



(21) 申請案號：107101834

(22) 申請日：中華民國 101 (2012) 年 09 月 27 日

(51) Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01)

(30) 優先權：2011/09/30	日本	2011-218736
2012/03/30	世界智慧財產權組織	PCT/JP2012/058603
2012/05/30	日本	2012-123781
2012/05/30	日本	2012-123782
2012/05/30	日本	2012-123773
2012/06/20	日本	2012-139211
2012/08/09	日本	2012-177311

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

日本

(72) 發明人：井川智之 IGAWA, TOMOYUKI (JP)；前田敦彥 MAEDA, ATSUHIKO (JP)；味元風太 MIMOTO, FUTA (JP)；倉持太一 KURAMOCHI, TAICHI (JP)

(74) 代理人：洪澄文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：37 項 圖式數：138 共 440 頁

(54) 名稱

具有促進抗原清除之 FcRn 結合域的治療性抗原結合分子

THERAPEUTIC ANTIGEN-BINDING MOLECULE WITH A FCRN-BINDING DOMAIN THAT PROMOTES ANTIGEN CLEARANCE

(57) 摘要

本發明提供：於中性 pH 對於 Fc 新生兒受體(FcRn)具有增強的親和性之經改質 FcRn 結合域；包含上述 FcRn 結合域之抗原結合分子，其具有低免疫原性、高安定性以及僅形成少數凝集物；於中性或酸性 pH 具有增加的 FcRn 結合活性而於中性 pH 對於預存在之抗藥物抗體無增加的結合活性之經改質之抗原結合分子；上述抗原結合分子用於改良抗原結合分子媒介之抗原攝入至細胞的用途；上述抗原分子用於減少特定抗原之血漿濃度的用途；上述經改質之 FcRn 結合域用於增加抗原對可於其降解之前結合之單一抗原結合分子的總數的用途；上述經改質 FcRn 結合域用於改良抗原結合分子之藥物動力學的用途；用於降低對於預存在之抗藥抗體的結合活性的方法；以及用於製造上述抗原結合分子的方法。

The present invention provides: a modified FcRn-binding domain having an enhanced affinity for the Fc Receptor neonatal (FcRn) at neutral pH; an antigen-binding molecule comprising said FcRn-binding domain, which has low immunogenicity, high stability and form only a few aggregates; a modified antigen-binding molecule having an increased FcRn-binding activity at neutral or acidic pH without an increased binding activity at neutral pH for a pre-existing anti-drug antibody; use of the antigen-binding molecules for improving antigen-binding molecule-mediated antigen uptake into cells; use of the antigen-binding molecules for reducing the plasma concentration of a specific antigen; use of the modified FcRn-binding domain for increasing the total number of antigens to which a single antigen-binding molecule can bind

before its degradation; use of the modified FcRn-binding domain for improving pharmacokinetics of an antigen-binding molecule; methods for decreasing the binding activity for a pre-existing anti-drug antibody; and methods for producing said antigen-binding molecules.

指定代表圖：

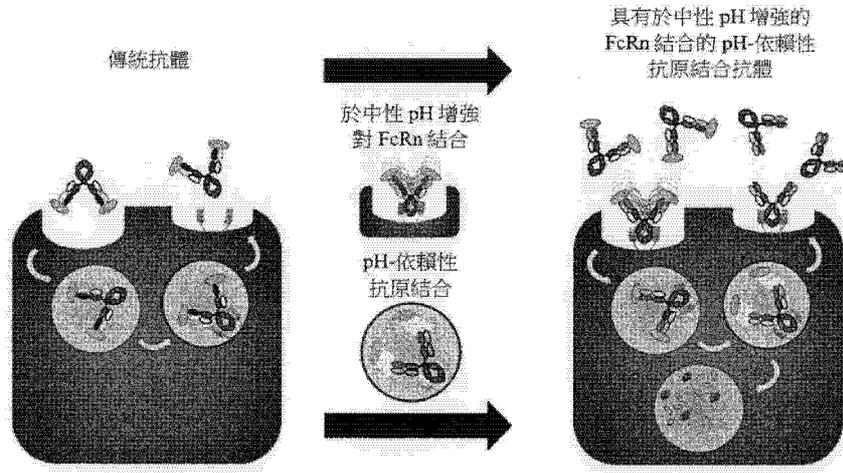


圖 1A

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】 (中文/英文)

治療性之具有促進抗原清除之 FcRn 結合區的抗原結合劑/

THERAPEUTIC ANTIGEN-BINDING MOLECULE WITH A FcRn-BINDING DOMAIN THAT PROMOTES ANTIGEN CLEARANCE

## 【技術領域】

【0001】本發明關於於中性 pH 對於 Fc 新生兒受體 (FcRn) 具有增強的親和性之經改質 FcRn 結合域；包含上述 FcRn 結合域之抗原結合分子，其具有低免疫原性、高安定性以及僅形成少數凝集物；於中性或酸性 pH 具有增加的 FcRn 結合活性而於中性 pH 對於預存在之抗藥物抗體無增加的結合活性之經改質之抗原結合分子；上述抗原結合分子用於改良抗原結合分子媒介之抗原攝入至細胞的用途；上述抗原分子用於減少特定抗原之血漿濃度的用途；上述經改質之 FcRn 結合域用於增加抗原對可於其降解之前結合之單一抗原結合分子的總數的用途；上述經改質之 FcRn 結合域用於改良抗原結合分子之藥物動力學的用途；用於降低對於預存在之抗藥抗體的結合活性的方法；以及用於製造上述抗原結合分子的方法。

## 【先前技術】

【0002】由於血漿中的高安定性以及少的副作用，為數增加中的抗體使用作為醫藥。標靶抗原之傳統抗體於注射後，結合患者血漿中的抗原，然後安定地持續呈抗體-抗原複合物之

形式直至降解。雖然典型的抗體一般具有長的半衰期(1 至 3 週)，然而抗原具有少於一日的相對短的半衰期。具有抗體之複合物中的抗原因此相較於抗原單獨具有顯著較長的半衰期。結果，於傳統抗體注射後，抗原濃度傾向增加。該等案例已被報導於標靶各種可溶抗原之抗體，該等抗原例如 IL-6(J Immunotoxicol. 2005, 3, 131-9.(NPL 1))、 $\beta$  澱粉樣蛋白(MAbs. 2010 Sep-Oct; 2(5): 576-88(NPL 2))、MCP-1(ARTHRITIS & RHEUMATISM 2006, 54,2387-92(NPL 3))、鐵調素(AAPS J. 2010, 12(4): 646-57.(NPL 4))及 sIL-6 受體(Blood. 2008 Nov 15; 112(10): 3959-64.(NPL 5))。受體已被描述由抗體投藥時之基線增加約 10 至 1000 倍(取決於抗原而定)之總血漿抗原濃度。

**【0003】** 由於該等總血漿抗原濃度的增加非所欲者，已開發藉由治療性抗體用以移除抗原的方案。該些方案之一為使用對於新生兒 Fc 受體之 IgG(FcRn)具有增加的結合親和性之 pH-依賴性抗原結合抗體以快速地設置抗原(參照，例如 PCT 申請案 PCT/JP2011/001888(PTL 1))。該 FcRn 為被發現於許多細胞之膜的蛋白質。於中性 pH 對 FcRn 具有增加的結合或性之抗體將於細胞表面結合 FcRn，藉此具有抗體之該受體將於囊泡中內化至細胞中。由於囊泡內部的 pH 逐漸降低，抗原將由 pH-依賴性抗原結合抗體解離，起因於其在酸性的低親和性。然後經解離的抗原降解而 FcRn 與所結合抗體於降解前循環回至細胞表面。因此，於中性 pH 對於 FcRn 具有增加的結合活性之 pH-依賴性抗原結合抗體可用於自血漿移除抗原以及降低其於

血漿之濃度。

**【0004】** 先前的研究已顯示 Fc-工程學以於酸性 pH 增加對 FcRn 的結合親和性亦可改良內體循環效率以及抗體的藥物動力學。例如， M252Y/S254T/T256E(YTE)變異體(J Biol Chem, 2006, 281 : 23514-23524.(NPL 6))、M428L/N434S(LS)變異體(Nat Biotechnol, 2010 28 : 157-159.(NPL 7))、T250Q/M428L(J Immunol. 2006, 176(1) : 346-56.(NPL 8))及 N434H 變異體(Clinical Pharmacology & Therapeutics(2011) 89(2) : 283-290.(NPL 9))相對於天然的 IgG1 顯示半衰期的改良。

**【0005】** 然而，該等取代亦具有改變抗體性質的風險，該等性質例如抗體安定性、免疫原性、凝聚行為與對於預先存在之抗體(例如類風濕性因子)的結合親和性，對於治療性抗體的開發為重要者。因此，本發明之主要目標係提供經改質 FcRn 結合域，其不僅增加抗體之清除也符合開發治療性抗原-結合分子的標準。該等開發標準特別地為高安定性、低免疫原性、低凝聚百分比及對於預先存在之抗藥物抗體(ADA)之低結合親和性。

**【0006】** 相關於本發明之先前技術文獻示於下文。所有文獻皆以參考方式併入本文。

[先前文獻]

[專利文獻]

**【0007】** [PTL 1] PCT/JP2011/00188(WO/2011/122011), ANTIGEN-BINDING MOLECULES THAT PROMOTE ANTIGEN CLEARANCE

[非專利文獻]

【0008】 [NPL 1] Martin PL, Cornacoff J, Prabhakar U, Lohr T, Treacy G, Sutherland JE, Hersey S, Martin E ; Reviews Preclinical Safety and Immune-Modulating Effects of Therapeutic 單株 抗體 to Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in Cynomolgus Macaques ; J Immunotoxicol. 2005, 3, 131-9

[NPL 2] Davda JP, Hansen RJ. ; Properties of a general PK/PD model of 抗體 -ligand interactions for therapeutic 抗體 that bind to soluble endogenous targets ; MAbs. 2010 Sep-Oct ; 2(5) : 576-88.

[NPL 3] Haringman JJ, Gerlag DM, Smeets TJ, Baeten D, van den Bosch F, Bresnihan B, Breedveld FC, Dinant HJ, Legay F, Gram H, Loetscher P, Schmouder R, Woodworth T, Tak PP. ; A randomized controlled trial with an 抗-CCL2(抗-monocyte chemotactic protein 1) 單株 antibody in patients with rheumatoid arthritis ; ARTHRITIS and RHEUMATISM 2006, 54,2387-92.

[NPL 4] Xiao JJ, Krzyzanski W, Wang YM, Li H, Rose MJ, Ma M, Wu Y, Hinkle B, Perez-Ruixo JJ. ; Pharmacokinetics of anti-hepcidin 單株 antibody Ab 12B9m and hepcidin in cynomolgus monkeys. ; AAPS J. 2010, 12(4), 646-57.)

[NPL 5] Nishimoto N, Terao K, Mima T, Nakahara H, Takagi N, Kakehi T. ; Mechanisms and pathologic significances

in increase in serum interleukin-6(IL-6) and soluble IL-6 受體 after administration of an anti-IL-6 受體 antibody, tocilizumab, in patients with rheumatoid arthritis and Castleman disease ; Blood. 2008 Nov 15 ; 112(10) : 3959-64.

[NPL 6] J Biol Chem, 2006, 281 : 23514-23524

[NPL 7] Nat Biotechnol, 2010 28 : 157-159

[NPL 8] J Immunol. 2006, 176(1) : 346-56

[NPL 9] Clinical Pharmacology & Therapeutics(2011) 89(2) : 283-290

## 【發明內容】

[技術問題]

【0009】本發明係由上述條件的觀點思考。本發明的目的係提供將改質的 FcRn-結合域，其於中性 pH 對於 FcRn 具有增強的親和性；包含該 FcRn-結合域之抗原結合分子，其中該抗原-結合分子具有低免疫原性、高安定性且僅形成少數凝聚物；經改質的抗原-結合分子，於中性或酸性 pH 具有增加的 FcRn-結合活性而於中性 pH 對於預先存在的抗藥物抗體於增加的結合活性；抗原-結合分子的用途，用以改良抗原-結合分子媒介之抗原攝入細胞；抗原-結合分子的用途，用以降低特定抗原之血漿濃度；經改質 FcRn-結合域之用途，用以增加於其降解之前可結合之單一抗原-結合分子之抗原總數；經改質 FcRn-結合域之用途，用以改良抗原-結合分子之藥物動力學；以及用以製造抗原-結合分子的方法。

[解決問題之手段]

【0010】本發明對於經改質 FcRn-結合域進行詳細研究，該域於中性 pH 對於 FcRn 具有增強的親和性，以及對於抗原-結合分子進行詳細研究，該抗原-結合分子包含該 FcRn-結合域，其具有低免疫原性、高安定性且僅形成少數凝聚物。其結果，本發明人發現於 FcRn-結核域特定位置之取代，於中性 pH 增加對 FcRn 的親和性而無實質上地增加免疫原性、無實質上地降低安定性及/或無實質上地增加高分子量物種的比例。

再者，本發明人對於經改質 FcRn-結合域進行詳細研究，該節和域於中性 pH 或酸性 pH 對於 FcRn 具有增強的親和性而對於預先存在之抗藥物抗體無顯著增加的結合活性，以及對於包含該 FcRn-結合域之抗原結合分子進行詳細研究。其結果，本發明人發現於 FcRn-結合域特定位置之取代，於中性 pH 降低對於預先存在抗藥物抗體的親和性而無實質上地降低 FcRn-結合活性。

【0011】具體地，本發明係關於下述者：

[1] 一種抗原-結合分子，包含經改質 FcRn 結合域，其中該經改質 FcRn 結合域包含於選自下列所成群組之一個或多個位置之胺基酸取代：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 及 EU436，其中該數字顯示根據 EU 編號之取代位置。

[2]如[1]所述之抗原-結合分子，其中該 FcRn 結合域具有胺基酸於位置 EU252 及 EU434 之胺基酸取代；以及於選自下列所成群組之一個或多個位置之胺基酸取代：

EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU256、EU258、  
EU286、EU387、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、  
EU428、EU433、EU434 及 EU436。

[3] 如[1]或[2]所述之抗原-結合分子，其中該經改質 FcRn  
結合域包含

於位置 EU238 之天冬胺酸，

於位置 EU250 之纈胺酸，

於位置 EU252 之酪胺酸，

於位置 EU254 之蘇胺酸，

於位置 EU255 之白胺酸，

於位置 EU256 之麩胺酸，

於位置 EU258 之天冬胺酸或異白胺酸，

於位置 EU286 之麩胺酸，

於位置 EU307 之麩胺醯胺，

於位置 EU308 之脯胺酸，

於位置 EU309 之麩胺酸，

於位置 EU311 之丙胺酸或組胺酸，

於位置 EU315 之天冬胺酸，

於位置 EU428 之異白胺酸，

於位置 EU433 之丙胺酸、離胺酸、脯胺酸、精胺酸或絲胺  
酸，

於位置 EU434 之酪胺酸或色胺酸，及/或

於位置 EU436 之異白胺酸、白胺酸、纈胺酸、蘇胺酸或苯  
丙胺酸。

[4] 如[2]所述之抗原-結合分子，其中該 FcRn 結合域包含胺基酸於選自下列所成群組之一個或多個位置組合之胺基酸取代

EU252、EU434 及 EU436；

EU252、EU307、EU311 及 EU434；

EU252、EU315 及 EU434；

EU252、EU308 及 EU434；

EU238、EU252 及 EU434；

EU252、EU434、EU307、EU311 及 EU436；以及

EU252、EU387 及 EU434。

[5] 如[4]所述之抗原-結合分子，其中該 FcRn 結合域包含：

於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU315 之天冬胺酸及於位置 EU434 之酪胺酸；或

於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸及於位置 EU436 之異白胺酸；或

於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸及於位置 EU436 之白胺酸；或

於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸及於位置 EU436 之纈胺酸；或

於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU254 之蘇胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸及於位置 EU436 之異白胺酸。

[6] 如[2]所述之抗原-結合分子，其中該 FcRn 結合域包含於三個或更多個位置之胺基酸取代，其中該三個或多個位置係

下列所成群組之組合之一者

EU252/EU434/EU307/EU311/EU286；

EU252/EU434/EU307/EU311/EU286/EU254；

EU252/EU434/EU307/EU311/EU436；

EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU254；

EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU250；

EU252/EU434/EU308/EU250；

EU252/EU434/EU308/EU250/EU436；以及

EU252/EU434/EU308/EU250/EU307/EU311。

[7] 如[6]所述之抗原-結合分子，其中該 FcRn 結合域包含：

於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU286 之麩胺酸，於位置 EU307 之麩胺醯胺，於位置 EU311 之丙胺酸以及於位置 EU434 之酪胺酸；或

於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU254 之蘇胺酸，於位置 EU286 之麩胺酸，於位置 EU307 之麩胺醯胺，於位置 EU311 之丙胺酸及於位置 EU434 之酪胺酸；或

於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU307 之麩胺醯胺，於位置 EU311 之丙胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸及於位置 436 之異白胺酸；或

於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU254 之蘇胺酸，於位置 EU286 之麩胺酸，於位置 EU307 之麩胺醯胺，於位置 EU311 之丙胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸及於位置 EU436 之異白胺酸；或

於位置 EU250 之纈胺酸，於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU254 之蘇胺酸，於位置 EU308 之脯胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸及於位置 EU436 之纈胺酸；或

於位置 EU250 纈胺酸，於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU307 麩胺醯胺，於位置 EU311 丙胺酸,於位置 EU434 酪胺酸及於位置 EU436 之纈胺酸；或

於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU307 之麩胺醯胺，於位置 EU311 之丙胺酸,於位置 EU434 之酪胺酸及於位置 EU436 之纈胺酸；或

於位置 EU250 之纈胺酸，於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU308 之脯胺酸及於位置 EU434 酪胺酸；或

於位置 EU250 之纈胺酸，於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU307 之麩胺醯胺，於位置 EU308 之脯胺酸，於位置 EU311 之丙胺酸及於位置 EU434 之酪胺酸。

[8] 如[2]所述之抗原-結合分子，其中該 FcRn 結合域包含於三個或更多個位置之胺基酸取代，其中該三個或多個位置係下列所成群組之組合之一者

EU252 及 EU434 及 EU307 及 EU311 及 EU436 及 EU286；

EU252 及 EU434 及 EU307 及 EU311 及 EU436 及 EU250 及 EU308；

EU252 及 EU434 及 EU307 及 EU311 及 EU436 及 EU250 及 EU286 及 EU308；

EU252 及 EU434 及 EU307 及 EU311 及 EU436 及 EU250 及 EU286 及 EU308 及 EU428。

[9] 如[8]所述之抗原-結合分子，其中該 FcRn 結合域包含：

於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU286 之麩胺酸，於位置 EU307 之麩胺醯胺，於位置 EU311 之丙胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸及於位置 EU436 之纈胺酸；或

於位置 EU250 之纈胺酸，於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU307 之麩胺醯胺，於位置 EU308 之脯胺酸，於位置 EU311 之丙胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸及於位置 EU436 之纈胺酸；或

於位置 EU250 之纈胺酸，於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU286 之麩胺酸，於位置 EU307 之麩胺醯胺，於位置 EU308 之脯胺酸，於位置 EU311 之丙胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸及於位置 EU436 之纈胺酸；或

於位置 EU250 之纈胺酸，於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU286 之麩胺酸，於位置 EU307 之麩胺醯胺，於位置 EU308 之脯胺酸，於位置 EU311 之丙胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸及於位置 EU436 之纈胺酸。

[10] 如[2]所述之抗原-結合分子，其中該 FcRn 結合域包含於三個或更多個位置之胺基酸取代，其中該三個或多個位置係下列所成群組之組合之一者：

EU434 及 EU307 及 EU311；

EU434 及 EU307 及 EU309 及 EU311；或

EU434 及 EU250 及 EU252 及 EU436。

[11] 如[10]所述之抗原-結合分子，其中該 FcRn 結合域包

含：

於位置 EU307 之麩胺醯胺，於位置 EU311 之組胺酸及於位置 EU434 之酪胺酸；或

於位置 EU307 之麩胺醯胺，於位置 EU309 之麩胺酸，於位置 EU311 丙胺酸及於位置 EU434 之酪胺酸；或

於位置 EU307 之麩胺醯胺，於位置 EU309 之麩胺酸，於位置 EU311 之組胺酸及於位置 EU434 酪胺酸；或

於位置 EU250 之纈胺酸；於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸及於位置 EU436 之纈胺酸。

