验结果表明,与在中性条件下几乎没有人FcRn结合能力的Fv4-IgG1存在时比,在中性条件下人FcRn结合增加的pH依赖性人IL-6受体结合抗体中的任一种存在时,可溶性人IL-6受体的血浆浓度随时间推移保持低的。其中,产生显著作用的抗体包括例如Fv4-IgG1-F14。相比于与Fv4-IgG1同时给予的可溶性人IL-6受体的血浆浓度,与Fv4-IgG1-F14同时给予的可溶性人IL-6受体的血浆浓度表明在给予后1天降低约54倍。此外,相比于与Fv4-IgG1同时给予的可溶性人IL-6受体的血浆浓度,与Fv4-IgG1-F21同时给予的可溶性人IL-6受体的血浆浓度表明在给予后7小时降低约24倍。此外,与Fv4-IgG1-F25同时给予的可溶性人IL-6受体的血浆浓度在给予后7小时低于检出限 (1.56ng/ml)。因此,相对于与Fv4-IgG1同时给予的可溶性人IL-6受体的浓度,预期Fv4-IgG1-F25能够显著降低可溶性人IL-6受体的浓度200倍或更多倍。上述研究结果表明,pH依赖性抗原结合抗体在中性条件下人FcRn结合的增加十分有效地用于提高抗原消除作用。同时,增加中性条件下人FcRn结合的氨基酸改变(将其引入以提高抗原消除作用)的类型不受特别限制;这类改变包括表6-1和表6-2所示改变。可以预测通过任何引入的改变,体内抗原消除作用将提高。

[0771] 此外,与仅给予可溶性人IL-6受体的血浆浓度相比,与pH依赖性人IL-6受体结合抗体的4种类型 (Fv4-IgG1-F14、Fv4-IgG1-F21、Fv4-IgG1-F25和Fv4-IgG1-F48) 之一同时给予的可溶性人IL-6受体的血浆浓度随时间推移保持低的。可将这类pH依赖性人IL-6受体结合抗体给予其中可溶性人IL-6受体的血浆浓度保持恒定(稳态)的机体,以保持可溶性人

IL-6受体的血浆浓度低于血浆中的稳态浓度。具体而言,可通过将这类抗体给予机体来降低体内血浆中的抗原浓度。

[0772] [实施例7]对低剂量(0.01mg/kg) Fv4-IgG1-F14的功效的评价

[0773] 按照与实施例6中描述的相同体内试验方法,测试低剂量(0.01mg/kg)的按实施例6中所述制备的Fv4-IgG1-F14。将结果(见图9)与实施例6中描述的通过以1mg/kg给予Fv4-IgG1和Fv4-IgG1-F14得到的结果进行比较。

[0774] 结果表明,虽然给予0.01mg/kg Fv4-IgG1-F14的组中血浆抗体浓度是给予1mg/kg组的约1/100(图10),但是可溶性人IL-6受体的血浆浓度的时程彼此相当。此外,这证实了与给予1mg/kg Fv4-IgG1的组相比,在给予0.01mg/kg Fv4-IgG1-F14的组中,给予后7小时可溶性人IL-6受体的血浆浓度降低约3倍。此外,当与只给予可溶性人IL-6受体的组相比时,在Fv4-IgG1-F14存在下,以不同剂量给予的两个组中,可溶性人IL-6受体的血浆浓度随时间推移都较低。

[0775] 研究结果表明,即使当以Fv4-IgG1剂量的1/100的剂量给予时,因Fv4-IgG1修饰以增加在中性条件下的人FcRn结合而产生的v4-IgG1-F14有效降低可溶性人IL-6受体的血浆浓度。具体而言,当pH依赖性抗原结合抗体经修饰以提高其在中性条件下的FcRn结合能力时,预测甚至可以较低的剂量有效地消除抗原。

[0776] [实施例8]使用正常小鼠的基于稳态模型的体内试验

[0777] 在中性条件下与小鼠FcRn结合的评价

[0778] 以下均按实施例5中所述制备:包含VH3-IgG1(SEQ ID NO:6)和L(WT)(SEQ ID NO:5)的VH3/L(WT)-IgG1、包含VH3-IgG1-v2(SEQ ID NO:9)和L(WT)(SEQ ID NO:5)的VH3/L(WT)-IgG1-v2和包含VH3-IgG1-F20(SEQ ID NO:10)和L(WT)(SEQ ID NO:5)的VH3/L(WT)-IgG1-F20,并通过下述方法,针对在中性条件(pH 7.4)下的小鼠FcRn结合,对这些进行评价。

[0779] 采用Biacore T100(GE Healthcare),对抗体与小鼠FcRn之间的结合进行动力学分析。通过氨基偶联方法,将适量的L蛋白(ACTIGEN)固定在传感器芯片CM4(GE Healthcare)上,让芯片俘获目标抗体。然后,注入稀释的FcRn溶液和运行缓冲液(作为参比溶液),以让小鼠FcRn与传感器芯片上俘获的抗体相互作用。所用运行缓冲液含有50mmol/l磷酸钠、150mmol/l NaCl和0.05%(w/v)吐温20(pH 7.4)。FcRn用各缓冲液稀释。使用10mmol/l甘氨酸-HCl(pH 1.5)使芯片再生。专门在25℃下进行测定。根据测定法中获得的传感图计算缔合速率常数 k_a (1/Ms)和解离速率常数 k_d (1/s),其两者均为动力学参数,并从这些值中求出各抗体对小鼠FcRn的 K_D (M)。应用Biacore T100评价软件(GE Healthcare)计算各参数。

[0780] 结果见表7(小鼠FcRn在pH 7.4下的亲和力)。其恒定区具有完整IgG1的VH3/L(WT)-IgG1(表7中的IgG1)只显示出与小鼠FcRn非常弱的结合。因此, K_D 无法计算,在表7中用ND表示。测定结果表明,在中性条件下人FcRn结合增加的经改变的抗体在中性条件下亦显示出与小鼠FcRn的结合增加。

[0781] [表7]

[0782]	K_D (M)
IgG1	ND

IgG1-v2	1.04E-06
IgG1-F20	1.17E-07

[0783] 使用具有可溶性人IL-6受体恒定血浆浓度的正常小鼠的体内试验

[0784] 使用按实施例1和5中所述制备的H54/L28-IgG1、Fv4-IgG1、Fv4-IgG1-v2和Fv4-IgG1-F20,通过下述方法进行体内试验。

[0785] 使用正常小鼠的体内输注试验

[0786] 将装有可溶性人IL-6受体的输注泵 (MINI-OSMOTIC PUMP MODEL 2004;alzet) 植入正常小鼠 (C57BL/6J小鼠;Charles River Japan) 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。以20mg/kg将单克隆抗小鼠CD4抗体 (R&D) 一次给予尾静脉以抑制抗可溶性人IL-6受体的中和抗体的产生。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,以1mg/kg将抗人IL-6受体抗体一次给予尾静脉。在给予抗人IL-6受体抗体后15分钟、7小时、1天、2天、3天、4天、7天、14天、21天和28天采血。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-20℃以下的冰箱中。

[0787] 通过ELISA测定抗人IL-6受体抗体的血浆浓度

[0788] 所用方法与实施例3中所述相同。

[0789] 通过电化学发光测定法测定血浆hsIL-6R浓度

[0790] 所用方法与实施例1中所述相同。

[0791] 如图11所示,当将H54/L28-IgG1,一种抗可溶性人IL-6受体的中和抗体,给予其中保持可溶性人IL-6受体的血浆浓度恒定在约40ng/ml的正常小鼠 (hsIL-6R组) 时,可溶性人IL-6受体的血浆浓度升高至650ng/ml (给药前的15倍)。另一方面,在给予因赋予H54/L28-IgG1 pH依赖性抗原结合能力所产生的Fv4-IgG1的组中,可溶性人IL-6受体的血浆浓度保持在约70ng/ml。这表明了因给予H54/L28-IgG1 (普通中和抗体) 所引起的可溶性人IL-6受体血浆浓度的增加,可通过赋予pH依赖性结合能力而抑制至约1/10。

[0792] 此外,通过给予Fv-IgG1-v2或Fv-IgG1-F20,其两者均因引入改变到pH依赖性人IL-6受体结合抗体中以增加在中性条件下的FcRn结合所产生,表明了可溶性人IL-6受体的血浆浓度保持稳态浓度的1/10或以下。当给予Fv-IgG1-v2时,给药后14天的可溶性人IL-6受体的血浆浓度为约2ng/ml。因此,Fv-IgG1-v2可降低浓度至给药前水平的1/20。同时,当给予Fv-IgG1-F20时,在给药后7小时、1天、2天和4天,可溶性人IL-6受体的血浆浓度低于检出限 (1.56ng/ml)。这表明了Fv-IgG1-F20降低浓度至给药前水平的1/25或低于1/25。

[0793] 上述研究结果表明,通过将在中性条件下具有pH依赖性抗原结合能力和FcRn结合能力两者的抗体给予其中血浆抗原浓度保持恒定的模型动物,可通过提高血浆抗原消除速率而显著降低血浆抗原浓度。

[0794] 典型的抗体例如H54/L28-IgG1只可通过与靶抗原结合而中和靶抗原的作用,甚至更坏地增加血浆抗原浓度。相比之下,发现在中性条件下具有pH依赖性抗原结合能力和FcRn结合能力的抗体不仅能够中和靶抗原,而且还降低靶抗原的血浆浓度。可预期从血浆中除去抗原的作用比中和更有益。此外,抗原去除还可作用于仅靠中和而效率不足的靶抗原。

[0795] [实施例9]确定提高抗原消除所需的在中性pH下与人FcRn的结合亲和力的阈值及中性pH下抗原消除与对人FcRn的结合亲和力之间的关系

[0796] 用于体内研究的抗体制备

[0797] 产生在中性pH下FcRn结合增加的包含VH3-IgG1 (SEQ ID NO:6) 和VL3-CK (SEQ ID NO:7) 的Fv4-IgG1的Fc变体。具体而言,制备VH3-M73 (SEQ ID NO:15) 和VH3-IgG1-v1 (SEQ ID NO:8)。通过参考实施例1中所述的本领域技术人员已知的方法,引入氨基酸取代。

[0798] 通过参考实施例2中所述的本领域技术人员已知方法,表达和纯化包含H54 (SEQ ID NO:1) 和L28 (SEQ ID NO:2) 的H54/L28-IgG1、包含VH3-IgG1 (SEQ ID NO:6) 和VL3-CK (SEQ ID NO:7) 的Fv4-IgG1、包含VH3-M73 (SEQ ID NO:15) 和VL3-CK (SEQ ID NO:7) 的Fv4-M73、包含VH3-IgG1-v1 (SEQ ID NO:8) 和VL3-CK (SEQ ID NO:7) 的Fv4-IgG1-v1和包含VH3-IgG1-v2 (SEQ ID NO:9) 和VL3-CK (SEQ ID NO:7) 的Fv4-IgG1-v2。

[0799] 在中性pH条件下抗体与人FcRn的结合亲和力的评价

[0800] 以下均按实施例2中所述制备:包含VH3-IgG1 (SEQ ID NO:6) 和L (WT) (SEQ ID NO:5) 的VH3/L (WT) -IgG1、包含VH3-M73 (SEQ ID NO:15) 和L (WT) (SEQ ID NO:5) 的VH3/L (WT) -M73、包含VH3-IgG1-v1 (SEQ ID NO:8) 和L (WT) (SEQ ID NO:5) 的VH3/L (WT) -IgG1-v1和包含VH3-IgG1-v2 (SEQ ID NO:9) 和L (WT) (SEQ ID NO:5) 的VH3/L (WT) -IgG1-v2,并针对在中性pH (pH 7.0) 下的人FcRn结合,对这些进行评价。

[0801] 采用实施例5中所述方法测量VH3/L (WT) -IgG1-v1和VH3/L (WT) -IgG1-v2与人FcRn的结合活性。由于VH3/L (WT) -IgG1和VH3/L (WT) -M73与人FcRn的低结合活性所致,无法采用实施例5中所述方法测量与人FcRn的结合活性,因此,通过下述方法评价这些抗体。采用Biacore T100 (GE Healthcare),对抗体与人FcRn间的结合进行动力学分析。通过胺偶联方法,将适量的L蛋白 (ACTIGEN) 固定在传感器芯片CM4 (GE Healthcare) 上,让芯片俘获目标抗体。然后,注入稀释的FcRn溶液和作为参比溶液的运行缓冲液,以让人FcRn与传感器芯片上俘获的抗体相互作用。所用运行缓冲液包含50mmol/l磷酸钠、150mmol/l NaCl和0.05% (w/v) 吐温20 (pH 7.0)。FcRn用各缓冲液稀释。使用10mmol/l甘氨酸-HCl (pH 1.5) 使芯片再生。在25℃下进行测定。

[0802] 采用同时拟合传感图的缔合期和解离期和整体拟合工作组的全部曲线的Biacore T100评价软件 (GE Healthcare),从传感图数据得到各抗体的KD (M)。使传感图与1:1结合模型 (由Biacore T100评价软件提供的“Langmuir结合”模型) 拟合。对于某些结合相互作用,采用基于平衡的方法,通过 R_{eq} 曲线的非线性回归分析、平衡结合反应相对于分析物浓度的对数得到KD。

[0803] 通过Biacore得到的在中性 (pH 7.0) 条件下人FcRn结合的结果示于表8。

[0804] [表8]

[0805]

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

[0806] 使用人FcRn转基因小鼠品系276在共注射模型中抗体对抗原消除的作用的体内研

究

[0807] 按实施例3中所述,使用共注射模型进行抗体的体内研究。用于该研究的抗人IL-6受体抗体为上述H54/L28-IgG1、Fv4-IgG1、Fv4-M73、Fv4-IgG1-v1和Fv4-IgG1-v2。用于该研究的小鼠为人FcRn转基因小鼠(B6.mFcRn-/- .hFcRn Tg品系276+/+小鼠,Jackson Laboratories;Methods Mol Biol.(2010)602:93-104)。

[0808] 如图12所示,H54/L28-IgG1、Fv4-IgG1、Fv4-M73、Fv4-IgG1-v1和Fv4-IgG1-v2的药代动力学相当,且这些抗体在研究期间保持类似的血浆浓度。

[0809] 血浆hsIL-6R浓度的时程见图13。相比于与Fv4-IgG1一起给予的hsIL-6R,与Fv4-IgG1-v2一起给予的hsIL-6R显示出清除增加,而与Fv4-M73和Fv4-IgG1-v1一起给予的hsIL-6R显示出清除降低。虽然所有Fc变体M73、v1和v2在中性pH条件(pH 7.0)下与人FcRn的结合亲和力提高,但是已证实仅Fv4-IgG1-v2而非Fv4-M73和Fv4-IgG1-v1显示出hsIL-6R清除增加。这就表明,为了增加抗原清除,在pH 7.0下抗体与人FcRn的结合亲和力必需至少强于IgG1-v1,其在pH 7.0下与人FcRn的结合亲和力为KD 3.2微摩尔或为完整人IgG1的28倍(与人FcRn的结合亲和力为KD 88微摩尔)。

[0810] 图14描述了在共同注射hsIL-6R和Fc变体后第1天在pH7.0下Fc变体与人FcRn的结合亲和力和血浆hsIL-6R浓度之间的关系。对该实施例和实施例6中描述的Fc变体(Fv4-IgG1、Fv4-M73、Fv4-IgG1-v1、Fv4-IgG1-v2、Fv4-IgG1-F14、Fv4-IgG1-F20、Fv4-IgG1-F21、Fv4-IgG1-F25、Fv4-IgG1-F29、Fv4-IgG1-F35、Fv4-IgG1-F48、Fv4-IgG1-F93和Fv4-IgG1-F94)作图。通过提高在pH7.0下抗体与人FcRn的结合亲和力,反映抗原清除的hsIL-6R的血浆浓度最初增加,然后却快速下降。这就表明,为了提高与完整人IgG1相比的抗原清除,在pH 7.0下抗体与人FcRn的结合亲和力必需优选强于KD 2.3微摩尔(自图14曲线拟合得到的值)。介于KD 88微摩尔与KD 2.3微摩尔之间的抗体与人FcRn的结合亲和力则可减少抗原清除(较高的hsIL-6R浓度)。换句话说,在pH 7.0下抗体与人FcRn的结合亲和力必需优选为完整人IgG1的38倍,以提高抗原清除,否则可降低抗原清除。

[0811] 图15描述了在共注射hsIL-6R和Fc变体后第1天在pH 7.0下Fc变体与人FcRn的结合亲和力和血浆抗体浓度之间的关系。对该实施例和实施例6中描述的Fc变体(Fv4-IgG1、Fv4-M73、Fv4-IgG1-v1、Fv4-IgG1-v2、Fv4-IgG1-F14、Fv4-IgG1-F20、Fv4-IgG1-F21、Fv4-IgG1-F25、Fv4-IgG1-F29、Fv4-IgG1-F35、Fv4-IgG1-F48、Fv4-IgG1-F93和Fv4-IgG1-F94)作图。通过提高在pH7.0下抗体与人FcRn的结合亲和力,反映抗体药代动力学(清除)的抗体的血浆浓度最初保持,然后却快速下降。这就表明,为了保持抗体的药代动力学类似于完整人IgG1(与人FcRn的结合亲和力为KD 88微摩尔),在pH 7.0下抗体与人FcRn的亲和力必需弱于KD 0.2微摩尔(从图15的曲线拟合得到的值)。强于KD 0.2微摩尔的抗体与人FcRn的结合亲和力增加抗体清除(即抗体更快地从血浆中消除)。换句话说,在pH 7.0下抗体与人FcRn的结合亲和力必需是在完整人IgG1的440倍以内,以显示出与完整人IgG1类似的抗体药代动力学,否则可导致抗体从血浆中快速消除。

[0812] 就图14和图15两者而言,为了提高与IgG1相比的抗原清除(即降低抗原血浆浓度),同时保持与完整人IgG1类似的抗体药代动力学,在pH 7.0下抗体与人FcRn的结合亲和力必需介于2.3微摩尔与0.2微摩尔之间,或换句话说,在pH 7.0下抗体与人FcRn的结合亲和力必需是完整人IgG1的38倍与440倍之间的范围内。具有与IgG1类似的药代动力学、有长

期抗原消除活性的这类抗体因其长效性质,而可有益于需要较长的给药间隔(例如慢性病)的抗体治疗(antibody therapeutic)。

[0813] 另一方面,通过提高在pH 7.0下抗体与人FcRn的结合亲和力强于KD 0.2微摩尔,或换句话说,通过将pH 7.0下抗体与人FcRn的结合亲和力提高多于440倍(与完整人IgG1相比),可在短期内大幅度地提高抗原清除,虽然抗体从血浆中的消除快于完整人IgG1。具有诱导抗原浓度快速和强烈降低的能力的这类抗体因其快速作用性质,而可有益于抗体治疗,例如其中疾病相关抗原必需从血浆中除去的急性病。

[0814] 每一抗体从血浆中消除抗原的量是评价通过给予在pH 7.0下与人FcRn的结合亲和力提高的抗体Fc变体所致抗原清除效率的重要因素。为了评价每一抗体消除抗原的效率,在本实施例和实施例6中所述体内研究的各个时间点进行以下计算。

[0815] A值:各时间点的抗原摩尔浓度

[0816] B值:各时间点的抗体摩尔浓度

[0817] C值:各时间点的抗原摩尔浓度/抗体摩尔浓度(抗原/抗体摩尔比率)

[0818] $C=A/B$

[0819] 图16中描述了各抗体的C值的时程(抗原/抗体摩尔比率)。C值越小,表明每一抗体消除抗原的效率越高,而C值越高则表明每一抗体消除抗原的效率越低。与IgG1相比,C值越低表明通过Fc变体实现的抗原清除效率越高,而与IgG1相比,C值越高则表明Fc变体对抗原清除效率具有负作用。与Fv4-IgG1相比,除Fv4-M73和Fv4-IgG1-v1外的所有Fc变体都表明抗原清除效率提高。Fv4-M73和Fv4-IgG1-v1表明对抗原清除效率有负作用,这与图14一致。

[0820] 图17描述了在共注射hsIL-6R和Fc变体后第1天在pH 7.0下Fc变体与人FcRn的结合亲和力与C值之间的关系(抗原/抗体摩尔比率)。对该实施例和实施例6中描述的Fc变体(Fv4-IgG1、Fv4-M73、Fv4-IgG1-v1、Fv4-IgG1-v2、Fv4-IgG1-F14、Fv4-IgG1-F20、Fv4-IgG1-F21、Fv4-IgG1-F25、Fv4-IgG1-F29、Fv4-IgG1-F35、Fv4-IgG1-F48、Fv4-IgG1-F93和Fv4-IgG1-F94)作图。这表明了,为了达到与完整人IgG1相比的较高的抗原清除效率,在pH 7.0下抗体与人FcRn的亲和力必需强于KD 3.0微摩尔(从图17的曲线拟合得到的值)。换句话说,在pH 7.0下抗体与人FcRn的结合亲和力必需是完整IgG1的至少29倍才达到与完整人IgG1相比的较高的抗原清除效率。

[0821] 总之,在pH 7.0下与FcRn的结合亲和力介于KD 3.0微摩尔和0.2微摩尔之间的抗体变体组,或换句话说,在pH 7.0下与FcRn的结合亲和力是完整人IgG1的29倍-440倍范围内的抗体变体组,具有与IgG1类似的抗体药代动力学,但从血浆中清除抗体的能力提高。因此,与IgG1相比,这类抗体显示出提高的抗原清除效率。与IgG1类似的药代动力学将能够长期从血浆中清除抗原(长效抗原清除),因此长时间的给药间隔对于慢性病的抗体治疗可以是优选的。在pH 7.0下与FcRn的结合亲和力强于KD 0.2微摩尔的抗体变体组,或换句话说,在pH 7.0下与FcRn的结合亲和力是完整人IgG1的440倍的抗体变体组,具有快速的抗体清除(短期抗体清除)。然而,因为这类抗体能够甚至更快速地清除抗原(速效抗原清除),因此与IgG1相比,这类抗体还显示出提高的抗原清除效率。如实施例8所述,正常小鼠中Fv4-IgG1-F20可诱导在极短期内将抗原从血浆中大量清除,但是抗原清除作用不持久。这种特征对其中需要在极短期内将疾病相关抗原快速大量地从血浆中消耗的急性病可以是优选的。

[0822] [实施例10]使用人FcRn转基因小鼠品系276通过稳态输注模型对Fv4-IgG1-F14的体内研究

[0823] 按实施例1中所述进行使用人FcRn转基因小鼠品系276通过稳态输注模型的Fv4-IgG1-F14的体内研究。研究组由以下组成：对照组（无抗体）、剂量为1mg/kg的Fv4-IgG1和剂量为1mg/kg、0.2mg/kg和0.01mg/kg的Fv4-IgG1-F14。

[0824] 图18描述了在给予抗体后hsIL-6R血浆浓度的时间概况。与无抗体的基线hsIL-6R水平相比，给予1mg/kg的Fv4-IgG1导致血浆hsIL-6R浓度增加数倍。另一方面，与Fv4-IgG1组和基线组相比，给予1mg/kg的Fv4-IgG1-F14导致血浆浓度显著降低。在第2天，未检测出血浆hsIL-6R浓度（在该测量系统中血浆hsIL-6R浓度的定量限为1.56ng/mL），且这持续直到第14天。

[0825] 如实施例1所述，与H54/L28-IgG1相比，H54/L28-IgG1-F14显示出血浆hsIL-6R浓度降低，但降低的程度小。对于与hsIL-6R具有pH依赖性结合性质的Fv4可变区，降低程度高得多。这就表明，虽然提高在pH 7.0下与人FcRn的结合亲和力有效降低血浆抗原浓度，但是pH依赖性抗原结合和在中性pH下与人FcRn的结合亲和力提高的组合显著增加抗原消除。

[0826] 使用较低剂量的Fv4-IgG1-F14的研究显示，甚至在0.01mg/kg（1mg/kg的1/100）下，降低抗原血浆浓度低于基线以下，这就表明该分子从血浆消耗抗原的显著效率。

[0827] [实施例11]在共注射模型中人FcRn转基因小鼠品系276和品系32的比较

[0828] 已使用人FcRn转基因小鼠品系276 (Jackson Laboratories) 进行了先前的体内研究。为了比较人FcRn转基因小鼠品系276与不同的转基因系品系（品系32）之间的差异，我们使用人FcRn转基因小鼠品系32 (B6.mFcRn-/- .hFcRn Tg品系32+/+小鼠 (B6.mFcRn-/-hFCRN Tg32;B6.Cg-Fcgrt<tmlDcr>Tg (FCGRT) 32Dcr) (Jackson#4915))，JacksonLaboratories; Methods Mol Biol. (2010) 602:93-104)，进行了H54/L28-IgG1、Fv4-IgG1和Fv4-IgG1-v2的共注射研究。研究方法与实施例3中的方法相同，只是使用人FcRn转基因小鼠品系32代替人FcR n转基因小鼠品系276。

[0829] 图19描述了在人FcRn转基因小鼠品系276和品系32两者中血浆hsIL-6R浓度的时程。H54/L28-IgG1、Fv4-IgG1和Fv4-IgG1-v2显示类似的血浆hsIL-6R浓度时间概况。在2种小鼠中，提高在pH 7.0下与人FcRn的结合亲和力促进抗原从血浆消除（比较Fv4-IgG1和Fv4-IgG1-v2）至相同程度。

[0830] 图20描述了在人FcRn转基因小鼠品系276和品系32两者中血浆抗体浓度的时程。H54/L28-IgG1、Fv4-IgG1和Fv4-IgG1-v2显示类似的血浆抗体浓度时间概况。

[0831] 总之，在品系276和品系32间未观察到显著差异，这表明了表达人FcRn的两个不同的转基因小鼠品系中，提高在pH 7.0下与人FcRn的结合亲和力的Fc变体对促进抗原血浆浓度的消除是有效的。

[0832] [实施例12]在中性pH下与人FcRn的结合亲和力提高的各种抗体Fc变体的产生

[0833] Fc变体的产生

[0834] 将提高在中性pH下与人FcRn的结合亲和力的各种突变引入Fv4-IgG1以进一步改进抗原消除特征。具体而言，将表9-1至表9-14中所示氨基酸突变引入Fv4-IgG1的重链恒定区以产生Fc变体（按照EU编号描述突变位点的氨基酸编号）。通过参考实施例1中描述的本领域技术人员已知的方法引入氨基酸取代。

[0835] 通过参考实施例2中所述的本领域技术人员已知方法,表达和纯化各包含所制备的重链和L(WT)(SEQ ID NO:5)的其它变体(IgG1-F100至IgG1-F599)。

[0836] 人FcRn结合的评价

[0837] 对于IgG1-v1、IgG1-v2和IgG1-F2至IgG1-F599,按实施例5中所述,对抗体与人FcRn之间的结合进行动力学分析,或对于IgG1和M73,按实施例9中所述进行。通过Biacore得到的在中性条件(pH 7.0)下人FcRn结合的结果示于表9-1至9-14。

[0838] [表9-1]

[0839]

变体名称	KD (M)	氨基酸取代
IgG1	8.8E-05	None
M73	1.4E-05	(W02009/125825)
IgG1-v1	3.2E-06	M252Y/S254T/T256E
IgG1-v2	8.1E-07	N434W
IgG1-F3	2.5E-06	N434Y
IgG1-F4	5.8E-06	N434S
IgG1-F5	6.8E-06	N434A
IgG1-F7	5.6E-06	M252Y
IgG1-F8	4.2E-06	M252W
IgG1-F9	1.4E-07	M252Y/S254T/T256E/N434Y
IgG1-F10	6.9E-08	M252Y/S254T/T256E/N434W
IgG1-F11	3.1E-07	M252Y/N434Y
IgG1-F12	1.7E-07	M252Y/N434W
IgG1-F13	3.2E-07	M252W/N434Y
IgG1-F14	1.8E-07	M252W/N434W
IgG1-F19	4.6E-07	P257L/N434Y
IgG1-F20	4.6E-07	V308F/N434Y
IgG1-F21	3.0E-08	M252Y/V308P/N434Y
IgG1-F22	2.0E-06	M428L/N434S
IgG1-F25	9.2E-09	M252Y/S254T/T256E/V308P/N434W
IgG1-F26	1.0E-06	I332V
IgG1-F27	7.4E-06	G237M
IgG1-F29	1.4E-06	I332V/N434Y
IgG1-F31	2.8E-06	G237M/V308F
IgG1-F32	8.0E-07	S254T/N434W
IgG1-F33	2.3E-06	S254T/N434Y
IgG1-F34	2.8E-07	T256E/N434W
IgG1-F35	8.4E-07	T256E/N434Y
IgG1-F36	3.6E-07	S254T/T256E/N434W
IgG1-F37	1.1E-06	S254T/T256E/N434Y
IgG1-F38	1.0E-07	M252Y/S254T/N434W

IgG1-F39	3.0E-07	M252Y/S254T/N434Y
----------	---------	-------------------

[0840] 表9-2是表9-1的续表。

[0841] [表9-2]

IgG1-F40	8.2E-08	M252Y/T256E/N434W
IgG1-F41	1.5E-07	M252Y/T256E/N434Y
IgG1-F42	1.0E-06	M252Y/S254T/T256E/N434A
IgG1-F43	1.7E-06	M252Y/N434A
IgG1-F44	1.1E-06	M252W/N434A
IgG1-F47	2.4E-07	M252Y/T256Q/N434W
IgG1-F48	3.2E-07	M252Y/T256Q/N434Y
IgG1-F49	5.1E-07	M252F/T256D/N434W
IgG1-F50	1.2E-06	M252F/T256D/N434Y
IgG1-F51	8.1E-06	N434F/Y436H
IgG1-F52	3.1E-06	H433K/N434F/Y436H
IgG1-F53	1.0E-06	I332V/N434W
IgG1-F54	8.4E-08	V308P/N434W
IgG1-F56	9.4E-07	I332V/M428L/N434Y
IgG1-F57	1.1E-05	G385D/Q386P/N389S
IgG1-F58	7.7E-07	G385D/Q386P/N389S/N434W
IgG1-F59	2.4E-06	G385D/Q386P/N389S/N434Y
IgG1-F60	1.1E-05	G385H
IgG1-F61	9.7E-07	G385H/N434W
IgG1-F62	1.9E-06	G385H/N434Y
IgG1-F63	2.5E-06	N434F
IgG1-F64	5.3E-06	N434H
IgG1-F65	2.9E-07	M252Y/S254T/T256E/N434F
IgG1-F66	4.3E-07	M252Y/S254T/T256E/N434H
IgG1-F67	6.3E-07	M252Y/N434F
IgG1-F68	9.3E-07	M252Y/N434H
IgG1-F69	5.1E-07	M428L/N434W
IgG1-F70	1.5E-06	M428L/N434Y
IgG1-F71	8.3E-08	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434W
IgG1-F72	2.0E-07	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434Y
IgG1-F73	1.7E-07	M252Y/M428L/N434W
IgG1-F74	4.6E-07	M252Y/M428L/N434Y
IgG1-F75	1.4E-06	M252Y/M428L/N434A
IgG1-F76	1.0E-06	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434A
IgG1-F77	9.9E-07	T256E/M428L/N434Y