[12] 如[1]至[11]中任一項所述之抗原-結合分子，其中該高分子量物之比例低於 2%。

[13] 如[1]至[12]中任一項所述之抗原-結合分子，其中該抗原-結合分子包含具有下述者之抗原-結合域

對於抗原於 pH5.5 至 6.5 具有相較於 pH7 至 8 為較低之結合活性或

對於抗原「鈣濃度-依賴性結合活性」。

[14] 如[1]至[5]中任一項所述之抗原-結合分子，其中該結合分子對於該 FcRn 之結合活性於 pH7 為 50 至 150nM， $T_m$  為高於 63.0°C 及 Epibase 分數低於 250。

[15] 如[1]至[3]及[6]至[7]中任一項所述之抗原-結合分子，其中該結合分子對於 FcRn 之結合活性於 pH7 為 15 至 50nM， $T_m$  為高於 60°C 及 Epibase 分數低於 500。

[16] 如[1]至[3]及[8]至[9]中任一項所述之抗原-結合分子，其中該結合分子對於 FcRn 之結合活性於 pH7 為強於

15nM， $T_m$  為高於 57.5°C 及 Epibase 分數低於 500。

[17] 如[1]至[3]中任一項所述之抗原-結合分子，其中該 FcRn 結合域包含胺基酸取代於於該位置 EU238、EU255 及/或 EU258，以及於三個或更多個位置，其中該三個或更多個位置為表 4 至表 7 所示組合之一者。

[18] 如[1]至[17]中任一項所述之抗原-結合分子，其中於該 FcRn 結合域之位置 EU257 之胺基酸不為選自下列所成群組之胺基酸：丙胺酸、纈胺酸、異白胺酸、白胺酸及蘇胺酸，及/或

於該 FcRn 結合域之位置 EU252 之胺基酸不為色胺酸。

[19] 如[1]至[18]中任一項所述之抗原-結合分子，其中該抗原-結合分子對於預先存在之抗藥物抗體具有結合活性，相較於包含完整 FcRn 結合域之對照抗體得結合親和性，該預先存在之抗藥物抗體不顯著增加。

[20] 如[19]所述之抗原-結合分子，其中該 FcRn 結合域進一步包含於選自下列所成群組之一個或多個位置之胺基酸取代：EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438 及 EU440。

[21] 如[20]所述之抗原-結合分子，其中該 FcRn 結合域包含選自下列所成群組之一個或多個胺基酸取代

於位置 EU387 之精胺酸；

於位置 EU422 之麩胺酸，精胺酸，或絲胺酸，天冬胺酸，離胺酸，蘇胺酸或麩胺醯胺；

於位置 EU424 之麩胺酸或精胺酸，離胺酸或天冬醯胺；  
於位置 EU426 之天冬胺酸，麩胺醯胺，丙胺酸或酪胺酸；  
於位置 EU433 之天冬胺酸；  
於位置 EU436 之蘇胺酸；  
於位置 EU438 之麩胺酸，精胺酸，絲胺酸或離胺酸；以及  
於位置 EU440 之麩胺酸，天冬胺酸或麩胺醯胺。

[22]如[1]至[21]中任一項所述之抗原-結合分子，其中該經改質 FcRn 結合域包含三個或更多個取代，其中該三個或更多個取代為表 12 至表 13 所示組合之一者。

[23] 如[1]至[22]中任一項所述之抗原-結合分子，其中該經改質 FcRn 結合域包含三個或更多個取代，其中該三個或更多個取代為表 14 至表 15 所示組合之一者。

[24] 如[20]至[23]中任一項所述之抗原-結合分子，其中該 FcRn 結合域包含：

於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU387 之精胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸及於位置 EU436 之纈胺酸；或

於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU422 之麩胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸及於位置 EU436 之纈胺酸；或

於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU422 之精胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸及於位置 EU436 之纈胺酸；或

於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU422 之絲胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸及於位置 EU436 之纈胺酸；或

於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU424 之麩胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸及於位置 EU436 之纈胺酸；或

於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU424 之精胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸及於位置 EU436 之纈胺酸；或

於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸，於位置 EU436 之纈胺酸及於位置 EU438 之麩胺酸；或

於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸，於位置 EU436 之纈胺酸及於位置 EU438 精胺酸；或

於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸，於位置 EU436 之纈胺酸及於位置 EU438 之絲胺酸；或

於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸，於位置 EU436 之纈胺酸及於位置 EU440 之麩胺酸。

[25] 如[1]至[24]中任一項所述之抗原-結合分子，其中該抗原結合分子為抗體。

[26] 一種[1]至[25]中任一項所述之抗原-結合分子之用途，係用於改良抗原-結合分子-媒介之抗原攝入至細胞。

[27] 一種[1]至[25]中任一項所述之抗原-結合分子之用途，係用於降低特定抗原的血漿濃度，其中該抗原-結合分子包含可結合該抗原之抗原-結合域。

[28] 一種用於改良抗原-結合分子之藥物動力學的方法，包含於選自下列所成群組之一個或多個位置將胺基酸取代導入該抗原-結合分子之 FcRn 結合域的步驟：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 及 EU436。

[29] 一種用以延遲對象中抗原-結合分子之清除的方法，包含於選自下列所成群組之一個或多個位置將胺基酸取代導

入該抗原-結合分子之 FcRn 結合域的步驟：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 及 EU436。

[30] 一種延長抗原-結合分子之血漿滯留時間的方法，包含於選自下列所成群組之一個或多個位置將胺基酸取代導入該抗原-結合分子之 FcRn 結合域的步驟：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 及 EU436。

[31] 一種增加抗原-結合分子之血漿抗原-清除速率的方法包含於選自下列所成群組之一個或多個位置將胺基酸取代導入該抗原-結合分子之 FcRn 結合域的步驟：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 及 EU436。

[32] 一種增加抗原-結合分子清除血漿抗原的能力，包含於選自下列所成群組之一個或多個位置將胺基酸取代導入該抗原-結合分子之 FcRn 結合域的步驟：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 及 EU436。

[33] 如[28]至[32]中任一項所述之方法，其中進一步於位置 EU256 將胺基酸取代導入該 FcRn 結合域。

[34] 如[28]至[32]中任一項所述之方法，其中該方法進一步包含於選自下列所成群組之一個或多個位置將胺基酸取代導入該 FcRn 結合域之步驟：EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438 及 EU440。

[35] 一種用於製造[1]至[25]中任一項所述之抗原-結合分子的方法，包含下列步驟

選擇親代 FcRn 結合域且藉由於選自下列所成群組之一個或多個位置導入胺基酸取代而改變親代 FcRn: EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 及 EU436；

選擇抗原-結合分子之抗原-結合域且改變至少一個抗原-結合域之胺基酸以獲得 pH-依賴性抗原-結合域或鈣-離子依賴性抗原-結合域；

獲得編碼抗原-結合分子之基因，其中該人類 FcRn 結合域與抗原-結合域係於(a)及(b)中製備與連接以及

使用於(c)中製備之基因製造抗原-結合分子。

[36] 如[35]所述之方法，其中步驟(a)進一步將位置 EU256 胺基酸取代導入至該 FcRn 結合域。

[37] 如[35]至[36]中任一項之方法，其中該方法進一步包含於選自下列所成群組之一個或多個位置將胺基酸取代導入至該 FcRn 結合域之步驟：EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438 及 EU440。

[38] 一種抗原-結合分子，包含經改質 FcRn 結合域，其中該經改質 FcRn 結合域包含選自下列所成群組之一個或多個位置之胺基酸取代：EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438 及 EU440，其中該抗原-結合分子對於預先存在之抗藥物抗體(ADA)具有結合活性，相較於包含完整 FcRn 結合域之對照抗體的結合親和性，該預先存在之抗藥物抗體於中

性 pH 不顯著增加。

[39] 如[38]所述之抗原-結合分子，其中該抗原-結合分子進一步於中性或酸性 pH 範圍對於 FcRn 具有增加的結合親和性。

[40] 如[38]或[39]所述之抗原-結合分子，其中取代於選自於 EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438 及 EU440 所成群組之位置之胺基酸係選自下列所成群組

於位置 EU387 之精胺酸；

於位置 EU422 之麩胺酸，精胺酸，絲胺酸，天冬胺酸，離胺酸，蘇胺酸或麩胺醯胺；

於位置 EU424 之麩胺酸，精胺酸，離胺酸或天冬醯胺；

於位置 EU426 之天冬胺酸，麩胺醯胺，丙胺酸或酪胺酸；

於位置 EU433 之天冬胺酸；

於位置 EU436 之蘇胺酸；

於位置 EU438 之麩胺酸，精胺酸，絲胺酸或離胺酸；以及

於位置 EU440 之麩胺酸，天冬胺酸，或麩胺醯胺。

[41] 如[38]至[40]中任一項所述之抗原-結合分子，其中該經改質 FcRn 結合域包含於一個或多個位置之胺基酸取代或表 10 所示組合之一者。

[42] 如[38]至[40]中任一項所述之抗原-結合分子，其中該經改質 FcRn 結合域包含胺基酸取代或表 11 所示取代組合之任一者。

[43] 如[39]至[42]中任一項所述之抗原-結合分子，其中該經改質 FcRn 結合域進一步包含於該 FcRn 結合域於選自下列所

成群組之一個或多個位置之胺基酸取代：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU256、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU434 及 EU436，其中該取代於中性 pH 或酸性 pH 賦予 FcRn 結合活性增加。

[44] 如[39]至[43]中任一項所述之抗原-結合分子，其中該經改質 FcRn 結合域包含於 FcRn 結合域位置之胺基酸取代

i)a)EU438/EU440 或 b)EU424；以及

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

[45] 如[44]所述之抗原-結合分子，其中該經改質 FcRn 結合域包含胺基酸取代

i)a)EU438R/EU440E 或 b)EU424N；以及

ii)a)M434H；b)M252Y/S254T/T256E；c)M428L/N434S；或 d)T250Q 及 M428L(EU 編號)。

[46] 如[45]所述之抗原-結合分子，其中該經改質 FcRn 結合域包含三個或更多個取代，其中該三個或更多個取代為表 13 及表 15 所示組合之一者。

[47] 如[39]至[42]中任一項所述之抗原-結合分子，其中該經改質 FcRn 結合域包含取代

於選自 EU387、EU422、EU424、EU438、EU440、EU433 所成群組之位置之一個或多個，或於二個或更多個位置，其中該二個位置為 EU422/EU424 及 EU438/EU440 所成群組之組合之一者；以及

二個或更多個位置，其中該二個位置為表 9 所示組合之一

者。

[48] 如[47]所述之抗原-結合分子，其中該經改質 FcRn 結合域包含三個或更多個胺基酸取代，其中該三個或更多個胺基酸取代為表 12 或表 14 所示組合之一者。

[49] 如[39]至[48]中任一項所述之抗原-結合分子，其中該抗原-結合分子包含 pH-依賴性抗原-結合域或鈣離子-依賴性抗原結合域。

[50] 一種用於對包含 FcRn 結合域之抗原-結合分子之預先存在的 ADA 降低結合性的方法，該 FcRn 結合域於中性或酸性 pH 對 FcRn 具有增加的結合活性以及於中性 pH 對預先存在之 ADA 具有增加的結合性，該方法包含下列步驟

提供具有 FcRn 結合域之抗原-結合分子，該 FcRn 結合域具有於中性或酸性 pH 對 FcRn 增加的結合活性以及於中性 pH 對預先存在之 ADA 增加的結合性；以及

於選自 EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438 及 EU440 所成群組之一個或多個位置取代 FcRn 結合域中之胺基酸以產生具有經改質 FcRn 結合域之抗原-結合分子。

[51] 如[50]所述之方法，其中該步驟 b)包含於三個或更多個位置取代胺基酸，其中該三個或更多個位置為表 10 所示組合之一者。

[52] 如[50]所述之方法，其中該步驟 b)包含將三個或更多個胺基酸取代導入至該 FcRn 結合域，其中該三個或更多個胺基酸取代為表 11 所示組合之一者。

[53] 一種用以增加抗原總數的方法，該抗原總數為單一

抗原-結合分子可與其結合而相較於親代抗體對於預先存在之 ADA 於中性 pH 不顯著增加結合活性，該方法包含下列步驟

提供包含親代 FcRn 結合域之抗原-結合分子，

藉由於選自 EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU256、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 及 EU436 所成群組之一個或多個位置之親代 FcRn 結合域之胺基酸序列取代胺基酸而改變步驟 a)之親代 FcRn 結合域；以及

藉由於選自 EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438 及 EU440 所成群組之一個或多個位置之親代 FcRn 結合域之胺基酸序列取代胺基酸而改變步驟 b)之該經改質 FcRn 結合域。

[54] 一種有助於以無抗原結合形式將胞外釋放之無抗原之抗原-結合分子攝入細胞中而相較於親代抗體於中性 pH 不顯著增加該抗原-結合分子對於預先存在之 ADA 結合活性的方法，包含下列步驟

提供包含親代 FcRn 結合域之抗原-結合分子，

藉由於選自 EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU256、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 及 EU436 所成群組之一個或多個位置之親代 FcRn 結合域之胺基酸序列取代胺基酸而改變步驟 a)之親代 FcRn 結合域；以及

藉由於選自 EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438 及 EU440 所成群組之一個或多個位置之親代

FcRn 結合域之胺基酸序列取代胺基酸而改變步驟 b)之該經改質 FcRn 結合域。

[55] 一種用於增加抗原-結合分子之活性以清除血漿抗原而相較於親代抗體於中性 pH 不顯著增加對於預先存在之 ADA 結合活性的方法，該方法包含下列步驟

提供包含親代 FcRn 結合域之抗原-結合分子，

藉由於選自 EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU256、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 及 EU436 所成群組之一個或多個位置之親代 FcRn 結合域之胺基酸序列取代胺基酸而改變步驟 a)之親代 FcRn 結合域；以及

藉由於選自 EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438 及 EU440 所成群組之一個或多個位置之親代 FcRn 結合域之胺基酸序列取代胺基酸而改變步驟 b)之該經改質 FcRn 結合域。

[56] 一種用於改良抗原-結合分子之藥物動力學而相較於親代抗體於中性 pH 不顯著增加對於預先存在之 ADA 結合活性的方法，該方法包含下列步驟

提供包含親代 FcRn 結合域之抗原-結合分子，

藉由於選自 EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU256、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 及 EU436 所成群組之一個或多個位置之親代 FcRn 結合域之胺基酸序列取代胺基酸而改變步驟 a)之親代 FcRn 結合域；以及

藉由於選自 EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438 及 EU440 所成群組之一個或多個位置之親代 FcRn 結合域之胺基酸序列取代胺基酸而改變步驟 b)之該經改質 FcRn 結合域。

[57] 一種用於降低總數或游離抗原血漿濃度而相較於親代抗體於中性 pH 不顯著增加該抗原-結合分子對於預先存在之 ADA 結合活性的方法，該方法包含下列步驟

提供包含親代 FcRn 結合域之抗原-結合分子，該抗原-結合分子包含可結合該抗原之抗原-結合域，

藉由於選自 EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU256、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 及 EU436 所成群組之一個或多個位置之親代 FcRn 結合域之胺基酸序列取代胺基酸而改變該親代 FcRn 結合域；以及

藉由於選自 EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438 及 EU440 所成群組之一個或多個位置之親代 FcRn 結合域之胺基酸序列取代胺基酸而改變步驟 b)之該經改質 FcRn 結合域。

[58] 一種用於製造包含 FcRm 結合域之抗原-結合分子的方法，該 FcRn 結合域於中性或酸性 pH 對 FcRn 具有增加的結合活性以及於中性 pH 對預先存在之 ADA 具有增加的結合性，該方法包含下列步驟

提供於中性或酸性 pH 範圍對 FcRn 具有增加的結合活性以及於中性 pH 範圍對預先存在之 ADA 具有增加的結合性之

FcRn 結合域，

於選自 EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438 及 EU440 所成群組之一個或多個位置取代胺基酸

選擇抗原-結合分子之抗原-結合域及改變抗原-結合域之至少一個胺基酸以獲得 pH-依賴性抗原-結合域，或選擇鈣離子-依賴性抗原-結合域；

獲得編碼抗原-結合分子之基因，其中人類 FcRn 結合域與 (a)與 (b)所製備之抗原-結合域連接以及

使用 (c)所製備之基因製造抗原-結合分子，其中所製造之該抗原-結合分子相較於具有完整 FcRn 結合域之親代抗原-結合域具有於中性或酸性 pH 對 FcRn 增加的結合活性以及於中性 pH 對預先存在之 ADA 增加的結合性。

[59] 如[58]所述之方法，其中該於中性或酸性 pH 範圍對 FcRn 及預先存在之 ADA 具有增加的結合活性以及於中性 pH 範圍對預先存在之 ADA 具有增加的結合性之 FcRn 結合域包含於選自下列所成群組之一個或多個位置之胺基酸取代：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU256、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 及 EU436。

[60] 如[53]至[57]中任一項所述之方法，其中該步驟 a)中導入之胺基酸為三個或更多個位置，其中該三個或更多個位置為表 4 至表 7 所示組合之一者。

[61] 如[53]至[60]中任一項所述之方法，其中該步驟 b)中導入之胺基酸取代為三個或更多個位置，其中該三個或更多個

位置為表 10 所示組合之一者。

### 【圖式簡單說明】

#### 【0012】

圖 1A 顯示圖式說明相較於具有增加的 FcRn 的 pH-依賴性抗原結合抗體之由先前技術抗體(傳統抗體)之血漿的抗原清除，該二抗體於中性 Ph 均結合可溶抗體。傳統抗體於血漿中結合至抗原且為非專一性的由細胞攝入至酸性內體。於內體的酸性環境中，傳統抗體於囊泡內結合 FcRn 且運送回至細胞表面，於該細胞表面處再次釋放。於內化與循環過程中，抗原結合至抗原-結合域。

於中性 pH 具有增加的 FcRn 結合的 pH-性抗原結合抗體，結合至細胞表面的 FcRn 且快速地內化至細胞中，因而相較於傳統抗體為較高頻率。於內體的酸性環境中，抗原由經改質抗體解離且傳遞至溶酶體，且抗原於融媒體處被蛋白質分解性地降解。仍結合至 FcRn 的該抗體，循環回至細胞表面。於該細胞表面處，該經循環的游離抗體可再一次結合至另一抗原。藉由重複此 FcRn-媒介攝入的循環，抗原解離與降解，以及抗體循環，該等於中性 pH 對於 FcRn 具有經改良的親和性的 pH-依賴性抗原-結合抗體，相較於傳統抗體可傳送顯著較大量的抗原至溶酶體，且因而相較於傳統抗體可顯著地降低血漿中的總抗原濃度。

圖 1B 顯示圖式說明於內體中之來自具有 pH-依賴性抗原-結合域之 IgG 抗體的可溶抗原的解離。此導致抗原清除增加，且使抗體於血漿中結合至另一抗原。

圖 2 顯示 hFcRn 結合親和性(x 軸)與 包含 Fc 變異體之抗體的  $T_m$  於 y 軸的圖(Fc 變異體 F1-F599：空心方塊； Fc 變異體 F600-F1052：實心方塊)。

圖 3 顯 hFcRn 結合親和性(x-軸) 與包含 Fc 變異體之抗體的高分子量(HMW)比例(以%)(y 軸)的圖(Fc 變異體 F1-F599：空心方塊，Fc 變異體 F600-F1050：實心方塊)。

圖 4 顯示 hFcRn 結合親和性(x-軸)與包含 Fc 變異體之抗體的免疫原性分數(Epibase 分數)的圖(F1-F599 之 Fc 變異體：空心方塊，Fc 變異體 F600-F1052：實心方塊)。

圖 5 顯示 hFcRn 結合親和性(x-軸)與溶解溫度  $T_m$ (y 軸)與包含 Fc 變異體之抗體(其 FcRn 結合親和性強於 15nM)的溶解溫度  $T_m$ (y 軸)的圖(F1-F599 之 Fc 變異體具有  $K_d$  小於或等於 15nM：空心方塊，F600-F1052 之 Fc 變異體具有  $K_d$  小於或等於 15nM(群 1)：實心方塊)。

圖 6 顯示 hFcRn 結合親和性(x 軸)與包含 Fc 變異體之抗體(其 FcRn 結合親和性強於 15nM)的 HMW(以%)(y-軸)的圖(F1-F599 之 Fc 變異體具有  $K_d$  小於或等於 15nM：空心方塊；F600-F1052 之 Fc 變異體具有  $K_d$  小於或等於 15nM(群 1)：實心方塊)。