[0843] 表9-3是表9-2的续表。

[0844] [表9-3]

[0845]

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

[0846] 表9-4是表9-3的续表。

[0847] [表9-4]

[0848]

IgG1-F120	6.3E-08	P257L/V308P/M428L/N434Y
-----------	---------	-------------------------

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

[0849] 表9-5是表9-4的续表。

[0850] [表9-5]

[0851]

IgG1-F167	2.9E-07	M252W/V303A/N434Y
IgG1-F168	3.2E-07	M252W/D376A/N434Y
IgG1-F169	2.9E-07	M252W/V305A/N434Y

IgG1-F170	1.7E-07	M252W/Q311A/N434Y
IgG1-F171	1.9E-07	M252W/D312A/N434Y
IgG1-F172	2.2E-07	M252W/K317A/N434Y
IgG1-F173	7.7E-07	M252W/E380A/N434Y
IgG1-F174	3.4E-07	M252W/E382A/N434Y
IgG1-F175	2.7E-07	M252W/S424A/N434Y
IgG1-F176	2.9E-07	S239K/M252W/N434Y
IgG1-F177	2.8E-07	M252W/S298G/N434Y
IgG1-F178	2.7E-07	M252W/D270F/N434Y
IgG1-F179	3.1E-07	M252W/N325G/N434Y
IgG1-F182	6.6E-08	P257A/M428L/N434W
IgG1-F183	2.2E-07	P257T/M428L/N434W
IgG1-F184	2.7E-07	P257V/M428L/N434W
IgG1-F185	2.6E-07	M252W/I332V/N434Y
IgG1-F188	3.0E-06	P257I/Q311I
IgG1-F189	1.9E-07	M252Y/T307A/N434Y
IgG1-F190	1.1E-07	M252Y/T307Q/N434Y
IgG1-F191	1.6E-07	P257L/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F192	1.1E-07	P257A/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F193	8.5E-08	P257T/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F194	1.2E-07	P257V/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F195	5.6E-08	P257L/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F196	3.5E-08	P257A/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F197	3.3E-08	P257T/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F198	4.8E-08	P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F201	2.1E-07	M252Y/T307D/N434Y
IgG1-F203	2.4E-07	M252Y/T307F/N434Y
IgG1-F204	2.1E-07	M252Y/T307G/N434Y
IgG1-F205	2.0E-07	M252Y/T307H/N434Y
IgG1-F206	2.3E-07	M252Y/T307I/N434Y
IgG1-F207	9.4E-07	M252Y/T307K/N434Y
IgG1-F208	3.9E-07	M252Y/T307L/N434Y

[0852] 表9-6是表9-5的续表。

[0853] [表9-6]

[0854]

IgG1-F209	1.3E-07	M252Y/T307M/N434Y
IgG1-F210	2.9E-07	M252Y/T307N/N434Y
IgG1-F211	2.4E-07	M252Y/T307P/N434Y
IgG1-F212	6.8E-07	M252Y/T307R/N434Y
IgG1-F213	2.3E-07	M252Y/T307S/N434Y

IgG1-F214	1.7E-07	M252Y/T307V/N434Y
IgG1-F215	9.6E-08	M252Y/T307W/N434Y
IgG1-F216	2.3E-07	M252Y/T307Y/N434Y
IgG1-F217	2.3E-07	M252Y/K334L/N434Y
IgG1-F218	2.6E-07	M252Y/G385H/N434Y
IgG1-F219	2.5E-07	M252Y/T289H/N434Y
IgG1-F220	2.5E-07	M252Y/Q311H/N434Y
IgG1-F221	3.1E-07	M252Y/D312H/N434Y
IgG1-F222	3.4E-07	M252Y/N315H/N434Y
IgG1-F223	2.7E-07	M252Y/K360H/N434Y
IgG1-F225	1.5E-06	M252Y/L314R/N434Y
IgG1-F226	5.4E-07	M252Y/L314K/N434Y
IgG1-F227	1.2E-07	M252Y/N286E/N434Y
IgG1-F228	2.3E-07	M252Y/L309E/N434Y
IgG1-F229	5.1E-07	M252Y/R255E/N434Y
IgG1-F230	2.5E-07	M252Y/P387E/N434Y
IgG1-F236	8.9E-07	K248I/M428L/N434Y
IgG1-F237	2.3E-07	M252Y/M428A/N434Y
IgG1-F238	7.4E-07	M252Y/M428D/N434Y
IgG1-F240	7.2E-07	M252Y/M428F/N434Y
IgG1-F241	1.5E-06	M252Y/M428G/N434Y
IgG1-F242	8.5E-07	M252Y/M428H/N434Y
IgG1-F243	1.8E-07	M252Y/M428I/N434Y
IgG1-F244	1.3E-06	M252Y/M428K/N434Y
IgG1-F245	4.7E-07	M252Y/M428N/N434Y
IgG1-F246	1.1E-06	M252Y/M428P/N434Y
IgG1-F247	4.4E-07	M252Y/M428Q/N434Y
IgG1-F249	6.4E-07	M252Y/M428S/N434Y
IgG1-F250	2.9E-07	M252Y/M428T/N434Y
IgG1-F251	1.9E-07	M252Y/M428V/N434Y

[0855] 表9-7是表9-6的续表。

[0856] [表9-7]

[0857]

IgG1-F252	1.0E-06	M252Y/M428W/N434Y
IgG1-F253	7.1E-07	M252Y/M428Y/N434Y
IgG1-F254	7.5E-08	M252W/T307Q/M428Y/N434Y
IgG1-F255	1.1E-07	M252W/Q311A/M428Y/N434Y
IgG1-F256	5.4E-08	M252W/T307Q/Q311A/M428Y/N434Y
IgG1-F257	5.0E-07	M252Y/T307A/M428Y/N434Y
IgG1-F258	3.2E-07	M252Y/T307Q/M428Y/N434Y

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

[0858] 表9-8是表9-7的续表。

[0859] [表9-8]

[0860]

IgG1-F287	1.0E-07	M252Y/V308P/E380A/E382A/M428F/N434Y
IgG1-F288	1.9E-07	M252Y/T256E/E382A/N434Y
IgG1-F289	4.8E-07	M252Y/T256E/M428Y/N434Y
IgG1-F290	4.6E-07	M252Y/T256E/E382A/M428Y/N434Y
IgG1-F292	2.0E-08	S239K/M252Y/V308P/E382A/M428I/N434Y
IgG1-F293	5.3E-08	M252Y/V308P/E380A/E382A/M428I/N434Y
IgG1-F294	1.1E-07	S239K/M252Y/V308P/M428F/N434Y
IgG1-F295	6.8E-07	S239K/M252Y/E380A/E382A/M428F/N434Y
IgG1-F296	4.9E-07	M252Y/Q311A/M428Y/N434Y

IgG1-F297	5.1E-07	M252Y/D312A/M428Y/N434Y
IgG1-F298	4.8E-07	M252Y/Q311A/D312A/M428Y/N434Y
IgG1-F299	9.4E-08	S239K/M252Y/V308P/Q311A/M428Y/N434Y
IgG1-F300	8.3E-08	S239K/M252Y/V308P/D312A/M428Y/N434Y
IgG1-F301	7.2E-08	S239K/M252Y/V308P/Q311A/D312A/M428Y/N434Y
IgG1-F302	1.9E-07	M252Y/T256E/T307P/N434Y
IgG1-F303	6.7E-07	M252Y/T307P/M428Y/N434Y
IgG1-F304	1.6E-08	M252W/V308P/M428Y/N434Y
IgG1-F305	2.7E-08	M252Y/T256E/V308P/E382A/N434Y
IgG1-F306	3.6E-08	M252W/V308P/E382A/N434Y
IgG1-F307	3.6E-08	S239K/M252W/V308P/E382A/N434Y
IgG1-F308	1.8E-08	S239K/M252W/V308P/E382A/M428Y/N434Y
IgG1-F310	9.4E-08	S239K/M252W/V308P/E382A/M428I/N434Y
IgG1-F311	2.9E-08	S239K/M252W/V308P/M428F/N434Y
IgG1-F312	4.5E-07	S239K/M252W/E380A/E382A/M428F/N434Y
IgG1-F313	6.5E-07	S239K/M252Y/T307P/M428Y/N434Y
IgG1-F314	3.2E-07	M252Y/T256E/Q311A/D312A/M428Y/N434Y
IgG1-F315	6.8E-07	S239K/M252Y/M428Y/N434Y
IgG1-F316	7.0E-07	S239K/M252Y/D270F/M428Y/N434Y
IgG1-F317	1.1E-07	S239K/M252Y/D270F/V308P/M428Y/N434Y
IgG1-F318	1.8E-08	S239K/M252Y/V308P/M428I/N434Y
IgG1-F320	2.0E-08	S239K/M252Y/V308P/N325G/E382A/M428I/N434Y
IgG1-F321	3.2E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/N325G/N434Y
IgG1-F322	9.2E-08	S239K/M252Y/D270F/T307P/V308P/N434Y
IgG1-F323	2.7E-08	S239K/M252Y/T256E/D270F/V308P/N434Y
IgG1-F324	2.8E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/V308P/N434Y

[0861] 表9-9是表9-8的续表。

[0862] [表9-9]

[0863]

IgG1-F325	2.1E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
IgG1-F326	7.5E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/Q311A/N434Y
IgG1-F327	6.5E-08	S239K/M252Y/T256E/D270F/T307Q/Q311A/N434Y
IgG1-F328	1.9E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/M428I/N434Y
IgG1-F329	1.2E-08	S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/N434Y
IgG1-F330	3.6E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/L309E/N434Y
IgG1-F331	3.0E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/P387E/N434Y
IgG1-F333	7.4E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/L309E/Q311A/N434Y
IgG1-F334	1.9E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/N325G/M428I/N434Y
IgG1-F335	1.5E-08	S239K/M252Y/T256E/D270F/V308P/M428I/N434Y
IgG1-F336	1.4E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y

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

[0864] 表9-10是表9-9的续表。

[0865] [表9-10]

[0866]

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

[0867] 表9-11是表9-10的续表。

[0868] [表9-11]

[0869]

IgG1-F412	8.8E-08	P257V/T307G/M428L/N434Y
IgG1-F413	1.2E-07	P257V/T307p/M428L/N434Y
IgG1-F414	1.1E-07	P257V/T307S/M428L/N434Y
IgG1-F415	5.6E-08	P257V/N286E/T307A/M428L/N434Y

IgG1-F416	9.4E-08	P257V/T307A/P387E/M428L/N434Y
IgG1-F418	6.2E-07	S239K/M252Y/T307P/N325G/M428Y/N434Y
IgG1-F419	1.6E-07	M252Y/T307A/Q311H/K360H/N434Y
IgG1-F420	1.5E-07	M252Y/T307A/Q311H/P387F/N434Y
IgG1-F421	1.3E-07	M252Y/T307A/Q311H/M428A/N434Y
IgG1-F422	1.8E-07	M252Y/T307A/Q311H/E382A/N434Y
IgG1-F423	8.4E-08	M252Y/T307W/Q311H/N434Y
IgG1-F424	9.4E-08	S239K/P257A/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F425	8.0E-08	P257A/V308P/L309E/M428L/N434Y
IgG1-F426	8.4E-08	P257V/T307Q/N434Y
IgG1-F427	1.1E-07	M252Y/P257V/T307Q/M428V/N434Y
IgG1-F428	8.0E-08	M252Y/P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F429	3.7E-08	M252Y/P257V/T307Q/N434Y
IgG1-F430	8.1E-08	M252Y/P257V/T307Q/M428Y/N434Y
IgG1-F431	6.5E-08	M252Y/P257V/T307Q/M428F/N434Y
IgG1-F432	9.2E-07	P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428V/N434Y
IgG1-F433	6.0E-08	P257V/T307Q/Q311A/N325G/N434Y
IgG1-F434	2.0E-08	P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428Y/N434Y
IgG1-F435	2.5E-08	P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428F/N434Y
IgG1-F436	2.5E-07	P257A/T307Q/M428V/N434Y
IgG1-F437	5.7E-08	P257A/T307Q/N434Y
IgG1-F438	3.6E-08	P257A/T307Q/M428Y/N434Y
IgG1-F439	4.0E-08	P257A/T307Q/M428F/N434Y
IgG1-F440	1.5E-08	P257V/N286E/T307Q/Q311A/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F441	1.8E-07	P257A/Q311A/M428L/N434Y
IgG1-F442	2.0E-07	P257A/Q311H/M428L/N434Y
IgG1-F443	5.5E-08	P257A/T307Q/Q311A/M428L/N434Y
IgG1-F444	1.4E-07	P257A/T307A/Q311A/M428L/N434Y
IgG1-F445	6.2E-08	P257A/T307Q/Q311H/M428L/N434Y
IgG1-F446	1.1E-07	P257A/T307A/Q311H/M428L/N434Y
IgG1-F447	1.4E-08	P257A/N286E/T307Q/M428L/N434Y

[0870] 表9-12是表9-11的续表。

[0871] [表9-12]

[0872]

IgG1-F448	5.3E-08	P257A/N286E/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F449	5.7E-07	S239K/M252Y/D270F/T307P/N325G/M428Y/N434Y
IgG1-F450	5.2E-07	S239K/M252Y/T307P/L309E/N325G/M428Y/N434Y
IgG1-F451	1.0E-07	P257S/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F452	1.4E-07	P257M/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F453	7.8E-08	P257N/T307A/M428L/N434Y

IgG1-F454	9.6E-08	P257I/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F455	2.5E-08	P257V/T307Q/M428Y/N434Y
IgG1-F456	3.4E-08	P257V/T307Q/M428F/N434Y
IgG1-F457	4.0E-08	S239K/P257V/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F458	1.5E-08	P257V/T307Q/V308P/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F459	1.3E-08	P257V/T307Q/V308P/Q311A/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F460	4.7E-08	P257V/T307A/V308P/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F462	8.5E-08	P257A/V308P/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F463	1.3E-07	P257A/T307A/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F464	5.5E-08	P257A/T307Q/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F465	2.1E-08	P257V/N286E/T307Q/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F466	3.5E-07	T256E/P257V/N434Y
IgG1-F467	5.7E-07	T256E/P257T/N434Y
IgG1-F468	5.7E-08	S239K/P257T/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F469	5.6E-08	P257T/V308P/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F470	5.4E-08	T256E/P257T/V308P/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F471	6.6E-08	P257T/V308P/N325G/E382A/M428L/N434Y
IgG1-F472	5.4E-08	P257T/V308P/N325G/P387F/M428L/N434Y
IgG1-F473	4.5E-07	P257T/V308P/L309P/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F474	3.5E-07	P257T/V308P/L309R/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F475	4.3E-08	T256E/P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F476	5.5E-08	P257V/T307Q/E382A/M428L/N434Y
IgG1-F477	4.3E-08	P257V/T307Q/P387E/M428L/N434Y
IgG1-F480	3.9E-08	P257L/V308P/N434Y
IgG1-F481	5.6E-08	P257T/T307Q/N434Y
IgG1-F482	7.0E-08	P257V/T307Q/N325G/N434Y
IgG1-F483	5.7E-08	P257V/T307Q/Q311A/N434Y
IgG1-F484	6.2E-08	P257V/V305A/T307Q/N434Y
IgG1-F485	9.7E-08	P257V/N286E/T307A/N434Y

[0873] 表9-13是表9-12的续表。

[0874] [表9-13]

[0875]

IgG1-F486	3.4E-07	P257V/T307Q/L309R/Q311H/M428L/N434Y
IgG1-F488	3.5E-08	P257V/V308P/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F490	7.5E-08	S239K/P257V/V308P/Q311H/M428L/N434Y
IgG1-F492	9.8E-08	P257V/V305A/T307A/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F493	4.9E-07	S239K/D270F/T307P/N325G/M428Y/N434Y
IgG1-F497	3.1E-06	P257T/T307A/M428V/N434Y
IgG1-F498	1.3E-06	P257A/M428V/N434Y
IgG1-F499	5.2E-07	P257A/T307A/M428V/N434Y

IgG1-F500	4.3E-08	P257S/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F506	1.9E-07	P257V/N297A/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F507	5.1E-08	P257V/N286A/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F508	1.1E-07	P257V/T307Q/N315A/M428L/N434Y
IgG1-F509	5.8E-08	P257V/T307Q/N384A/M428L/N434Y
IgG1-F510	5.3E-08	P257V/T307Q/N389A/M428L/N434Y
IgG1-F511	4.2E-07	P257V/N434Y
IgG1-F512	5.8E-07	P257T/N434Y
IgG1-F517	3.1E-07	p257V/N286E/N434Y
IgG1-F518	4.2E-07	P257T/N286E/N434Y
IgG1-F519	2.6E-08	P257V/N286E/T307Q/N434Y
IgG1-F521	1.1E-08	P257V/N286E/T307Q/M428Y/N434Y
IgG1-F523	2.6E-08	P257V/V305A/T307Q/M428Y/N434Y
IgG1-F526	1.9E-08	P257T/T307Q/M428Y/N434Y
IgG1-F527	9.4E-09	P257V/T307Q/V308P/N325G/M428Y/N434Y
IgG1-F529	2.5E-08	P257T/T307Q/M428F/N434Y
IgG1-F533	1.2E-08	P257A/N286E/T307Q/M428F/N434Y
IgG1-F534	1.2E-08	P257A/N286E/T307Q/M428Y/N434Y
IgG1-F535	3.9E-08	T250A/P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F538	9.9E-08	T250F/P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F541	6.0E-08	T250I/P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F544	3.1E-08	T250M/P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F549	5.4E-08	T250S/P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F550	5.9E-08	T250V/P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F551	1.2E-07	T250W/P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F552	1.1E-07	T250Y/P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F553	1.7E-07	M252Y/Q311A/N434Y

[0876] 表9-14是表9-13的续表。

[0877] [表9-14]

[0878]

IgG1-F554	2.8E-08	S239K/M252Y/S254T/V308P/N434Y
IgG1-F556	1.5E-06	M252Y/T307Q/Q311A
IgG1-F559	8.0E-08	M252Y/S254T/N286E/N434Y
IgG1-F560	2.8E-08	M252Y/S254T/V308P/N434Y
IgG1-F561	1.4E-07	M252Y/S254T/T307A/N434Y
IgG1-F562	8.3E-08	M252Y/S254T/T307Q/N434Y
IgG1-F563	1.3E-07	M252Y/S254T/Q311A/N434Y
IgG1-F564	1.9E-07	M252Y/S254T/Q311H/N434Y
IgG1-F565	9.2E-08	M252Y/S254T/T307A/Q311A/N434Y
IgG1-F566	6.1E-08	M252Y/S254T/T307Q/Q311A/N434Y

IgG1-F567	2.2E-07	M252Y/S254T/M428I/N434Y
IgG1-F568	1.1E-07	M252Y/T256E/T307A/Q311H/N434Y
IgG1-F569	2.0E-07	M252Y/T256Q/T307A/Q311H/N434Y
IgG1-F570	1.3E-07	M252Y/S254T/T307A/Q311H/N434Y
IgG1-F571	8.1E-08	M252Y/N286E/T307A/Q311H/N434Y
IgG1-F572	1.0E-07	M252Y/T307A/Q311H/M428I/N434Y
IgG1-F576	1.6E-06	M252Y/T256E/T307Q/Q311H
IgG1-F577	1.3E-06	M252Y/N286E/T307A/Q311A
IgG1-F578	5.7E-07	M252Y/N286E/T307Q/Q311A
IgG1-F580	8.6E-07	M252Y/N286E/T307Q/Q311H
IgG1-F581	7.2E-08	M252Y/T256E/N286E/N434Y
IgG1-F582	7.5E-07	S239K/M252Y/V308P
IgG1-F583	7.8E-07	S239K/M252Y/V308P/E382A
IgG1-F584	6.3E-07	S239K/M252Y/T256E/V308P
IgG1-F585	2.9E-07	S239K/M252Y/N286E/V308P
IgG1-F586	1.4E-07	S239K/M252Y/N286E/V308P/M428I
IgG1-F587	1.9E-07	M252Y/N286E/M428L/N434Y
IgG1-F592	2.0E-07	M252Y/S254T/E382A/N434Y
IgG1-F593	3.1E-08	S239K/M252Y/S254T/V308P/M428I/N434Y
IgG1-F595	1.8E-07	S239K/M252Y/M428I/N434Y
IgG1-F596	4.0E-07	M252Y/D312A/E382A/M428Y/N434Y
IgG1-F597	2.2E-07	M252Y/E382A/P387E/N434Y
IgG1-F598	1.4E-07	M252Y/D312A/P387E/N434Y
IgG1-F599	5.2E-07	M252Y/P387E/M428Y/N434Y

[0879] [实施例13]使用人FcRn转基因小鼠品系32通过稳态输注模型的各种Fc变体抗体的体内研究

[0880] 使用人FcRn转基因小鼠品系32在稳态输注模型中针对其从血浆中消除抗原的能力对实施例12中产生的Fc变体进行测试。按实施例1中所述,进行了稳态输注模型体内研究,只是使用人FcRn转基因小鼠品系32代替品系276,且注射单克隆抗小鼠CD4抗体2次(在植入输注泵前和抗体注射后14天)或3次(在植入输注泵前和抗体注射后10和20天)。

[0881] 通过参考实施例2中所述的本领域技术人员已知方法,表达和纯化从表9-1至9-14描述的Fc变体中选出的下列抗体Fc变体:

[0882] 包含VH3-IgG1和VL3-CK的Fv4-IgG1;

[0883] 包含VH3-IgG1-F11和VL3-CK的Fv4-IgG1-F11;

[0884] 包含VH3-IgG1-F14和VL3-CK的Fv4-IgG1-F14;

[0885] 包含VH3-IgG1-F39和VL3-CK的Fv4-IgG1-F39;

[0886] 包含VH3-IgG1-F48和VL3-CK的Fv4-IgG1-F48;

[0887] 包含VH3-IgG1-F140和VL3-CK的Fv4-IgG1-F140;

[0888] 包含VH3-IgG1-F157和VL3-CK的Fv4-IgG1-F157;

- [0889] 包含VH3-IgG1-F194和VL3-CK的Fv4-IgG1-F194;
[0890] 包含VH3-IgG1-F196和VL3-CK的Fv4-IgG1-F196;
[0891] 包含VH3-IgG1-F198和VL3-CK的Fv4-IgG1-F198;
[0892] 包含VH3-IgG1-F262和VL3-CK的Fv4-IgG1-F262;
[0893] 包含VH3-IgG1-F264和VL3-CK的Fv4-IgG1-F264;
[0894] 包含VH3-IgG1-F393和VL3-CK的Fv4-IgG1-F393;
[0895] 包含VH3-IgG1-F434和VL3-CK的Fv4-IgG1-F424;和
[0896] 包含VH3-IgG1-F447和VL3-CK的Fv4-IgG1-F447。

[0897] 将这些抗体以1mg/kg的剂量给予人FcRn转基因小鼠品系32。

[0898] 图21描述了小鼠中血浆hsIL-6R浓度的时程。与Fv4-IgG1相比,在pH 7.0下与人FcRn的结合亲和力提高的所有Fc变体显示血浆hsIL-6R浓度降低,因此促进从血浆中消除抗原。虽然抗原浓度降低的程度和持久性在各Fc变体中不同,但是与IgG1相比,所有变体的血浆hsIL-6R浓度一致降低,这就表明提高在pH 7.0下与人FcRn的结合亲和力普遍可促进从血浆中消除抗原。图22描述了小鼠中血浆抗体浓度的时程。抗体药代动力学在各Fc变体中不同。

[0899] 如实施例9中所述,每一抗体从血浆中消除抗原的量是评价通过给予在pH 7.0下与人FcRn的结合亲和力提高的抗体Fc变体所致抗原消除的效率的重要因素。因此,图23中描述了各抗体的C值(抗原/抗体摩尔比率)的时程。图24描述了在给予抗体后第1天在pH 7.0下Fc变体与人FcRn的结合亲和力和C值(抗原/抗体摩尔比率)之间的关系。这就表明与Fv4-IgG1相比,该研究中测试的所有抗体Fc变体都具有较低的C值。因为该研究中测试的所有Fc变体在pH 7.0下与人FcRn的结合亲和力强于KD 3.0微摩尔,因此与完整人IgG1相比,它们实现较高的抗原消除效率。这与在实施例9中所得到的结果一致(图17)。

[0900] 图25描述了在该研究中测试的Fc变体中,具有与IgG1显示出类似药代动力学的F11、F39、F48和F264的Fc变体的抗体。由于该研究使用人FcRn转基因小鼠进行,因此预期这些Fc变体同样在人中具有类似于IgG1的长的半衰期。图26描述了注射具有类似于完整人IgG1的药代动力学的抗体(F11、F39、F48和F264)的小鼠中血浆hsIL-6R浓度的时程。与IgG1相比,这些变体降低血浆hsIL-6R浓度约10倍。此外,这些抗体降低hsIL-6R浓度低于基线hsIL-6R浓度(无抗体的浓度)。因此,这些抗体能够长期消除血浆中的抗原,因此长的给药间隔对于慢性病的抗体治疗将是优选的。

[0901] 图27和图28分别描述了IgG1及Fc变体F157、F196和F262的血浆抗体浓度和血浆hsIL-6R浓度的时程。出人意料的是,虽然与完整人IgG1相比,F157和F262的抗体药代动力学显示显著较快的从血浆清除,但是F157和F262显示hsIL-6R从血浆中的消除非常大量而持久。具体而言,从第1天到第28天(第14天除外),F157的血浆hsIL-6R浓度低于检出限(1.56ng/mL),而第14天到第28天F262的血浆hsIL-6R浓度低于检出限(1.56ng/mL)。另一方面,与F157相比,对于具有较慢抗体清除的F196,抗原浓度在第14天开始增加,在第28天返回基线。在该研究测试的Fc变体中,F157和F262是在第28天能够降低血浆hsIL-6R浓度低于1.56ng/mL的唯一Fc变体。

[0902] 从抗体的药代动力学中未曾预料到F157和F262的这种持久的长期作用,因为与完整人IgG1相比,抗体非常快速地从血浆消除。具体地讲,在第21天未检测到F157的血浆抗体

浓度。然而,第21和28天,血浆hsIL-6R浓度持续降低至检出限1.56ng/mL以下水平。这种未预料到的作用被认为是由于以FcRn结合形式的抗体存在于血管内皮细胞表面上所致。虽然这些抗体在血浆中显示低浓度,但是这些抗体仍以FcRn结合形式存在于血管腔隙中(其作为血浆抗体浓度无法测量)。这些FcRn结合的抗体仍可与血浆中的抗原结合,并且在FcRn介导的抗原/抗体复合体摄取后,抗原释放在内体中,并被溶酶体降解,同时抗体以FcRn结合形式再循环回到细胞表面。因此这些FcRn结合的抗体促使抗原消除。这就解释了为什么这些抗体即使在血浆中的抗体浓度变低后仍保持抗原消除能力的原因。

[0903] [实施例14]在常规抗体和抗原消除性抗体的比较性计算机模拟研究

[0904] 实施例13表明,与抗原pH依赖性结合且在中性pH下与人FcRn的结合亲和力提高的抗体能够从血浆中消除抗原。因此,这类抗原消除性抗体可用于靶向这类抗原的抗体,其中单纯的结合和中和不足以治疗疾病,需要从血浆中耗尽抗原。

[0905] 抗原消除性抗体还可用于靶向单纯结合和中和是足够的抗原的抗体。抗体结合和抗原的中和需要与血浆中的抗原至少相同摩尔量的抗体(如果抗体具有与抗原无限的亲和力,则抗原可被与抗原相同摩尔量的抗体中和)。与常规抗体(没有pH依赖性抗原结合和Fc工程改造的抗体)不同,抗原消除性抗体可降低血浆的抗原浓度。这意味着可降低中和抗原所需要的抗体浓度。如果与常规抗体相比,抗原消除性抗体降低血浆抗原浓度达10倍,则中和抗原所需的抗体浓度也可降低达10倍。因此,在治疗情况下,与常规抗体相比,抗原消除性抗体可减少抗体剂量或延长给药间隔。

[0906] 与IgG1相比,Fc变体例如F11、F39、F48和F264能够降低血浆抗原浓度约10倍。为了评价这类抗原消除性抗体较之于常规抗体的作用,我们对在常规抗体和抗原消除性抗体两者的治疗情况下,保持抗原中和所需要的抗体剂量进行了计算机模拟评价。我们测定了每3个月给药间隔保持中和所需要的剂量(即Q3M的所需剂量)。

[0907] 药代动力学模型的构建

[0908] 我们采用PK分析软件SAAM II(The SAAM Institute,Inc.),构建了药代动力学(PK)模型。按以下文献所述,构建PK模型:Pharmacokinet Pharmacodyn.2001年12月;28(6):507-32和Br J Clin Pharmacol.2007年3月;63(5):548-61。PK模型的构思见图29。通过下列微分方程式描述了各隔室的量。