圖 7 顯示 hFcRn 結合親和性與包含 Fc 變異體之抗體(其 FcRn 結合親和性強於 15nM)的免疫抗原性分數的圖(F1-F599 之 Fc 變異體具有  $K_d$  小於或等於 15nM：空心方塊；F600-F1052 之 Fc 變異體具有  $K_d$  小於或等於 15nM(群 1)：實心方塊)。

圖 8 顯示顯示的圖 hFcRn 結合親和性與包含 Fc 變異體之抗體(其 FcRn 結合親和性介於 15nM 與 50nM 之間)的 Tm 的圖(F1-F599 之 Fc 變異體具有 Kd=15 至 50nM，空心方塊；F600-F1052 之 Fc 變異體具有 Kd=15 至 50nM(群 2)：實心方塊)

圖 9 顯示 hFcRn 結合親和性與包含 Fc 變異體之抗體的(其 FcRn 結合親和性介於 15nM 與 50nM 之間)的 HMW(%)的圖(F1-F599 之 Fc 變異體 具有 Kd=15 至 50nM，空心方塊；F600-F1052 之 Fc 變異體具有 Kd=15 至 50nM(群 2)：實心方塊)。

圖 10 顯示 hFcRn 結合親和性與包含 Fc 變異體之抗體(其 FcRn 結合親和性介於 15nM 與 50nM 之間)的免疫原性分數的圖(F1-F599 之 Fc 變異體 具有 Kd=15 至 50nM，空心方塊；F600-F1052 之 Fc 變異體具有 Kd=15 至 50nM(群 2)：實心方塊)

圖 11 顯示 hFcRn 結合親和性與包含 Fc 變異體之抗體(其 FcRn 結合親和性介於 50nM 與 150nM 之間)的 Tm 的圖(F1-F599 之 Fc 變異體具有 Kd=50 至 150nM，空心方塊； F600-F1052 之 Fc 變異體具有 Kd=50 至 150nM(群 3)：實心方塊)。

圖 12 顯示的圖 hFcRn 結合親和性與包含 Fc 變異體之抗體(其 FcRn 結合親和性介於 50nM 與 150nM 之間)的 HMW(%)的圖(F1-F599 之 Fc 變異體具有 Kd=50 至 150nM，空心方塊；F600-F1052 之 Fc 變異體具有 Kd=50 至 150nM(群 3)：實心方塊)。

圖 13 顯示 hFcRn 結合親和性與包含 Fc 變異體之抗體(其 FcRn 結合親和性介於 50nM 與 150nM 之間)的免疫原性分數的圖(F1-F599 之 Fc 變異體具有  $K_d=50$  至 150nM：空心方塊；F600-F1052 之 Fc 變異體具有  $K_d=50$  至 150nM(群 3)：實心方塊)。

圖 14 顯示 hFcRn 結合親和性與包含 Fc 變異體之抗體(其 FcRn 結合親和性介於 150nM 與 700nM 之間)的  $T_m$  的圖(F1-F599 之 Fc 變異體具有  $K_d=150$  至 700nM，空心方塊；Fc 變異體 F600-F1052 具有  $K_d=150$  至 700nM(群 4)：實心方塊)。

圖 15 顯示 hFcRn 結合親和性與包含 Fc 變異體之抗體(其 FcRn 結合親和性介於 150nM 與 700nM 之間)的 HMW(%)的圖(F1-F599 之 Fc 變異體具有  $K_d=150$  至 700nM：空心方塊；F600-F1052 之 Fc 變異體具有  $K_d=150$  至 700nM(群 4)：實心方塊)。

圖 16 顯示 hFcRn 結合親和性與包含 Fc 變異體之抗體(其 FcRn 結合親和性介於 150nM 與 700nM 之間)的免疫原性分數的圖(F1-F599 之 Fc 變異體具有  $K_d=150$  至 700nM：空心方塊；F600-F1052 之 Fc 變異體具有  $K_d=150$  至 700nM(群 4)：實心方塊)。

圖 17 顯示圖形表示之於人類 FcRn 基因轉殖鼠注射 Fv4-IgG1、Fv4-F652、Fv4-F890 之後與 Fv4-F946 以及於對照小鼠(無抗體注射)之歷時血漿抗原(hsIL-6R)濃度。

圖 18 顯示圖形表示之於人類 FcRn 基因轉殖鼠注射

Fv4-IgG1、Fv4-F652、Fv4-F890 之後的歷時血漿抗體濃度。

圖 19 顯示圖形表示之於人類 FcRn 基因轉殖小鼠之對照(無抗體注射)以及於 Fv4-IgG1、Fv4-F11 與 Fv4-F652 之注射後之歷時血漿抗原(hsIL-6R)濃度。

圖 20 顯示圖形表示之於人類 FcRn 基因轉殖小鼠之 Fv4-IgG1、Fv4-F11 與 Fv4-F652 之注射後之歷時血漿抗體濃度。

圖 21 顯示圖形表示之來自 15 個各別 RA 患者(a-1 至 a-5)對抗 Fv4-IgG1、Fv4-F11、Fv4-F268、Fv4-F890 與 Fv4-F947 的血漿電化學發光(ECL)回應，以及該 ECL 回應之平均(b)、幾何平均(c)以及中間值(d)。

圖 22 顯示來自 15 個各別 RA 患者對抗 Fv4-IgG1、Fv4-F890 與 Fv4-F1058 至 Fv4-F1073(a-1 至 a-18)的血漿電化學發光(ECL)回應，以及該 ECL 回應之平均(b)、幾何平均(c)以及中間值(d)。

圖 23 顯示對人類 FcRn 基因轉殖小鼠(線 276)投藥抗-人類 IL-6 受體抗體之可溶形式後之歷時血漿濃度圖，其中可溶形式人類 IL-6 受體的血漿濃度為恆定(穩態輸助模式)。

圖 21 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗人源化抗-IL-6 受體抗體 Fv4-IgG1(圖 21-1)、YTE 變異體(圖 21-2)及其 LS 變異體(圖 21-3)之血漿的電化學發光(ECL)回應圖。

圖 22 顯示圖形表示之來自 15 個各別 RA 患者對抗人源化抗-IL-6 受體抗體 Fv4-IgG1(Fig.22-1)、Fv4-N434H(圖 22-2)、Fv4-F11(圖 22-3)、Fv4-F68(圖 22-4)、Fv4-890(圖 22-5)與

Fv4-F947(圖 22-6)之血漿的電化學發光(ECL)回應。

圖 23 顯示圖 22 中所示來自 15 個各別 RA 患者對抗 Fv4-IgG1、Fv4-F11、Fv4-F68、Fv4-F890 與 Fv4-F947 之 ECL 回應之平均(圖 23-1)、幾何平均(圖 23-2)與中間值(圖 23-3)。

圖 24 顯示圖形表示之來自 15 個各別 RA 患者對抗人源化抗-IL-6 受體抗體 Fv4-IgG1(圖 24-1)以及變異體 Fv4-F890、Fv4-F1058、Fv4-F1059、Fv4-F1060、Fv4-F1061、Fv4-F1062、Fv4-F1063、Fv4-F1064、Fv4-F1065、Fv4-F1066、Fv4-F1067、Fv4-F1068、Fv4-F1069、Fv4-F1070、Fv4-F1071、Fv4-F1072 與 Fv4-F1073(圖 24-2 至圖 24-18) 之血漿的電化學發光(ECL) 回應。

圖 25 顯示圖 24 中所示來自 15 個各別 RA 患者對抗 Fv4-IgG1、變異體 Fv4-F890、Fv4-F1058、Fv4-F1059、Fv4-F1060、Fv4-F1061、Fv4-F1062、Fv4-F1063、Fv4-F1064、Fv4-F1065、Fv4-F1066、Fv4-F1067、Fv4-F1068、Fv4-F1069、Fv4-F1070、Fv4-F1071、Fv4-F1072 與 Fv4-F1073 之血漿的 ECL 回應的平均(圖 25-1)、幾何平均(圖 25-2)與中間值(圖 25-3)。

圖 26 顯示圖形表示之來自 15 個各別 RA 患者對抗變異體 Fv4-F1104、Fv4-F1105 與 Fv4-F1106 之血漿的電化學發光 (ECL)回應。

圖 27 顯示圖形表示之來自 15 個各別 RA 患者對抗變異體 Fv4-F1107、Fv4-F1108、Fv4-F1109、Fv4-F1110、Fv4-F1111、Fv4-F1112、Fv4-F1113 與 Fv4-F1114(圖 27-1 至圖 27-8) 之血漿的電化學發光(ECL)回應

圖 28 顯示圖形表示之來自 15 個各別 RA 患者對抗變異體 Fv4-F1230(圖 28-1)、Fv4-F1231(圖 28-2)、Fv4-F1232(圖 28-3) 之血漿的電化學發光(ECL)回應。

圖 29 顯示圖形表示之來自 15 個各別 RA 患者對抗變異體 Fv4-F947、Fv4-F1119、Fv4-F1120、Fv4-F1121、Fv4-F1122、Fv4-F1123 與 Fv4-F1124 之血漿的電化學發光(ECL)回應

圖 30-1 至圖 30-4 顯示圖形表示之來自 15 個各別 RA 患者對抗變異體 Fv4-F939、Fv4-F1291、Fv4-F1268 與 Fv4-F1269 之血漿的電化學發光(ECL)回應。圖 30-5 至圖 30-9 顯示圖形表示之來自 15 個各別 RA 患者對抗變異體 Fv4-F1243、Fv4-F1245、Fv4-F1321、Fv4-F1340 與 Fv4-F1323 之血漿的電化學發光(ECL)回應。

圖 31 顯示圖形表示之來自 15 個各別 RA 患者對抗變異體 Fv4-F890(圖 31-1)與 Fv4-F1115(=F890 + S424N、圖 31-2) 之血漿的電化學發光(ECL)回應。

圖 32 顯示圖形表示之來自 15 個或 30 個各別 RA 患者對抗變異體 Fv4-YTE(圖 32-1)、Fv4-F1166(=YTE + Q438R/S440E, 圖 32-2)、Fv4-F1167(=YTE+S424N, 圖 32-3)、Fv4-LS(圖 32-4)、Fv4-F1170(=LS + Q438R/S440E, 圖 32-5)、Fv4-F1171(LS + S424N, 圖 32-6)、Fv4-N434H(圖 32-7)、Fv4-F1172(=N434H + Q438R / S440E, 圖 32-8)、Fv4-F1173(=N434H + S424N, 圖 32-9)) 之血漿的電化學發光(ECL)回應。

圖 33 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體

Fv4-LS、Fv4-F1380(圖 33-2)、Fv4-F1384(圖 33-3)、Fv4-F1385(圖 33-4)、Fv4-F1386(LS + S426Y, 圖 33-5)、Fv4-F1388(圖 33-6) 與 Fv4-F1389(LS + Y436T, 圖 33-7) 之血漿的電化學發光(ECL) 回應。

圖 34 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F939 之電化學發光(ECL)回應。

圖 35 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1378 之電化學發光(ECL)回應。

圖 36 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1379 之電化學發光(ECL)回應。

圖 37 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1262 之電化學發光(ECL)回應。

圖 38 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1138 之電化學發光(ECL)回應。

圖 39 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1344 之電化學發光(ECL)回應。

圖 40 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1349 之電化學發光(ECL)回應。

圖 41 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1350 之電化學發光(ECL)回應。

圖 42 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1351 之電化學發光(ECL)回應。

圖 43 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1261 之電化學發光(ECL)回應。

圖 44 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1263 之電化學發光(ECL)回應。

圖 45 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1305 之電化學發光(ECL)回應。

圖 46 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1306 之電化學發光(ECL)回應。

圖 47 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1268 之電化學發光(ECL)回應。

圖 48 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1269 之電化學發光(ECL)回應。

圖 49 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1413 之電化學發光(ECL)回應。

圖 50 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1416 之電化學發光(ECL)回應。

圖 51 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1419 之電化學發光(ECL)回應。

圖 52 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1420 之電化學發光(ECL)回應。

圖 53 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1370 之電化學發光(ECL)回應。

圖 54 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1371 之電化學發光(ECL)回應。

圖 55 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1599 之電化學發光(ECL)回應。

圖 56 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1600 之電化學發光(ECL)回應。

圖 57 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1566 之電化學發光(ECL)回應。

圖 58 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1448 之電化學發光(ECL)回應。

圖 59 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1601 之電化學發光(ECL)回應。

圖 60 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1602 之電化學發光(ECL)回應。

圖 61 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1603 之電化學發光(ECL)回應。

圖 62 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1531 之電化學發光(ECL)回應。

圖 63 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1604 之電化學發光(ECL)回應。

圖 64 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1605 之電化學發光(ECL)回應。

圖 65 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1586 之電化學發光(ECL)回應。

圖 66 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1592 之電化學發光(ECL)回應。

圖 67 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1610 之電化學發光(ECL)回應。

圖 68 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1611 之電化學發光(ECL)回應。

圖 69 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1612 之電化學發光(ECL)回應。

圖 70 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1613 之電化學發光(ECL)回應。

圖 71 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1614 之電化學發光(ECL)回應。

圖 72 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1615 之電化學發光(ECL)回應。

圖 73 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1567 之電化學發光(ECL)回應。

圖 74 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1572 之電化學發光(ECL)回應。

圖 75 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1576 之電化學發光(ECL)回應。

圖 76 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1578 之電化學發光(ECL)回應。

圖 77 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1579 之電化學發光(ECL)回應。

圖 78 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1641 之電化學發光(ECL)回應。

圖 79 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1642 之電化學發光(ECL)回應。

圖 80 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1643 之電化學發光(ECL)回應。

圖 81 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1644 之電化學發光(ECL)回應

圖 82 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1645 之電化學發光(ECL)回應。

圖 83 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1646 之電化學發光(ECL)回應。

圖 84 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1647 之電化學發光(ECL)回應。

圖 85 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1648 之電化學發光(ECL)回應。

圖 86 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1649 之電化學發光(ECL)回應。

圖 87 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1650 之電化學發光(ECL)回應。

圖 88 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1651 之電化學發光(ECL)回應。

圖 89 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1652 之電化學發光(ECL)回應。

圖 90 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1653 之電化學發光(ECL)回應

圖 91 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1654 之電化學發光(ECL)回應。

圖 92 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1655 之電化學發光(ECL)回應。

圖 93 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1329 之電化學發光(ECL)回應。

圖 94 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1331 之電化學發光(ECL)回應。

圖 95 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1718 之電化學發光(ECL)回應。

圖 96 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1719 之電化學發光(ECL)回應。

圖 97 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1720 之電化學發光(ECL)回應。

圖 98 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1721 之電化學發光(ECL)回應。

圖 99 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1671 之電化學發光(ECL)回應。

圖 100 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1670 之電化學發光(ECL)回應。

圖 101 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1711 之電化學發光(ECL)回應。

圖 102 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1712 之電化學發光(ECL)回應。

圖 103 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1713 之電化學發光(ECL)回應。

圖 104 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1722 之電化學發光(ECL)回應。

圖 105 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1723 之電化學發光(ECL)回應。

圖 106 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1724 之電化學發光(ECL)回應。

圖 107 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1725 之電化學發光(ECL)回應。

圖 108 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1675 之電化學發光(ECL)回應。

圖 109 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1714 之電化學發光(ECL)回應。

圖 110 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1715 之電化學發光(ECL)回應。

圖 111 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1716 之電化學發光(ECL)回應。

圖 112 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1717 之電化學發光(ECL)回應。

圖 113 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1683 之電化學發光(ECL)回應。

圖 114 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1756 之電化學發光(ECL)回應。

圖 115 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1757 之電化學發光(ECL)回應。

圖 116 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1758 之電化學發光(ECL)回應。

圖 117 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1759 之電化學發光(ECL)回應。

圖 118 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1681 之電化學發光(ECL)回應。

圖 119 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1749 之電化學發光(ECL)回應。

圖 120 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1750 之電化學發光(ECL)回應。

圖 121 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1751 之電化學發光(ECL)回應。

圖 122 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1760 之電化學發光(ECL)回應。

圖 123 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1761 之電化學發光(ECL)回應。

圖 124 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1762 之電化學發光(ECL)回應。

圖 125 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1763 之電化學發光(ECL)回應。

圖 126 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1752 之電化學發光(ECL)回應。

圖 127 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1753 之電化學發光(ECL)回應。

圖 128 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1754 之電化學發光(ECL)回應。

圖 129 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1755 之電化學發光(ECL)回應。

圖 130 顯示圖形表示之來自 30 個各別 RA 患者對抗變異體 F1685 之電化學發光(ECL)回應。

圖 131 顯示圖形表示於人類 FcRn 基因轉殖小鼠注射 Fv4-IgG1、Fv4-F1243 與 Fv4-F1245 後之歷時血漿抗體濃度。

圖 132 顯示圖形表示於人類 FcRn 基因轉殖小鼠注射 Fv4-IgG1、Fv4-F1243 與 Fv4-F1245 後以及於對照小鼠(無抗體注射)之歷時血漿抗原(hsIL-6R)濃度。

圖 133 顯示圖形表示之於人類 FcRn 基因轉殖小鼠注射 Fv4-IgG1、Fv4-F1389 後之歷時血漿抗體濃度。

圖 134 顯示 SPR 分析之感應圖譜(sensorgram)。抗-hIgA 抗體的 hIgA 結合係於不同條件(pH、Ca-濃度)中分析。

圖 135 顯示圖形表示於人類 FcRn 基因轉殖小鼠注射 GA2-F760 與 GA2-F1331 後之歷時血漿抗體濃度。

圖 136 顯示圖形表示於人類 FcRn 基因轉殖小鼠注射 GA2-F760 與 GA2-F1331 後之歷時血漿 hIgA 濃度。

圖 137 顯示圖形表示於人類 FcRn 基因轉殖小鼠注射 278-F760 與 278-F1331 後之歷時血漿抗體濃度。

圖 138 顯示圖形表示之於人類 FcRn 基因轉殖小鼠注射 278-F760 與 278-F1331 後之歷時血漿 hIgE(Asp6)濃度。

### 【實施方式】

【0013】說明本發明的材料與方法之前，應了解該等說明僅為例示且不意圖限制。亦應了解本發明不限定為本文所揭示之特定尺寸、形狀、維度、材料、方法、過程等，期可根據常規試驗及/或最適化而加以變化。用於說明的詞語僅為了敘述特定態樣或具體例的目的，且不意圖限制本發明之範疇，本發明之範疇僅由隨附之申請專利範圍予以界定。除非具體指明，本文中所使用之所有技術與科學用語具有屬於此項技術領域中具有通常知識者通常認識之相同意義。矛盾的情況時，以本發明說明書，包括定義，為基準。

【0014】本說明書中所述及之各文獻、專利或專利申請案的揭示內容，以參考方式併入本文。然而，此處所列者不應被理解為承認因優點或先前發明之早於本發明的揭示內容而影響本發明的權利。

【0015】除非具體指明，使用於本文之單字「一」、「一者」及「該」意指「至少一個」。

【0016】揭示於專利 WO/2011/122011 的研究已顯示於 pH7.4 對 FcRn 具有增加的結合之抗原-結合分子(例如抗-IL6 受體抗體)能由血漿清除抗原且降低血漿中之總抗原濃度，且因而可藉由 pH-依賴性抗原結合(於 pH7.4 於血漿中結合至抗原且於 pH 6.0 於酸性內體中解離該抗原)或藉由離子化鈣濃度-依賴性抗原結合(以高離子化鈣濃度於血漿中結合至抗原且以低離子化鈣濃度於內體中解離該抗原)改良抗原清除的效率(參照圖 1B)。相較於傳統抗體，藉由於中性 pH 對於 FcRn 具有改良的結合親和性的 pH-依賴性抗原結合抗體由血漿之抗原清除

機制係顯示於圖 1A。

【0017】本發明提供於 FcRn-結合域之新的胺基酸取代而增加抗原-結合分子於酸性與中性 pH 範圍之 FcRn 結合活性，其中該 FcRn-結合活性於中性 pH 範圍強於完整 IgG 或包含完整 FcRn-結合域之抗原-結合分子之一者(例如強於 3200nM)。經改質抗原-結合分子於其投藥後相對於包含相同抗原-結合域而為完整人類 IgGFcRn-結合域之對照抗原-結合分子，可降低血漿中之總抗原濃度。