[0909] [Math.1]

$$[0910] \quad \frac{dX_{sc}}{dt} = -ka \times X_{sc}$$

$$[0911] \quad \frac{dX_{mab}}{dt} = ka \times X_{sc} - CL_{mab} \times \frac{X_{mab}}{V_{mab}} - kon \times \frac{X_{mab} \times X_{ag}}{V_{mab}} + koff \times X_{com} + \left(\frac{CL_{com}}{V_{com}} - \frac{CL_{mab}}{V_{mab}} \right) \times X_{com}$$

$$[0912] \quad \frac{dX_{com}}{dt} = -CL_{com} \times \frac{X_{com}}{V_{com}} + kon \times \frac{X_{mab} \times X_{ag}}{V_{mab}} - koff \times X_{com}$$

$$[0913] \quad \frac{dX_{ag}}{dt} = -CL_{ag} \times \frac{X_{ag}}{V_{ag}} - kon \times \frac{X_{mab} \times X_{ag}}{V_{mab}} + koff \times X_{com} + R$$

[0914] X_{sc} :皮下组织的抗体量

[0915] X_{mab} :血清游离抗体的量

[0916] X_{com} :抗体和抗原的免疫复合体(=复合体)的量

[0917] Xag:血清游离抗原的量

[0918] ka:吸收速率常数

[0919] 在该模型中,对于所有抗体,假设生物利用度(F)为1,抗原生物合成速率(R)通过以下方程式确定。

[0920] [Math.2]

[0921] $R = CLag \times Cpre$

[0922] Cpre:血清的稳态抗原浓度。

[0923] 用于该计算机模拟研究的药代动力学参数和抗原结合动力学参数描述于表10。

[0924] [表10]

[0925]	CLmab	L/天/kg	0.0025
	CLag	L/天/kg	0.0243
	CLcom	L/天/kg	0.0045
	Vmab=Vag	L/kg	0.0843
	Vcom	L/kg	0.0519
	ka	1/天	0.4800
	koff	1/天	53.0496
	kon	1/nM/天	53.0496
		L/ug/天	0.353664

[0926] 模拟计算抗原消除性抗体和亲和力成熟的作用

[0927] 把给予抗体前稳态浓度(Cpre)设为2,400ng/mL。用所构建的PK模型,我们估算在单次皮下给予后84天为保持游离抗原浓度低于35ng/mL的抗体的最小剂量。抗原的分子量设置为190kDa,治疗性抗体的分子量全都设置为150kDa。

[0928] 作为抗体,具有不同结合亲和力的常规抗体和抗原消除性抗体(得自KD 1nM的亲本抗体的不同亲和力成熟度)用于该计算机模拟研究。抗原消除性抗体的作用反应在抗原-抗体复合体比常规抗体更快地清除。表11中描述了抗原-抗体复合体的清除参数(CLcom)。

[0929] [表11]

[0930]			常规Ab	抗原消除性Ab
	CLcom	L/天/kg	0.0045	0.0729

[0931] 还考虑了得自KD为1nM的亲本抗体的亲和力成熟的作用(亲和力在100倍范围内变化)。1nM、300pM、100pM、30pM和10pM的ED用于该计算机模拟研究。亲和力成熟的作用反应在koff降低。koff值在100倍范围内变化(koff=53.05、17.68、5.30、1.77、0.53[1/天])。

[0932] 为了保持在单次皮下给予后84天游离抗原浓度低于35ng/mL,对于结合亲和力(ED)为1nM、300pM、100pM、30pM和10pM的常规抗体和抗原消除性抗体,得到每个体的抗体剂量。结果见表12。

[0933] [表12]

[0934]	剂量 (mg/个体)	1nM	333pM	100pM	33pM	10pM
	常规Ab	2868	1256	692	532	475
	抗原消除性Ab	180	81	46	36	33

[0935] 结合亲和力为1nM的亲本常规抗体需要2,868mg以实现Q3M给药剂量。虽然可通过改进与抗原的结合亲和力来降低抗体剂量,但剂量的降低达到上限。这种上限源自抗体结合和抗原的中和需要与血浆中的抗原至少相同摩尔量的抗体的事实。即使用10pM的结合亲和力,常规抗体需要475mg以实现Q3M给药剂量,这是无法通过单次注射来皮下注射的剂量,因为受制剂抗体浓度和皮下可注射体积的限制。

[0936] 另一方面,可通过工程改造成pH依赖性抗原结合(或通过直接产生具有pH依赖性结合的抗体)和工程改造成具有在中性pH下与FcRn的结合亲和力提高的FC区而将常规抗体工程改造成抗原消除性抗体,来显著减少抗体剂量。结合亲和力为1nM的抗原消除性抗体只需要180mg便能实现Q3M给药剂量。即使用具有无限亲和力的常规抗体也无法达到这种剂量水平。通过改进抗原消除性抗体的结合亲和力至10pM,可减少剂量至33mg,这是可易于皮下注射的剂量。

[0937] 因此,该计算机模拟研究表明,抗原消除性抗体具有显著优于常规抗体的优势。可将抗体的剂量减少至即使具有无限亲和力的常规抗体也不能够达到的水平。至于给药剂量间隔,当抗原消除性抗体以与常规抗体相同的剂量注射时,抗原消除性抗体可具有更持久的作用,因此使给药间隔显著更长。通过抗原消除性抗体减少剂量和延长给药间隔两者可提供优于常规抗体的显著优势。

[0938] 应当注意的是,按实施例1中所述,抗原消除性抗体不一定需要与抗原的pH依赖性结合。与抗原的pH依赖性结合可显著提高抗体的抗原消除活性。此外,pH依赖性结合性质可利用其浓度在血浆和内体内不同的其它因素替换。这类因素也可用来产生在血浆中结合抗原但在内体中解离抗原的抗体。

[0939] [实施例15]提高pH依赖性抗人IL-6抗体的人IL-6消除加快作用的研究

[0940] pH依赖性人IL-6结合抗体的产生

[0941] 描述于W0 2009/125825的包含CLB8H-IgG1 (SEQ ID NO:16) 和CLB8L-CK (SEQ ID NO:17) 的CLB8-IgG1是嵌合抗IL-6抗体。包含H16-IgG1 (SEQ ID NO:18) 和L13-CK (SEQ ID NO:19) 的H16/L13-IgG1是因赋予CLB8-IgG1以pH依赖性方式与人IL-6结合的性质而产生的嵌合抗IL-6抗体(其在pH 7.4下结合但在pH 5.8下解离)。

[0942] 嵌合抗IL-6抗体与人IL-6的pH依赖性结合活性的评价

[0943] 采用Biacore T100 (GE Healthcare),针对在pH 5.5和pH 7.4下的人IL-6结合活性(解离常数(KD)),对CLB8-IgG1和H16/L13-IgG1进行评价。使用含有0.05%表面活性剂P20的10mmol/l ACES/150mmol/l NaCl (pH 7.4和pH 6.0) 作为运行缓冲液进行测定。在抗体与采用氨基偶联方法固定在传感器芯片上的重组蛋白A/G (Thermo Scientific) 结合后,注入适当浓度的人IL-6 (TORAY) 作为分析物。在37℃下进行测定。应用Biacore T100评价软件 (GE Healthcare),分析测定结果,并由测定结果计算缔合速率常数 k_a (1/Ms) 和解离速率常数 k_d (1/s)。然后由 k_a 和 k_d 计算KD (M) (表13)。此外,再评价每个抗体的pH依赖性结合以计算在pH 7.4与pH 6.0之间的KD比率。

[0944] [表13]

[0945]	样品	pH	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	KD(pH5.5)/KD(pH7.4)
	CLB8-IgG1	pH7.4	3.6E+06	8.0E-04	2.2E-10	0.8
		pH5.5	3.7E+06	6.6E-04	1.8E-10	
	H16/L13-IgG1	pH7.4	2.1E+06	4.6E-03	2.2E-09	7.4
		pH5.5	3.7E+05	5.9E-03	1.6E-08	

[0946] 在中性条件下具有FcRn结合活性的pH依赖性抗人IL-6抗体的制备

[0947] 将突变引入包含H16-IgG1 (SEQ ID NO:18) 和L13-CK (SEQ ID NO:19) 的H16/L13-IgG1中以增加在中性条件 (pH 7.4) 下的FcRn结合。具体而言,通过用Trp取代434位上的Asn (按EU编号),自IgG1的重链恒定区制备H16-IgG1-V2 (SEQ ID NO:20),同时通过用Tyr取代252位上的Met并用Trp取代434位上的Asn (按EU编号),自IgG1的重链恒定区构建H16-F14 (SEQ ID NO:21)。通过参考实施例1中描述的本领域技术人员已知的方法引入氨基酸取代。

[0948] 通过参考实施例2中描述的本领域技术人员已知方法,表达和纯化包含CLB8H-IgG1 (SEQ ID NO:16) 和CLB8L-CK (SEQ ID NO:17) 的CLB8-IgG1、包含H16-IgG1 (SEQ ID NO:18) 和L13-CK (SEQ ID NO:19) 的H16/L13-IgG1、包含H16-IgG1-v2 (SEQ ID NO:20) 和L13-CK (SEQ ID NO:19) 的H16/L13-IgG1-v2和包含H16-F14 (SEQ ID NO:21) 和L13-CK (SEQ ID NO:19) 的H16/L13-F14。

[0949] 在中性pH下Fc变体的小鼠FcRn结合活性的评价

[0950] 以下均按实施例5中所述制备:包含VH3-IgG1和L (WT) 的VH3/L (WT) -IgG1、包含VH3-IgG1-v2和L (WT) 的VH3/L (WT) -IgG1-v2和包含VH3-IgG1-F14和L (WT) 的VH3/L (WT) -IgG1-F14,并通过实施例8中所述方法,针对在中性条件 (pH 7.4) 下的小鼠FcRn结合,对这些进行评价。

[0951] 结果见表14。IgG1显示非常弱的结合活性,而IgG1-v2和IgG1-F14显示在pH7.4下与小鼠FcRn的较强结合亲和力。

[0952] [表14]

[0953]	KD
IgG1	ND
IgG1-v2	1.0E-06
IgG1-F14	1.3E-07

[0954] 使用正常小鼠的体内试验

[0955] 在将仅hIL-6或hIL-6和抗人IL-6抗体给予正常小鼠 (C57BL/6J小鼠;Charles River Japan) 后,评价人IL-6 (hIL-6;TORAY) 和抗人IL-6抗体的体内动力学。将hIL-6溶液 (5微克/ml) 或含有hIL-6和抗人IL-6抗体的混合物溶液 (CLB8-IgG1组;分别为5微克/ml的hIL-6和0.025mg/ml的CLB8-IgG1、H16/L13-IgG1、H16/L13-IgG1-v2和H16/L13-IgG1-F14组;5微克/ml的hIL-6和0.14mg/ml的H16/L13-IgG1、H16/L13-IgG1-V2和H16/L13-IgG1-F14) 以10ml/kg的剂量一次给予尾静脉。设置抗体剂量,使得在给药溶液中超过99.8%的人IL-6与抗体结合。在给予仅hIL-6后5分钟、30分钟、2小时、4小时、7小时、1天及在给予hIL-6和抗人IL-6抗体溶液混合物后5分钟、7小时、1天、2天、3天、4天、7天、14天、21天和30天采血。将所采集的血液立即在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。

[0956] 通过ELISA测量人IL-6血浆浓度

[0957] 通过采用人IL-6Quantikine HS ELISA试剂盒(R&D),测量小鼠血浆中的人IL-6浓度。制备血浆浓度为20、10、5、2.5、1.25、0.625和0.3125ng/ml的校准曲线样品和稀释100倍或更多倍的小鼠血浆样品。为了使样品中的所有IL-6与CLB8-IgG1结合,将150微升的5微克/ml CLB8-IgG1加入150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ELISA试剂盒(R&D)所提供的板中,使之在室温下静置1小时。然后,加入ELISA试剂盒(R&D)提供的IL-6缀合物,在室温下反应1小时,并加入ELISA试剂盒(R&D)提供的底物溶液,在室温下反应1小时。随后,使用ELISA试剂盒(R&D)提供的扩增溶液(Amplifier Solution)作为底物,进行显色反应,在室温下反应半小时。在用ELISA试剂盒(R&D)提供的终止溶液终止反应后,通过微量板读板仪,测量490nm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。对于正常小鼠,通过该方法测量的静脉内给予后血浆hIL-6浓度的时程如图30所示。

[0958] 通过ELISA测量抗人IL-6抗体血浆浓度

[0959] 通过ELISA测量小鼠血浆中抗人IL-6抗体的浓度。将抗人IgG(γ 链特异性的)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。制备血浆浓度为1.6、0.8、0.4、0.2、0.1、0.05和0.025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。为了使样品中的所有抗人IL-6抗体与人IL-6结合,将200微升的1微克/ml人IL-6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,加入山羊抗人IgG(γ 链特异性的)生物素(BIOT)缀合物(Southern Biotech Association),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TMB 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。对于正常小鼠,通过该方法测量的静脉内给予后血浆抗体浓度的时程如图31所示。

[0960] 与人IL-6 pH依赖性结合的作用

[0961] 体内测试以pH依赖性方式与人IL-6结合的CLB8-IgG1和H16/L13-IgG1,并比较它们之间的结果。如图31所示,抗体的药代动力学显示线性清除。同时,如图30所示,发现相比于与CLB8-IgG1同时给予的hIL-6,与以pH依赖性方式结合人IL-6的H16/L13-IgG1同时给予的hIL-6加快hIL-6的消除。因此,证实了通过赋予pH依赖性人IL-6结合能力,给药后4天血浆hIL-6浓度可降低约76倍。

[0962] 在中性条件(pH 7.4)下FcRn结合的作用

[0963] 除H16/L13-IgG1以外,使用正常小鼠,体内测试了由将上述氨基酸取代引入H16/L13-IgG1产生的H16/L13-IgG1-v2和H16/L13-F14。将试验结果与H16/L13-IgG1的结果进行比较。如图31所示,在给予后1天,在中性条件(pH 7.4)下与小鼠FcRn的结合增加的H16/L13-IgG1-v2的血浆抗体浓度是H16/L13-IgG1的1/2.9倍。或者,在给予后7小时,在中性条

件 (pH 7.4) 下与小鼠FcRn的结合进一步提高的H16/L13-F14的血浆抗体浓度是H16/L13-IgG1的1/21倍。

[0964] 如图30所示,相比于与H16/L13-IgG1同时给予的hIL-6,与在中性条件 (pH 7.4) 下与小鼠FcRn结合增加的H16/L13-IgG1-v2或H16/L13-F14同时给予的hIL-6表明显著更快地消除。与第1天的H16/L13-IgG1相比,H16/L13-IgG1-v2降低hIL-6的血浆浓度约10倍。与7小时的H16/L13-IgG1相比,H16/L13-F14降低hIL-6的血浆浓度约38倍。因此,揭示了通过赋予在中性条件 (pH 7.4) 下的小鼠FcRn结合能力,可降低血浆人IL-6浓度。如上所述,通过赋予在中性条件 (pH 7.4) 下的小鼠FcRn结合能力,降低了血浆抗体浓度;然而,产生降低血浆hIL-6浓度的作用,其大大超过抗体浓度的降低。具体而言,这意味着可通过给予以pH依赖性方式与人IL-6结合并且使之在中性条件 (pH 7.4) 下具有小鼠FcRn结合能力的抗体,来加快人IL-6的消除。

[0965] 上述研究结果表明,还可通过给予在中性条件下具有pH依赖性抗原结合能力和FcRn结合能力的抗体,显著降低不仅仅是人可溶性IL-6受体而且还有抗原例如人IL-6的血浆抗原浓度。

[0966] [实施例16]对促进以pH依赖性方式与人IgA结合的受体Fc融合蛋白的人IgA消除加快作用的研究

[0967] 以pH依赖性方式与人IgA结合的受体Fc融合蛋白的产生

[0968] 包含A0H-IgG1 (SEQ ID NO:22) 的二聚体的A0-IgG1是人CD89-Fc融合蛋白。如J.Mol.Biol. (2003) 324:645-657中所述,人CD89,亦称人Fc α 受体I,以pH依赖性方式与人IgA结合 (即在中性pH下与人IgA强结合,但在酸性pH下与人IgA弱结合)。

[0969] CD89-Fc融合蛋白与人IgA的pH依赖性结合活性的评价

[0970] 采用Biacore T100 (GE Healthcare),针对在pH 6.0和pH 7.4下的人IgA结合活性 (解离常数 (KD)),对A0-IgG1进行评价。使用含有0.05%表面活性剂P20的10mmol/l ACES/150mmol/l NaCl (pH 7.4和pH 6.0) 作为运行缓冲液进行测定。在CD89-Fc融合蛋白与采用氨基偶联方法固定在传感器芯片上的重组蛋白A/G (Thermo Scientific) 结合后,注入适当浓度的hIgA (人IgA:按参考实施例5中所述制备) 作为分析物。在37℃下进行测定。采用Biacore T100评价软件 (GE Healthcare) 分析测定结果,所获得的传感图如图32所示。这清楚表明,CD89-Fc融合蛋白具有pH依赖性人IgA结合活性,其在中性pH下与人IgA强结合,但在酸性pH下与人IgA弱结合。

[0971] 在中性条件下具有FcRn结合活性的pH依赖性受体Fc融合蛋白的制备

[0972] 将突变引入包含A0H-IgG1 (SEQ ID NO:22) 的二聚体的A0-IgG1中以增加在中性条件 (pH 7.4) 下的FcRn结合。具体而言,通过用Trp取代A0-IgG1中426位上的Asn,自IgG1的重链恒定区制备A0-IgG1-v2。通过参考实施例1中描述的本领域技术人员已知的方法引入氨基酸取代。

[0973] 通过参考实施例2中描述的本领域技术人员已知方法,表达和纯化包含A0H-IgG1 (SEQ ID NO:22) 的二聚体的A0-IgG1和包含A0H-IgG1-v2 (SEQ ID NO:23) 的二聚体的A0-IgG1-v2。

[0974] 使用正常小鼠的体内试验

[0975] 正常小鼠中 (C57BL/6J小鼠;Charles River Japan),在给予仅hIgA或hIgA和

CD89-Fc融合蛋白(A0H-IgG1或A0H-IgG1-v2)后,对人IgA(hIgA)和CD89-Fc融合蛋白的体内动力学进行评价。将hIgA溶液(80微克/ml)或含有hIgA和CD89-Fc融合蛋白(分别为80微克/ml和1.5mg/ml,其中大部分hIgA与CD89-Fc融合蛋白结合)的混合物的溶液以10ml/kg的剂量一次给予尾静脉。给予后15分钟、7小时、1天、2天、4天和7天采血。将所采集的血液立即在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。

[0976] 通过ELISA测量人IgA血浆浓度

[0977] 使用hsIL-6R通过ELISA测量小鼠血浆中的人IgA浓度,因为重组人IgA具有针对hsIL-6R的可变区。将山羊抗人IgA抗体(Bethyl Laboratories)分配到Nunc-ImmunoPlate MaxiSorp(Nalge Nunc International)上,使之在4℃下静置过夜以制备抗人IgA-固定化板。制备血浆浓度为0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125或0.00625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。为了使样品中的所有IgA与hsIL-6R结合,将200微升的10微克/ml hsIL-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IgA-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,使用TMB OneComponent 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。对于正常小鼠,通过该方法测量的静脉内给予后血浆hIgA浓度的时程见图33。

[0978] 通过ELISA测量的CD89-Fc融合蛋白血浆浓度

[0979] 通过ELISA测量小鼠血浆中CD89-Fc融合蛋白的浓度。将抗人IgG(γ 链特异性的)F(ab')₂抗体片段(Sigma)分配到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。制备血浆浓度为25.6、12.8、6.4、3.2、1.6、0.8和0.4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。为了使样品中的所有CD89-Fc融合蛋白与人IgA结合,将200微升的5微克/ml人IgA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,加入山羊抗人IgG(Fc特异性的)-碱性磷酸酶缀合物(SIGMA),在室温下反应1小时。随后,采用BluePhos Microwell磷酸酶底物系统(BluePhos Microwell Phosphatase Substrates System)(Kirkegaard&Perry Laboratories)作为底物进行显色反应,通过微量板读板仪测量650nm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。对于正常小鼠,按该方法测量的静脉内给予后CD89-Fc融合蛋白血浆浓度的时程见图34。

[0980] 在中性条件(pH 7.4)下的FcRn结合的作用

[0981] 除A0-IgG1以外,使用正常小鼠,体内测试由将上述氨基酸取代引入A0-IgG1产生的A0-IgG1-v2。将试验结果与A0-IgG1的结果进行比较。如图34所示,给予后2天,在中性条件(pH 7.4)下与小鼠FcRn结合增加的A0-IgG1-v2的血浆浓度是A0-IgG1的1/1.8倍。

[0982] 如图33所示,相比于与A0-IgG1同时给予的hIgA,与在中性条件(pH 7.4)下与小鼠

FcRn结合增加的A0-IgG1-v2同时给予的hIgA表明显著更快地消除。在第2天,与A0-IgG1相比,A0-IgG1-v2降低hIgA的血浆浓度约5.7倍。如上所述,通过赋予在中性条件(pH 7.4)下的小鼠FcRn结合能力,来降低血浆抗体浓度;然而,产生降低血浆hIgA浓度的作用,其大大超过抗体浓度的降低。具体而言,这意味着可通过给予以pH依赖性方式与人IgA结合且使之在中性条件(pH7.4)下具有小鼠FcRn结合能力的受体Fc融合蛋白,来加快人IgA的消除。

[0983] 上述研究结果表明,还可通过给予在中性条件下具有pH依赖性抗原结合能力和FcRn结合能力两者的受体Fc融合蛋白,来显著降低血浆抗原浓度,例如人IgA的血浆抗原浓度。因此,还可对受体Fc融合蛋白进行工程改造以具有从血浆消除抗原(或配体)血浆浓度的能力。

[0984] [实施例17]对促进pH依赖性抗人丛蛋白A1抗体的丛蛋白A1消除加快作用的研究(抗体的制备)

[0985] 有关pH依赖性人丛蛋白A1结合抗体

[0986] 包含PX268H-IgG1 (SEQ ID NO:24) 和PX268L-CK (SEQ ID NO:25) 的PX268-IgG1是嵌合抗丛蛋白A1抗体。包含PX141H-IgG1 (SEQ ID NO:26) 和PX141L-CK (SEQ ID NO:27) 的PX141-IgG1是以pH依赖性方式与可溶性人丛蛋白A1结合的嵌合抗丛蛋白A1抗体(即在中性pH下与可溶性人丛蛋白A1强结合,但在酸性pH下与可溶性人丛蛋白A1弱结合)。

[0987] 抗人丛蛋白A1抗体与人丛蛋白A1的pH依赖性结合活性的评价

[0988] 用Biacore T100 (GE Healthcare),针对在pH 6.0和pH 7.4下的人丛蛋白A1结合活性(解离常数(KD)),对PX268-IgG1和PX141-IgG1进行评价。使用含有0.05%表面活性剂P20的10mmol/l ACES/150mmol/l NaCl (pH 7.4和pH 6.0)作为运行缓冲液,进行测定。在抗体与采用氨基偶联方法固定在传感器芯片上的重组蛋白A/G (Thermo Scientific)结合后,注入适当浓度的hsPlexin A1 (可溶性人丛蛋白A1:按参考实施例5中所述制备)作为分析物。在37℃下进行测定。应用Biacore T100评价软件 (GE Healthcare),分析测定结果,并由测定结果计算缔合速率常数、 k_a (1/Ms) 和解离速率常数 k_d (1/s)。然后根据 k_a 和 k_d 计算KD (M) (表15)。此外,评价pH依赖性结合以计算各抗体在pH 7.4和pH 6.0之间的KD比率。

[0989] [表15]

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

[0991] 在中性条件下具有FcRn结合活性的pH依赖性抗人丛蛋白A1抗体的制备

[0992] 将突变引入包含PX141H-IgG1 (SEQ ID NO:26) 和PX141L-CK (SEQ ID NO:27) 的PX141-IgG1中以增加在中性条件(pH 7.4)下的FcRn结合。具体而言,通过用Trp取代434位上的Asn(按EU编号),自IgG1的重链恒定区制备PX141H-IgG1-V2 (SEQ ID NO:28)。通过参考实施例1中描述的本领域技术人员已知的方法引入氨基酸取代。

[0993] 通过参考实施例2中描述的本领域技术人员已知方法,表达和纯化包含PX268H-IgG1 (SEQ ID NO:24) 和PX268L-CK (SEQ ID NO:25) 的PX268-IgG1、包含PX141H-IgG1 (SEQ

ID NO:26) 和PX141L-CK (SEQ ID NO:27) 的PX141-IgG1和包含PX141H-IgG1-v2 (SEQ ID NO:28) 和PX141L-CK (SEQ ID NO:27) 的PX141-IgG1-v2。

[0994] 使用正常小鼠的体内试验

[0995] 在正常小鼠 (C57BL/6J小鼠;Charles River Japan) 中,在给予仅hsPlexin A1或hsPlexin A1和抗人丛蛋白A1抗体后,评价可溶性人丛蛋白A1 (hsPlexin A1) 和抗人丛蛋白A1抗体的体内动力学。将hsPlexin A1溶液 (100微克/ml) 或含有hsPlexin A1和抗人丛蛋白A1抗体 (PX268-IgG1组;分别为100微克/ml的hsPlexin A1和1.2mg/ml的PX268-IgG1、PX141-IgG1和PX141-IgG1-v2组;100微克/ml的hsPlexin A1和1.0mg/ml的PX141-IgG1和PX141-IgG1-v2) 的混合物的溶液以10ml/kg的剂量一次给予尾静脉。

[0996] 在给药溶液中,设置抗体的剂量,使得超过99.9%的可溶性人丛蛋白A1与抗体结合。给予hsPlexin A1和抗人丛蛋白A1抗体溶液混合物后15分钟、7小时、1天、2天、4天、7天采血。将所采集的血液立即在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。

[0997] 给予仅hsPlexin A1后通过ELISA测量人丛蛋白A1血浆浓度

[0998] 使用生物素化抗FLAG M2抗体 (Sigma),通过ELISA测量小鼠血浆中人丛蛋白A1的浓度,因为重组人丛蛋白A1具有C端的FLAG标签序列端。将通过用丛蛋白A1免疫兔而制备的兔抗人丛蛋白A1多克隆抗体分配到Nunc-ImmunoPlate MaxiSorp (Nalge Nunc International) 上,使之在4℃下静置过夜以制备抗人丛蛋白A1-固定化板。制备血浆浓度为25.6、12.8、6.4、3.2、1.6和0.8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。随后,将样品分配到抗人丛蛋白A1-固定化板上,使之在室温下静置1小时。然后,加入生物素化抗FLAG M2抗体 (Sigma),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TMB One Component HR 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。通过该方法测量的静脉内给予后血浆hsPlexin A1浓度的时程见图35。

[0999] 通过ELISA测量PX268-IgG1组中人丛蛋白A1血浆浓度

[1000] 使用生物素化抗FLAG M2抗体 (Sigma) 通过ELISA测量小鼠血浆中人丛蛋白A1的浓度,因为重组人丛蛋白A1具有C端的FLAG标签序列端。将通过用丛蛋白A1免疫兔而制备的兔抗人丛蛋白A1多克隆抗体分配到Nunc-ImmunoPlate MaxiSorp (Nalge Nunc International) 上,使之在4℃下静置过夜以制备抗人丛蛋白A1-固定化板。制备血浆浓度为25.6、12.8、6.4、3.2、1.6和0.8微克/ml的校准曲线样品和稀释50倍或更多倍的小鼠血浆样品。为了使样品中的所有丛蛋白A1与PX268-IgG1结合,将150微升的40微克/ml PX268-IgG1加入150微升的校准曲线样品和血浆样品中,然后使样品在37℃下静置过夜。随后,将样品分配到抗人丛蛋白A1-固定化板上,使之在室温(或4℃)下静置1小时。然后,加入生物素化抗FLAG M2抗体 (Sigma),在室温(或4℃)下反应1小时。随后,加入链霉抗生物素-PolyHRP80 (Stereospecific Detection Technologies),在室温(或4℃)下反应1小时,并使用TMB 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。通过该方法测量的静脉内给药后血浆hsPlexin A1浓度的时程见图35。

[1001] 通过ELISA测量PX141-IgG1和PX141-IgG1-v2组中人从蛋白A1血浆浓度

[1002] 使用生物素化抗FLAG M2抗体 (Sigma), 通过ELISA测量小鼠血浆中人从蛋白A1的浓度, 因为重组人从蛋白A1具有C端的FLAG标签序列端。将PX268-IgG1分配到Nunc-ImmunoPlate MaxiSorp (Nalge Nunc International) 上, 使之在4℃下静置过夜以制备抗人从蛋白A1-固定化板。制备血浆浓度为25.6、12.8、6.4、3.2、1.6和0.8微克/ml的校准曲线样品和稀释50倍或更多倍的小鼠血浆样品。为了使样品中的所有从蛋白A1与PX141-IgG1或PX141-IgG1-v2结合, 将150微升的40微克/ml PX141-IgG1或PX141-IgG1-v2加入150微升的校准曲线样品和血浆样品中, 然后使样品在37℃下静置过夜。随后, 将样品分配到抗人从蛋白A1-固定化板上, 使之在室温 (或4℃) 下静置1小时。然后, 加入生物素化抗FLAG M2抗体 (Sigma), 在室温 (或4℃) 下反应1小时。随后, 加入链霉抗生物素-PolyHRP80 (Stereospecific Detection Technologies), 在室温 (或4℃) 下反应1小时, 并使用TMB 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。通过该方法测量的静脉内给予后7小时的血浆hsPlexin A1浓度见图35。

[1003] 与可溶性人从蛋白A1的pH依赖性结合的作用

[1004] 对以pH依赖性方式与人IL-6结合的PX268-IgG1和PX141-IgG1进行体内测试, 并比较它们之间的结果。同时, 如图35所示, 发现相比于与PX268-IgG1同时给予的hsPlexin A1, 与以pH依赖性方式结合可溶性人从蛋白A1的PX141-IgG1同时给予的hsPlexin A1降低hsPlexin A1的血浆总浓度。

[1005] 在中性条件 (pH 7.4) 下FcRn结合的作用

[1006] 除PX141-IgG1以外, 使用正常小鼠, 对由将上述氨基酸取代引入PX141-IgG1产生的PX141-IgG1-v2进行体内测试。将试验结果与PX141-IgG1的结果进行比较。

[1007] 如图35所示, 与在中性条件 (pH 7.4) 下与小鼠FcRn结合增加的PX141-IgG1-v2同时给予的hsPlexin A1显示, hsPlexin A1的血浆总浓度被降低至无法检出的水平 (检出限为0.8微克/mL)。因此, 这就揭示了可通过赋予在中性条件 (pH 7.4) 下的小鼠FcRn结合能力, 来降低可溶性人从蛋白A1浓度。具体而言, 这意味着可通过给予以pH依赖性方式与人从蛋白A1结合且使之在中性条件 (pH 7.4) 下具有小鼠FcRn结合能力的抗体, 来加快可溶性人从蛋白A1的消除。

[1008] 上述研究结果表明, 还可通过给予在中性条件下具有pH依赖性抗原结合能力和FcRn结合能力的抗体, 显著降低不仅人可溶性IL-6受体还有抗原 (例如人IL-6、人IgA和人可溶性从蛋白A1) 的血浆抗原浓度。

[1009] [参考实施例1] 引入氨基酸取代的IgG抗体的表达载体的构建

[1010] 按照所提供的说明书中描述的方法, 使用QuikChange位点定向诱变试剂盒 (QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit) (Stratagene) 或In-Fusion HD克隆试剂盒 (In-Fusion HD Cloning Kit) (Clontech) 产生突变型, 并将所得质粒片段插入哺乳动物细胞表达载体以产生所需要的H链表达载体和L链表达载体。采用本领域技术人员已知的常

规方法,测定所得到的表达载体的核苷酸序列。

[1011] [参考实施例2] IgG抗体的表达和纯化

[1012] 通过下述方法表达抗体。按照生产商提供的方法所述,通过FreestyleHEK293 (Invitrogen) 或HEK293H细胞品系 (Invitrogen) 表达抗体。将人胚肾癌衍生的HEK293H细胞系 (Invitrogen) 悬浮于补充10%胎牛血清 (Invitrogen) 的DMEM (Invitrogen) 中。对于 5×10^5 个细胞/ml的细胞密度的贴壁细胞 (直径10cm; CORNING), 将细胞以10ml/培养皿铺板于培养皿中, 在CO₂培养箱 (37°C, 5% CO₂) 中培养一整昼夜。然后, 通过吸取除去培养基, 加入6.9ml的CHO-S-SFM-II培养基 (Invitrogen)。将所制备的质粒通过脂转染方法导入细胞。收集所得培养上清液, 离心 (约2,000x g, 5分钟, 室温) 除去细胞, 并通过0.22微米过滤器MILLEX (注册商标) -GV (Millipore) 过滤除菌得到上清液。用rProtein A Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences), 通过本领域的技术人员已知方法, 从所得培养上清液中纯化出抗体。为了测定纯化的抗体的浓度, 使用分光光度计, 测量280nm下的吸光度。采用通过Protein Science (1995) 4:2411-2423中描述的方法计算的吸光度系数, 由测定值计算抗体浓度。

[1013] [参考实施例3] 可溶性人IL-6受体 (hsIL-6R) 的制备

[1014] 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) 中报道的)。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: Blue Sepharose 6 FF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。

[1015] [参考实施例4] 人FcRn的制备

[1016] FcRn是FcRn和β2-微球蛋白的复合体。根据已公布的人FcRn基因序列 (J Exp Med. 1994年12月1日; 180 (6): 2377-81), 制备寡聚DNA引物。使用人cDNA (Human Placenta Marathon-Ready cDNA, Clontech) 作为模板和所制备的引物, 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。使用人cDNA (Human Placenta Marathon-Ready cDNA, Clontech) 作为模板和所制备的引物, 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。

[1017] 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FcRn (SEQ ID NO:30) 和β2-微球蛋白 (SEQ ID NO:31) 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 Sepharose 6 Fast 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)。

[1018] [参考实施例5] 人IgA (hIgA) 的制备

[1019] 通过本领域的技术人员已知方法, 使用rProtein L-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:29) 和L (WT) (SEQ ID NO:5) 的

hIgA。

[1020] [参考实施例6]可溶性人丛蛋白A1 (hsPlexin A1) 的制备

[1021] 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。特别是将由来自上述NCBI参比FLAG标签 (DYKDDDDK) 的27-1243位氨基酸序列组成的hsPlexin A1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。

序列表

<110> 中外制药株式会社
 <120> 促进抗原清除的与FcRn的亲合力得到改进的抗体
 <130> C1-A1004Y1P
 <150> JP 2010-079667
 <151> 2010-03-30
 <150> JP 2010-250830
 <151> 2010-11-09
 <160> 31
 <170> PatentIn version 3.4
 <210> 1
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> 人工合成的肽序列
 <400> 1

[0001] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Asp Asp
 20 25 30
 Gln Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

	115							120								125
	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu
	130						135					140				
	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
	145					150					155					160
	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
					165					170					175	
	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
				180					185						190	
	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro
			195					200					205			
	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys
		210					215					220				
[0002]	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro
	225					230					235					240
	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
					245					250					255	
	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp
				260					265					270		
	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn
		275						280					285			
	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
		290					295					300				
	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu
	305					310					315					320
	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys
					325					330					335	
	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr
				340					345					350		

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

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

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

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

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

<210> 2

<211> 214

<212> PRT

[0003] <213> 人工

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

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

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

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

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

	85	90	95
	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val	Glu Ile Glu Arg Thr Val Ala Ala	
	100	105	110
	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
	115	120	125
	Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
	130	135	140
	Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
	145	150	155 160
	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
	165	170	175
	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
	180	185	190
[0004]	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
	195	200	205
	Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
	210		
	<210> 3		
	<211> 447		
	<212> PRT		
	<213> 人工		
	<220>		
	<223> 人工合成的肽序列		
	<400> 3		
	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu		
	1	5	10 15
	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Asp Asp		
	20	25	30
	Gln Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp		
	35	40	45

	Ile	Gly	Tyr	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	
	50						55				60						
	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	
	65					70					75					80	
	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Ala	Tyr	Tyr	Cys	
				85						90					95		
	Ala	Arg	Ser	Leu	Ala	Arg	Thr	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Glu	Gly	
				100					105					110			
	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
			115					120					125				
	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	
		130					135					140					
	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	
	145					150					155					160	
[0005]	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	
					165					170					175		
	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	
				180					185					190			
	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	
			195					200					205				
	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	
		210					215					220					
	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	
	225					230					235					240	
	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Trp	Ile	Ser	
				245						250					255		
	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	
				260					265					270			
	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	

125

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

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

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

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

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

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

[0007]

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

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

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

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

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

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

[0008]

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

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

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

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

Lys

<210> 5
<211> 214
<212> PRT
<213> 人

<400> 5

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

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

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

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

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

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

[0009]

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 6
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工合成的肽序列

<400> 6

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

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

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

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

[0010] Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

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

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

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

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

[0011]

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

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

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

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

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

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

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

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

<210> 7

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 7

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

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

[0012] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 8

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 8

[0013]

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							
[0014]	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro			
	225					230					235					240			
	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Tyr	Ile	Thr			
					245					250					255				
	Arg	Glu	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp			
				260					265					270					
	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn			
		275						280					285						
	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val			
		290					295					300							
	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu			
	305					310					315					320			
	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys			
					325					330					335				
	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr			
				340					345					350					

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

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

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

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

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

<210> 9

<211> 447

<212> PRT

[0015] <213> 人工

<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				
	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			
[0016]	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	
			195					200					205				
	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	
		210					215					220					
	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	
	225					230					235					240	
	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	
					245					250					255		
	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	
				260					265					270			
	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	
			275					280					285				
	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	
		290					295					300					
	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	
	305					310					315					320	

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

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

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

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

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

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

[0017]

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

<210> 10

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工

<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			
	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		
[0018]	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu		
					165					170					175			
	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser		
				180					185					190				
	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro		
			195					200					205					
	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys		
		210					215					220						
	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro		
	225					230					235					240		
	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser		
				245						250					255			
	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp		
				260					265					270				
	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn		
		275						280					285					

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

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

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

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

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

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

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

[0019]

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

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

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

<210> 11

<211> 324

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 11

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

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

																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													</
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro

<210> 12
<211> 324
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 人工合成的肽序列

[0021]

<400> 12

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

	100							105				110				
	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
			115					120					125			
	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
		130					135					140				
	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
	145					150					155					160
	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn
					165					170					175	
	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp
				180					185					190		
	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro
			195					200					205			
[0022]	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
		210					215					220				
	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
	225					230					235					240
	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
					245					250					255	
	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
				260					265					270		
	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
			275					280					285			
	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
		290					295					300				
	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
	305					310					315					320
	Ser	Leu	Ser	Pro												

<210> 13
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工合成的肽序列

<400> 13

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

[0023] Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

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

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp

	180	185	190
	Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro 195 200 205		
	Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu 210 215 220		
	Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn 225 230 235 240		
	Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile 245 250 255		
	Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr 260 265 270		
	Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys 275 280 285		
[0024]	Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys 290 295 300		
	Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu 305 310 315 320		
	Ser Leu Ser Pro Gly Lys 325		
	<210> 14 <211> 324 <212> PRT <213> 人工		
	<220> <223> 人工合成的肽序列		
	<400> 14		
	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys 1 5 10 15		
	Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr 20 25 30		

	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	
			35					40					45				
	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	
		50					55					60					
	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	
	65					70					75					80	
	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	
				85						90					95		
	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Ser	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	
				100					105					110			
	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	
			115					120					125				
	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	
		130					135					140					
[0025]	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	
	145					150					155					160	
	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	
					165					170					175		
	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	
				180					185					190			
	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	
			195					200					205				
	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	
		210					215					220					
	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	
	225					230					235					240	
	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	
				245						250					255		
	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	

260

265

270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro

<210> 15
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 人工合成的肽序列

[0026] <400> 15

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

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

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

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

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

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

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

	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
		115						120					125				
	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	
		130					135					140					
	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	
	145					150					155					160	
	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	
					165					170					175		
	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	
				180					185					190			
	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	
			195					200					205				
	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Ser	Cys	Val	Glu	
		210					215					220					
[0027]	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	
	225					230					235					240	
	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	
					245					250					255		
	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	
				260					265					270			
	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	
			275					280					285				
	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	
		290					295					300					
	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	
	305					310					315					320	
	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	
					325					330					335		
	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	

	340		345		350
Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys	355		360		365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln	370		375		380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly	385		390		395
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln	405		410		415
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala	420		425		430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro	435		440		

[0028]

<210> 16
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> 人工

 <220>
 <223> 人工合成的肽序列

 <400> 16

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

	Leu	Glu	Met	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95	
	Ala	Arg	Gly	Leu	Trp	Gly	Tyr	Tyr	Ala	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
				100					105					110		
	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
			115					120					125			
	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu
		130					135					140				
	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
	145					150					155					160
	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
					165					170					175	
	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
				180					185					190		
[0029]	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro
			195					200					205			
	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys
		210					215					220				
	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro
	225					230					235					240
	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
					245					250					255	
	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp
				260					265					270		
	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn
		275						280					285			
	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
		290					295					300				
	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu

	305		310		315		320
	Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys	325		330		335	
	Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr	340		345		350	
	Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr	355		360		365	
	Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu	370		375		380	
	Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu	385		390		395	400
	Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys	405		410		415	
[0030]	Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu	420		425		430	
	Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro	435		440		445	
	<210> 17						
	<211> 213						
	<212> PRT						
	<213> 人工						
	<220>						
	<223> 人工合成的肽序列						
	<400> 17						
	Gln Ile Val Leu Ile Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly	1	5	10		15	
	Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met	20		25		30	
	Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr	35		40		45	

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr
85 90 95

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

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

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

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

[0031]

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 18
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 18

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

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

Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Glu Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr His Pro His Thr Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Leu Trp Gly His Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

[0032]

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

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

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

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

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

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

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

[0033]

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

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

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

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

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

<210> 19

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 19

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Gly His Pro Tyr Thr
85 90 95

[0034]

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 20

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 20

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

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

Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

[0035] Ala Glu Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr His Pro His Thr Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Leu Trp Gly His Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

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

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

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

[0036]

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

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

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

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

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

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

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

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

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

<210> 21

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 21

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

[0037]

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

Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Glu Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr His Pro His Thr Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Leu Trp Gly His Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

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

[0038]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

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

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

<210> 22

<211> 436

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人工合成的肽序列

[0039]

<400> 22

Gln Glu Gly Asp Phe Pro Met Pro Phe Ile Ser Ala Lys Ser Ser Pro
1 5 10 15

Val Ile Pro Leu Asp Gly Ser Val Lys Ile Gln Cys Gln Ala Ile Arg
20 25 30

Glu Ala Tyr Leu Thr Gln Leu Met Ile Ile Lys Asn Ser Thr Tyr Arg
35 40 45

Glu Ile Gly Arg Arg Leu Lys Phe Trp Asn Glu Thr Asp Pro Glu Phe
50 55 60

Val Ile Asp His Met Asp Ala Asn Lys Ala Gly Arg Tyr Gln Cys Gln
65 70 75 80

Tyr Arg Ile Gly His Tyr Arg Phe Arg Tyr Ser Asp Thr Leu Glu Leu
85 90 95

Val Val Thr Gly Leu Tyr Gly Lys Pro Phe Leu Ser Ala Asp Arg Gly
100 105 110

Leu Val Leu Met Pro Gly Glu Asn Ile Ser Leu Thr Cys Ser Ser Ala
115 120 125

His Ile Pro Phe Asp Arg Phe Ser Leu Ala Lys Glu Gly Glu Leu Ser
130 135 140

Leu Pro Gln His Gln Ser Gly Glu His Pro Ala Asn Phe Ser Leu Gly
145 150 155 160

Pro Val Asp Leu Asn Val Ser Gly Ile Tyr Arg Cys Tyr Gly Trp Tyr
165 170 175

Asn Arg Ser Pro Tyr Leu Trp Ser Phe Pro Ser Asn Ala Leu Glu Leu
180 185 190

Val Val Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
195 200 205

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro
210 215 220

[0040]

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
225 230 235 240

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
245 250 255

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
260 265 270

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
275 280 285

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
290 295 300

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
305 310 315 320

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
325 330 335

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
340 345 350

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
355 360 365

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
370 375 380

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
385 390 395 400

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
405 410 415

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
420 425 430

Leu Ser Leu Ser
435

[0041]

<210> 23
<211> 436
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 23

Gln Glu Gly Asp Phe Pro Met Pro Phe Ile Ser Ala Lys Ser Ser Pro
1 5 10 15

Val Ile Pro Leu Asp Gly Ser Val Lys Ile Gln Cys Gln Ala Ile Arg
20 25 30

Glu Ala Tyr Leu Thr Gln Leu Met Ile Ile Lys Asn Ser Thr Tyr Arg
35 40 45

Glu Ile Gly Arg Arg Leu Lys Phe Trp Asn Glu Thr Asp Pro Glu Phe
50 55 60

Val Ile Asp His Met Asp Ala Asn Lys Ala Gly Arg Tyr Gln Cys Gln
65 70 75 80

Tyr Arg Ile Gly His Tyr Arg Phe Arg Tyr Ser Asp Thr Leu Glu Leu
85 90 95

Val Val Thr Gly Leu Tyr Gly Lys Pro Phe Leu Ser Ala Asp Arg Gly
100 105 110

Leu Val Leu Met Pro Gly Glu Asn Ile Ser Leu Thr Cys Ser Ser Ala
115 120 125

His Ile Pro Phe Asp Arg Phe Ser Leu Ala Lys Glu Gly Glu Leu Ser
130 135 140

Leu Pro Gln His Gln Ser Gly Glu His Pro Ala Asn Phe Ser Leu Gly
145 150 155 160

Pro Val Asp Leu Asn Val Ser Gly Ile Tyr Arg Cys Tyr Gly Trp Tyr
165 170 175

Asn Arg Ser Pro Tyr Leu Trp Ser Phe Pro Ser Asn Ala Leu Glu Leu
180 185 190

[0042]

Val Val Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
195 200 205

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro
210 215 220

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
225 230 235 240

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
245 250 255

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
260 265 270

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
275 280 285

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
290 295 300

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
305 310 315 320

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
325 330 335

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
340 345 350

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
355 360 365

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
370 375 380

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
385 390 395 400

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
405 410 415

[0043]

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Trp His Tyr Thr Gln Lys Ser
420 425 430

Leu Ser Leu Ser
435

<210> 24

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 24

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

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Ala Cys Ile Tyr Ile Gly Ser Asp Ser Ala Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Thr Leu
65 70 75 80

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

Arg Trp Asp Asn Ser Gly Arg Ala Leu Lys Leu Trp Gly Pro Gly Thr
100 105 110

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

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

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

[0044]

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

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

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

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

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0045]

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

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

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

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

<210> 25

<211> 219

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 25

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

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

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

Ile Tyr Phe Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys
50 55 60

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

Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Asn Tyr Asp Cys Gly
85 90 95

Ser Ala Asp Cys His Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

[0046]

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 26

<211> 454

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 26

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

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

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

Ile Gly Cys Ile Val Thr Gly Ser Tyr Gly Arg Ser Trp Tyr Ala Ser
50 55 60

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

Val Thr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr
85 90 95

[0047]

Phe Cys Ala Arg Asp Pro Phe Val Ile Ala Ser Ser His Tyr Gln Asn
100 105 110

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

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

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

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190

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

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

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225 230 235 240

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
245 250 255

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270

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

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

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305 310 315 320

[0048]

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

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

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

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370 375 380

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

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
405 410 415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 27
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 27

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

Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Pro Asn Ile Tyr Asn Asn
20 25 30

[0049] Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

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

Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Tyr Lys Ser Tyr Asp
85 90 95

Asn Asp Asp Asn Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 28

<211> 454

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 28

[0050] Gln Glu Gln Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Glu Gly
1 5 10 15

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

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

Ile Gly Cys Ile Val Thr Gly Ser Tyr Gly Arg Ser Trp Tyr Ala Ser
50 55 60

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

Val Thr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr
85 90 95

Phe Cys Ala Arg Asp Pro Phe Val Ile Ala Ser Ser His Tyr Gln Asn
100 105 110

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

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

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

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190

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

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

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225 230 235 240

[0051]

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
245 250 255

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270

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

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

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305 310 315 320

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

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

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

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370 375 380

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

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
405 410 415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Trp His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450

[0052]

<210> 29

<211> 472

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 29

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

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

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

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

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

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

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

Pro Leu Ser Leu Cys Ser Thr Gln Pro Asp Gly Asn Val Val Ile Ala
130 135 140

Cys Leu Val Gln Gly Phe Phe Pro Gln Glu Pro Leu Ser Val Thr Trp
145 150 155 160

Ser Glu Ser Gly Gln Gly Val Thr Ala Arg Asn Phe Pro Pro Ser Gln
165 170 175

Asp Ala Ser Gly Asp Leu Tyr Thr Thr Ser Ser Gln Leu Thr Leu Pro
180 185 190

[0053]

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

Tyr Thr Asn Pro Ser Gln Asp Val Thr Val Pro Cys Pro Val Pro Ser
210 215 220

Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser
225 230 235 240

Cys Cys His Pro Arg Leu Ser Leu His Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu
245 250 255

Leu Leu Gly Ser Glu Ala Asn Leu Thr Cys Thr Leu Thr Gly Leu Arg
260 265 270

Asp Ala Ser Gly Val Thr Phe Thr Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Ser
275 280 285

Ala Val Gln Gly Pro Pro Glu Arg Asp Leu Cys Gly Cys Tyr Ser Val
290 295 300

Ser Ser Val Leu Pro Gly Cys Ala Glu Pro Trp Asn His Gly Lys Thr
305 310 315 320

Phe Thr Cys Thr Ala Ala Tyr Pro Glu Ser Lys Thr Pro Leu Thr Ala
325 330 335

Thr Leu Ser Lys Ser Gly Asn Thr Phe Arg Pro Glu Val His Leu Leu
340 345 350

Pro Pro Pro Ser Glu Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Ala Arg Gly Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu
370 375 380

Gln Gly Ser Gln Glu Leu Pro Arg Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala Ser
385 390 395 400

Arg Gln Glu Pro Ser Gln Gly Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile
405 410 415

[0054]

Leu Arg Val Ala Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys
420 425 430

Met Val Gly His Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile
435 440 445

Asp Arg Leu Ala Gly Lys Pro Thr His Val Asn Val Ser Val Val Met
450 455 460

Ala Glu Val Asp Gly Thr Cys Tyr
465 470

<210> 30
<211> 365
<212> PRT
<213> 人

<400> 30

Met Gly Val Pro Arg Pro Gln Pro Trp Ala Leu Gly Leu Leu Leu Phe
1 5 10 15

Leu Leu Pro Gly Ser Leu Gly Ala Glu Ser His Leu Ser Leu Leu Tyr

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Phe His Ala Ser Ser Ser Leu Thr Val Lys Ser Gly Asp Glu His His
260 265 270

Tyr Cys Cys Ile Val Gln His Ala Gly Leu Ala Gln Pro Leu Arg Val
275 280 285

Glu Leu Glu Ser Pro Ala Lys Ser Ser Val Leu Val Val Gly Ile Val
290 295 300

Ile Gly Val Leu Leu Leu Thr Ala Ala Ala Val Gly Gly Ala Leu Leu
305 310 315 320

Trp Arg Arg Met Arg Ser Gly Leu Pro Ala Pro Trp Ile Ser Leu Arg
325 330 335

Gly Asp Asp Thr Gly Val Leu Leu Pro Thr Pro Gly Glu Ala Gln Asp
340 345 350

Ala Asp Leu Lys Asp Val Asn Val Ile Pro Ala Thr Ala
355 360 365

[0056]

<210> 31
<211> 119
<212> PRT
<213> 人

<400> 31

Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser
1 5 10 15

Gly Leu Glu Ala Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg
20 25 30

His Pro Ala Glu Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser
35 40 45

Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu
50 55 60

Arg Ile Glu Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp
65 70 75 80

	Ser	Phe	Tyr	Leu	Leu	Tyr	Tyr	Thr	Glu	Phe	Thr	Pro	Thr	Glu	Lys	Asp
				85					90						95	
[0057]	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													