【0018】Fc 受體為免疫細胞之表面蛋白質，免疫細胞例如天然殺手細胞、巨噬細胞、中性球與肥大細胞。其等結合至抗體之 Fc(片段，可結晶)區域，該區域與受感染細胞或侵入病原接觸且刺激吞噬性細胞或細胞毒性細胞以破壞微生物，或藉由抗體-媒介之吞噬作用或抗體-依賴性細胞-媒介的細胞毒性以破壞受感染細胞。

【0019】有數種類型之 Fc 受體，其係根據其所辨識之抗體類型而分類。本文中，詞語「FcRn」意指結合至 IgG 之新生兒 Fc 受體，結構類似於 MHC 第 I 型蛋白質，且於人類係由 FCGRT 基因編碼。

【0020】如使用於本文之詞語「FcRn 結合域」意指直接或間接結合至 FcRn 的蛋白質域。較佳地，該 FcRn 為哺乳動物 FcRn，更較佳為人類 FcRn。直接結合至 FcRn 的 FcRn 結合域為抗體 Fc 區域。同時，能結合至例如白蛋白或 IgG 之具有人類 FcRn-結合活性之多肽的區域，可經由白蛋白、IgG 等間接結合至人類 FcRn。因此，該等人類 FcRn-結合域可為結合至具

有人類 FcRn-結合活性之多肽的區域。

【0021】如使用於本文之詞語「Fc 區域」或「抗原-結合分子之 Fc 區域」意指直接結合至 FcRn 的 FcRn-結合域，較佳為哺乳動物 FcRn，更較佳為人類 FcRn。特別地，Fc 區域為抗體之 Fc 區域。較佳地，該 Fc 區域為哺乳動物 Fc 區域，更較佳人類 Fc 區域。更特別地，本發明之 Fc 區域為包含人類免疫球蛋白的第 2 及第 3 恆定域(CH2 與 CH3)的 Fc 區域，更較佳為鉸鏈區、CH2 與 CH3。較佳地，該免疫球蛋白為 IgG。較佳地，該 Fc 區域為人類 IgG1 之 Fc 區域。

【0022】本發明提供具有經改質 FcRn-結合域之抗原-結合分子，其中該抗原-結合分子相較於具有完整 FcRn-結合域之抗原-結合分子，於中性 pH 範圍具有增加的 FcRn-結合活性。

忒別地，本發明提供具有經改質 FcRn-結合域之抗原-結合分子，該 FcRn-結合域於選自下述所成群組之一個或多個位置具有胺基酸取代：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU25、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 與 EU436。本發明之抗原-結合分子亦可於額外的位置包含取代。例如，該抗原-結合分子除了於上述一個或多個位置之取代之外，可包含於位置 EU256 之取代。較佳地，於位置 EU256 之胺基酸係經麩胺酸取代。

【0023】除非另行指明，詞語「結合親和性」或「結合活性」意指藉由測定二物質所形成之複合物之解離常數(KD)時之該二物質之間的非共價交互作用強度。結合蛋白質(或「配體」)，例如對於特定標靶分子(例如 FcRn)可具有 KD 小於  $10^{-5}$ 、

$10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  或  $10^{-8}$  M。結合配體對於標靶於第一 pH 範圍之相較於對於標靶於第二 pH 範圍之較高親和性，可藉由於第一 pH 範圍結合標靶之數值  $KD$ ，較於第二 pH 範圍結合標靶之數值  $KD$  為小而予以指示。結合親和性之差異可為至少 1.5、2、3、4、5、10、15、20、50、70、80、100、500 或 1000 倍。結合親和性可藉由各種方法測定，包含表面等離子共振、平衡透析、膠體過濾、ELISA 或光譜(例如使用螢光分析)。

**【0024】** FcRn-結合域於 pH 範圍對於 FcRn 之增加的結合親和性係相應於與完整 FcRn-結合域所測量的 FcRn-結合親和性比較時，所測量的增加的 FcRn-結合親和性。結合親和性之  $KD(\text{完整})/KD(\text{變異體})$  的差異至少為 1.5、2、3、4、5、10、15、20、50、70、80、100、500 或 1000 倍。FcRn-結合域對於 FcRn 之增加的結合親和性可於酸性或中性 pH 範圍。

**【0025】** 詞語「包含完整 FcRn 結合域之抗原-結合分子」意指包含未經改質 FcRn-結合域之抗原-結合分子。如使用於本文之詞語「完整 IgG FcRn-結合域」意指人類 IgG 之未經改質 FcRn-結合域。特別地，該 FcRn-結合域為完整人類 IgG 之 FcRn-結合域。較佳地，完整 FcRn-結合域為完整 Fc 區域。詞語「包含完整 Fc 區域之抗體」意指包含未經改質 Fc 區域之抗體。該源自未經改質 Fc 區域之抗體較佳為 IgG。更較佳地，其為人類 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4，又更較佳地為人類 IgG1。本發明之特別較佳具體例中，包含完整 Fc 區域之抗體為包含未經改質 Fc 區域之抗體。包含完整 Fc 區域之抗體可為完整人 IgG。

【0026】如使用於本文之詞語「完整 IgG」意指未經改質 IgG 且不限於特定類型之 IgG。此意味人類 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 或其同種異型變異體可使用作為「完整人類 IgG」，只要其可於酸性 pH 範圍結合至人類 FcRn。較佳地，「完整 IgG」為人類 IgG1。較佳地，完整 IgG 為包含野生型 Fc 區域之 IgG。

【0027】本發明內容中，抗原-結合分子於中性 pH 範圍之增加的 FcRn-結合活性較佳強於 KD 3.2 微莫耳，較佳地，於中性 pH 範圍之增加的 FcRn-結合活性強於 700 奈米莫耳，更較佳地強於 500 奈米莫耳以及最較佳地強於 150 奈米莫耳。

【0028】於中性 pH 範圍之本發明抗原-結合分子增加的 FcRn-結合活性一般比完整 IgG 之 FcRn-結合活性強於約 2-倍至約 100-倍的範圍。較佳地，於酸性 pH 範圍之抗原-結合分子增加的 FcRn-結合活性比完整 IgG 之 FcRn-結合活性強於至少 10-倍。更較佳地，於中性 pH 範圍之本發明抗原-結合分子增加的 FcRn-結合活性比完整 IgG 之 FcRn-結合活性強於至少 20-倍。

【0029】如使用於本文之詞語「中性 pH 範圍」與「中性 pH」，典型地意指 pH 6.7 至 pH 10.0，較佳地為 pH 7.0 至 pH 8.0 內之任何 pH 值，其實例包括 pH 7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9 與 8.0。特別較佳的酸性 pH 值為 pH 7.4，其接近活體內之血漿(血液)pH。

【0030】如使用於本文之詞語「酸性 pH 範圍」與「酸性 pH」，典型地意指 pH 4.0 至 pH 6.5，較佳地為 pH 5.5 至 pH 6.5 內之任何 pH 值，其實例包括 pH 5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、

6.1、6.2、6.3、6.4 與 6.5。特別較佳的酸性 pH 值為 pH 5.8 至 pH 6.0 的範圍，其接近活體內之早期內體之 pH。

【0031】胺基酸位置意指此應用中，除非另行指明，如「EU387」或「位置 387」為根據稱為 EU 編號系統流程之編號 (Kabat, E. A., T. T. Wu, H. M. Perry, K. S. Gottesman, C. Foeler. 1991. Sequences of Proteins of Immunological Interest. No. 91-3242 U. S. Public Health Services, National Institutes of Health, Bethesda) 以及意指 FcRn-結合域的位置，特別是 Fc 區域。於類似方式中，取代係顯示為例如「EU387R」或「EU440E」，其中在「EU」之後所提供數字指示根據 EU 編號之取代位置以及在數字之後的字母為以單一字母碼所提供之經取代之胺基酸。取代可書寫成(胺基酸 1)-位置(胺基酸 2)，其中第 1 個胺基酸為經取代之胺基酸以及第 2 個胺基酸為於特定位置取代之胺基酸。

【0032】如使用於本文之詞語「取代」與「胺基酸之取代」意指於胺基酸序列之胺基酸以另一者置換，其中後者係不同於經置換之胺基酸。用於置換胺基酸的方法為此項技術領域者所習知且包括，但不限於，編碼該胺基酸序列之核苷酸序列的突變。更具體地，於 FcRn-結合域之胺基酸取代意指相對於親代之胺基酸序列之胺基酸置換。已具有所欲取代之經改質 FcRn-結合域亦包括於本發明之 FcRn-結合域。親代 FcRn-結合域為具有於位置 EU238 之脯胺酸、於位置 EU250 之蘇胺酸、於位置 EU252 之甲硫胺酸、於位置 EU254 之絲胺酸、於位置 EU255 之精胺酸、於位置 EU256 之蘇胺酸、於位置 EU258 之麩胺酸、

於位置 EU286 之天冬醯胺、於位置 EU307 之蘇胺酸、於位置 EU308 之纈胺酸、於位置 EU309 之白胺酸、於位置 EU311 之麩胺醯胺、於位置 EU315 之天冬醯胺、於位置 EU387 之脯胺酸、於位置 EU422 之纈胺酸、於位置 EU424 之絲胺酸、於位置 EU426 之絲胺酸、於位置 EU428 之甲硫胺酸、於位置 EU433 之組胺酸、於位置 EU434 之天冬醯胺、於位置 EU436 之酪胺酸、於位置 EU438 之麩胺醯胺與於位置 EU440 之絲胺酸且於中性 pH 對於 FcRn 無或為低的親和性(弱於 3200nM)之 FcRn-結合域。親代 FcRn-結合域可包含於其他位置之取代，但較佳地，親代 FcRn-結合域係未經改質。較佳地，親代 FcRn 結合域為 Fc 區域(親代 Fc 區域)。較佳地，親代 Fc 區域細衍生自哺乳動物抗體；更較佳地，親代 Fc 區域為人類抗體之 Fc 區域。本文中人類抗體之 Fc 區域較佳意指人類 Fc 區域。

親代 Fc 區域較佳為完整 Fc 區域，更較佳為人類完整 Fc 區域。較佳地，親代 Fc 區域為 IgG 之 Fc 區域，更較佳為人類 IgG。甚至更較佳地，親代 Fc 區域為包含野生型鉸鏈區、野生型 CH2 與野生型 CH3 知人類 Fc 區域。本發明之內容中，詞語親代抗體意指包含親代 Fc 區域之抗體。

**【0033】** 親代抗原-結合分子包括，但不限於，受體蛋白質(膜結合受體與可溶性受體)、辨識例如細胞表面標記之膜抗原的抗體以及辨識例如細胞激素之可溶性抗原的抗體。

**【0034】** 如使用於本文之詞語「親代抗原-結合分子」意指具有親代 FcRn-結合域之抗原-結合分子。「親代抗原-結合分子」之來源並無限定且可由任何有機體獲得：非人類的動物或

人類。較佳地，有機體係選自小鼠、大鼠、天竺鼠、倉鼠、長爪沙鼠、貓、兔、犬、山羊、綿羊、牛、馬、駱駝與非人類靈長類。於另一具體例中，「親代抗原-結合分子」亦可由食蟹猴、狨猴、獼猴、黑猩猩或人類化獲得。親代 IgG 可為天然產生的 IgG，或天然產生的 IgG 之變異體或工程化版本。親代 IgG 可意指多肽本身、包含親代 IgG 之組成物、或編碼其等之胺基酸序列。應注意的是「親代 IgG」包括已市售，如下文所概述之重組所製造之 IgG。較佳地，「親代 IgG」係由人類 IgG1 獲得，但不限於特定之 IgG 亞型。此意味人類 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 可合適地使用作為「親代 IgG」。於相同方式中，來自前文所敘述之任何有機體之 IgG 的任何亞型可較佳地使用作為「親代 IgG」。天然產生的 IgG 之變異體或工程化版本的實例係揭示於 Curr Opin Biotechnol. 2009 Dec; 20(6): 685-91, Curr Opin Immunol. 2008 Aug; 20(4): 460-70, Protein Eng Des Sel. 2010 Apr; 23(4): 195-202、專利 WO 2009/086320、WO 2008/092117、WO 2007/041635 與 WO 2006/105338，但不限於該等。

**【0035】** 本發明之 FcRn-結合域或 Fc 區域可包含於二個或多個位置之取代，於本文中意指「取代之組合」。例如，由組合「EU424 / EU434 / EU436」所定義之 Fc 區域為包含於位置 EU424、EU434 與 EU436 之取代的 Fc 區域。

**【0036】** 取代胺基酸(該胺基酸係具有其中逾親代 FcRn-結合域之胺基酸係經取代)可為任何胺基酸，除非本文中特別指明，包括但不限於下述所成群組：丙胺酸(Ala, A)、精胺酸(arg,

R)、天冬醯胺(asn, N)、天冬胺酸(asp, D)、半胱胺酸(cys, C)、麩胺酸(glu, E)、麩胺醯胺(gln, Q)、甘胺酸(gly, G)、組胺酸(his, H)、異白胺酸(ile, I)、白胺酸(leu, L)、離胺酸(lys, K)、甲硫胺酸(met, M)、苯丙胺酸(phe, F)、脯胺酸(pro, P)、絲胺酸(ser, S)、蘇胺酸(thr, T)、色胺酸(trp, W)、酪胺酸(tyr, Y)與纈胺酸(val, V)。較佳地，於位置 EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438 與 EU440 之任一者之該取代胺基酸係選自下述所成群組：丙胺酸(Ala, A)、精胺酸(arg, R)、麩胺酸(glu, E)、麩胺醯胺(gln, Q)、天冬胺酸(asp, D)、絲胺酸(ser, S)、蘇胺酸(thr, T)、酪胺酸(tyr, Y)與離胺酸(lys, K)。

**【0037】** 本發明之較佳具體例中，本發明之抗原-結合分子具有經改質 FcRn-結合域其包含與經取代者為不同胺基酸之胺基酸取代

於位置 EU252 與 EU434 以及

於選自下述所成群組之一個或多個位置： EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 與 EU436。

**【0038】** 本文中除非具體指明，取代胺基酸可為任何胺基酸。對於位置 EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 與 EU436 之取代胺基酸顯示於表 1。

## 【0039】 [表 1]

較佳取代胺基酸

位置(根據 EU 編號流程)	取代胺基酸
EU238	天冬胺酸
EU250	纈胺酸
EU252	酪胺酸
EU254	蘇胺酸
EU255	白胺酸
EU256	麩胺酸
EU258	天冬胺酸或異白胺酸
EU286	麩胺酸
EU307	麩胺醯胺
EU308	脯胺酸
EU309	麩胺酸
EU311	丙胺酸或組胺酸
EU315	天冬胺酸
EU428	異白胺酸
EU433	丙胺酸、離胺酸、脯胺酸、精胺酸或絲胺酸
EU434	酪胺酸或色胺酸
EU436	異白胺酸、白胺酸、纈胺酸、蘇胺酸或苯丙胺酸

【0040】 較佳地，本發明之經改質 FcRn-結合域包含製烤一個表 1 所示之胺基酸取代。可使用 FcRn-結合域而無任何改變，只要其以具有至少一個上述所提供之胺基酸於特定位置且該 FcRn-結合域於酸性與中性 pH 範圍具有人類 FcRn-結合活性，藉此使該 FcRn-結合活性於中性 pH 範圍為增加的。

【0041】 較佳具體例中，本發明之經改質抗原-結合分子包含於 FcRn-結合域之三個或更多個位置之改質，其中該三個或更多個位置為表 2、4 至 7 所示之組合之一。

## 【0042】 [表 2]

FcRn-結合域中取代位置之較佳組合

a)	EU252 / EU434 / EU436,
b)	EU252 / EU434 / EU307 / EU311,
c)	EU252 / EU434 / EU315,
d)	EU252 / EU434 / EU308,
e)	EU252 / EU434 / EU238,
f)	EU252 / EU434 / EU436 / EU307 / EU311,
g)	EU252 / EU434 / EU255
h)	EU252 / EU434 / EU258
i)	EU252 / EU434 / EU433
j)	EU252 / EU434 / EU255 / EU258

【0043】於更較佳具體例中，本發明之抗原-結合分子包含於 FcRn-結合域之三個或更多個胺基酸取代，其中該三個或更多個取代為表 3、12、14 與 17 至 20 所示之組合之一。

【0044】 [表 3]

FcRn-結合域中之較佳取代組合

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

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

#### 【0045】 安定性、免疫原性與凝集物形成

藉由導入取代而工程化 FcRn-結合域可降低抗原-結合分子之安定性(WO/2007/092772)。藥物蛋白質的安定性對於製造醫藥品為重要的，此乃因具有不佳安定性之蛋白質於儲存期間傾向容易凝集。因此，因於 Fc 區域之取代所引起的降低的

安定性將使安定配方物的開發困難(WO2007/092772)。

【0046】此外，具有單體物種與高分子量物種之藥物蛋白質的純度，對於醫藥品開發亦為重要的。於蛋白質 A 純化後之野生型 IgG1 不含有顯著量的高分子量物種，但藉由導入取代而工程化之 FcRn-結合域 考造成大量的高分子量物種。於此情況中，高分子量物種 需要藉由純化過程由大量藥物物質移除，在純化過程的開發中此點可能為困難的。

【0047】再者，蛋白質醫藥品於人類之免疫原性為重要的，此乃因抗-藥物抗體的存在將造成藥物由身體的廓清且因而損失治療藥效(IDrugs 2009； 12：233-7.)。當取代經導入至野生型 Fc 域(如 IgG1 Fc 域)時，該經改質序列扁乘非-人類序列。該等經改質序列將藉由 MHC 第 II 型呈示且因此於人類患者為免疫原性的。

【0048】蛋白質將不會被開發作為藥物，如果該等蛋白質包含顯現不佳安定性與純度的 Fc 變異體，以及不佳的免疫原性將阻礙臨床發展。因此本發明之一目的係改良

於 pH7.4 的 FcRn 結合親和性而不損失顯著的安定性；  
增加高分子量物種 比例的量，以及  
增加免疫原性風險(抗-藥物抗體形成的風險)。

【0049】(群 1)

因此，本發明亦提供 原-結合分子其包含在 FcRn-結合域之胺基酸取代於位置 EU252、EU434、EU307 與 EU311，具有於 pH7 對於 FcRn 的結合活性為高於 15nM，熔解溫度 T<sub>m</sub> 為 57.5 °C 或更高，HMW 低於 2%以及低免疫原性，其中低免疫原

性係相當於以 Epibase(Lonza)所測定之分數低於 500。

較佳地，抗原-結合分子包含於 FcRn-結合域中胺基酸取代於四個或更多個位置，其中該四個或更多個位置為下述所成群組之組合

EU252/ EU434 / EU307 / EU311 / EU436，以及

EU252/ EU434 / EU307 / EU311 / EU436 與選自 EU286、EU308 與 EU428 所成群組之一個或多個位置的組合。

【0050】較佳組合示於表 4。

【0051】[表 4]

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

特別較佳為表 4 之組合 a)、g)、h)與 i)。

【0052】於更較佳具體例中，經改質 FcRn-結合域包含：

於位置 EU252 之酪胺酸、於位置 EU286 之麩胺酸、於位置 EU307 之麩胺醯胺、於位置 EU311 之丙胺酸、於位置 EU434 之酪胺酸以及於位置 EU436 之纈胺酸； 或

於位置 EU250 之纈胺酸、於位置 EU252 之酪胺酸、於位置 EU307 之麩胺醯胺、於位置 EU308 之脯胺酸、於位置 EU311 之丙胺酸、於位置 EU434 之酪胺酸與於位置 EU436 之纈胺酸

； 或

於位置 EU250 之纈胺酸、於位置 EU252 之酪胺酸、於位置 EU286 之麩胺酸、於位置 EU307 之麩胺醯胺、於位置 EU308 之脯胺酸、於位置 EU311 丙胺酸、於位置 EU434 之酪胺酸與於位置 EU436 之纈胺酸； 或

於位置 EU250 之纈胺酸、於位置 EU252 之酪胺酸、於位置 EU286 之麩胺酸、於位置 EU307 之麩胺醯胺、於位置 EU308 脯胺酸、於位置 EU311 之丙胺酸、於位置 EU434 之酪胺酸與於位置 EU436 之纈胺酸。

#### 【0053】 (群 2)

本發明亦提供抗原-結合分子包含於 FcRn-結合域中胺基酸取代於三個或更多個位置，其中該三個或更多個位置為下述所成群組之組合之一者： a) EU252/EU434/EU307/EU311；與 b) EU252/EU434/EU308； 其中該抗原-結合分子於中性 pH 之 FcRn-結合活性為 15 至 50nM，T<sub>m</sub> 高於 60°C，HMW 低於 2%且其中該抗原-結合分子具有低免疫原性，據此低免疫原性係相當於以 Epibase(Lonza)測定之分舒數低於 500。