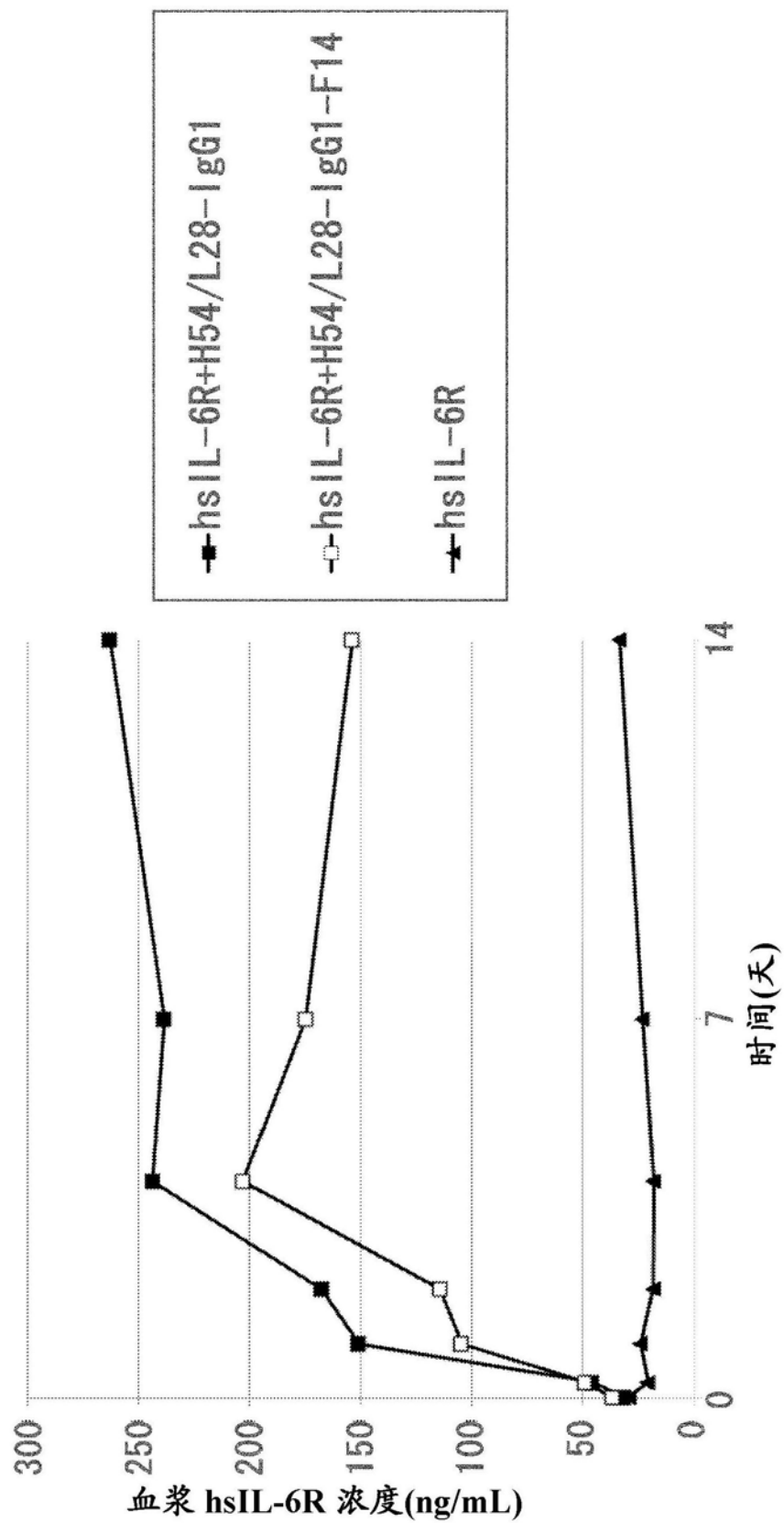


图1

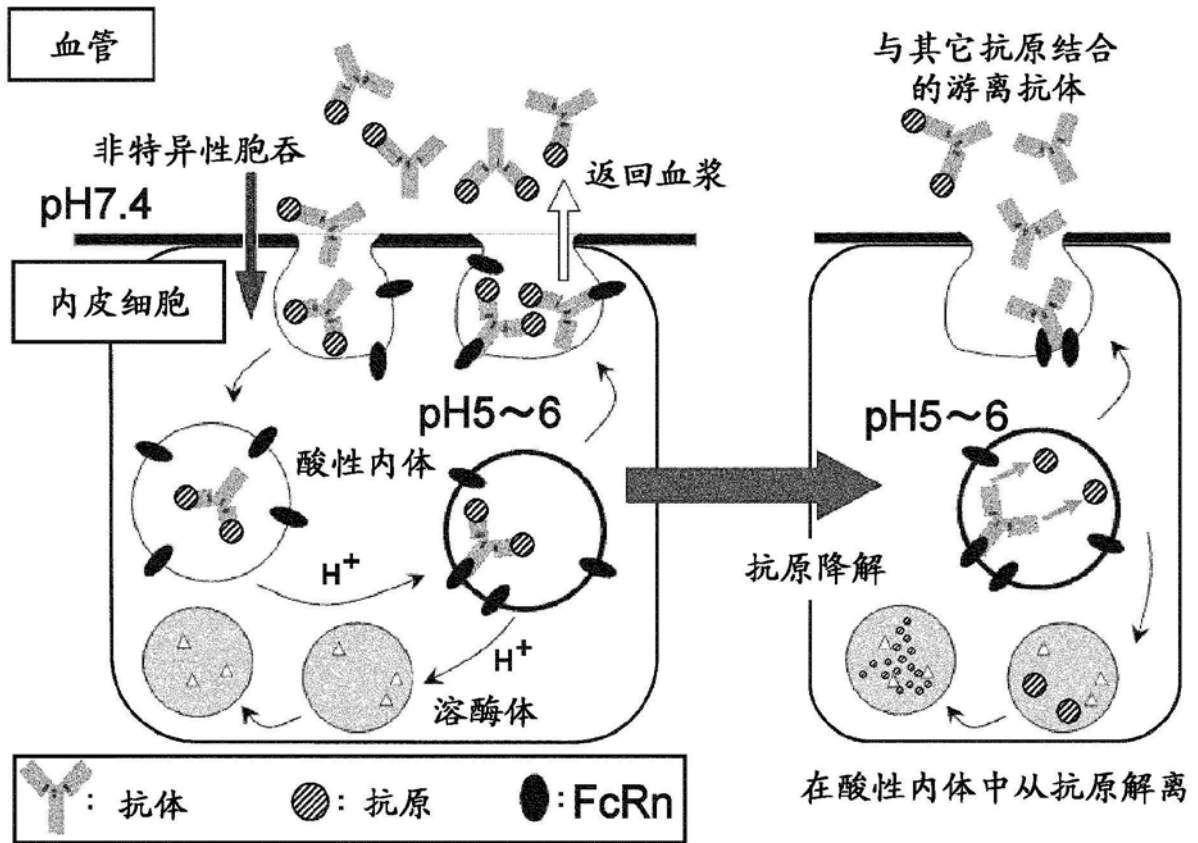


图2

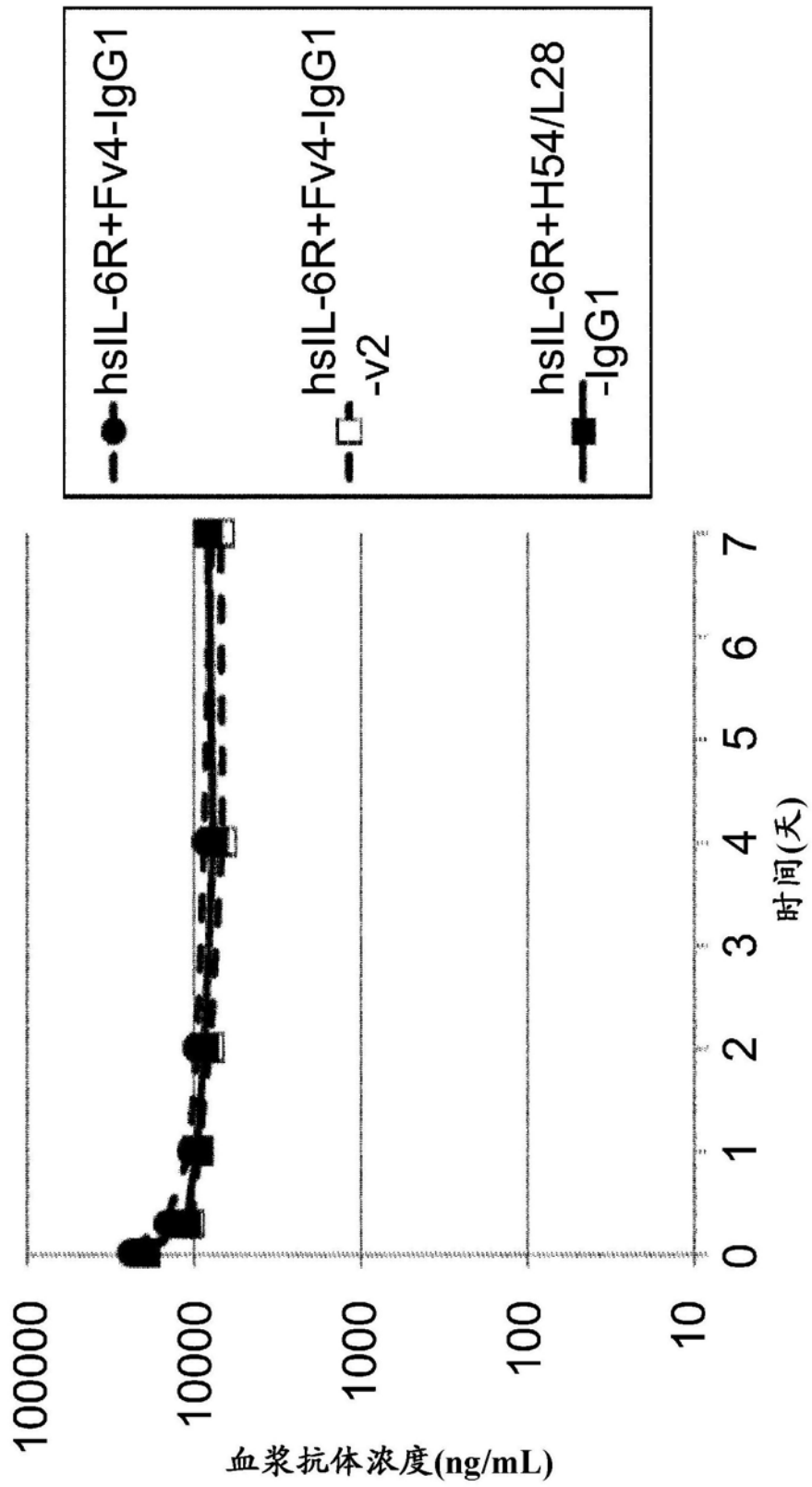


图3

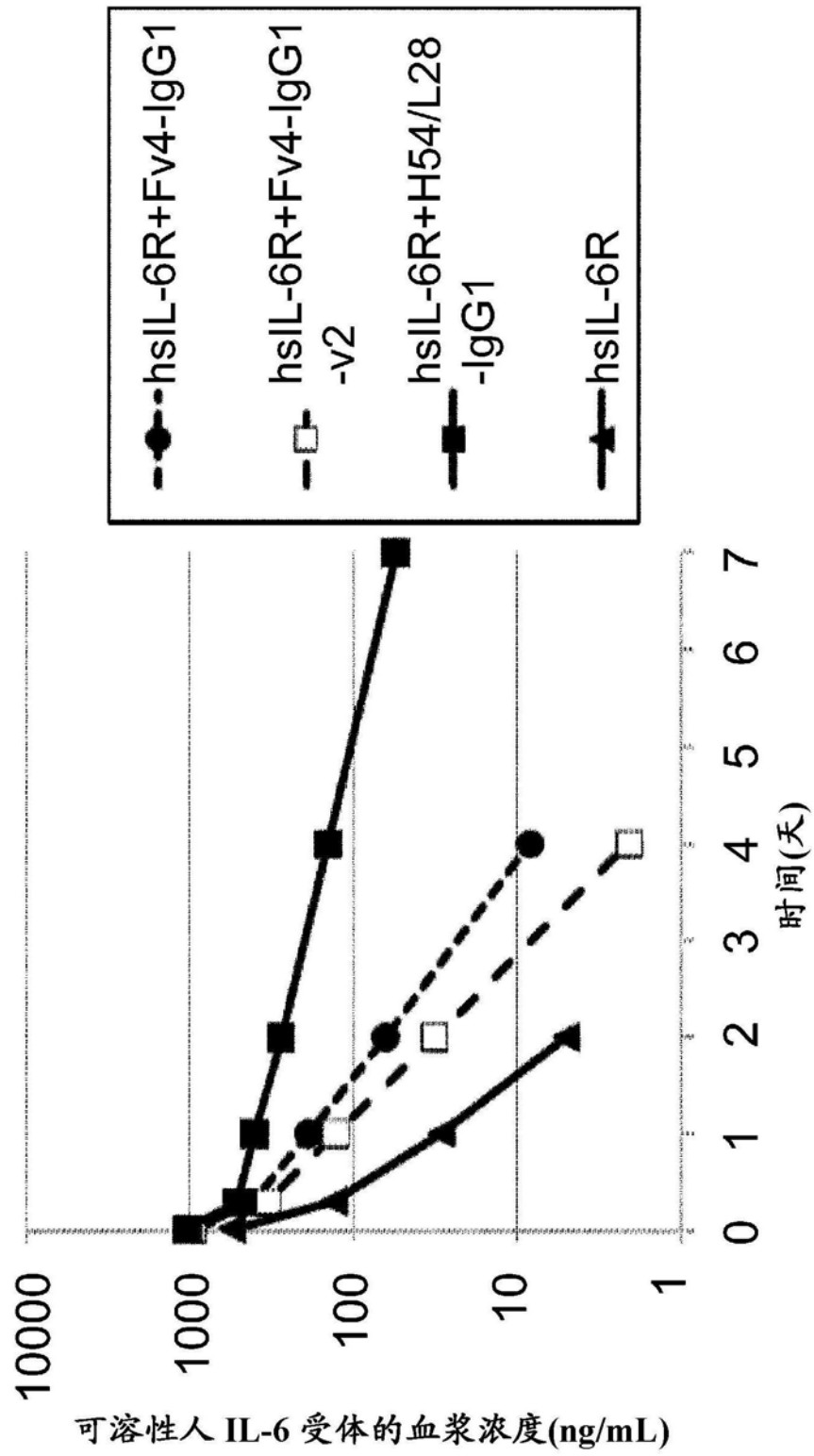


图4

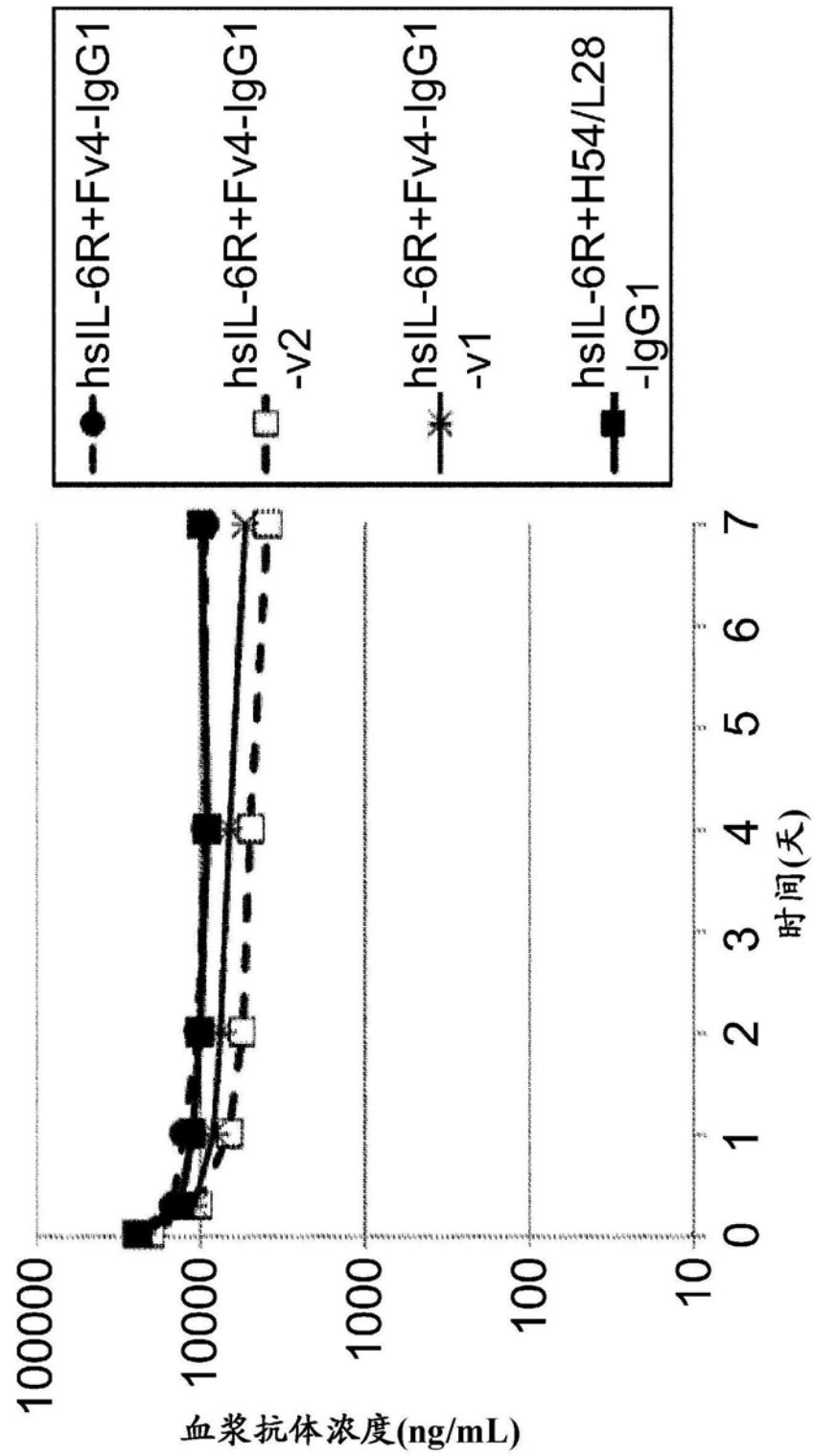


图5

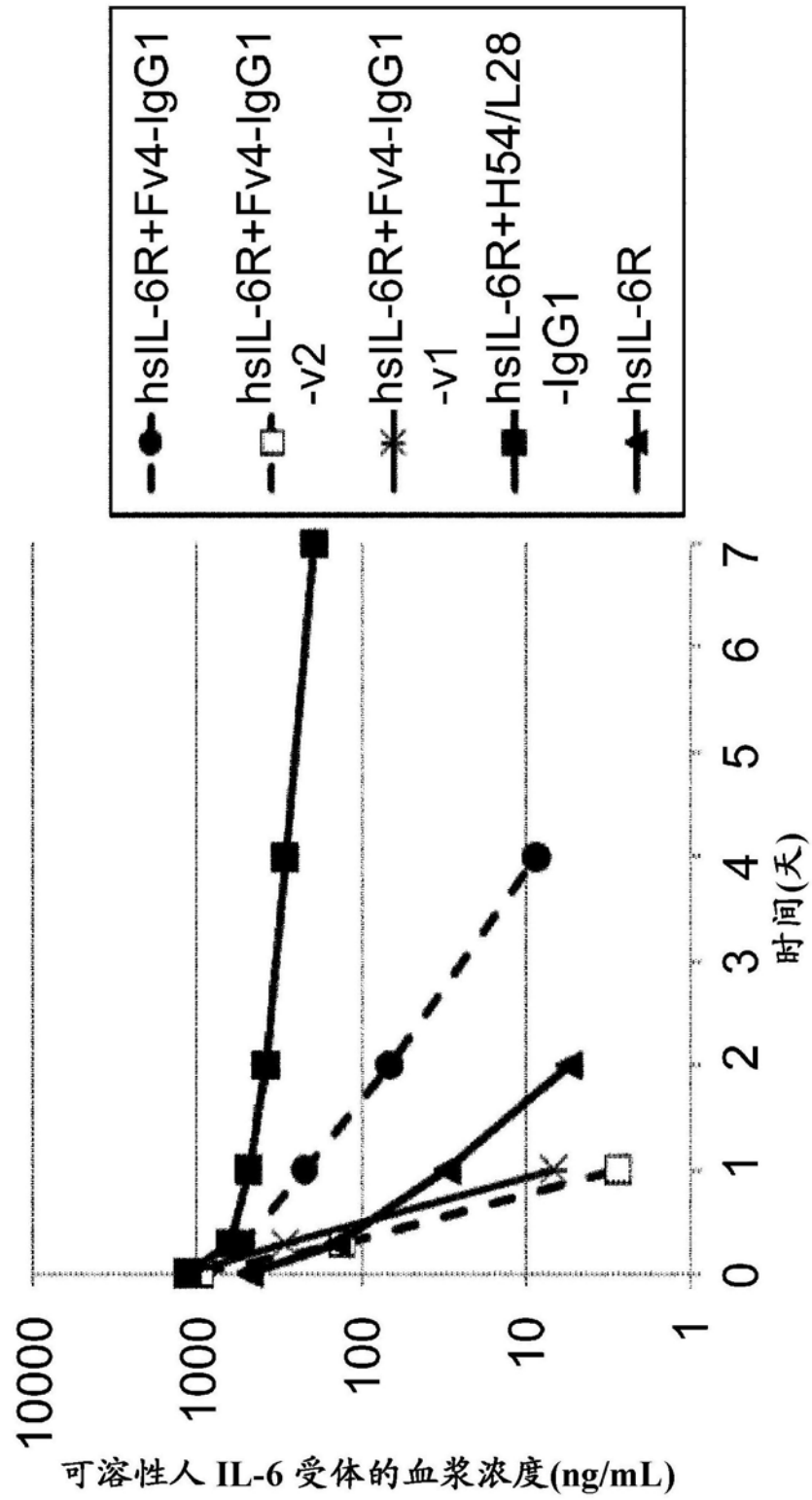


图6

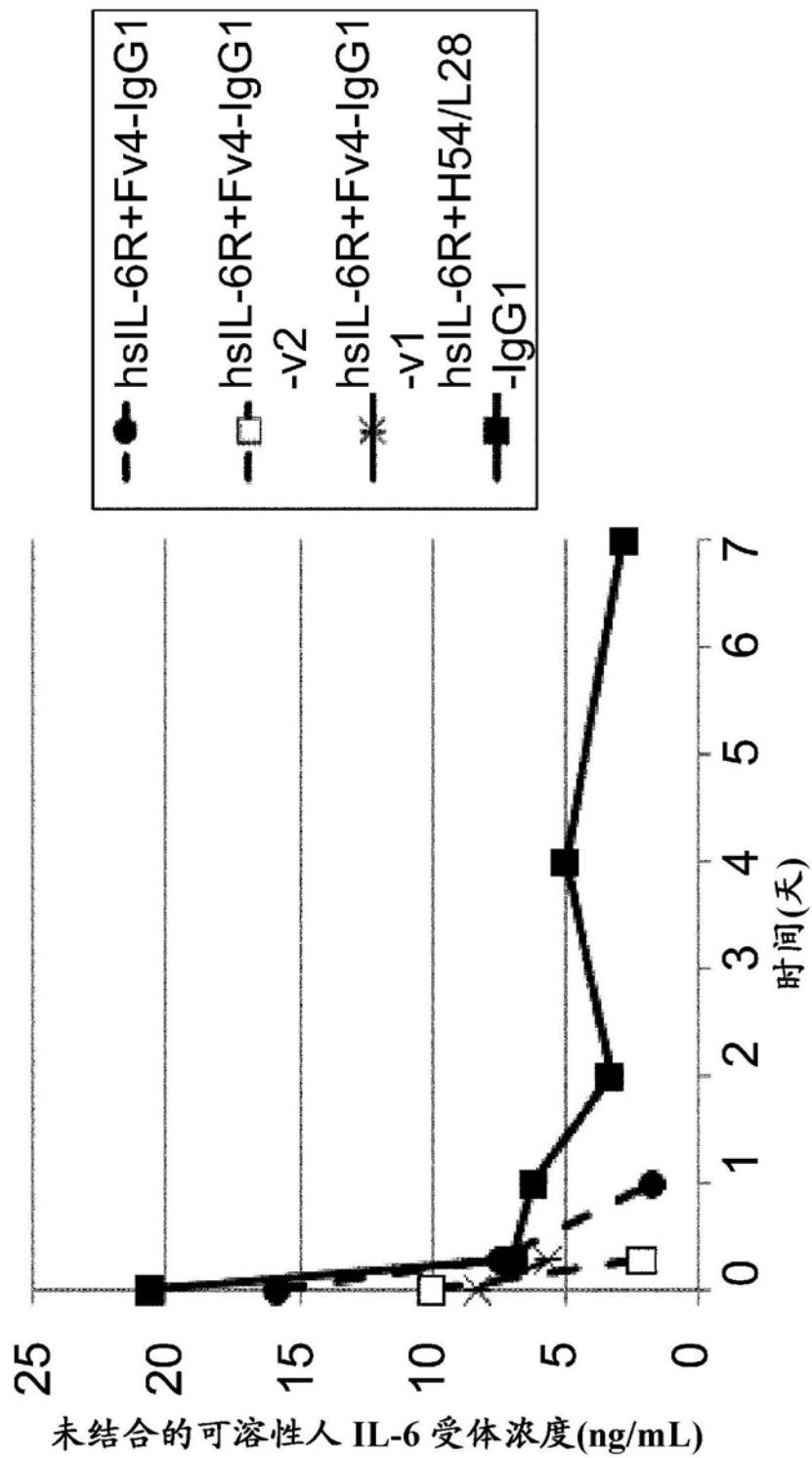


图7

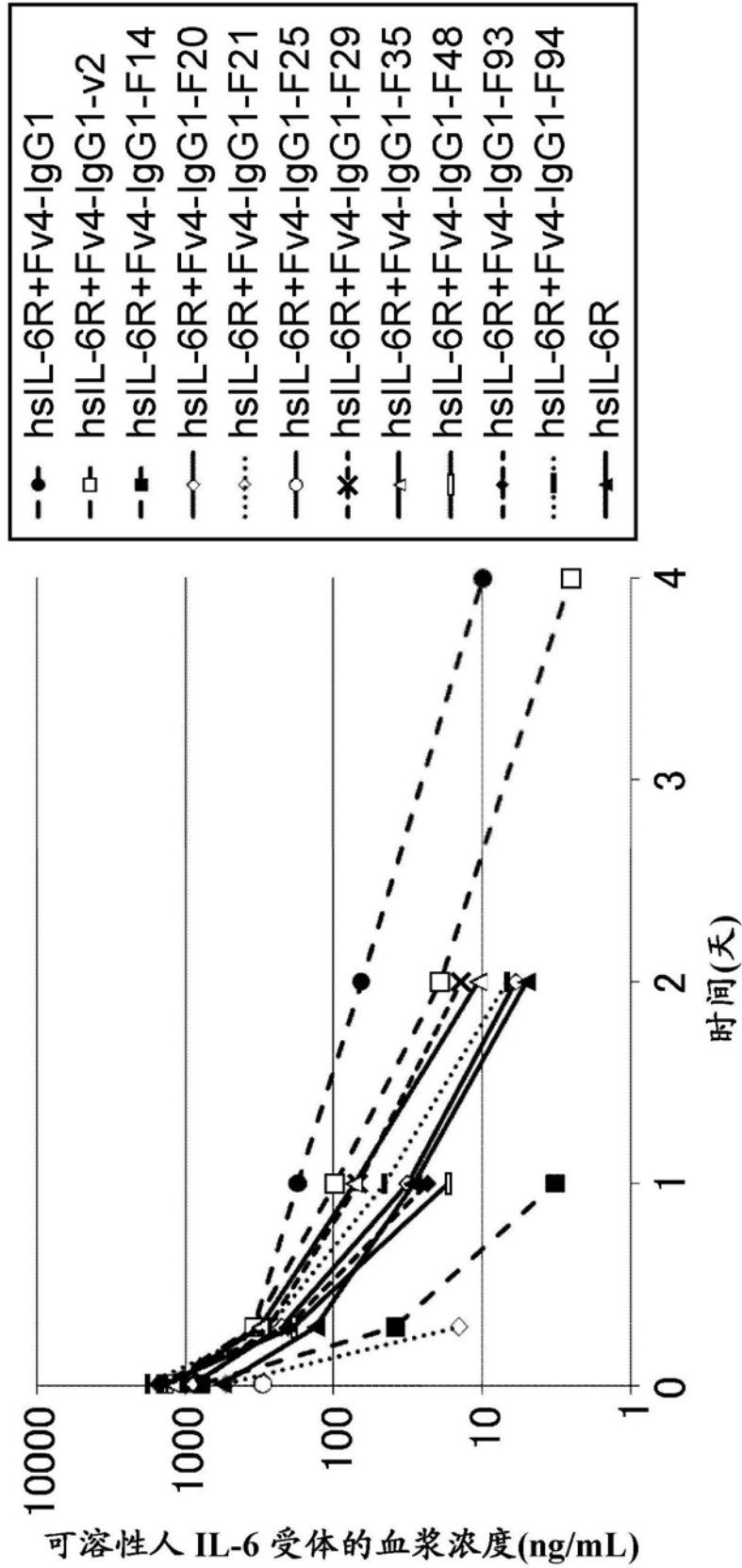


图8

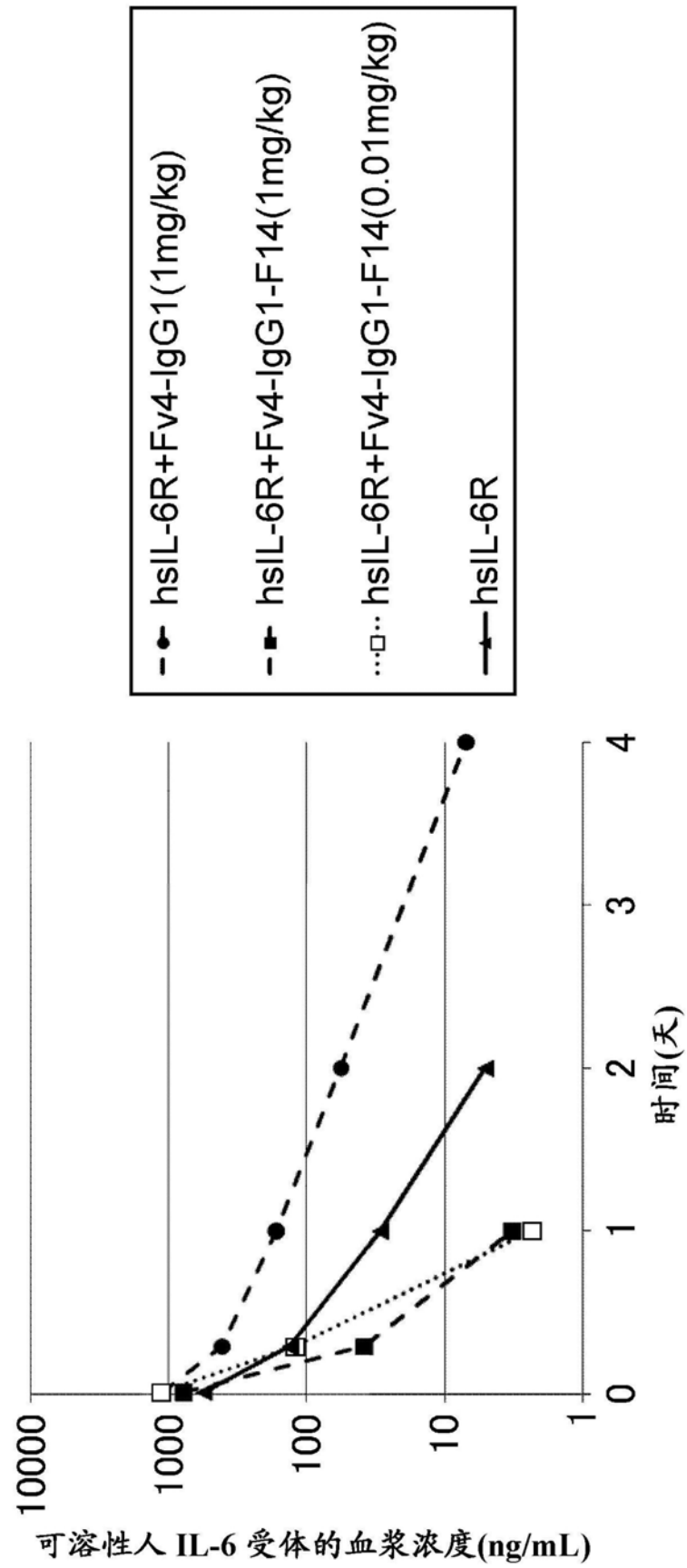


图9

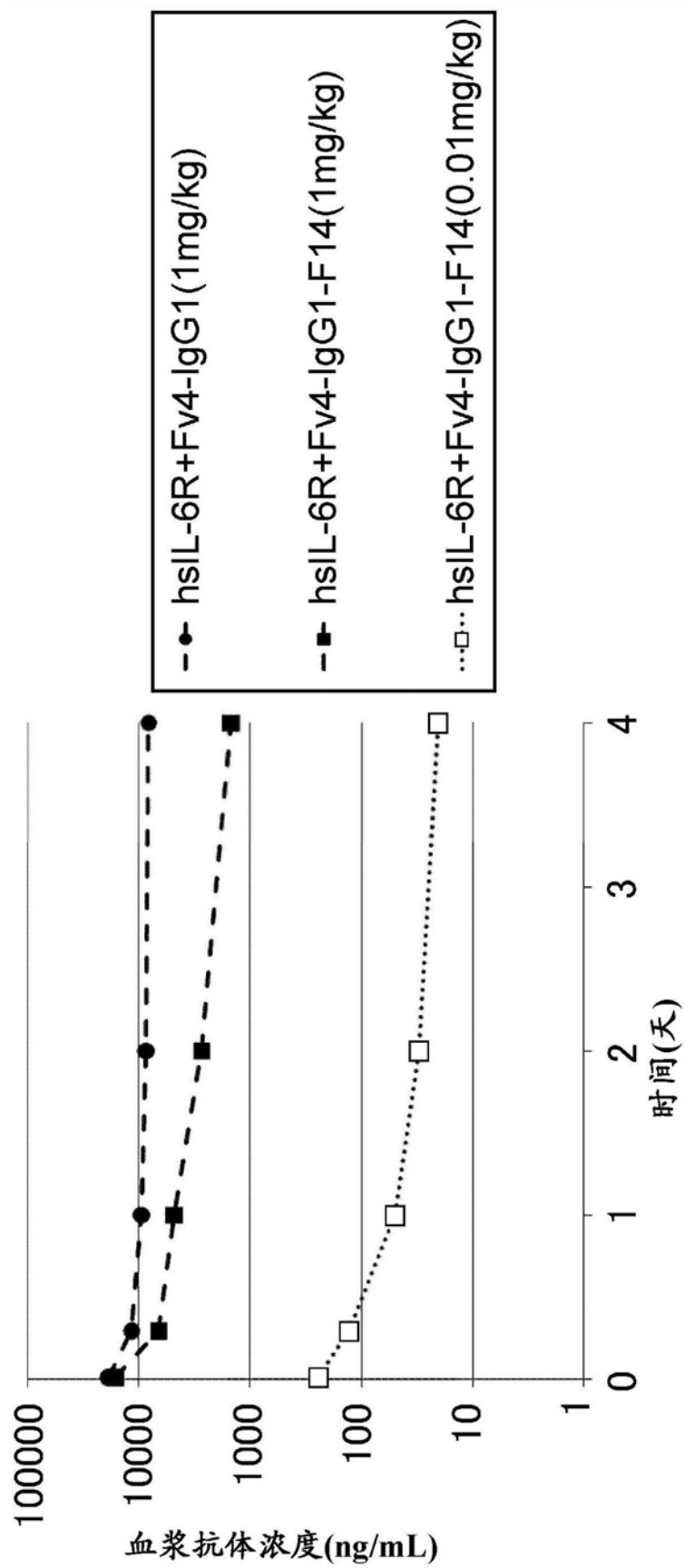


图10

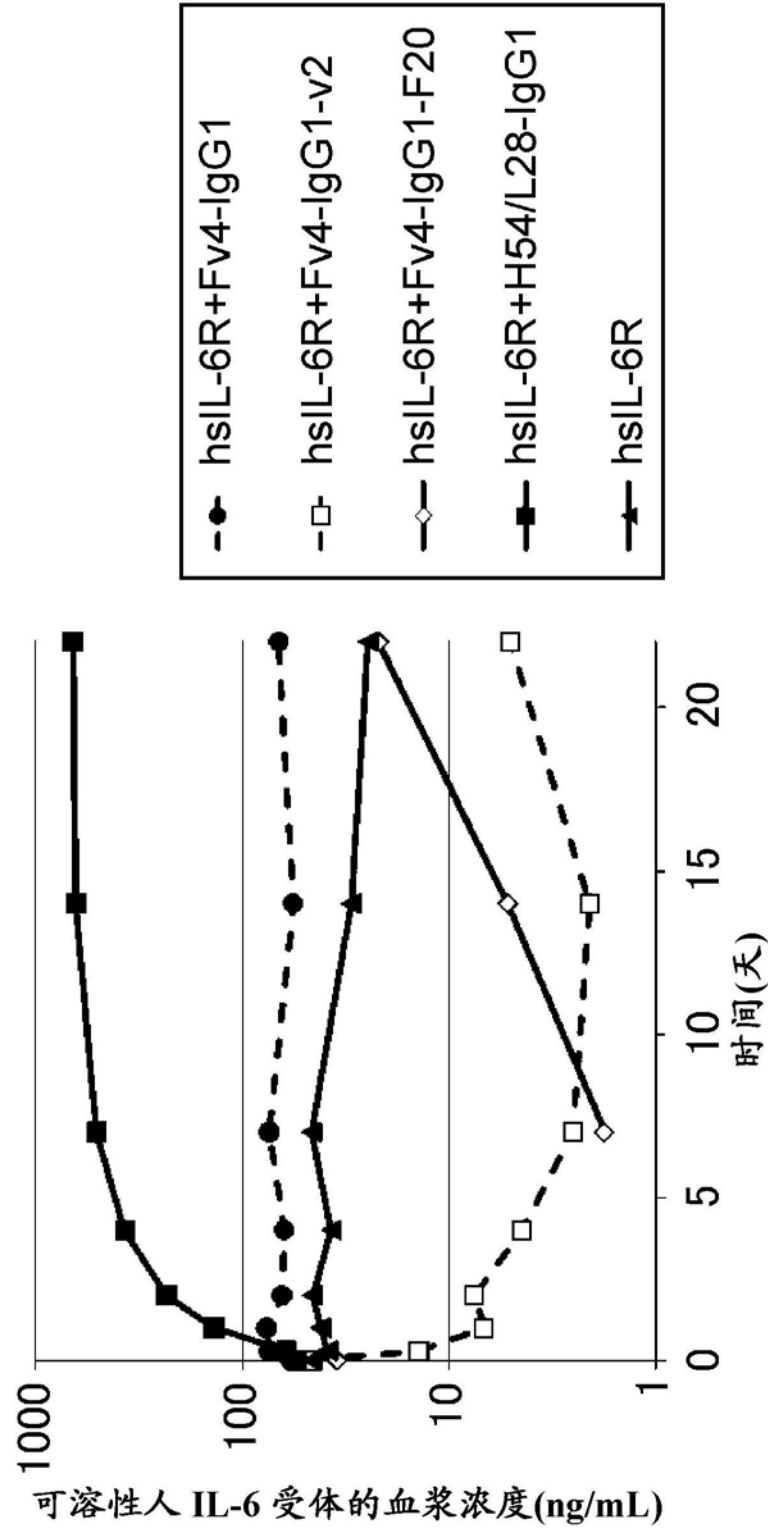


图11

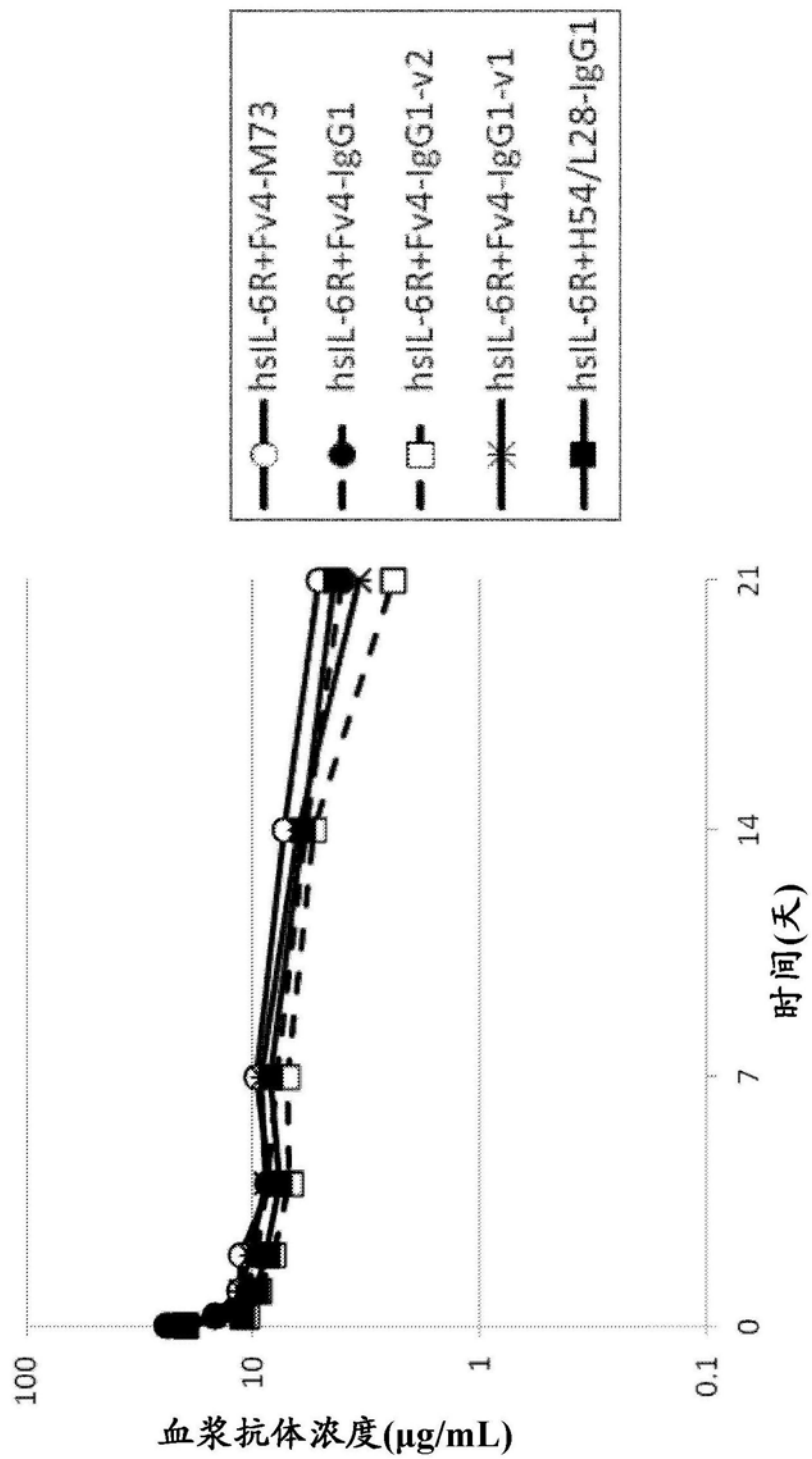


图12

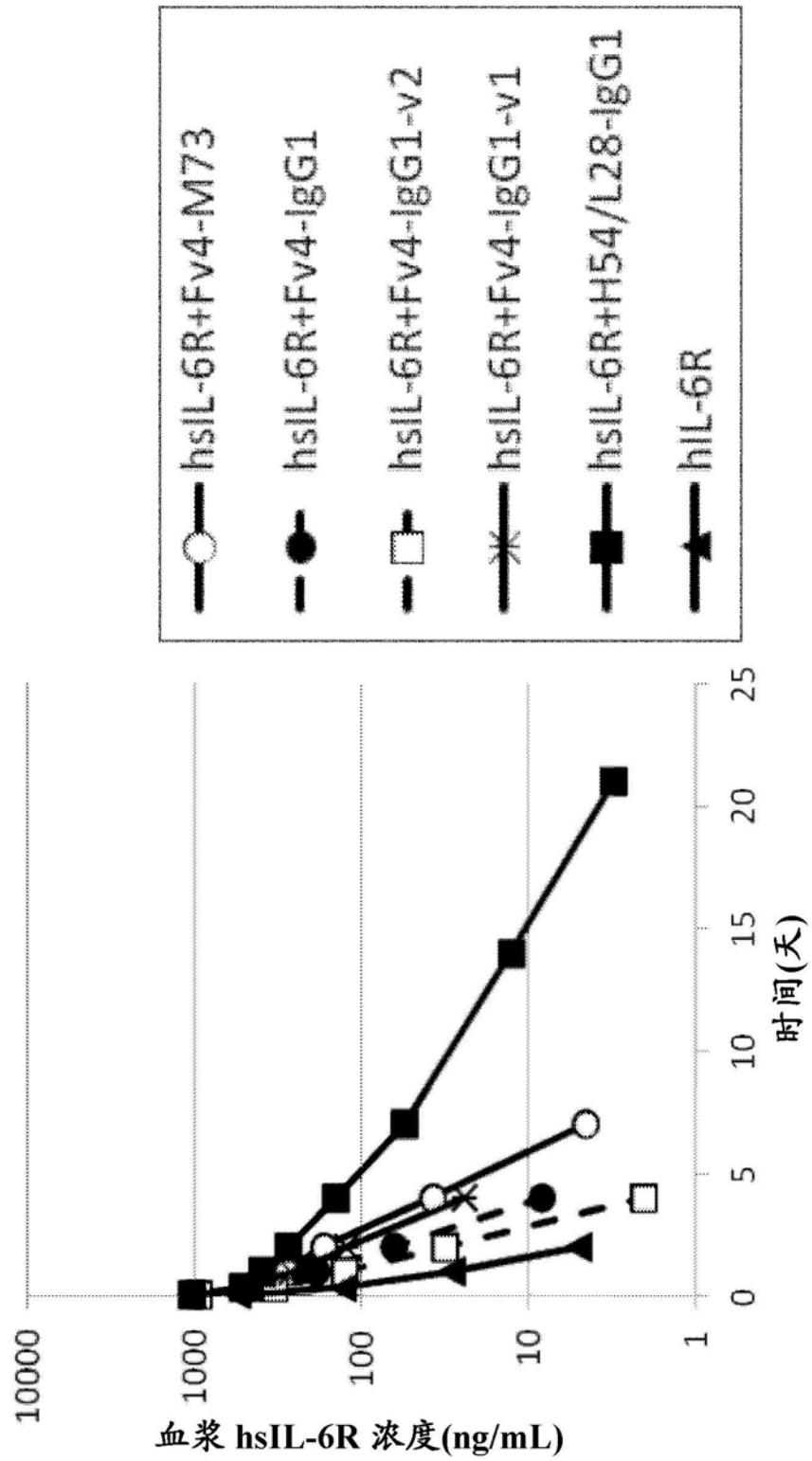


图13

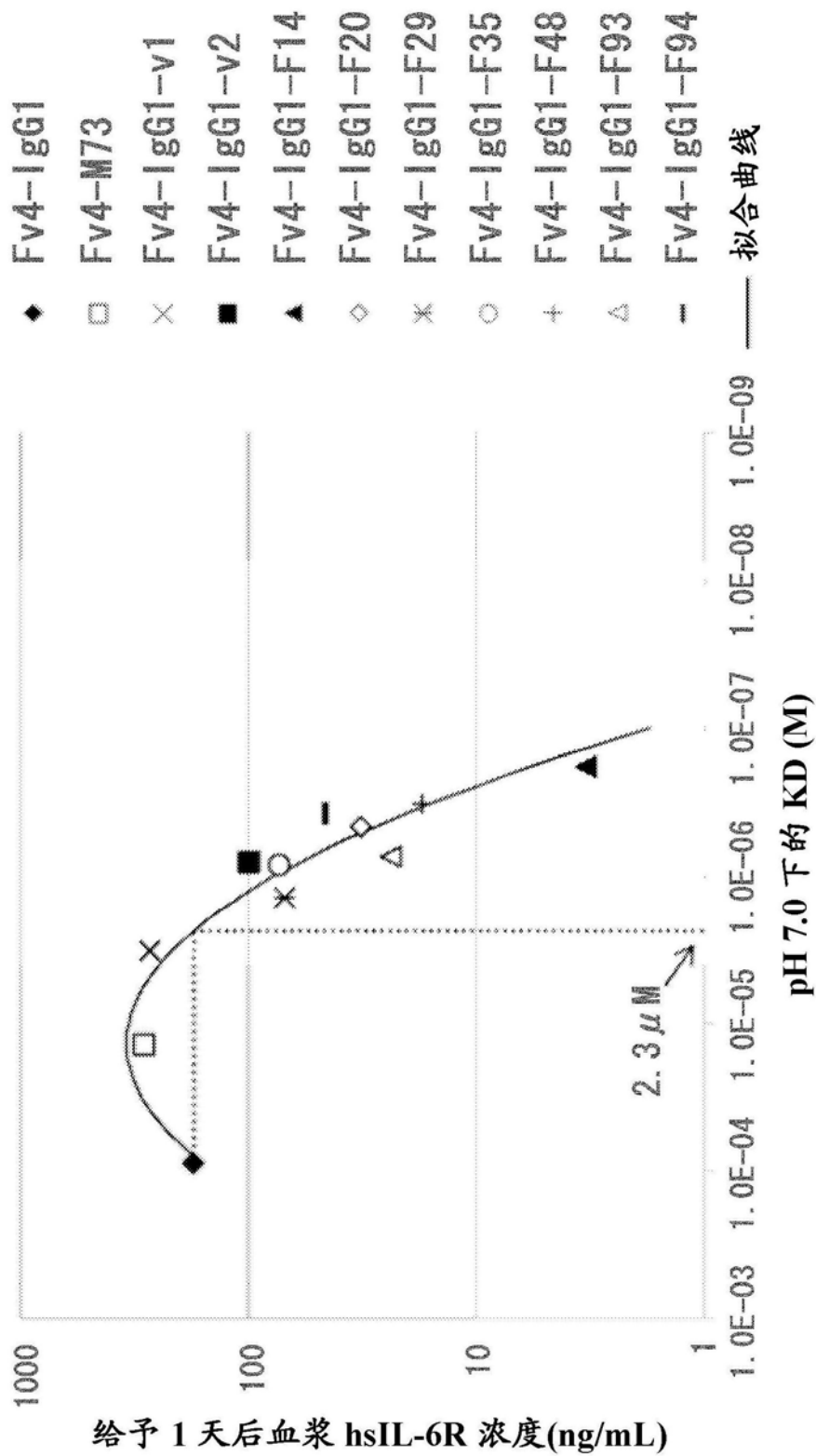


图14

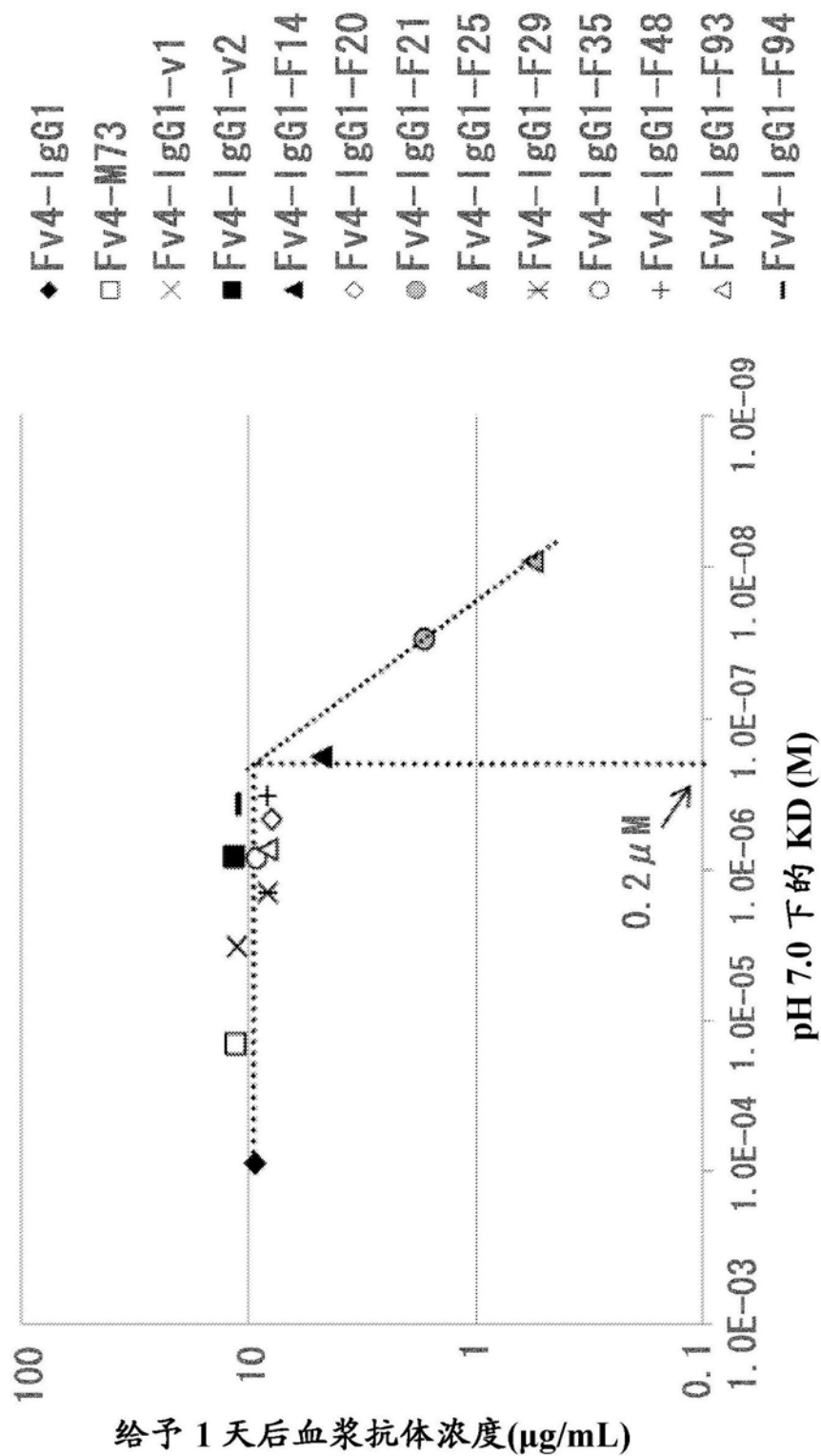


图15

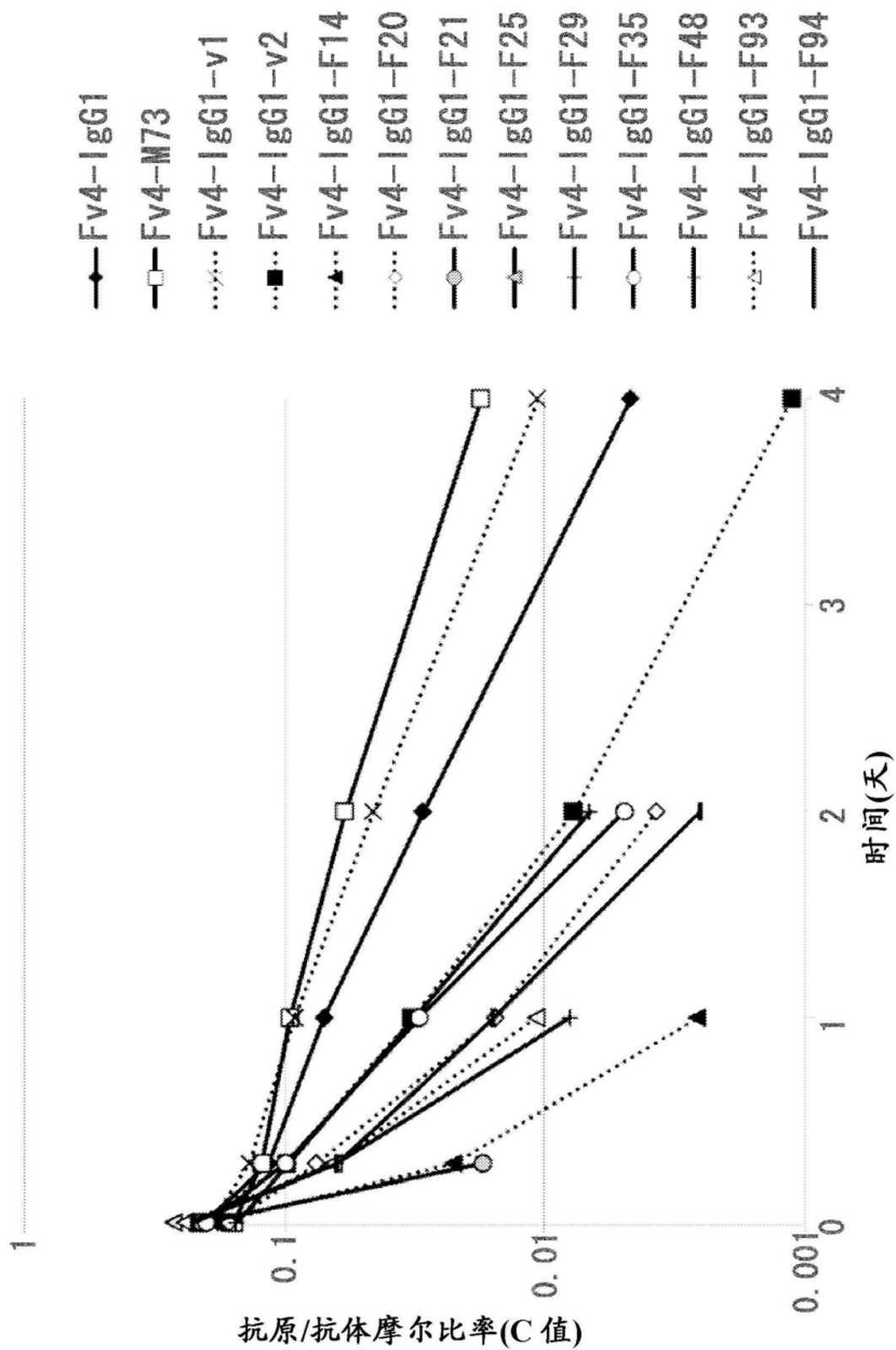


图16

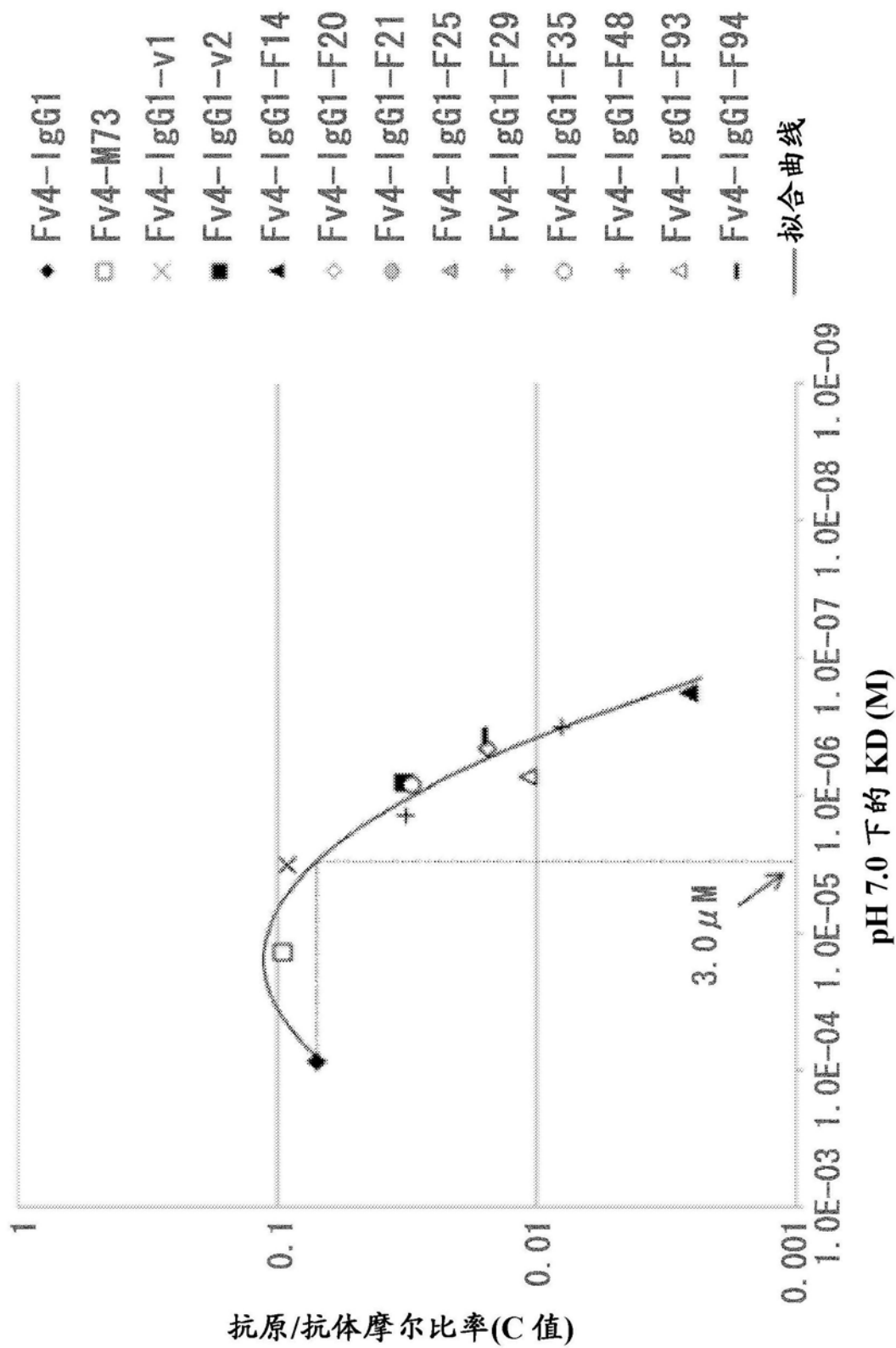


图17

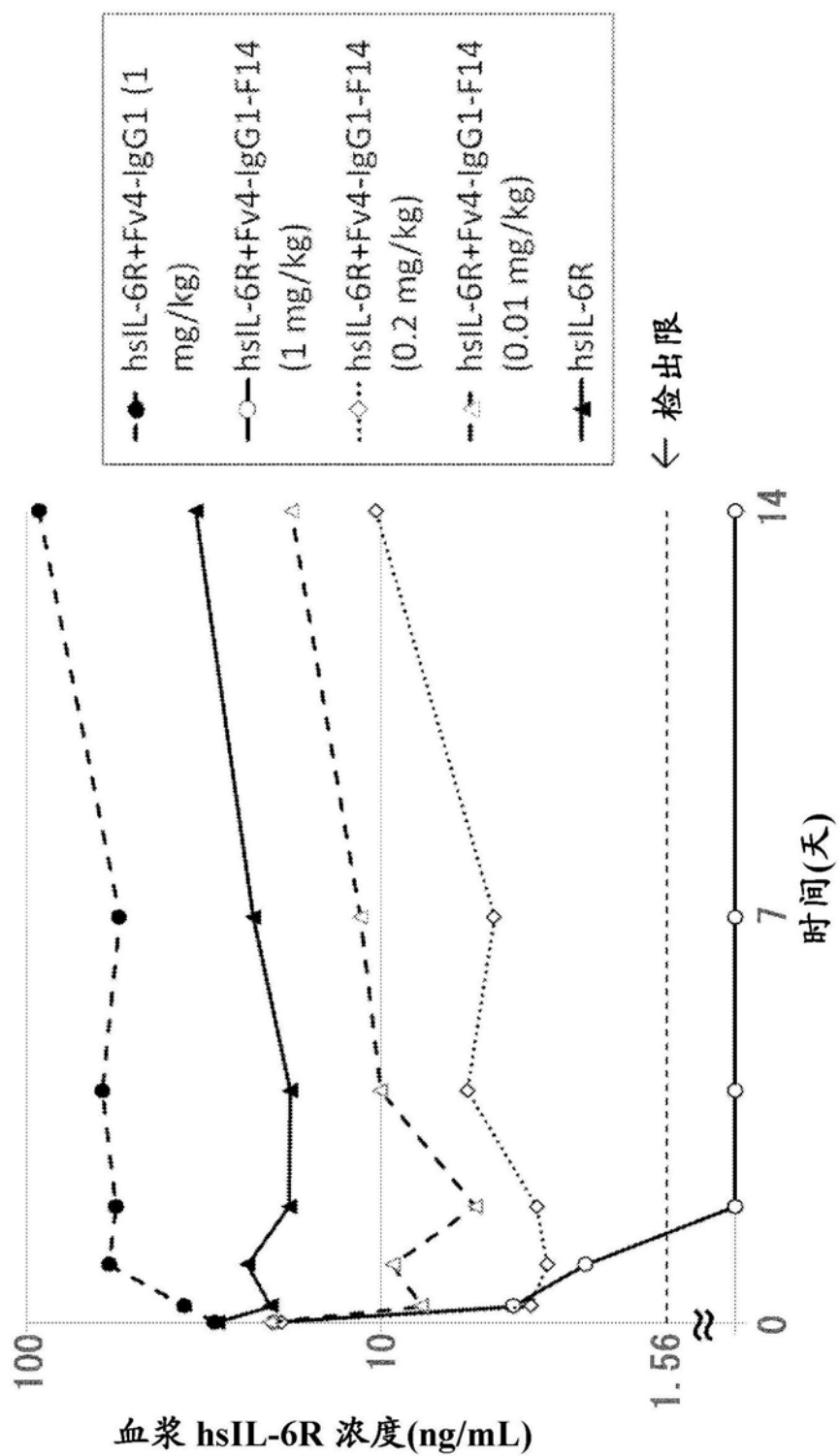