【0054】 較佳具體例中，胺基酸取代係於四個或更多個位置，其中該四個或更多個位置為表 5 所示組合之一。

#### 【0055】 [表 5]

較佳組合

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

【0056】更較佳的為抗原-結合分子包含四個或更多個胺基酸取代，其中該四個或更多個取代為下屬所成群組之組合之一：

於位置 EU252 之酪胺酸、於位置 EU286 之麩胺酸、於位置 EU307 之麩胺醯胺、於位置 EU311 之丙胺酸與於位置 EU434 之酪胺酸；

於位置 EU252 之酪胺酸、於位置 EU254 之蘇胺酸、於位置 EU286 之麩胺酸、於位置 EU307 之麩胺醯胺、於位置 EU311 之丙胺酸與於位置 EU434 之酪胺酸；

於位置 EU252 之酪胺酸、於位置 EU307 之麩胺醯胺、於位置 EU311 之丙胺酸、於位置 EU434 之酪胺酸與於位置 436 之異白胺酸；

於位置 EU252 之酪胺酸、於位置 EU254 之蘇胺酸、於位置 EU286 之麩胺酸、於位置 EU307 之麩胺醯胺、於位置 EU311 之丙胺酸、於位置 EU434 之酪胺酸與於位置 EU436 之異白胺酸；

於位置 EU250 之纈胺酸、於位置 EU252 之酪胺酸、於位置 EU254 之蘇胺酸、於位置 EU308 之脯胺酸、於位置 EU434 之酪胺酸與於位置 EU436 之纈胺酸；

於位置 EU250 之纈胺酸、於位置 EU252 之酪胺酸、於位置 EU307 之麩胺醯胺、於位置 EU311 之丙胺酸、於位置 EU434 之酪胺酸與於位置 EU436 之纈胺酸；

於位置 EU252 之酪胺酸、於位置 EU307 之麩胺醯胺、於位置 EU311 之丙胺酸、於位置 EU434 之酪胺酸與於位置 EU436 之纈胺酸；

於位置 EU250 之纈胺酸、於位置 EU252 之酪胺酸、於位置 EU308 之脯胺酸、與於位置 EU434 之酪胺酸； 以及

於位置 EU250 之纈胺酸、於位置 EU252 之酪胺酸、於位置 307 之麩胺醯胺、於位置 EU308 之脯胺酸、於位置 EU311 之丙胺酸與於位置 EU434 之酪胺酸。

**【0057】** (群 3)

本發明亦提供抗原-結合分子包含於 FcRn-結合域之胺基酸取代

於位置 EU252 /EU434； 以及

於位置 EU436 及/或於位置 EU254 及/或於位置 EU315；

且於 pH 7 具有 FcRn-結合活性為 50 至 150nM， $T_m$  高於 63 °C，HMW 低於 2%且其中該抗原-結合分子具有低免疫原性，據此低免疫原性係相當於以 Epibase(Lonza)測定之分數低於 250。

**【0058】** 較佳地，胺基酸取代為三個或更多個位置，其中該三個或更多個位製為表 6 所適組合之一。

**【0059】** [表 6]

較佳組合

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

【0060】於較佳具體例中，該經改質抗原-結合分子包含三個或更多個胺基酸取代，其中該三個或更多個胺基酸取代為下述所成群組之組合之一：

於位置 EU252 之酪胺酸、於位置 EU315 之天冬胺酸與於位置 EU434 之酪胺酸；

於位置 EU252 之酪胺酸、於位置 EU434 之酪胺酸與於位置 EU436 之異白胺酸；

於位置 EU252 之酪胺酸、於位置 EU434 之酪胺酸與於位置 EU436 之白胺酸；

於位置 EU252 之酪胺酸、於位置 EU434 之酪胺酸與於位置 EU436 之纈胺酸； 以及

於位置 EU252 之酪胺酸、於位置 EU254 之蘇胺酸、於位置 EU434 之酪胺酸與於位置 EU436 之異白胺酸。

【0061】(群 4)

本發明進一步提供抗原-結合分子其包含於 FcRn-結合域之三個或更多個胺基酸取代，其中該三個或更多個胺基酸取代為表 7 所示組合之一。該經改質抗原-結合分子於 pH 7 具有 FcRn-結合活性為 150 至 700nM，T<sub>m</sub> 高於 66.5 °C，HMW 低於 2%且其中該抗原-結合分子具有低免疫原性，據此低免疫原性係相當於以 Epibase(Lonza)測定之分數低於 250。

【0062】[表 7]

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

**【0063】** 較佳地，經改質抗原-結合分子包含三個或更多個取代，其中該三個或更多個取代為下述所成群組之組合之一

於位置 EU307 之麩胺醯胺、於位置 EU311 之組胺酸與於位置 EU434 之酪胺酸；

於位置 EU307 之麩胺醯胺、於位置 EU309 之麩胺酸、於位置 EU311 之丙胺酸、於位置 EU434 之酪胺酸；

於位置 EU307 之麩胺醯胺、於位置 EU309 之麩胺酸、於位置 EU311 之組胺酸、於位置 EU434 之酪胺酸；或

於位置 EU250 之纈胺酸、於位置 EU252 之酪胺酸、於位置 EU434 之酪胺酸、於位置 EU436 之纈胺酸。

**【0064】** 預先存在之抗-藥物抗體

抗體中之胺基酸的取代可產生負向結果，例如至料抗體之免疫原性增加，換言之，其可造成細胞激素風暴及/或抗-藥物抗體(ADA)的產生。由於 ADA 可影響治療抗體的藥效與藥物動力學，而且有時候導致嚴重的副作用，治療抗性體的臨床利用與藥效會受到限制。許多因子影響治療抗體之免疫原性，以及起效子 T-細胞抗原決定基的存在為因子之一。同樣地，對抗治療抗體之預先存在之抗體的出現亦可能成為問題。該預先存在之抗體的一實例為類風濕性因子(RF)，自體抗體(抗體相關於對抗自體蛋白質)對抗抗體(亦即 IgG)的 Fc 部分。類風濕性因子已見於特別是罹患全身性紅斑狼瘡(SLE)或風濕性關節炎

的患者。關節炎患者中，RF 與 IgG 聯合以形成免疫複合物其有助於疾病進程。近來，經報導具有 Asn434His 突變之人源化抗-C IgG1 抗體引起顯著的類風濕性因子結 (Clin Pharmacol Ther. 2011 Feb; 89(2): 283-90(NPL 9))。詳細的研究已證實於人類 IgG1 之 Asn434His 突變，相較於親代人類 IgG1，增加類風濕性因子對該抗體之 Fc 區域的結合。

**【0065】** RF 為對抗人類 IgG1 的多株自體-抗體，以及於人類 IgG 序列之 RF 的抗原決定基於純株之間變異，但 RF 抗原決定機似乎位於 CH2/CH3 介面區域以及 CH3 域可與 FcRn 節和抗原決定基重疊。因此，於中性 pH 增加對 FcRn 的結合親和性的突變，亦可能增加對 RF 之特定純株的結合親和性。

**【0066】** 因此，較佳為於中性及/或酸性 pH 增加對 FcRn 的結合親和性而不增加治療抗體於中性 pH 對於血漿中預先存在之抗體的結合親和性。

**【0067】** 因此，本發明亦提供抗原-結合分子包含經改質 FcRn-結合域(較佳為經改質 Fc 區域)，藉此相較於包含野生行 Fc 區域之抗原-結合分子的結合親和性，預先存在之 ADA 於中性 pH 的結合活性不顯著增加。經改質 FcRn-結合域(經改質 Fc 區域) 較佳包含胺基酸取代於選自 EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438 與 EU440 所成群組之一個或多個位置。

**【0068】** 上述取代較佳係經導入至於中性或酸性 pH 對於 FcRn 具有增加的親和性之抗原-結合分子的 FcRn-結合域或 Fc 區域，藉此該經改質 FcRn-結合域 或 Fc 區域於中性 pH 對於

預先存在之 ADA 具有增加的結合活性。取代的效果為對於預先存在的 ADA 的結合活性的降低。因此，於較佳具體例中，相較於於中性或酸性 pH 對於 FcRn 具有增加的結合活性以及於中性 pH 範圍對於預先存在之抗-藥物抗體具有增加的活性之 FcRn-結合域或 Fc 區域，本發明之經改質 FcRn-結合域或經改質 Fc 區域對於預先存在之 ADA 具有降低的結合活性。較佳地，於中性 pH 對於 FcRn 與預先存在之 ADA 具有增加的結合活性之抗原-結合分子為抗原-結合分子包含胺基酸取代於如上所述之選自下述所成群組之一個或多個位置： EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 與 EU436。除了上述之一個或多個位置外，亦可包含取代於位置 EU256。較佳地，胺基酸於位置 EU256 係以麩胺酸取代。

**【0069】** 因此，本發明亦提供包括於中性或酸性 pH 對於 FcRn 具有增加的親和性之經改質 Fc 區域之抗原-結合分子，藉此相較於包含野生型 Fc 區域之抗原-結合分子的結合親和性，於中性 pH 對於預先存在之抗-藥物抗體 (ADA) 之親和性無顯著增加。於較佳具體例中，本發明提供包括於中性或酸性 pH 對於 FcRn 具有增加的親和性之經改質 Fc 區域之抗原-結合分子，其包含胺基酸取代於選自下述所成群組之一個或多個位置： EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438 與 EU440。

**【0070】** 較佳地，該包括於中性或酸性 pH 對於 FcRn 具有增加的親和性之經改質 Fc 區域之抗原-結合分子，藉此相較於

對照之抗原-結合分子，於中性 pH 對於預先存在之 ADA 之結合活性無顯著增加，其中該 wherein the 經改質 Fc 區域包含胺基酸取代於選自表 8 所示取代之的一個或多個位置。

【0071】 [表 8]

取代胺基酸

位置	具有下述取代						
EU387	R						
EU422	E	R	S	D	K	T	Q
EU424	E	R	K	N			
EU426	D	Q	A	Y			
EU433	D						
EU436	T						
EU438	E	R	S	K			
EU440	E	D	Q				

【0072】 如使用於本文之詞語「抗-藥物抗體」與「ADA」意指對於位在治療性抗體之抗原決定基具有結合親和性且因而能結該治療性抗體之內源性抗體。如使用於本文之詞語「預先存在之抗-藥物抗體」與「預先存在之 ADA」意指於治療性抗體投藥至患者之前，存在於患者的血液且可偵測的抗-藥物抗體。較佳地，該預先存在之 ADA 為人類抗體。於特別較佳具體例中，該預先存在之 ADA 類風濕性因子，對抗人類 IgG 抗體之 Fc 區域的多株或單株自體抗體。類風濕性因子的抗決定基係位在 CH2/CH3 界面區域以及 CH3 域，但於純株之間有變動。

【0073】 包括於中性或酸性 pH 對於 FcRn 且於中性 pH 對於預先存在之抗-藥物抗體具有增加的親和性之經改質 Fc 區域之抗原-結合分子之 FcRn-結合域區域之抗原-結合分子為包括 FcRn-結合域(或 Fc 區域)之抗原-結合分子，相較於包含完整

FcRn-結合域(或完整 Fc 區域)之抗體，該 FcRn-結合域(或 Fc 區域)經改質以增加抗原-結合分子之 FcRn-結合域(或 Fc 區域)之結合親和性。改質涉及包括，但不限於，於抗原-結合域之 Fc 區域之胺基酸序列的胺基酸取代。包括 FcRn-結合域或 Fc 區域之抗原-結合分子，其對於下述者具有增加的結合活性 a) 於中性 pH 範圍之預先存在之 ADA 以及於中性(在中性 pH 具有增加的 FcRn-結合活性之感興趣的抗原-結合分子的情況)或酸性 pH(在酸性 pH 具有增加的 FcRn-結合活性之感興趣的抗原-結合分子的情況)對於 FcRn，本文中稱為「參考抗體」。「參考抗體」較佳為於選自 EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438 與 EU440 所成群組之一個或多個位置取代胺基酸前之經改質抗原-結合分子，更較佳地為經導入表 8 所示取代之任一者前之經改質抗原-結合分子。「參考抗體」可為抗原-結合分子其包括於 FcRn-結合域之胺基酸取代於選自下述所成群組之一個或多個位置： EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU256、EU258 EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 與 EU436。

**【0074】** 於中性 pH 具有增加的 FcRn-結合活性之「參考抗體」為抗原-結合分子其包括於中性 pH 範圍對於 FcRn 具有增加的親和性的 Fc 區域且於中性 pH 對於預先存在之 ADA 具有增加的親和性，包括於 Fc 區域之胺基酸取代於

位置 EU252 與 EU434； 以及

選自下述所成群組之一個或多個位置： EU238、EU250、EU254、EU255、EU256、EU258、EU286、EU307、EU308、

EU309、EU311、EU315、EU428、EU433 與 EU436。

更較佳地，該包括於中性 pH 對於 FcRn 具有增加的親和性之 Fc 區域且於中性 pH 範圍對於預先存在之 ADA 具有增加的親和性之抗原-結合分子，包括表 9 所示之組合之一。

**【0075】 [表 9]**

於中性 pH 範圍具有增加的 FcRn-結合活性之參考抗體的取代之較佳組合

1	M252Y/N434Y/
2	M252Y/N434Y/Y436V
3	M252Y/N434Y/Y436F
4	M252Y/N434Y/Y436V
5	M252Y/S254T/T256E/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
6	M252Y/S254T/T256E/V308P/N434Y/Y436V
7	M252Y/N434W/Y436V
8	M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V
9	M252Y/S254T/T256E/N286E/N434Y/Y436V
10	M252Y/S254T/R255L/T256E/N434Y/Y436V
11	M252Y/S254T/R255L/T256E/N434Y/Y436V
12	M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/N434Y/Y436V
13	M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/N434Y/Y436V
14	M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V
15	M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V
16	M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V
17	M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V
18	M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V
19	M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V
20	L235R/G236R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V
21	L235R/G236R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V
22	EU238D / EU252Y / EU434Y / EU436V
23	EU252Y / EU434Y / EU436V
24	EU250V/EU252Y/EU434Y/ EU436V/EU307Q/EU308P / EU311A
25	EU252Y / EU434Y / EU436V/ EU235R / EU239K
26	EU252Y / EU434Y
27	EU252Y / EU434Y / EU436V

【0076】於酸性 pH 具有增加的 FcRn-結合活性之「參考抗體」為抗原-結合分子其包括於中性 pH 範圍對於 FcRn 具有增加的親和性的 Fc 區域且於中性 pH 對於預先存在之 ADA 具有增加的親和性，較佳包括取代於

於位置 EU434，或

ii) 於二個或更多個位置，其中該二個或更多個位置為選

自下述所成群組之組合之一： a) EU252/EU254/EU256； b) EU428/EU434；與 c) EU250/EU428。

【0077】較佳地，該包括於酸性 pH 範圍具有增加的親和性之 Fc 區域且於中性 pH 範圍對於預先存在之 ADA 具有增加的親和性之抗原-結合分子包括

取代 M434H； 或

ii) 下述所成群組之組合之一： a) M252Y/S254T/T256E； b) M428L/N434S；與 c) T250Q 與 M428L(EU 編號)。

較佳地，該包括 Fc 區域之抗原-結合分子(該 Fc 區域包括下述取代或組合之一者 a) M252Y/S254T/T256E、 b) M428L/N434S 或 c) T250Q 與 M428L or d) M434H(EU 編號))於酸性 pH 對於 FcRn 具有增加的結合活性而於中性 pH 範圍不增加結合活性。

【0078】對於預先存在之抗-藥物抗體之抗原-結合分子之 Fc 區域的結合活性於目前應用中係於中性 pH 以電化學發光(ECL)表現；然而，其他適合用於測定對於預先存在之 ADA 之結合活性的方法為此項技術領域中具有通常知識者所習知。ECL 分析係舉例說明於 Moxness 等人(Clin Chem、2005、51：1983-85) 以及本發明之實施例。測定對於預先存在之 ADA 之結合活性之分析所使用之條件，可由此項技術領域者予以合適的選擇，且因而不特別限制。

【0079】對於預先存在之 ADA 之增加的或較高的結合親和性，相較於對照抗原-結合分子之對於預先存在之 ADA 之結合親和性為增加的。

**【0080】** 如使用於本文之詞語「對照抗原-結合分子」意指包括完整人類 Fc 區域之抗原-結合分子，較佳為包括完整人類 Fc 區域之抗體或抗體衍生物。

**【0081】** 對於 預先存在之 ADA 之結合親和性可於溫度自 10°C 至 50°C 予以評估。較佳地，應用 15°C 至 40°C 以測定人類 Fc 區域與人類預先存在之 ADA 之間的結合親和性。更較佳地，由 20°C 至 35°C 之任一溫度，例如應用 20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34 與 35 °C 之一者以測定人類 Fc 區域與人類預先存在之 ADA 之間的結合親和性。較佳地，溫度係於 20 與 25°C 之間，更較佳地為 25°C。較佳具體例中，人類預先存在之 ADA 與人類 Fc 區域之間的交互作用係於 pH 7.4(或 pH7.0)且於 25°C 測定。

**【0082】** 本發明之內溶中，詞語「對於預先存在之 ADA 之增加的結合親和性」意指相較於對照抗原-結合分子之對於預先存在之 ADA 所測定之結合親和性，本發明之抗原-結合分子所測定之結合親和性(亦即 KD)的增加。該等對於結合親和性 for a 預先存在之 ADA 之結合親和性的增加可於個別患者或患者群中觀察到。

**【0083】** 如使用於本文之詞語「患者群」或「患者」，不特別限定且包含罹患疾病之所有人類以及對其投藥治療或治療性抗原-結合分子。較佳地，患者為罹患自體免疫疾病者。更較佳地，患者為罹患關節炎疾病或全身性紅斑狼瘡(SLE)者。關節炎疾病特別包括類風濕性關節炎。

**【0084】** 本發明之內容中，於個別患者之對於預先存在之

ADA 的結合活性的顯著增加，相較於對照抗原-結合分子對於預先存在之 ADA 的結合活性，係對應於患者之包括經改質 Fc 區域之治療性抗原-結合分子(亦即，治療性抗體)對於預先存在之 ADA 的結合活性測定增加至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%。相較於對照抗原-結合分子對於預先存在之 ADA 的結合活性，該包括經改質 Fc 區域之抗原-結合分子的結合活性，較佳的該增加為至少 20%、更較佳的該增加為至少 30%，甚至較佳的其至少 40% 以及最較佳的該增加為至少 50%。或者，於患者之對於預先存在之 ADA 的抗原-結合分子的結合活性顯著增加，較佳為 ECL 回應對於該抗原-結合分子多於 250，較佳為對 ECL 之至少 500，更較佳為對 ECL 之至少 1000，最較佳為對 ECL 之至少 2000。更較佳地，相較於對照抗原-結合分子之 ECL 回應該增加為低於 500(更較佳為低於 250)。對照抗原-結合分子之對於預先存在之 ADA 之結合活性與具有經改質 Fc 區域之抗原-結合分子之間的較佳範圍，特別於 ECL 回應由低於 250 達至少 250，由低於 250 達至少 500，由低於 500 達 500 或更高，由低於 500 至 1000 或更多，以及由低於 500 達至少 2000。

**【0085】** 對於預先存在之 ADA 之結合活性的增加，亦可回應於患者族群之部分患者中所測定的增加，相較於中性 pH 對於對照抗原-結合分子具有 ECL 回應至少 500(較佳為至少 250)的部分患者，對抗原-結合分子具有 ECL 回應至少 500(較佳為至少 250)，該抗原-結合分子 a) 於中性或酸性 pH 對於 FcRn 以及 b) 於中性 pH 對於預先存在之 ADA 具有增加的結合活

性。患者族群之部分患者中的「顯著」增加，相較於對於對照抗原-結合分子具有 ECL 回應的部分患者，較佳為增加至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50% 患者，該患者具有包含經改質 Fc 區域之治療性抗原-結合分子於中性 pH 對於類風濕性因子具有 ECL 回應為 500 或更低(較佳為 250 或更高)。較佳地，該增加為至少 20%，更較佳地為至少 30%，甚至更較佳地，其為至少 40% 以及最較佳地為 50% 或更高。

**【0086】** 本發明內容中，對於預先存在之 ADA 之結合親和性的降低意指相較於對參考抗體所測定之結合活性，測定到降低的結合活性(亦即，KD 或 ECL 回應)，該等對於預先存在之 ADA 之結合親和性的降低，可於個別患者或患者族群中觀察。於個別患者中，在中性 pH 之治療性抗原-結合分子對於預先存在之 ADA 的親和性降低，意指 相較於該患者之參考抗體於中性 pH 對於預先存在之 ADA 所測定之結合活性，於中性 pH 測定到降低的結合活性。較佳地，相較於參考抗體於中性 pH 對於預先存在之 ADA 所測定之結合活性，於個別患者之顯著降低為經改質抗原-結合分子對於預先存在之 ADA 之結合活性於中性 pH 測定到降低為至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%。更較佳地，相較於參考抗體，該降低為至少 30%，甚至更較佳為 40% 以及最較佳為 50%。

**【0087】** 或者，於個別患者之經改質抗原-結合分子對於預先存在之 ADA 之結合活性的顯著降低，可測定為相較於參考抗體之 ECL 回應，該抗原-結合分子之 ECL 回應的降低為 500 或更高(較佳地，由 ECL 為 1000 或更高、更較佳地由 ECL 為

2000 或更高), 至低於 500, 較佳地低於 250。較佳的降低為由 ECL 回應之 500 或更高至 ECL 回應之低於 500, 更較佳由至少 250 至低於 250, 甚至更較佳由至少 500 至低於 250。較佳範圍為, 具體地, 由至少 250 至低於 250、由至少 500 至低於 250、由至少 1000 至低於 250、由至少 2000 至低於 250、由至少 500 至低於 500、由至少 1000 至低於 500 以及由至少 2000 至低於 500。

**【0088】** 降低亦可為患者族群中之患者百分比的降低, 該患者族群具有其預先存在之 ADA 於中性 pH 範圍對於經改質抗原-結合分子之增加的結合。換言之, 該降低可測定為相較於對參考抗體之 ECL 回應, 具有其預先存在之 ADA 對經改質抗原-結合分子之 ECL 回應之族群的百分比降低。較佳地, 降低可為相較於具有參考抗體對於預先存在之 ADA 之增加的結合活性之部分患者, 其中之治療性抗原-結合分子對於預先存在之 ADA 具有增加的結合性之患者族群中之部分患者降低至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%, 其中該增加的結合活性係表示為 ECL 回應之 500 或更高, 較佳地為 250 或更高。較佳地該降低為至少 20%, 更較佳地該降低為至少 30%, 甚至更較佳, 其為 40% 以及最較佳地為 50% 或更高。

**【0089】** 較佳具體例中, 本發明之治療性抗原-結合分子於中性 pH 對於預先存在之 ADA 具有低的結合活性。特別地, 本發明之經改質抗原-結合分子於中性 pH 對於預先存在之 ADA 的結合活性, 相較於參考抗體於中性 pH 對於預先存在之 ADA

的結合活性，為顯著降低。更較佳地，本發明之經改質抗原-結合分子於中性 pH 對於預先存在之 ADA 的結合活性，相較於對照抗原-結合分子(具有對於作為對照抗原-結合分子之預先存在之 ADA 約相同活性)之結合活性，為不顯著增加。對於預先存在之 ADA 的低的結合活性或基線親和性，較佳於個別患者之 ECL 回應不低於 500。較佳地，ECL 回應不低於 250。於患者族群中，對於預先存在之 ADA 的低的結合活性，於患者族群之 90%患者中之 ECL 回應不低於 500，更較佳為 95%患者中，最較佳為 98%患者中。

**【0090】** 更較佳具體例中，包括具有於中性或酸性 pH 對於 FcRn 具有增加的勤合性之經改質 FcRn-結合域之抗原-結合分子，其中相較於對照抗原-結合分子，於中性 pH 對於預先存在之 ADA 的結合活性不顯著增加，藉此本發明之經改質 FcRn-結合域包括表 10 所示一個或多個位置或組合之取代。

**【0091】** [表 10]

於 FcRn-結合域中之取代位置及位置組合

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

**【0092】** 更較佳具體例中，本發明之抗原-結合分子包括具有表 11 所示之一個或多個取代或組合之經改質 FcRn-結合域。

## 【0093】 [表 11]

於 FcRn-結合域中之取代及取代組合：

1	EU387R
2	EU422E
3	EU422R
4	EU422S
5	EU424E
6	EU424R
7	EU438E
8	EU438R
9	EU438S
10	EU440E
11	EU422E / EU424R
12	EU422S / EU424R
13	EU438R / EU440E
14	EU422D
15	EU422K
16	EU422T
17	EU422Q
18	EU438K
19	EU440D
20	EU440Q
21	EU438R / EU440D
22	EU438K / EU440E
23	EU438K / EU440D
24	EU424N
25	EU426D
26	EU426A
27	EU426Q
28	EU426Y
29	EU436F
30	EU436T
31	EU433D

【0094】較佳具體例中，具有 a) 於中性或酸性 pH 對於 FcRn 之增加的親和性 b)於中性 pH 對於預先存在之 ADA 之結合親和性相較於對照抗原-結合分子為不顯著增加之包括經改

質 FcRn-結合域之抗原-結合分子，該抗原-結合分子包括表 12 所示取代組合之任一者。

【0095】亦較佳地，於中性 pH 範圍具有增加的 FcRn 結合活性且於中性 pH 對於預先存在之 ADA 之結合親和性相較於包括野生型 Fc 區域之抗原-結合分子為不顯著增加的抗原-結合分子，包括胺基酸取代於 FcRn-結合域於 a) 選自下述所成群組之一個或多個位置：EU387、EU422、EU424、EU438、EU440、EU433，或 b) 二個或更多個位置，其中該二個或更多個位置矽諉組合：EU422/EU424；或 EU438/EU440。更較佳地，該取代為選自表 11 所示組合。

【0096】甚至更較佳地，於中性 pH 範圍對於 FcRn 具有增加的結合活性且於中性 pH 對於預先存在之 ADA 之結合親和性相較於包括野生型 Fc 區域之抗原-結合分子為不顯著增加的抗原-結合分子包括表 12 所示的取代組合之任一者。特別地，於中性 pH 範圍具有增加的 FcRn 結合活性而藉此於中性 pH 對於預先存在之 ADA 之結合親和性不顯著增加的較佳經改質抗原-結合分子 whereby the 結合親和性包括三個或更多個取代於 FcRn-結合域，其中該三個或更多個取代為表 12 所示之組合編號(2)至(26)與(28)至(59)之任一者。

【0097】 [表 12]

於中性 pH 範圍增加 FcRn-結合活性而不顯著地增加對於預先存在之 ADA 的結合活性 之 Fc 區域的取代組合(根據 EU 編號流程所提供的位置)。

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

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

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

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

【0098】本發明亦提供於酸性 pH 範圍對於 FcRn 具有增加的結合活性且於中性 pH 對於預先存在之 ADA 之結合親和性相較於對照抗原-結合分子為不顯著增加的抗原-結合分子，包括胺基酸取代於 a) 位置 EU424 或 b) 位置 EU438/EU440。

更較佳地，取代選自於 a) EU424N 與 EU438R/EU440E。

【0099】較佳地，於酸性 pH 範圍對於 FcRn 具有增加的結合活性且於中性 pH 對於預先存在之 ADA 之結合親和性相較於對照抗原-結合分子為不顯著增加的抗原-結合分子的 FcRn-結合域，包括表 13 所示取代組合之一。更較佳地，於酸性範圍具有增加的 FcRn-結合活性且藉此於中性 pH 對於預先存在之 ADA 之結合親和性相較於對照抗原-結合分子為不顯著增加的抗原-結合分子，包括表 13 所示取代組合編號(13)至(28)之任一者。

【0100】 [表 13]

於酸性 pH 範圍增加 FcRn-結合活性而不顯著地增加對於

預先存在之 ADA 的結合活性 之 Fc 區域的取代組合(根據 EU 編號流程所提供的位置)。

1	EU252Y / EU254T/ EU256E/ EU438R / EU440E
2	EU252Y / EU254T/ EU256E/ EU424N
3	EU428L / EU434S / EU438R / EU440E
4	EU424N / EU428L / EU434S
5	EU426D / EU428L / EU434S
6	EU426A / EU428L / EU434S
7	EU426Q / EU428L / EU434S
8	EU426Y / EU428L / EU434S
9	EU428L / EU434S / EU436F
10	EU428L / EU434S / EU436T
11	EU434H / EU438R / EU440E
12	EU424N / EU434H
13	N434Y/Y436V/Q438R/S440E
14	N434Y/Y436V/Q438R/S440D
15	N434Y/Y436V/Q438K/S440E
16	N434Y/Y436V/Q438K/S440D
17	H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
18	H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
19	H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
20	H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
21	N434Y/Y436T/Q438R/S440E
22	N434Y/Y436T/Q438R/S440D
23	N434Y/Y436T/Q438K/S440E
24	N434Y/Y436T/Q438K/S440D
25	H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
26	H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440D
27	H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
28	H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440D

【0101】除了取代於位置 EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438 與 EU440 之任一者外，本發明之 Fc 區域進一步亦包括下述胺基酸取代於下述位置之一者或多者：

EU248、EU249、EU250、EU251、EU252、EU253、EU254、EU255、EU256、EU257，

EU305、EU306、EU307、EU308、EU309、EU310、EU311  
、EU312、EU313、EU314，

EU342、EU343、EU344、EU345、EU346、EU347、EU348  
、EU349、EU350、EU351、EU352、EU380、EU381、EU382  
、EU383、EU384、EU385、EU386、EU388，

EU414、EU415、EU416、EU417、EU418、EU419、EU420  
、EU421、EU423、EU425、EU427、EU428、EU429、EU430  
、EU431、EU432、EU433、EU434、EU435、EU436、EU437  
、EU441、EU442、EU443 與 EU444。

**【0102】** 於該等位置之任一者取代 Fc 區域可降低對於預先存在之 ADA 的結合親和性，特別是對於類風濕性因子，而不負向影響對於 FcRn 的結合親和性。

**【0103】** 進一步地，本發明的方法可進一步包括於一個或多個下述位置取代如上述的抗原-結合分子的 Fc 區域的步驟：

EU248、EU249、EU250、EU251、EU252、EU253、EU254  
、EU255、EU256、EU257，

EU305、EU306、EU307、EU308、EU309、EU310、EU311  
、EU312、EU313、EU314、EU342、EU343、EU344、EU345  
、EU346、EU347、EU348、EU349、EU350、EU351、EU352  
、EU380、EU381、EU382、EU383、EU384、EU385、EU386  
、EU388，

EU414、EU415、EU416、EU417、EU418、EU419、EU420  
、EU421、EU423、EU425、EU427、EU428、EU429、EU430  
、EU431、EU432、EU433、EU434、EU435、EU436、EU437

、EU441、EU442、EU443 與 EU444。

**【0104】** 對於起效子受體為弱的或無結合活性、或結合至 Fc  $\beta$  受體之補體蛋白質、或補體蛋白質，亦可引起不欲之反應(例如不適合的血小板活化)。不結合例如 Fc  $\beta$  RIIa 受體之起效子受體的經改質抗原-結合分子較為安全及/或較為有效。因此，較佳具體例中，本發明之經改質抗原-結合分子額外地對於起效子受體具有弱的結合活性或不結合至起效子受體。起效子受體之實例包含但不限於活化 Fc  $\beta$  受體，特別是 Fc  $\beta$  受體 I、Fc  $\beta$  受體 II 與 Fc  $\beta$  受體 III。Fc  $\beta$  受體 I 包含 Fc  $\beta$  受體 Ia、Fc  $\beta$  受體 Ib 與 Fc  $\beta$  受體 Ic 與其亞型。Fc  $\beta$  受體 II 包含 Fc  $\beta$  受體 IIa(其具有二個同種異型 R131 與 H131)與 Fc  $\beta$  受體 IIb。Fc  $\beta$  受體 III 包含 Fc  $\beta$  受體 IIIa(其具有二個同種異型：V158 與 F158)與 Fc  $\beta$  受體 IIIb(其具有二個同種異型：Fc  $\beta$  IIIb-NA1 與 Fc  $\beta$  IIIb-NA2)。對於起效子受體具有弱的結合活性或不結合至起效子受體的抗體，例如為包括靜默 Fc 區域之抗體或無 Fc 區域之抗體(例如 Fab、F(ab)'<sub>2</sub>、scFv、sc(Fv)<sub>2</sub>、雙體抗體(diabodies))。

**【0105】** 對於起效子受體具有弱的結合活性的 Fc 區域，例如揭示於 Strohl 等人(Current Opinion in Biotechnology(2009) 20(6), 685-691)者。特別地，其揭示例如去糖基化 Fc 區域(N297A, N297Q)與靜默 Fc 區域之實例，其具有 Fc 區域經工程化為靜默(或免疫壓抑)起效子功能性(IgG1-L234A/L235A、IgG1-H268Q/A330S/P331S、IgG1-C226S/C229S、IgG1-C226S/C229S/E233P/L234V/L235A、IgG1-L234F/L235E/P331S、IgG2-

V234A/G237A、IgG2-H268Q/V309L/A330S/A331S、IgG4-L235A/G237A/E318A、IgG4-L236E)。專利 WO2008/092117 揭示包括 Fc 區域之抗體，該 Fc 區域包括靜默 Fc 區域其包括取代 G236R/L328R、L235G/G236R、N325A/L328R 或 N325L/L328R(位置根據 EU 編號系統)。再者，專利 WO 2000/042072 揭示包括靜默 Fc 區域之抗體，該 Fc 區域包括取代於下述一個或多個位置：EU233、EU234、EU235 與 EU237。專利 WO 2009/011941 揭示包括靜默 Fc 區域之抗體，該 Fc 區域包括由 EU231 至 EU238 的殘基刪除。Davis 等人 (Journal of Rheumatology(2007) 34(11): 2204-2210)揭示包括靜默 Fc 區域之抗體，該 Fc 區域包括取代 C220S/C226S/C229S/P238S。Shields 等人 (Journal of Biological Chemistry(2001) 276(9), 6591-6604)揭示包括靜默 Fc 區域之抗體，該 Fc 區域包括取代 D265A。

**【0106】** 詞語「對於起效子受體之弱的結合」意指結合活性為完整 IgG(或包含完整 Fc 區域之抗體)對於起效子受體之結合活性之 95%或更低，較佳為 90%或更低、85%或更低、80%或更低、75%或更低，更較佳為 70%或更低、65%或更低、60%或更低、55%或更低、50%或更低、45%或更低、40%或更低、35%或更低、30%或更低、25%或更低、20%或更低、15%或更低、10%或更低、9%或更低、8%或更低、7%或更低、6%或更低、5%或更低、4%或更低、3%或更低、2%或更低、1%或更低。對於 Fc $\beta$ R 之結合活性，相較於完整 IgG(或包含完整 Fc 區域之抗體)對於起效子受體之結合活性，較佳降低倍數為至

少約 10-倍或更多，約 50-倍或更多，約 100-倍或更多。

**【0107】** 靜默 Fc 區域為包括一個或多個胺基酸取代、插入、增加及/或刪除之經改質 Fc 區域，相較於完整 Fc 區域其降低對於起效子受體之結合。對於起效子受體之結合活性可降低多達該 Fc 區域不再結合起效子受體。靜默 Fc 區域的實例包含但不限於其包括胺基酸取代於選自下述所成群組之一個或多個位置的 Fc 區域：EU234、EU235、EU236、EU237、EU238、EU239、EU265、EU266、EU267、EU269、EU270、EU271、EU295、EU296、EU297、EU298、EU300、EU324、EU325、EU327、EU328、EU329、EU331 與 EU332。

**【0108】** 特別地，靜默 Fc 區域具有選自下述列表之胺基酸取代於選自下述所成群組之一個或多個位置：EU234、EU235、EU236、EU237、EU238、EU239、EU265、EU266、EU267、EU269、EU270、EU271、EU295、EU296、EU297、EU298、EU300、EU324、EU325、EU327、EU328、EU329、EU331 與 EU332。較佳地，靜默 Fc 區域具有選自下述列表之胺基酸取代於選自下述所成群組之一個或多個位置：EU235、EU237、EU238、EU239、EU270、EU298、EU325 與 EU329。

胺基酸於位置 EU234 較佳係以選自下述所成群組之胺基酸之一者置換：Ala、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Lys、Met、Phe、Pro、Ser 與 Thr。

胺基酸於位置 EU235 較佳係以選自下述所成群組之胺基酸之一者置換：Ala、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Met、Pro、Ser、Thr、Val 與 Arg。

胺基酸於位置 EU236 較佳係以選自下述所成群組之胺基酸之一者置換：Arg、Asn、Gln、His、Leu、Lys、Met、Phe、Pro 與 Tyr。

胺基酸於位置 EU237 較佳係以選自下述所成群組之胺基酸之一者置換：Ala、Asn、Asp、Gln、Glu、His、Ile、Leu、Lys、Met、Pro、Ser、Thr、Val、Tyr 與 Arg。

胺基酸於位置 EU238 較佳係以選自下述所成群組之胺基酸之一者置換：Ala、Asn、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Thr、Trp 與 Arg。

胺基酸於位置 EU239 較佳係以選自下述所成群組之胺基酸之一者置換：Gln、His、Lys、Phe、Pro、Trp、Tyr 與 Arg。

胺基酸於位置 EU265 較佳係以選自下述所成群組之胺基酸之一者置換：Ala、Arg、Asn、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr 與 Val。

胺基酸於位置 EU266 較佳係以選自下述所成群組之胺基酸之一者置換：Ala、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp 與 Tyr。

胺基酸於位置 EU267 較佳係以選自下述所成群組之胺基酸之一者置換：Arg、His、Lys、Phe、Pro、Trp 與 Tyr。

胺基酸於位置 EU269 較佳係以選自下述所成群組之胺基酸之一者置換：Ala、Arg、Asn、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr 與 Val。

胺基酸於位置 EU270 較佳係以選自下述所成群組之胺基

酸之一者置換：Ala、Arg、Asn、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr 與 Val。

胺基酸於位置 EU271 較佳係以選自下述所成群組之胺基酸之一者置換：Arg、His、Phe、Ser、Thr、Trp 與 Tyr。

胺基酸於位置 EU295 較佳係以選自下述所成群組之胺基酸之一者置換：Arg、Asn、Asp、Gly、His、Phe、Ser、Trp 與 Tyr。

胺基酸於位置 EU296 較佳係以選自下述所成群組之胺基酸之一者置換：Arg、Gly、Lys 與 Pro。

胺基酸於位置 EU297 較佳以 Ala 置換。

胺基酸於位置 EU298 較佳係以選自下述所成群組之胺基酸之一者置換：Arg、Gly、Lys、Pro、Trp 與 Tyr。

胺基酸於位置 EU300 較佳係以選自下述所成群組之胺基酸之一者置換：Arg、Lys 與 Pro。

胺基酸於位置 EU324 較佳以 Pro 置換。

胺基酸於位置 EU325 較佳係以選自下述所成群組之胺基酸之一者置換：Ala、Arg、Gly、His、Ile、Lys、Phe、Pro、Thr、Trp、Tyr 與 Val。

胺基酸於位置 EU327 較佳係以選自下述所成群組之胺基酸之一者置換：Arg、Gln、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr 與 Val。

胺基酸於位置 EU328 較佳係以選自下述所成群組之胺基酸之一者置換：Arg、Asn、Gly、His、Lys 與 Pro。

胺基酸於位置 EU329 較佳係以選自下述所成群組之胺基

酸之一者置換：Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、Val 與 Arg。

胺基酸於位置 EU330 較佳以 Pro 或 Ser 置換。

胺基酸於位置 EU331 較佳係以選自下述所成群組之胺基酸之一者置換：Arg、Gly 與 Lys。

胺基酸於位置 EU332 較佳係以選自下述所成群組之胺基酸之一者置換：Arg、Lys 與 Pro。

較佳地，靜默 Fc 區域包括以 Lys 或 Arg 取代於位置 EU235、以 Lys 或 Arg 取代於 EU237、以 Lys 或 Arg 取代於 EU238、以 Lys 或 Arg 取代於 EU239、以 Phe 取代於 EU270、以 Gly 取代於 EU298、以 Gly 取代於 EU325 或以 Lys 或 Arg 取代於 EU329。更較佳地，靜默 Fc 區域包括以精胺酸取代於位置 EU235 以及以離胺酸取代於位置 EU239。更較佳地，其包括取代 L235R / S239K。