图18

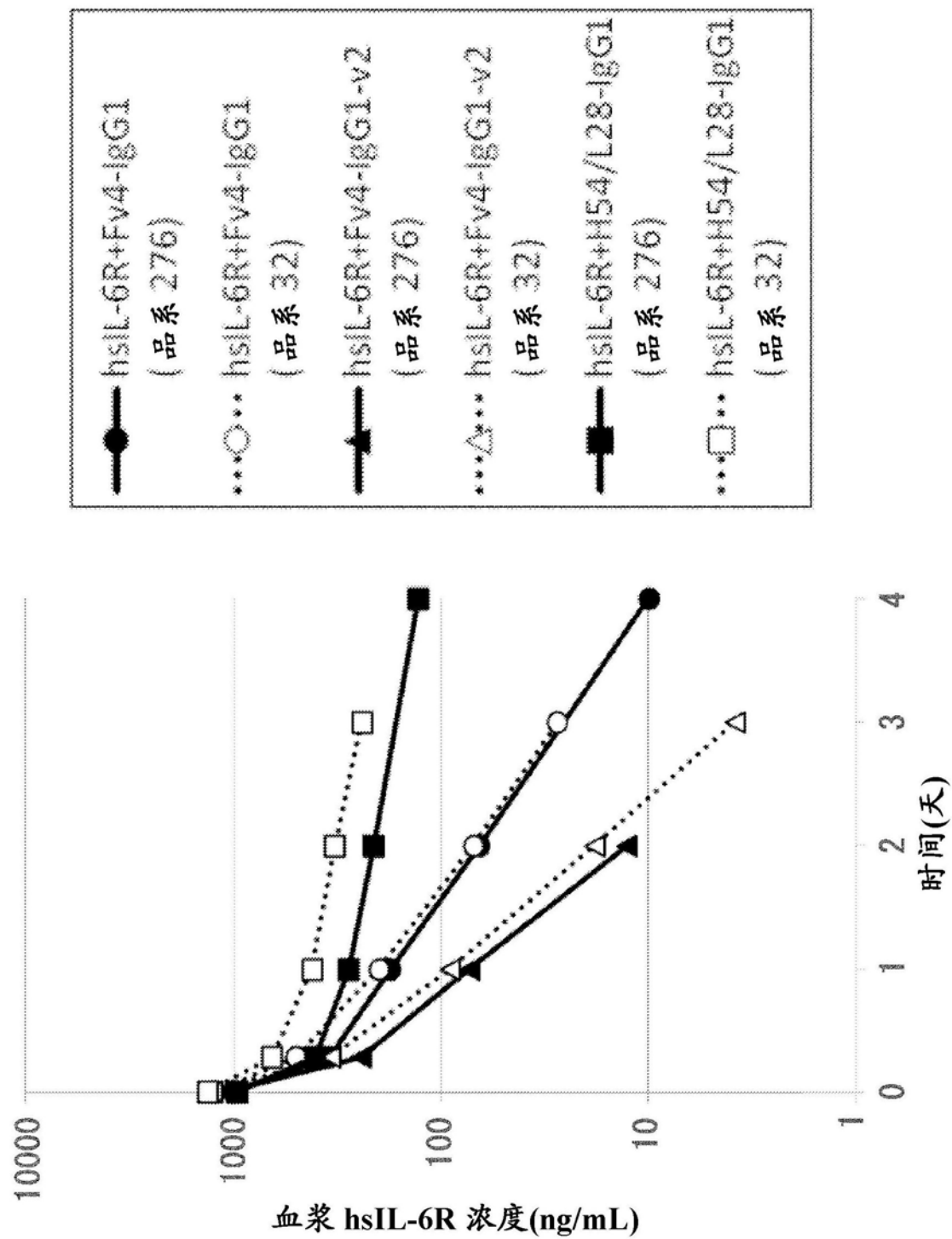


图19

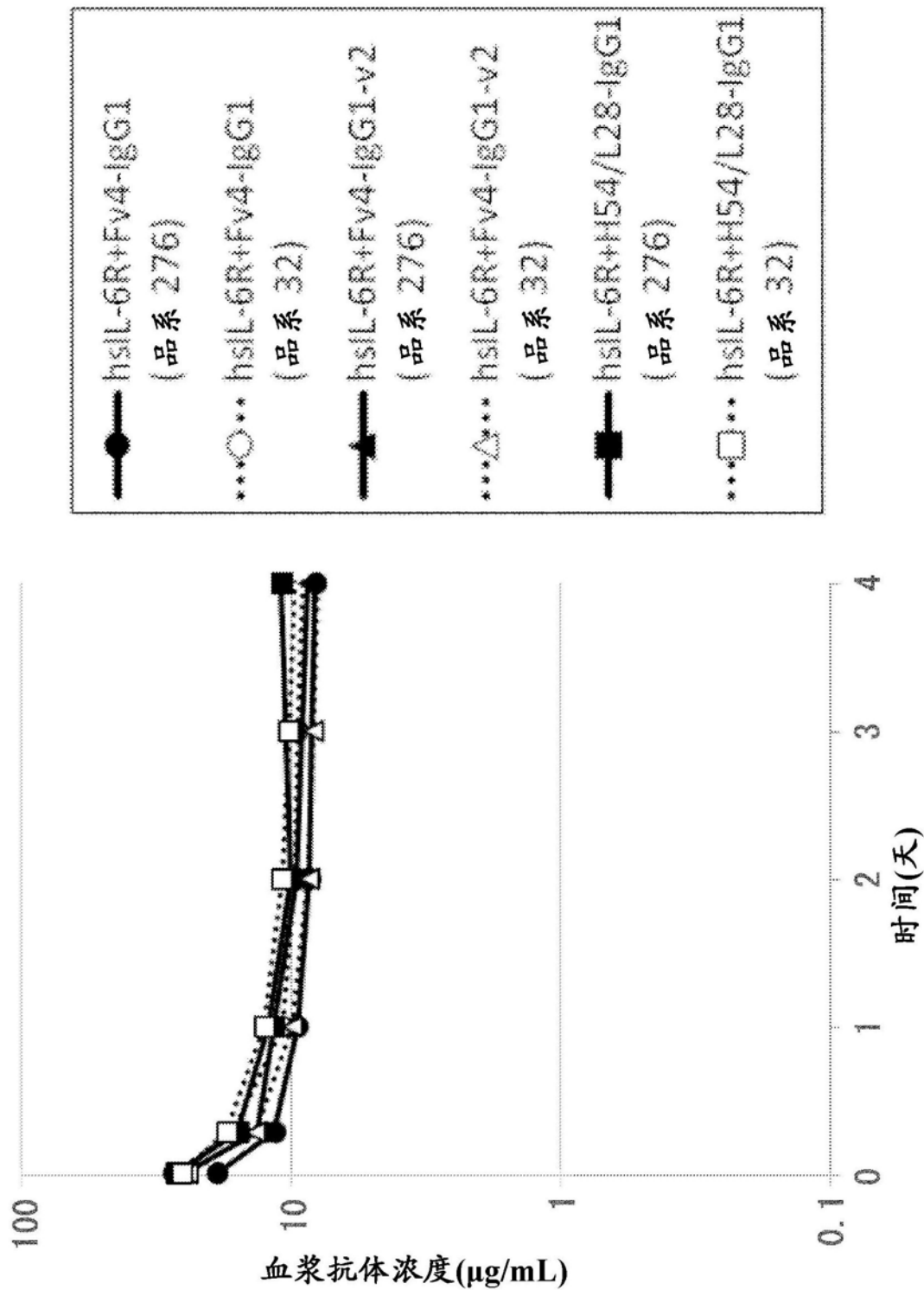


图20

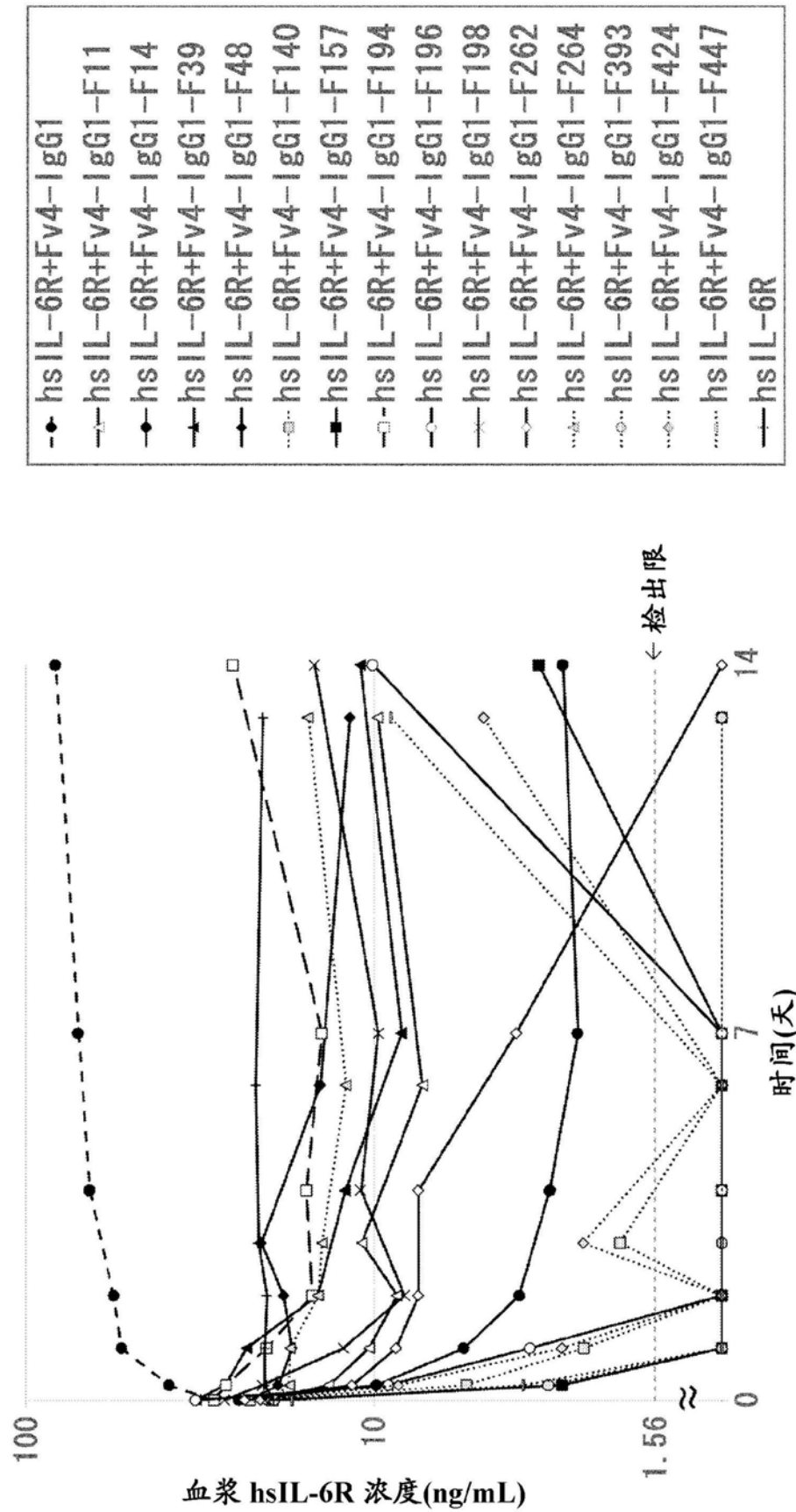


图21

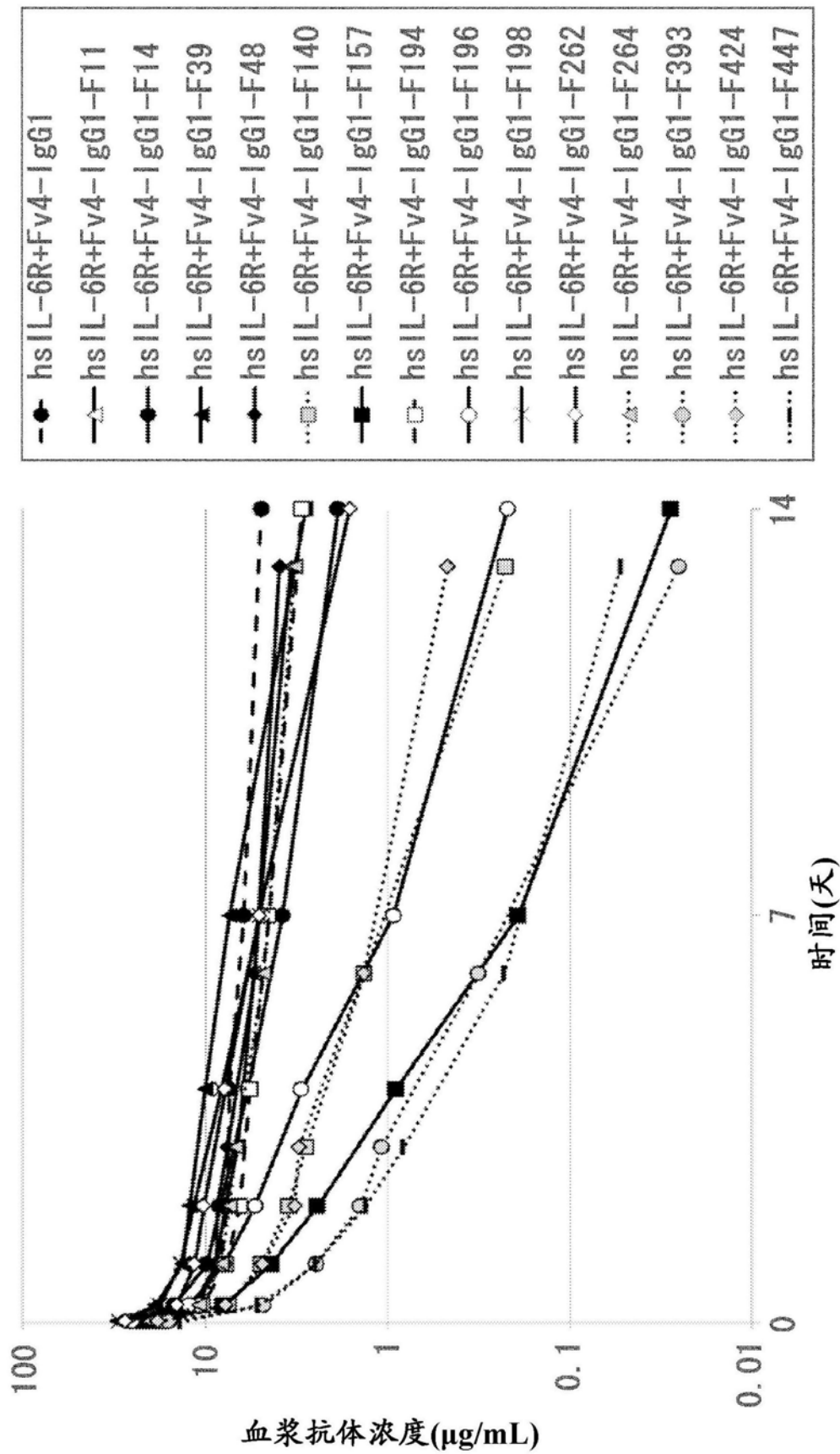


图22

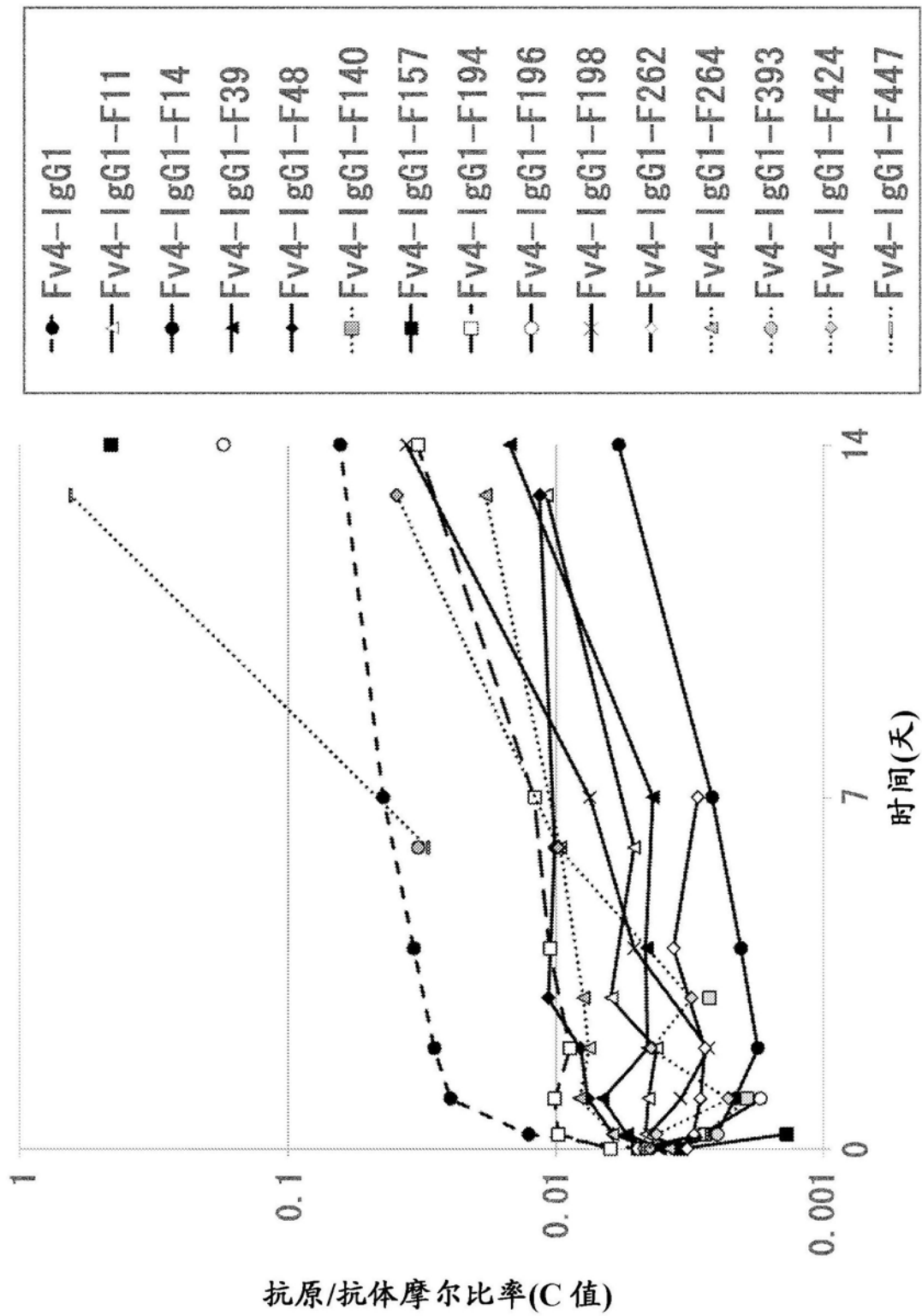


图23

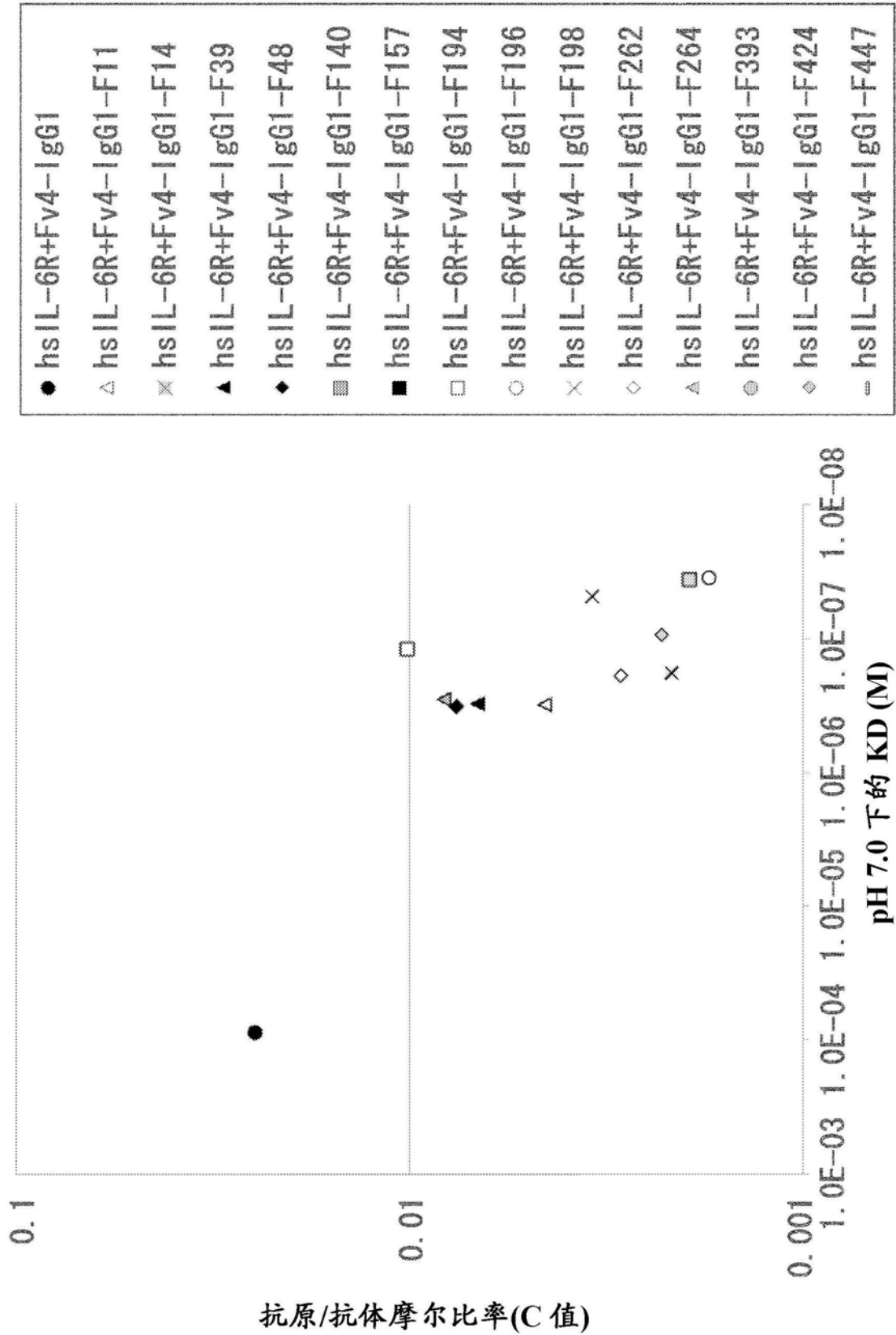


图24

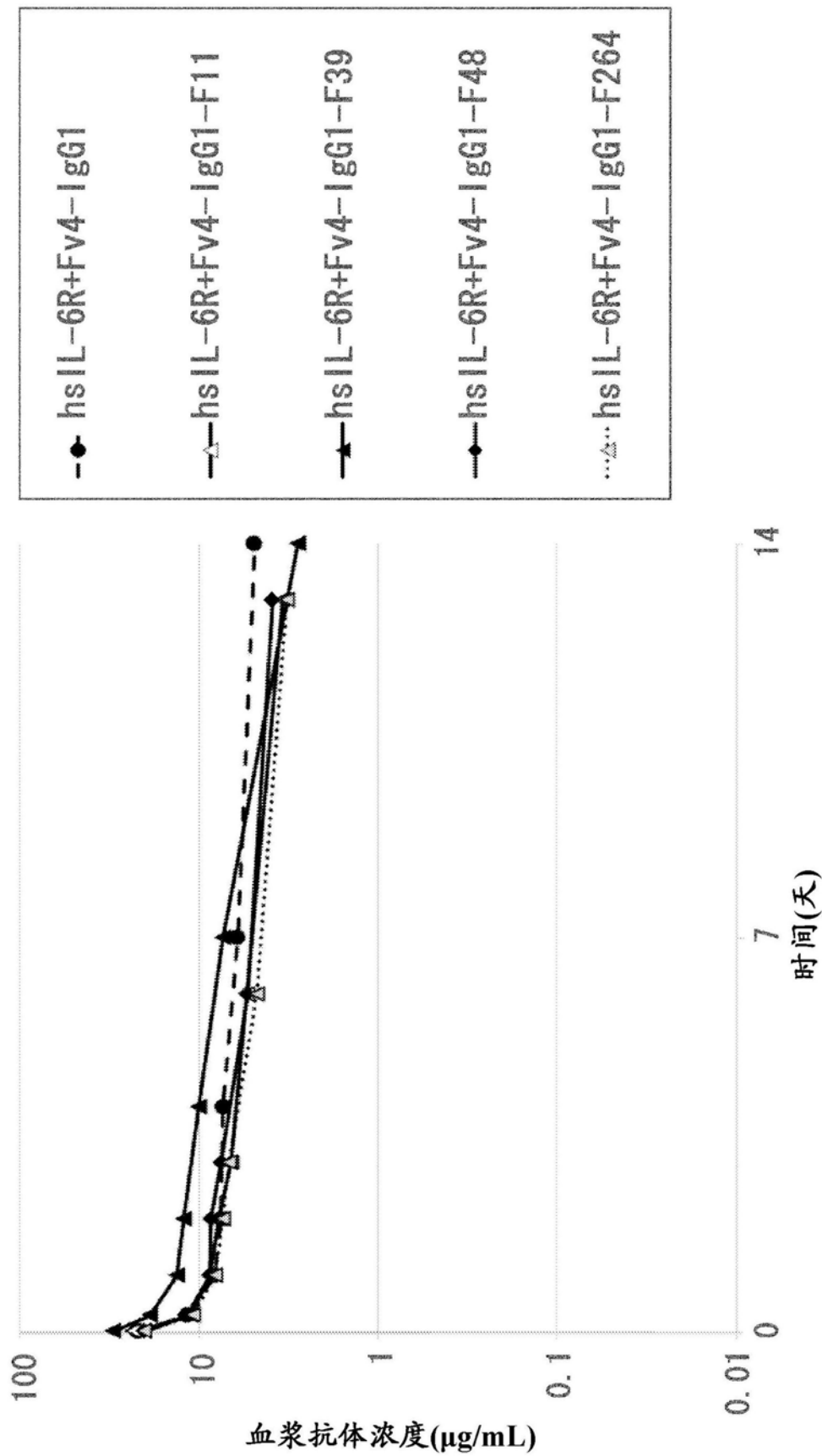


图25

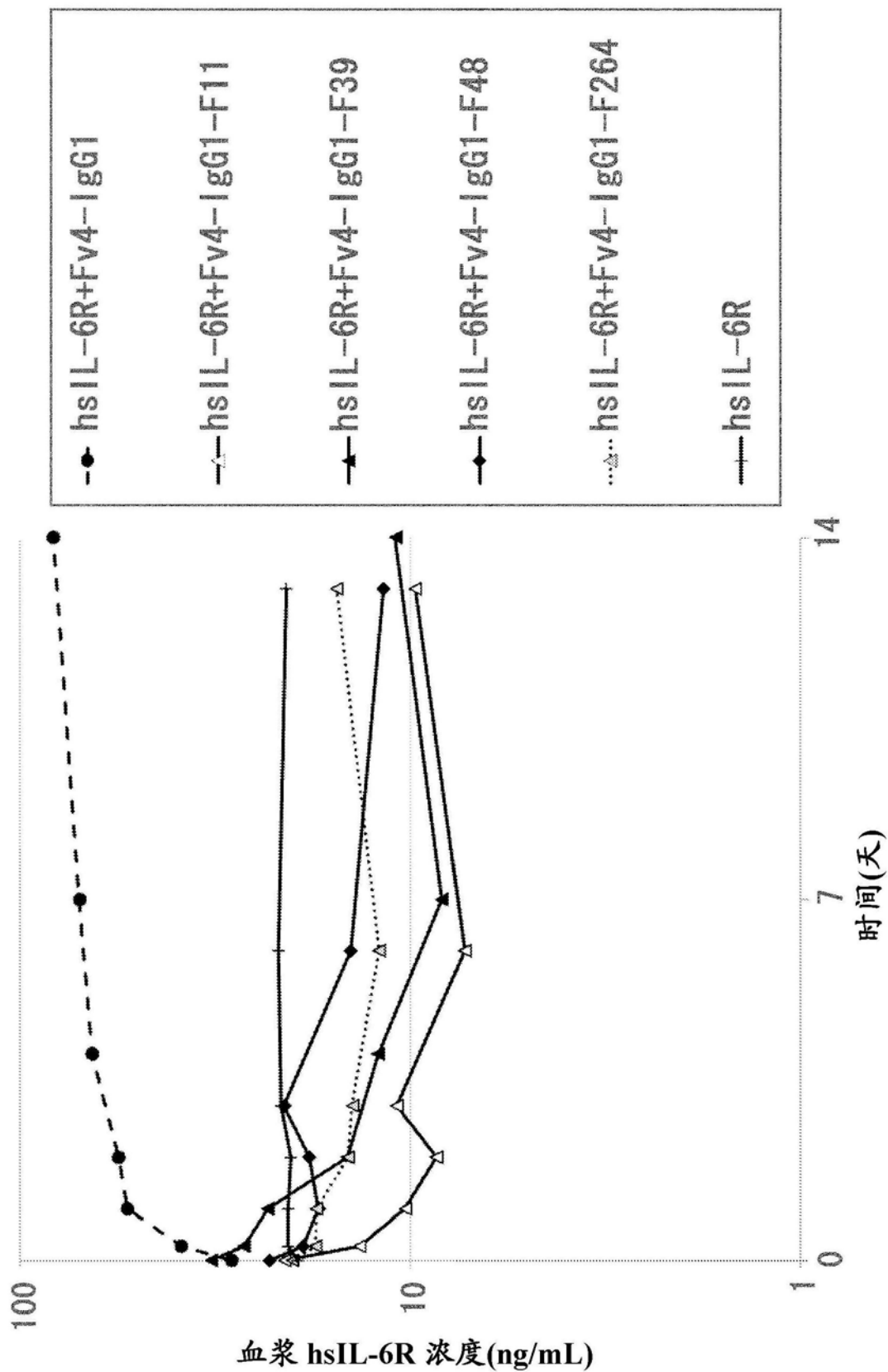


图26

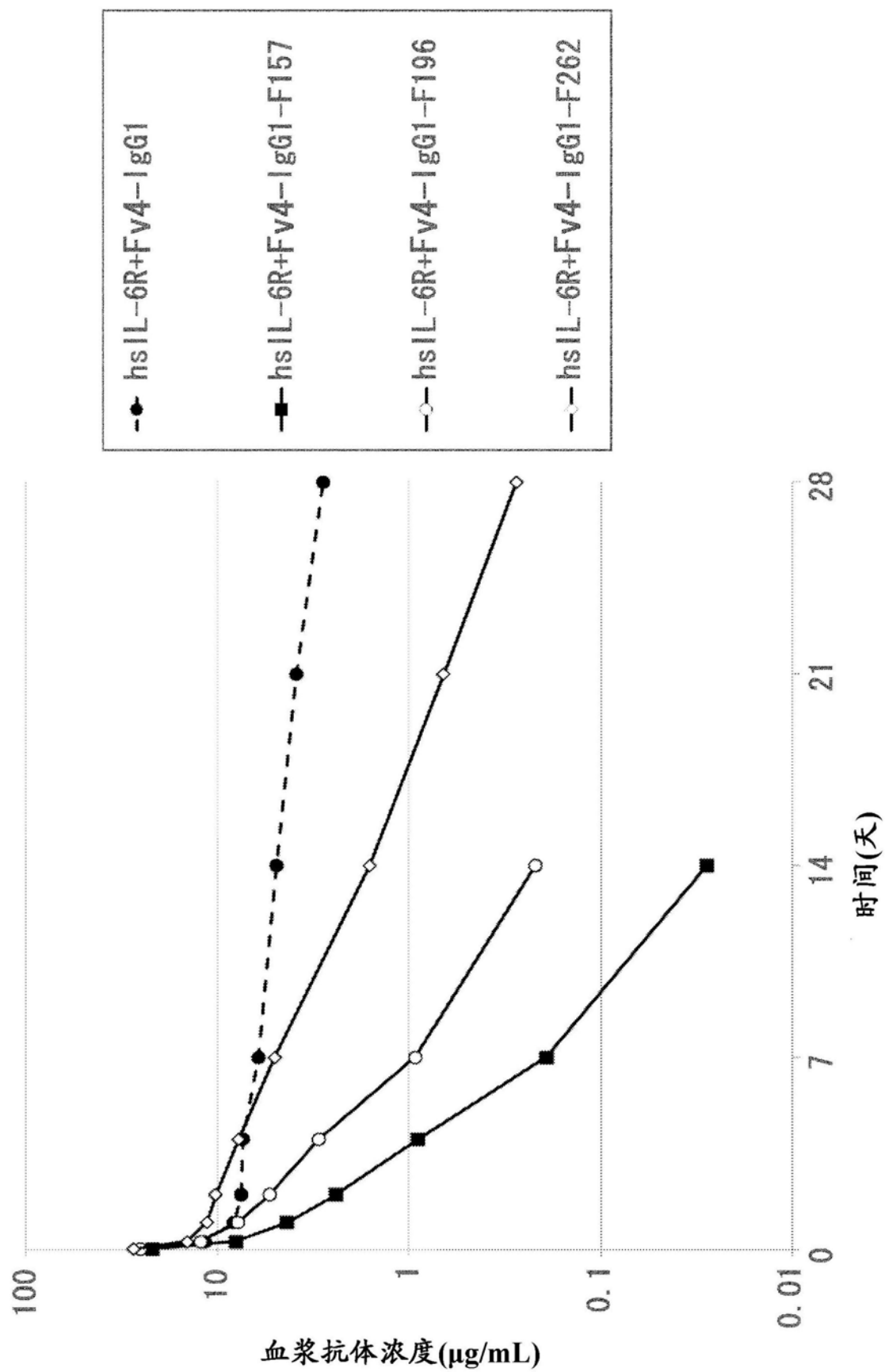


图27

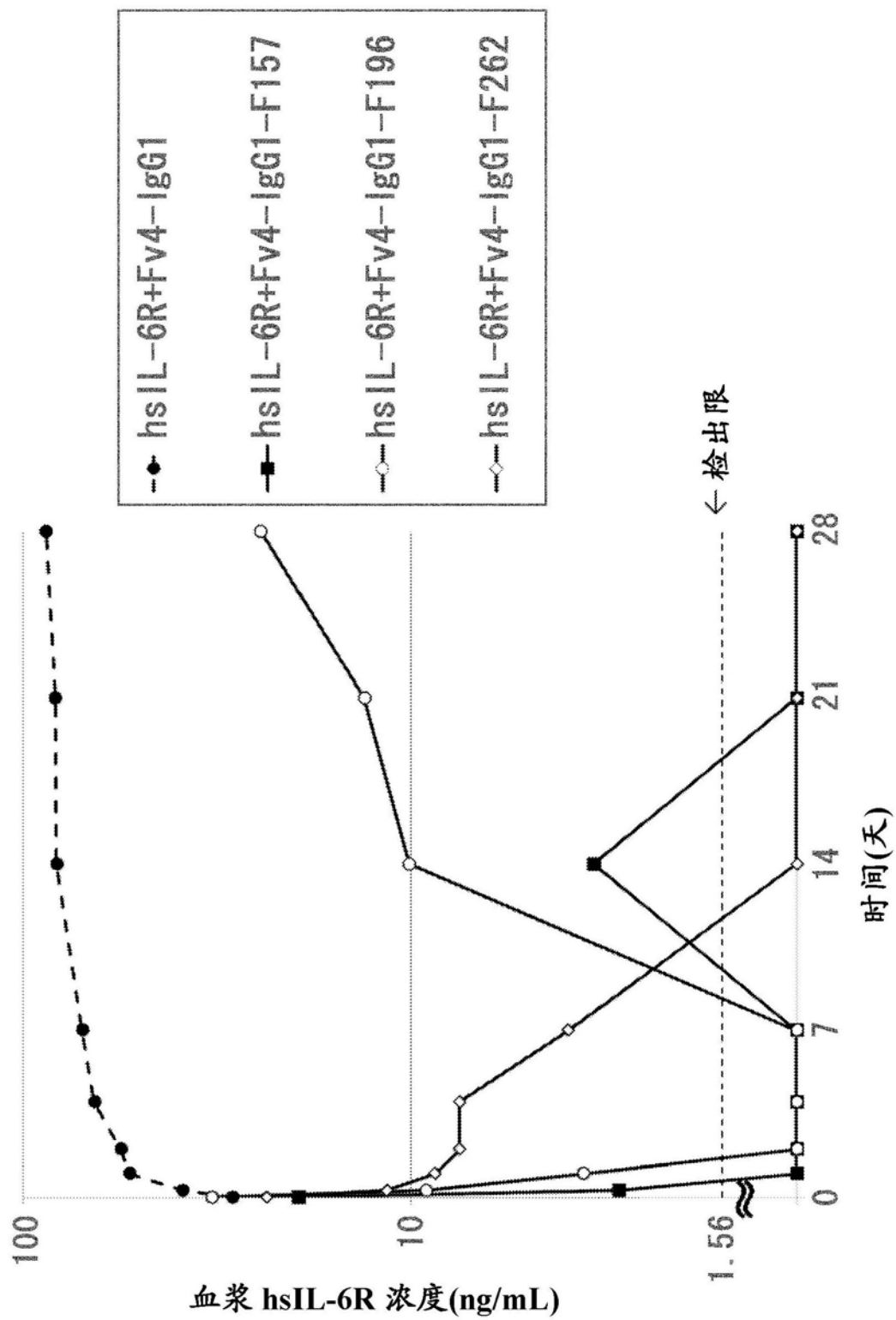


图28

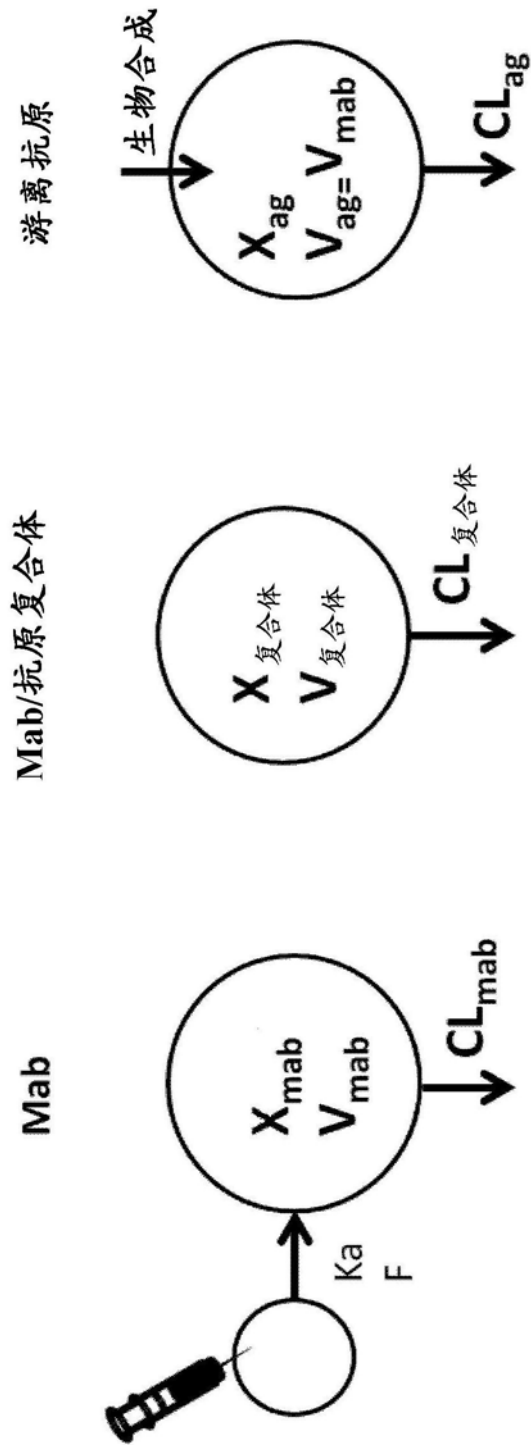


图29

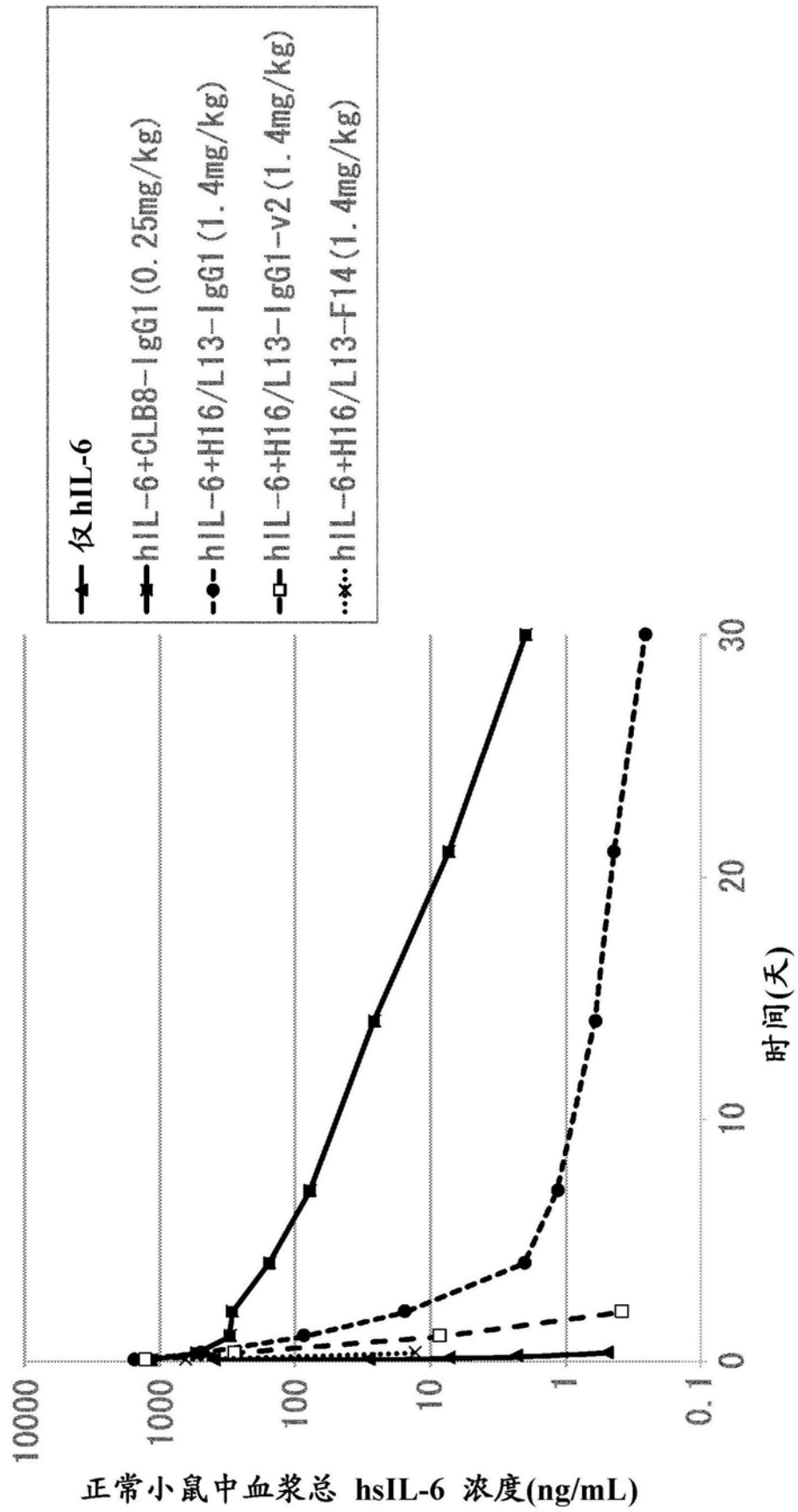


图30

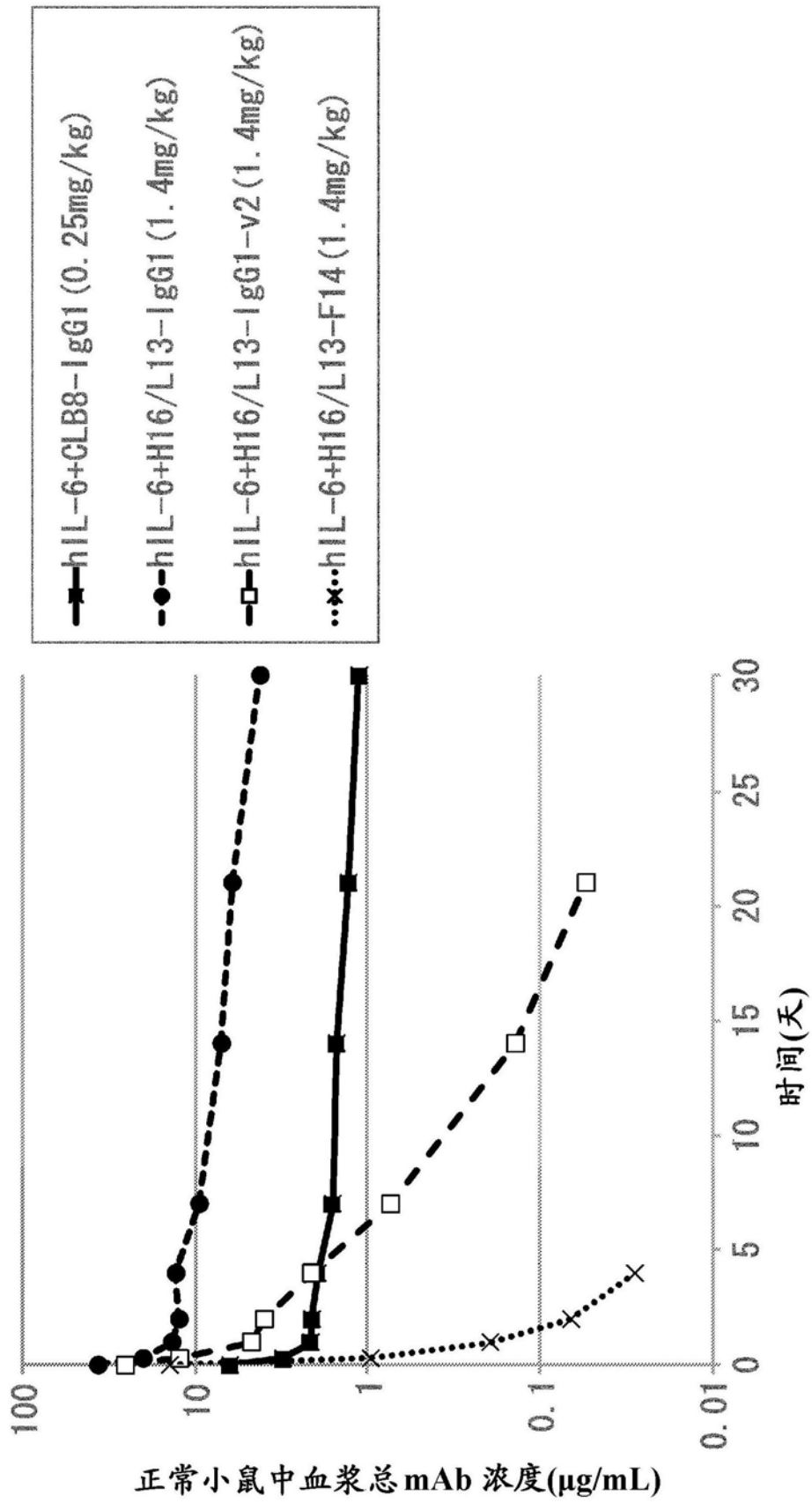


图31

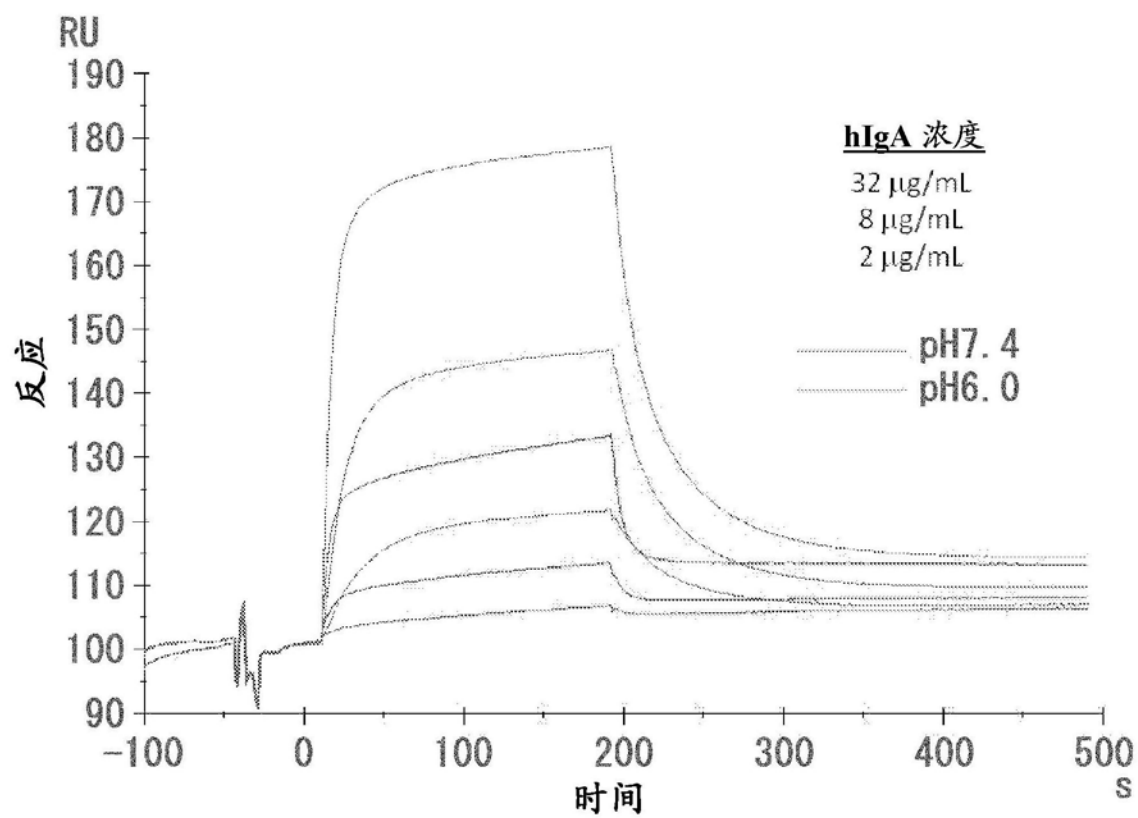


图32

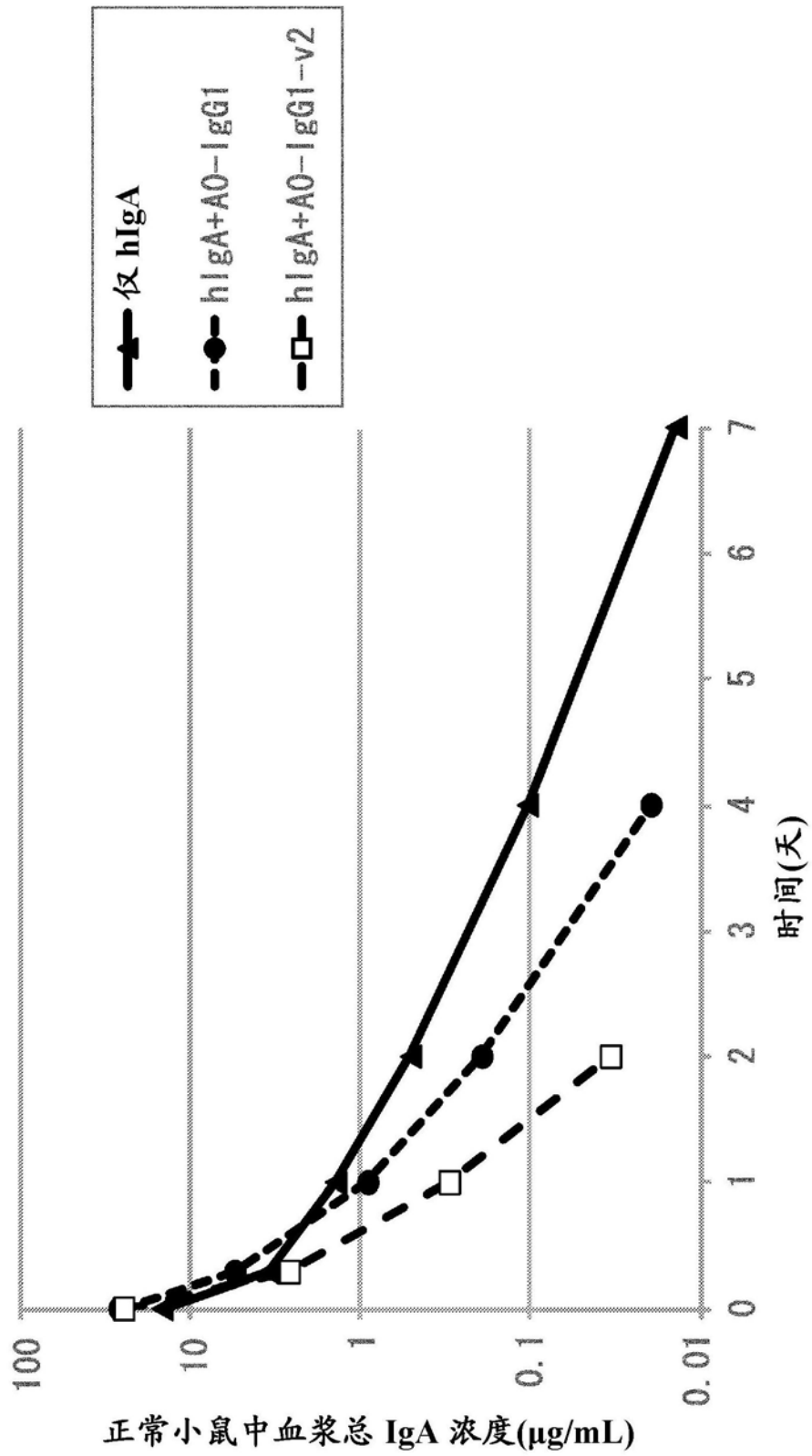


图33

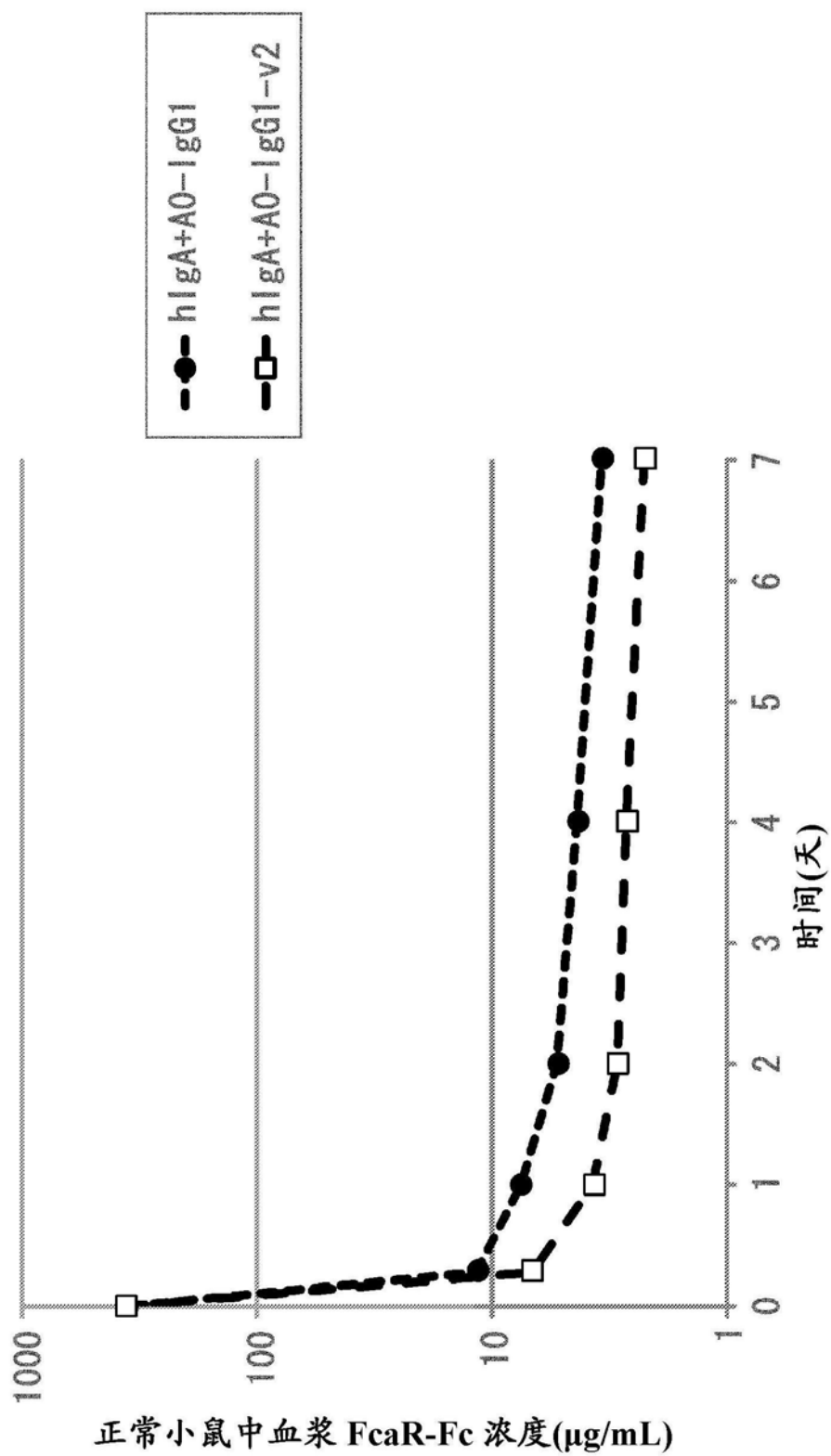


图34

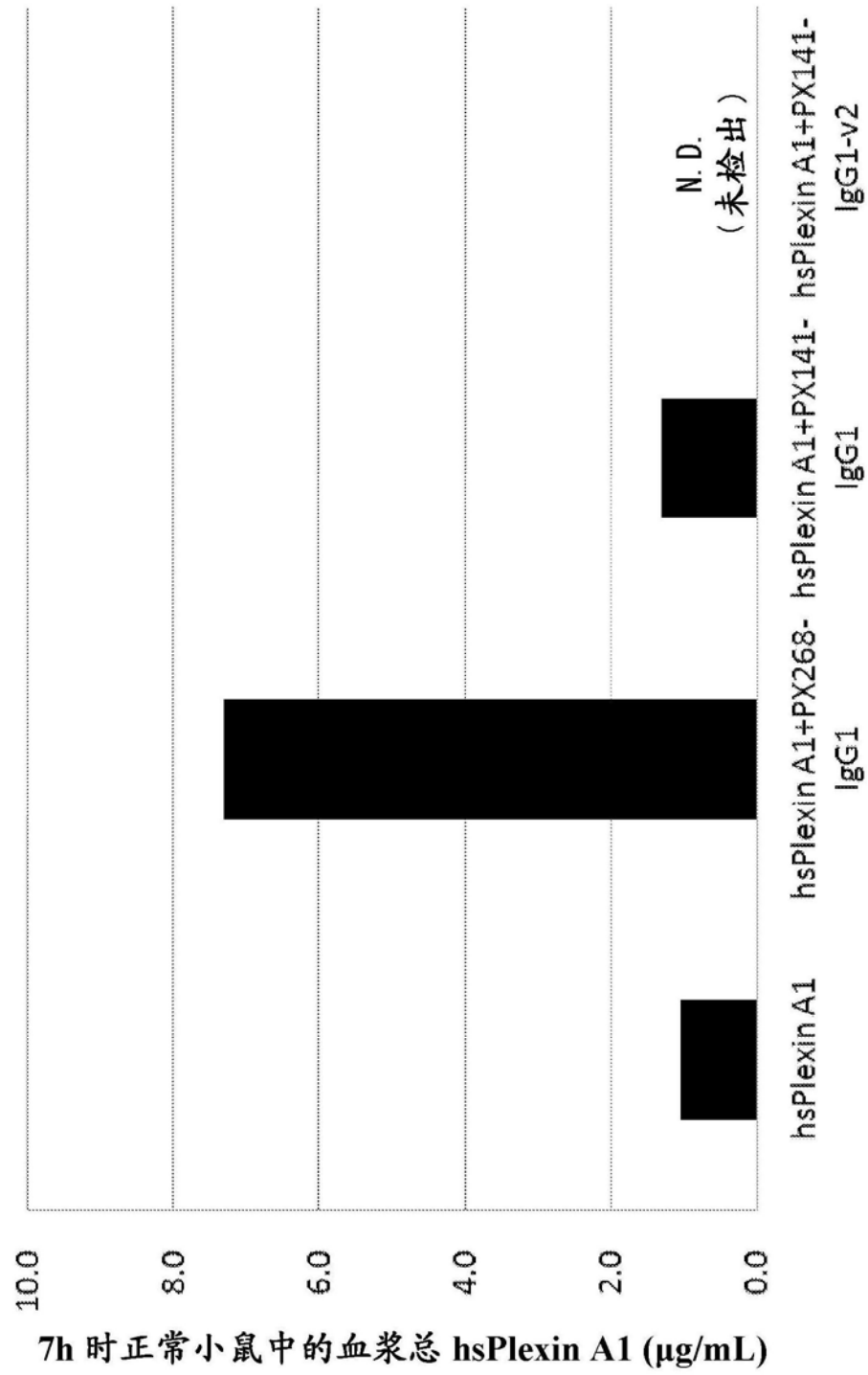


图35