**【0109】**再者，本發明之經改質抗原-結合分子較佳為經去糖基化的。更較佳地，本發明之經改質抗原-結合分子包含突變於重鏈糖基化位點以防止於該位點之糖基化，例如揭示於專利 WO2005/03175。因此，本發明之較佳具體例中，該經改質無糖基之抗原-結合分子戲藉由改質重鏈糖基化位點，亦即導入取代 N297Q 或 N297A(位置根據 EU 編號系統)且於合適宿主細胞中表現該蛋白質。用於導入取代的方法可使用實施例所揭示者。

**【0110】**本發明之特定具體例中，本發明之經改質抗原-結合分子其對於補體蛋白質具有弱的結合活性或不結合至補體

蛋白質。較佳地，該補體蛋白質為 C1q。對於補體蛋白質為弱的結合活性，較佳為於補體蛋白質的結合活性，相較於完整 IgG 或包含完整 Fc 區域之抗體之對於補體蛋白質的結合活性，其降低倍數約 10 倍或更高，約 50-倍或更高，約 100-倍或更高。Fc 區域對於補體蛋白質之結合活性可藉由改質胺基酸序列而降低，例如胺基酸胺基酸取代、插入、增加及/或刪除。

**【0111】** 本發明之較佳具體例中，該抗原-結合分子於酸性或中性 pH 具有增加的 FcRn-結合親和性且對於起效子受體及/或補體蛋白質具有弱的或無結合活性。較佳地，該抗原-結合分子包括於 FcRn-結合域取代於

選自下述所成群組之一個或多個位置：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU256、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 與 EU436 以及

於選自下述所成群組之一個或多個位置：：EU234、EU235、EU236、EU237、EU238、EU239、EU265、EU266、EU267、EU269、EU270、EU271、EU295、EU296、EU297 EU298、EU300、EU324、EU325、EU327、EU328、EU329、EU331 與 EU332(根據 EU 編號系統)。更較佳地，對於起效子受體及/或補體蛋白質具有降低的或無結合活性之本發明之經改質抗原-結合分子，包括一個或多個取代於 Fc 區域之選自下述所成群組之取代：以 Lys 或 Arg 取代於位置 EU235、以 Lys 或 Arg 取代於 EU237、以 Lys 或 Arg 取代於 EU238、以 Lys 或 Arg 取代於 EU239、以 Phe 取代於 EU270、以 Gly 取代於 EU298、以

Gly 取代於 EU325 以及以 Lys 或 Arg 取代於 EU329。甚至更較佳地，其包括取代於 Fc 區域之於位置 EU235 之以及於位置 EU239 之 Lys。以及甚至更較佳地，其包括取代組合 L235R / S239K 於 Fc 區域。

**【0112】** 較佳地，該抗原-結合分子對於預先存在之 ADA 不具有顯著增加的結合活性。因此，本發明之對於起效子受體及/或補體蛋白質具有降低的或無結合活性之抗原-結合分子進一步包括胺基酸取代於 c)選自下述所成群組之一個或多個位置：EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438 與 EU440。本發明之更較佳具例中，該經改質抗原-結合分子包括三個或更多個胺基酸取代於 FcRn-結合域，其中該三個或更多個胺基酸取代為表 14 及 15 所示之組合之一

**【0113】** [表 14]

於中性 pH 範圍增加 FcRn-結合活性而不顯著地增加對於預先存在之 ADA 的結合活性，且降低對於起效子受體及/或補體蛋白質之結合活性的取代組合。

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

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

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

【0114】 [表 15]

於酸性 pH 範圍增加 FcRn-結合活性而不顯著地增加對於預先存在之 ADA 的結合活性，且降低對於起效子受體及/或補體蛋白質之結合活性的取代組合。

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

**【0115】** 進一步的改質

再者，本發明之抗原-結合分子除了上述改質外包括於 FcRn-結合域之位置 EU257 不為選自下述所成群組之胺基酸：丙胺酸、纈胺酸、異白胺酸、白胺酸與蘇胺酸，及/或於 FcRn-結合域之位置 EU252 不為色胺酸。換言之，本發明之較佳抗原-結合分子除了上述任何改質外包括於位置 EU257 之丙胺酸、纈胺酸、異白胺酸、白胺酸、蘇胺酸、精胺酸、天冬醯胺、天冬胺酸、半胱胺酸、之麩胺酸、麩胺醯胺、甘胺酸、組胺酸、離胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、脯胺酸、絲胺酸、色胺酸或酪胺酸，以及於位置 EU252 之精胺酸、天冬醯胺、天冬胺酸、半胱胺酸、麩胺酸、麩胺醯胺、甘胺酸、組胺酸、離胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、脯胺酸、絲胺酸或酪胺酸。

**【0116】** 亦較佳的為經改質 FcRn-結合域其包括除了取代於本文述及位置或位置組合之任一者外，於位置 EU239 之離胺

酸及/或於位置 EU270 之苯丙胺酸。

**【0117】** 抗原-結合分子

本發明之抗原-結合分子不特別限定，只要其包含具有特定於標靶抗原之結合活性之抗原-結合域與本發明之 FcRn-結合域即可。較佳的抗原-結合域包含，例如具有抗體之抗原-結合域之域。抗體之抗原-結合區域包括，例如 CDR。抗體之抗原-結合區域可含有來自全抗體之所有六個 CDR，或一個或二個或更多個 CDR。抗體之抗原-結合區域包括胺基酸刪除、取代、增加及/或插入，或其可包括部分 CDR。

**【0118】** 另一方面，本發明之抗原-結合分子包含具有拮抗性活性之抗原-結合分子

(拮抗性抗原-結合分子)、具有促效性活性之抗原-結合分子(促效性抗原-結合分子)以及具有細胞毒性之分子。較佳具體例中，該抗原-結合分子為拮抗性抗原-結合分子，特別地為辨識例如受體或細胞激素之抗原的拮抗性抗原-結合分子。

**【0119】** 本發明之抗原-結合分子較佳為抗體。本發明內容中之較佳抗體包含，例如，IgG 抗體。當所使用之抗體為 IgG 抗體時，不特別限定 IgG 的類型；因此，IgG 可屬於任何亞型(亞類)如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。對於人類 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 恆定區、基因多型體(同種異型)係揭示於「Sequences of proteins of immunological interest, IH Publication No.91-3242」。該等同種異型於此應用中亦可使用於恆定區。特別地，對於人類 IgG1，胺基酸 Asp-Glu-Leu(DEL)與 Glu-Glu-Met(EEM)二者可使用於 EU 編號

之殘基 356 至 358。類似地，對於人類 免疫球蛋白 kappa 恆定區、基因多型體(同種異型)係揭示於「Sequences of proteins of immunological interest, IH Publication No.91-3242」。該等同種異型於此應用中亦可使用於恆定區。再者，本發明之抗原-結合分子可包含抗體恆定區，以及胺基酸突變可經導入至該恆定區。可經導入之胺基酸突變包含，例如，該等賦予或修復結合至 Fc 受體者(Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Mar 14; 103(11): 4005-10)，但不限定於該等實例。或者，亦可能藉由如 IgG2 之和示的恆定區而改變 pH-依賴性結合(WO09125825)。

**【0120】** 當本發明之抗原-結合分子為抗體時，該抗體可衍生自任何動物如小鼠、人類、大鼠、兔、山羊或駱駝。較佳地，該抗體為人類抗體。再者，該抗體 可為經改變之抗體，例如，嵌合抗體，以及特別地，包括胺基酸取代於人源化抗體之序列之經改變抗體等。本發明所考慮之抗體類別亦包含雙特异性抗體、與各種分子連結之抗體改質產品以及包含抗體片段(特別是免疫球蛋白及/或免疫活性抗體片段)。較佳具體例中，該抗原-結合分子為單株抗體。

**【0121】** 「嵌合抗體」係藉由組和衍生自不同動物之序列所製備之抗體。具體地，嵌和抗體包含，例如，具有重鏈與輕鏈可變(V)區域來自小鼠抗體以及重鏈與輕鏈恆定(C)區域來自人類抗體的抗體。用於產生嵌和抗體的方法為已知。於人類-小鼠嵌合抗體的情況，例如，編碼抗體 V 區域之 DNA 可連結至編碼人類抗體 C 區域之 DNA；其可插入至表現載體且導入至宿主以製造嵌合抗體。

【0122】「人源化抗體」亦指稱重構型抗體，為此項技術領域所習知之抗體，其中抗體之互補決定區(CDR)衍生自非人類哺乳動物，例如，小鼠，且經移植至人類抗體的 CDR。用於鍵定 CDR 的方法為已知(Kabat et al., *Sequence of Proteins of Immunological Interest*(1987), National Institute of Health, Bethesda, Md.; Chothia et al., *Nature*(1989) 342 : 877)。適合用於此目的之一般遺傳重組技術亦為已知(參照歐洲專利申請案 EP 125023；及專利 WO 96/02576)。人源化抗體可藉由已知方法製造，例如，可測定小鼠抗體的 CDR，且獲得編碼抗體之 DNA，其中該抗體之 CDR 係連結製人類抗體的框架區域(FR)。然後使用利用傳統表現載體的系統而製造人源化抗體。該等 DNA 可藉由 PCR 合成，使用製備為具有與 CDR 及 FR 二者之終端區域重疊之數個寡核苷酸作為引子(參照揭示於專利 WO 98/13388 之方法)。選擇經由 CDR 連結之人類抗體 FR 以使 CDR 形成合適的抗原結合位典。必要時，於抗體可變區之 FR 的胺基酸可經改變而使重構型人類抗體之 CDR 可形成合適的抗原結合位點(Sato et al., *Cancer Res.*(1993) 53 : 10.01-6)。可經改變之 FR 的胺基酸殘基包含經由非共價鍵直接結合至抗原的部分(Amit et al., *Science*(1986) 233 : 747-53)、對於 CDR 結構有影響或具有效果的部分(Chothia et al., *J. Mol. Biol.*(1987) 196 : 901-17)以及涉及 VH-VL 交互作用的部分(EP 239400)。

【0123】當本發明之抗原-結合分子為嵌合抗體或人源化抗體時，該等抗體之恆定區較加衍生自人類抗體。例如，C- $\gamma$ 1、C- $\gamma$ 2、C- $\gamma$ 3 與 C- $\gamma$ 4 可使用於 H 鏈，而 C-kappa 與 C-lambda

可使用於 L 鏈。尤有甚者，必要時，胺基酸突變可經導入至人類抗體 C 區域以增強或降低結合至 Fc- $\gamma$  受體或改良抗體安定性或製造性。本發明之嵌合抗體較加包含衍生自非人類哺乳動物之抗體的可變區以及衍生自人類抗體之恆定區域。同時，人源化抗體較加包含衍生自非人類哺乳動物之抗體的 CDR 以及衍生自人類抗體之 FR 與 C 區域。衍生自非人類抗體之恆定區較佳包含人類 FcRn-結合區域。該抗體 包含，例如， IgG 類 (IgG1、IgG2、IgG3 與 IgG4)。用於本發明之人源化抗體之 恆定區可為任何同型抗體之恆定區。較佳使用衍生自人類 IgG1 之恆定區，但不限定為該等。衍生自人類抗體之 FR，其使用於人源化抗體，不特別限制，且可衍生自任何同型抗體。

**【0124】** 如使用於本文之詞語「雙特異性抗體」意指一抗體，其具有於相同抗體分子中辨識不同抗原決定基之可變區。雙特異性抗體可為辨識二種或更多種不同抗原之抗體，或為於相同抗原辨識二種或更多種抗原決定基之抗體。

**【0125】** 再者，包含抗體片段之多肽可為，例如， scFv-Fc(WO 2005/037989)、dAb-Fc 與 Fc 融合蛋白質。於該多肽中之抗體片對可為例如 Fab 片段、F(ab')<sub>2</sub> 片段、scFvs(Nat Biotechnol. 2005 Sep; 23(9): 1126-36)、域 抗體(dAbs)(WO 2004/058821、WO 2003/002609)， Fc 區域可使用作為 人類 FcRn-結合域當分子包含 when a molecule 區域時。或者， FcRn-結合域可融合至該等分子。

**【0126】** 進一步地，可應用於本發明之 抗原-結合分子 可為或可包含類抗體分子(例如，具有類抗體分子之本發明 Fc 區

域的融合蛋白質)。類抗體分子(支架分子、肽分子)為藉由結合至標靶分子可顯示功能之分子 (Current Opinion in Biotechnology(2006) 17 : 653-658 ; Current Opinion in Biotechnology(2007) 18 : 1-10 ; Current Opinion in Structural Biology(1997) 7 : 463-469 ; Protein Science(2006) 15 : 14-27) 且包含，例如， DARPs(WO 2002/020565)、Affibody(WO 1995/001937)、Avimer(WO 2004/044011 ; WO 2005/040229) 與 Adnectin(WO 2002/032925)。如果該等類抗體分子可結合至標靶分子以 pH-依賴性或鈣-依賴方式 及/或於中性 pH 範圍具有人類 FcRn-結合活性，可能有助於抗原藉由抗原-結合分子攝入至細胞，有助於藉由投藥抗原-結合分子降低血漿抗原濃度以及改良抗原-結合分子之動力學且增加對單一抗原-結合分子可予以結合之抗原總數。

**【0127】**再者，抗原-結合分子可為由本發明之 FcRn-結合域與結核至包含配體之標靶的受體蛋白質之間的融合所產生的蛋白質，包含，例如， TNFR-Fc 融合蛋白質、IL1R-Fc 融合蛋白質、VEGFR-Fc 融合蛋白質與 CTLA4-Fc 融合蛋白質 (Nat Med. 2003、Jan ; 9(1) : 47-52 ; BioDrugs.(2006) 20(3) : 151-60)。如果該等受體 - FcRn-結合域融合蛋白質 除了於中性 pH 範圍具有 FcRn-結合活性之外，以 pH-依賴性或鈣-依賴方式結合至包含配體的標靶分子，其可能有助於抗原藉由抗原-結合分子攝入至細胞，有助於藉由投藥抗原-結合分子降低血漿抗原濃度以及改良抗原-結合分子之動力學且增加對單一抗原-結合分子可予以結合之抗原總數。受體蛋白質係合適地經

設計與經改質而使其包含對於包含配體之標靶之受體蛋白質的結合域。作為前文例示者(亦即，TNFR-Fc 融合蛋白質、IL1R-Fc 融合蛋白質、VEGFR-Fc 融合蛋白質與 CTLA4-Fc 融合蛋白質)，特別較佳為包含該等結合至包含配體之標靶者所需之受體蛋白質之細胞外域的可溶性受體分子。該等經設計與改質之受體意指本發明之人工受體／用於設計與改質受體分子已構築人工受體的方法於此項技術中為已知且確實傳統的。

【0128】再者，本發明之 抗體可具有將改質糖鏈。具有經改質糖鏈之抗體包含，例如， 具有經改質糖基化之抗體(WO 99/54342)、經添加至糖鏈而於岩藻糖有缺陷之抗體 (WO 00/61739； WO 02/31140； WO 2006/067847； WO2 006/067913)與具有二等分 GlcNAc 之糖鏈的抗體(WO 02/79255)。

【0129】根據 Journal of Immunology(2009) 182 : 7663-7671，完整人類 IgG1 之人類 FcRn-結合活性於酸性 pH 範圍(pH 6.0)為 KD 1.7 微莫耳(microM)，而於中性 pH 範圍該活性為幾乎不可偵測。因此較佳具體例中，本發明之抗原-結合分子包含抗原-結合分子其人類 FcRn-結合活性於酸性 pH 範圍強於 KD 1.7 微莫耳且於中性 pH 範圍較完整人類 IgG1 之人類 FcRn-結合活性為相同或更強。更較佳具體例中，相較於完整 IgG1，其於中性 pH 範圍對於預先存在之 ADA 之結合活性不顯著增加。上述 KD 值係藉由揭示於 Journal of Immunology(2009) 182 : 7663-7671(藉由將抗原-結合分子固定化至晶片且裝填人類 FcRn 作為分析物)之方法測定。

【0130】解離常數(KD)人類 FcRn-結合活性之值。然而，完整人類 IgG 之人類 FcRn-結合活性於中性 pH 範圍(pH 7.4)具有少的人類 FcRn-結合活性。因而，通常難以計算活性為 KD。用於評估人類 FcRn-結合活性於 pH 7.4 是否高於完整人類 IgG 者之方法包含藉由比較於相同濃度裝填分析物後所回應之 Biacor 的強度。具體地，當裝填人類 FcRn 至經固定有抗原-結合分子的晶片於 pH 7.4 之回應強於裝填人類 FcRn 至經固定有完整人類 IgG 的晶片於 pH 7.4 之回應時，該抗原-結合分子之人類 FcRn-結合活性係被判斷於 pH 7.4 強於完整人類 IgG 之人類 FcRn-結合活性。。

【0131】本發明之內容中，pH 7.0 可使用作為中性 pH 範圍。使用 pH 7.0 作為中性 pH 可有助於人類 FcRn 與 FcRn-結合域之間的弱的交互作用。關於應用於分析條件之溫度，結合親和性可於自 10°C 至 50°C 之任何溫度評估。較佳地，應用任何溫度範圍自 15°C 至 40°C 以測定人類 FcRn-結合域與人類 FcRn 之間的結合親和性。更較佳地，亦應用任何溫度範圍自 20°C 至 35°C，例如下列任一者：20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34 與 35°C 以測定人類 FcRn-結合域與人類 FcRn 之間的結合親和性。揭示於專利 WO2011/122011 之實施例 5 之 25°C 溫度為本發明之具體例之一實例。較佳具體例中，人類 FcRn-結合域與人類 FcRn 之間的交互作用可於 pH 7.0 與 25°C 如同專利 WO2011/122011 之實施例 5 揭示方法予以測定。抗原-結合分子對人類 FcRn 之結合親和性可如同專利 WO2011/122011 之實施例 5 揭示方藉由

Biacore 測定。

**【0132】** 較佳地，於中性 pH 範圍之結合親和性係於 pH 7.4 測定，其接近活體內血漿(血液)pH。當人類 FcRn-結合域與人類 FcRn 之間的結合親和性因其於 pH 7.4 的低親和性而難以評估時，可使用 pH 7.0 作為替代 pH 7.4。較佳地，於酸性 pH 範圍之結合親和性係於 pH 6.0 測定，其接近活體內早期內體之 pH。關於應用於分析條件之溫度，人類 FcRn-結合域與人類 FcRn 之間的結合親和性可於自 10°C 至 50°C 之任何溫度評估。較佳地，應用任何溫度範圍自 15°C 至 40°C 以測定人類 FcRn-結合域與人類 FcRn 之間的結合親和性。更較佳地，亦應用任何溫度範圍自 20°C 至 35°C，例如下列任一者：20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34 與 35°C 以測定人類 FcRn-結合域與人類 FcRn 之間的結合親和性。揭示於專利 WO2011/122011 之實施例 5 與本發明實施例之 25°C 溫度為本發明之具體例之一實例。

**【0133】** 完整人類 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 較佳使用作為參考完整人類 IgG 以與抗原-結合分子對該等人類 FcRn 結合活性或活體內活性相比較。較佳地，包括相同抗原-結合域作為本發明之抗原-結合分子以及完整人類 IgG Fc 區域作為人類 FcRn-結合域之抗原-結合分子，係使用作為參考。更較佳地，完整人類 IgG1 係使用作為參考完整人類 IgG 用以將其人類 FcRn 結合活性或活體內活性與本發明之抗原-結合分子之人類 FcRn 結合活性或活體內活性做比較。

**【0134】** 用於分析抗原-結合或人類 FcRn-結合活性的 pH

以外的條件可由此項技術領域中具有通常知識者合適地選擇且該等條件不特別限定。例如，可使用揭示於專利 WO 2009/125825 之於 37°C 使用 MES 緩衝劑的條件以測定活性。另一具體例中，可使用揭示於專利 WO2011/122011 之實施例 4 或 5 之於 25°C 使用 Na-磷酸鹽緩衝劑以測定活性。同時，抗原-結合分子之抗原-結合活性與人類 FcRn-結合活性可藉由此項技術領域習知之方法測定，例如，使用 Biacore(GE Healthcare) 等。當抗原為可溶性抗原時，抗原-結合分子對結合至可溶性抗原之活性可藉由將抗原作為分析物裝填至經固定有抗原-結合分子之晶片而測定。或者，當抗原為膜-型抗原時，抗原-結合分子對結合至膜-型抗原之活性可藉由將抗原-結合分子做為分析物裝填至經固定有抗原-結合分子之晶片而測定。抗原-結合分子之人類 FcRn-結合活性可藉由分別將人類 FcRn 或抗原-結合分子作為分析物裝填至經固定有抗原-結合分子或人類 FcRn 之晶片而測定。

**【0135】** 本發明提供之包含抗原-結合域與拒於中性範圍具有增加的 FcRn-結合活性之人類 Fc 區域之本發明之抗原-結合分子。較佳地，其於中性 pH 範圍對於預先存在之 ADA 之結合活性不顯著增加。該抗原-結合分子於中性 pH 範圍之 FcRn-結合活性較佳強於 KD 3.2 微莫耳。更較佳地，於中性 pH 範圍之 FcRn-結合活性強於 700 微毫莫耳，甚至更較佳為強於 500 微毫莫耳且最較佳地，強於 150 微毫莫耳。較佳地，

抗原-結合分子於中性 pH 範圍具有增加的人類 FcRn-結合活性且抗原-結合活性於酸性 pH 範圍較低於中性 pH 範圍或於

低鈣濃度較低於高鈣濃度條件。較佳地，該抗原-結合分子於中性 pH 範圍對於預先存在之 ADA 之結合活性不顯著增加。本發明亦提供包含抗原-結合域與人類 FcRn-結合域之本發明之抗原-結合分子，其中其人類 FcRn-結合活性於中性 pH 範圍為增加的，再其中該人類 FcRn-結合活性於中性 pH 範圍為 28-倍強於完整人類 IgG 者，更較佳地，該人類 FcRn-結合活性於中性 pH 範圍為 38-倍強於完整人類 IgG 者。較佳地，該抗原-結合分子於中性 pH 範圍對於預先存在之 ADA 之結合活性不顯著增加。本發明之抗原-結合分子於中性 pH 範圍具有增加的 FcRn-結合活性。較佳地，於中性 pH 範圍對於預先存在之 ADA 不顯著增加之結合活性，於 pH 7.0 與 25°C 之人類 FcRn-結合活性，相較於完整人類 IgG 為強於 28-倍，較佳為強於 38-倍。或者，於 pH 7.0 與 25°C 具有增加的 FcRn 結合活性之抗原-結合分子之人類 FcRn-結合活性，較佳強於 KD 3.2 微莫耳。更較佳地，於 pH 7.0 與 25°C 之 FcRn-結合活性強於 700 微毫莫耳，更較佳地強於 500 微毫莫耳以及最較佳地，強於 150 微毫莫耳。

**【0136】** 本發明提供本發明之抗原-結合分子，包含本發明之抗原-結合域與 a 人類 Fc 區域，於酸性 pH 範圍具有增加的 FcRn-結合活性且於中性 pH 範圍對於預先存在之 ADA 之結合活性不顯著增加。本發明亦提供

本發明之抗原-結合分子其包含抗原-結合域與於酸性 pH 範圍具有增加的人類 FcRn-結合活性之人類 FcRn-結合域且相較於完整 IgG 之對於預先存在之 ADA 之結合活性，於中性 pH

範圍對於預先存在之 ADA 之結合活性不顯著增加，其中該人類 FcRn-結合活性於酸性 pH 範圍係約 2-倍至約 100-倍範圍強於完整人類 IgG 之人類 FcRn-結合活性。較佳地，本發明之抗原-結合分子於酸性 pH 範圍之人類 FcRn-結合活性係至少 10-倍強於完整人類 IgG 之人類 FcRn-結合活性，更較佳地，於酸性 pH 範圍之人類 FcRn-結合活性係至少 20-倍強於完整人類 IgG 之人類 FcRn-結合活性。本發明之於酸性 pH 範圍具有增加的 FcRn-結合活性且藉此其於中性 pH 範圍對於預先存在之 ADA 之結合活性不顯著增加之抗原-結合分子，於 pH 6.0 與 25°C 具有之人類 FcRn-結合活性為 10-倍強於，較佳為 25-倍強於完整人類 IgG。

**【0137】** 本發明之抗原-結合分子可具有於中性 pH 範圍之增加的 FcRn-結合活性以及於酸性 pH 範圍之抗原-結合活性(其係低於抗原-結合活性於中性 pH 範圍之抗原-結合活性)或於低鈣濃度之抗原-結合活性(其係低於高鈣濃度之抗原-結合活性)。該抗原-結合分子之具體實例包含於 pH7.4 對於人類 FcRn 相較於完整 IgG 具有較高結合活性且其抗原-結合活性於 pH 5.8 係低於 pH 7.4(該等 pH 分別假設為早期內體與血漿之活體內 pH)。其抗原-結合活性於 pH 5.8 係低於 pH 7.4 之抗原-結合分子亦可意指為其抗原-結合活性於 pH 7.4 係強於 pH 5.8 之抗原-結合分子。KD(pH 5.8)/KD(pH 7.4)之值，其為對抗原之解離常數(KD)於 pH 5.8 與 pH 7.4 之比例，為 1.5、2、3、4、5、10、15、20、50、70、80、100、500、1000 或 10,000，較佳為 2 或更大，更較佳為 10 或更大以及再較佳為 40 或更大。

KD(pH 5.8)/KD(pH 7.4)之值的上限不特別限定且可為任何值，例如，400、1,000 或 10,000，只要可使用本項技術領域所習知之技術製造即可。

亦較佳地，本發明之抗原-結合分子於酸性 pH 範圍具有增加的 FcRn-結合活性，以及於酸性 pH 範圍相較於中性 pH 範圍為較低的抗原-結合活性或於低鈣濃度相較於高鈣濃度為較低的抗原-結合活性。較佳地，該抗原-結合分子於中性 pH 範圍對於預先存在之 ADA 圍之結合活性不顯著增加。該抗原-結合分子之具體實例包含於 pH 5.8 至 pH 6.0 相較於 IgG，對於人類 FcRn 具有較高之結合活性者，該等 pH 矽假設為活體內之早期內體的 pH 且其抗原-結合活性於 pH 5.8 係低於 pH 7.4。其抗原-結合活性於 pH 5.8 係低於 pH 7.4 之抗原-結合分子亦可意指為抗原-結合分子其抗原-結合活性於 pH 5.8 係弱於 pH 7.4 之抗原-結合分子。較佳地，於酸性 pH 範圍對於 FcRn 具有增加的結合活性之抗原-結合分子，於中性 pH 範圍相較於完整人類 IgG 具有較強的 FcRn-結合活性。

**【0138】** 本發明之經改質 FcRn-結合域可應用至任何抗原-結合分子，而無關於標靶抗原之類型。

**【0139】** 本發明之抗原-結合分子可具有其他性質。例如，其可為促效性或拮抗性抗原-結合分子，只要其具有 a) 必要的中性 pH 範圍之增加的人類 FcRn-結合活性或 b) 對於酸性範圍之增加的人類 FcRn-結合活性 且其對於預先存在之 ADA 之結合活性不顯著增加。較佳地，該抗原-結合分子之抗原-結合活性於酸性 pH 範圍係低於中性 pH 範圍。較佳地，本發明之抗

原-結合分子包含，例如，拮抗性抗原-結合分子。該拮抗性抗原-結合分子典型地為藉由阻斷配體(促效劑)與受體之間的結合而抑制受體-媒介之細胞內信號傳遞之抗原-結合分子。

**【0140】** 同時，本發明之抗原-結合分子可辨識任何抗原。藉由本發明之抗原-結合分子可辨識之具體抗原包含，例如，上述受體蛋白質(膜-固著受體與可溶性受體)、膜抗原如細胞表面標記與可溶性抗原如細胞激素。該等抗原包含，例如，下述抗原。

**【0141】** 包含抗原-結合域之本發明之抗原-結合分子可利用 pH 的不同而因血漿與內體之間的環境差異而使抗原結合分子對抗原於血漿與內體有不同的結合親和性(於血漿為強的結合且於內體為弱的結合)。由於血漿與內體之間的環境差異不限於 pH 不同，pH 依賴性結合性質對於抗原-結合分子對抗原的結合可利用其濃度於血漿中與內體中為不同的其他因子取代，該等例如離子化鈣濃度。該因子亦可使用於產生於血漿中結合至抗原而於內體內接離該抗原之抗體。因此，本發明亦包含包括人類 FcRn-結合域之抗原-結合分子，其人類 FcRn-結合活性於中性 pH 範圍為增加的且其抗原-結合活性於內體中係低於與血漿比較時。較佳地，該等抗原-結合分子於中性 pH 範圍對於預先存在之 ADA 的結合活性不顯著增加。該抗原-結合分子之人類 FcRn-結合活性於血漿中係強於完整人類 IgG 者與且進一步地該抗原-結合分子之抗原-結合域對於內體內之抗原相較於血漿中者具有較低親和性。較佳地，該抗原-結合域為其抗原-結合活性於酸性 pH 範圍係低於中性 pH 範圍之抗原-

結合域(pH-依賴性抗原-結合域)或其抗原-結合活性於低鈣濃度係低於高鈣濃度之抗原-結合域(鈣-濃度-依賴性抗原-結合域)。本發明亦包含具有人類 FcRn-結合域之抗原-結合分子，其於酸性 pH 範圍具有增加的人類 FcRn-結合活性且該抗原-結合分子進一步地包括對於抗原相較於血漿中於內體內具有較低親和性之抗原-結合域，以致於該抗原-結合分子之人類 FcRn-結合活性於內體中強於完整人類 IgG 者且該抗原-結合分子之抗原-結合活性於內體中強於血漿中。較佳地，該等抗原-結合分子於中性 pH 範圍對於預先存在之 ADA 的結合活性不顯著增加。較佳地，該抗原-結合域為其抗原-結合活性於酸性 pH 範圍係低於中性 pH 範圍之抗原-結合域(pH-依賴性抗原-結合域)或其抗原-結合活性於低鈣濃度係低於高鈣濃度之抗原-結合域(鈣-濃度-依賴性抗原-結合域)。

**【0142】** 本發明之抗原-結合分子有助於抗原攝入至細胞，特別是當本發明之包含 pH-依賴性抗原-結合域或鈣-濃度-依賴性抗原-結合域之抗原-結合域之抗原-結合分子。抗原-結合分子於內體中容易地由抗原解離且然後藉由結合至人類 FcRn 而釋放至細胞外側。本發明之抗原-結合分子係推測於血漿中再次容易地結合至抗原。因此，例如，當本發明之抗原-結合分子為中和抗原-結合分子時，可藉由投藥該分子而有助於血漿抗原濃度的降低。

**【0143】 抗原-結合域**

較佳地，抗原-結合分子之抗原-結合域於酸性 pH 活於低鈣離子濃度對於抗原具有降低的親和性。更較佳地，該抗原-

結合域為本文所述之 pH-依賴性抗原-結合域或離子化鈣濃度依賴性抗原-結合域。

**【0144】** pH-依賴性抗原-結合域，

再者，本發明之抗原-結合分子較佳包含 pH-依賴性抗原-結合域其抗原-結合活性於酸性 pH 範圍係較低於中性 pH 範圍。該抗原-結合分子較佳具有抗原-結合活性於酸性 pH 範圍係較低於中性 pH 範圍。該結合活性比例不特別限定，只要抗原-結合活性於酸性 pH 範圍係較低於中性 pH 範圍。較佳具體例中，本發明之抗原-結合分子包含抗原-結合分子其抗原-結合活性於 pH 7.4 係二倍或更高於 pH 5.8 者，較佳地該抗原-結合活性於 pH 7.4 係十倍或更高於 pH 5.8。再較佳具體例中，本發明之抗原-結合分子包含抗原-結合分子其抗原-結合活性於 pH 7.4 係 40 倍或更高於 pH 5.8 者。

**【0145】** 本發明之抗原-結合分子之具體實例包含揭示於專利 WO 2009/125825 之具體例。較佳具體例中，本發明之包含 pH-依賴性抗原-結合域之抗原-結合分子具有抗原-結合活性於 pH 5.8 係較低於 pH 7.4 者，其中該  $KD(pH5.8)/KD(pH7.4)$  之值，其為對抗原之解離常數(KD)於 pH 5.8 與 pH 7.4 之比例，較佳為 2 或更大，更較佳為 10 或更大以及再較佳為 40 或更大。 $KD(pH 5.8)/KD(pH 7.4)$  之值的上限不特別限定且可為任何值，例如，400、1,000 或 10,000，只要可使用本項技術領域所習知之技術製造即可。

**【0146】** 另一較佳具體例中，本發明之抗原-結合分子其抗原-結合活性於 pH 5.8 係較低於 pH 7.4 者，具有  $KD(pH5.8)/$

KD(pH7.4)之值其為於 pH 5.8 對抗原之 KD 與於 pH 7.4 對抗原之 KD 之比例，為 2 或更大，更較佳為 5 或更大以及甚至較佳為 10 或更大以及再較佳為 30 或更大。KD(pH5.8)/ KD(pH7.4) 值之上限不特別限定且可為任何值，例如 50、100 或 200，只要可使用此項技術領域所習知之技術製造即可。

**【0147】** 測定抗原-結合活性、對於預先存在之 ADA 之結合活性與人類 FcRn-結合活性之 pH 以外的條件可由此項技術領域中具有通常知識者予以適當地選擇且該等條件並不特別限定；然而，可於，例如，MES 緩衝劑與 37°C 的條件下進行，如同實施例所述。再者，抗原-結合分子之抗原-結合活性可藉由此項技術領域所習知之方法測定，例如，使用 Biacore T100(GE Healthcare)等，如同實施例所述。

**【0148】** 用於降低(損害)抗原-結合分子之抗原-結合活性於酸性 pH 範圍至低於抗原-結合活性於中性 pH 範圍者(pH-依賴性結合活性之方法)之方法不特別限定且 and 合適的方法為已知於此項技術領域。專利 WO 2009/125825，例如，揭示用於降低(損害)抗原-結合活性於酸性 pH 範圍至低於中性 pH 範圍者之方法，係藉由取代組胺酸用於抗原-結合域之胺基酸或插入組胺酸至抗原-結合域。其進一步已知抗體可藉由取代組胺酸用於抗體之胺基酸而授予 pH-依賴性抗原-結合活性 (FEBS Letter(1992) 309(1): 85-88)。其他合適方法包含用於取代非天然胺基酸用於抗原-結合域之胺基酸或插入非天然胺基酸組胺酸至抗原-結合域。其已知 pKa 可藉由使用非天然胺基酸而人工的予以調整 (Angew. Chem. Int. Ed. 2005, 44, 34 ;

Chem Soc Rev. 2004 Sep 10, 33(7): 422-30; Amino Acids.(1999) 16(3-4): 345-79)。任何非天然胺基酸皆可使用於本發明內容。事實上，可使用非天然胺基酸係習知於此項技術領域。

**【0149】** 較佳具體例中，本發明之包含抗原-結合域(具有抗原-結合活性於酸性 pH 範圍係較低於中性 pH 範圍者)之抗原-結合分子，包含抗原-結合分子其中抗原-結合分子中之至少一個胺基酸係經以組胺酸或非天然胺基酸取代及/或其中至少一個組胺酸或非天然胺基酸經插入。經組胺酸或非天然胺基酸突變所導入之位點不特別限定且可為任何位點只要此項技術領域者認為合適的皆可，限制條件為所得抗原-結合活性相較於取代之前，於酸性 pH 範圍係較弱於於中性 pH 範圍者( $KD(\text{於酸性 pH 範圍})/KD(\text{於中性 pH 範圍})$ 值係較大或  $kd(\text{於酸性 pH 範圍})/kd(\text{於中性 pH 範圍})$ 值係較大)。於抗原-結合分子為抗體的情況中，實例包含抗體之可變區與 CDR。欲以組胺酸或非天然胺基酸置換之胺基酸數目以及欲插入之胺基酸數目可由此項技術領域者合適地予以選擇。一個胺基酸可經組胺酸或非天然胺基酸置換，或一個胺基酸可經插入，或二個或更多個胺基酸可經組胺酸或非天然胺基酸置換，換二個或更多個胺基酸可經插入。再者，除了組胺酸或非天然胺基酸之取代，或組胺酸或非天然胺基酸之插入，亦可同時進行其他胺基酸之刪除、增加及/或取代等。組胺酸或非天然胺基酸之取代，或組胺酸或非天然胺基酸之插入，可使用如組胺酸掃描之方法隨機進行，於丙胺酸掃描中以丙胺酸取代組胺酸為此項技術領域者所習知。其  $KD(\text{pH}5.8)/KD(\text{pH}7.4)$ 或  $kd(\text{pH}5.8)/kd(\text{pH}7.4)$ 相較於突

變之前係增加的抗原-結合分子，可由其中經隨機導入組胺酸或非天然胺基酸突變之抗原-結合分子。

**【0150】** 較佳地，抗原-結合域之結合活性於中性 pH(亦即，pH7.4)係予以維持的。當抗原-結合分子之抗原-結合活性於組胺酸或非天然胺基酸突變之前設定為 100%，該抗原-結合分子之抗原-結合活性於 pH7.4 於組胺酸或非天然胺基酸突變之後為至少 10%或更高，較佳為 50%或更高，更較佳為 80%或更高以及再較佳為 90%或更高。抗原-結合活性於 pH 7.4 在組胺酸或非天然胺基酸突變之後可較抗原-結合活性於 pH 7.4 在組胺酸或非天然胺基酸突變之前為更強。當該抗原-結合分子之抗原-結合活性因為組胺酸或非天然胺基酸之取代或插入而增加時，抗原-結合活性可藉由導入一個或多個胺基酸之取代、刪除、增加及/或插入等至抗原-結合分子予以調整而使抗原-結合活性變成與組胺酸取代或插入之前相等。

**【0151】** 本發明內容中，當抗原-結合分子為抗體時，組胺酸或非天然胺基酸取代之可能位點包含，例如，抗體之 CDR 序列以及負責 CDR 結構之序列，包含，例如，揭示於專利 WO 2009/125825 之位點。

**【0152】** 再者，本發明提供抗原-結合分子其具有組胺酸或非天然胺基酸之取代於下述位點之至少一個胺基酸

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

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

H32、H61、L53、L90 與 L94 之該等改變位點，係推測為一般之高度改變位點。胺基酸位置係顯示根據 Kabat 編號 (Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.(1991))。當指稱可變域中的殘基時，通常使用 Kabat 編號系統(大約輕鏈之殘基 1 至 170 與重鏈之殘基 1 至 113)。對於組胺酸或非天然胺基酸取代之具體較佳位點組合包含，例如，H27、H31 與 H35 之組合；H27、H31、H32、H35、H58、H62 與 H102 之組合；L32 與 L53 之組合；以及 L28、L32 與 L53 之組合。再者，於重鏈與輕鏈之取代位點之較佳組合包含，例如，H27、H31、L32 與 L53 之組合。

**【0153】** 當抗原為 IL-6 受體(例如，人類 IL-6 受體)時，較佳改變位點包含但不特別限定於下述者：

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

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

對於組胺酸或非天然胺基酸取代之位點之具體較佳組合包含，例如，H27、H31 與 H35 之組合；H27、H31、H32、H35、H58、H62 與 H102 之組合；L32 與 L53 之組合；以及 L28、L32 與 L53 之組合。再者，於重鏈與輕鏈之取代位點之較佳組合包含，例如，H27、H31、L32 與 L53 之組合。

**【0154】** 組胺酸或非天然胺基酸可經取代於上述位置之一個或多個。

**【0155】** 或者，本發明之抗原-結合分子可包含經改變以使

抗原-結合活性於 pH5.8 係較低於 pH7.4 者之抗體恆定區。用於改變 Methods for altering 包含於抗原-結合分子之抗體恆定區的方法對於此項技術領域者為習知且確實為常規的。改變後抗體恆定區之具體實例包含揭示於專利 WO 2009/125825(序列編號：11、12、13 與 14)實施例之恆定區。

**【0156】** 同時，用於改變抗體恆定區的方法包含，例如用於評估各種恆定區同型(IgG1、IgG2、IgG3 與 IgG4)與選擇於酸性範圍降低抗原-結合活性之同型(增加於酸性 pH 範圍之解離速率)之方法為已知。該等方法亦包含藉由導入胺基酸取代至野生型同型之胺基酸序列(野生型 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 之胺基酸序列)而降低於酸性 pH 範圍之抗原-結合活性(增加於酸性 pH 範圍之解離速率)的方法。The sequence of hinge 區域 in the 抗體恆定區之鉸鏈區序列被考慮於同型(IgG1, IgG2, IgG3 與 IgG4)之間有差異且於鉸鏈區胺基酸序列之差異對於抗原-結合活性具有重大影響。因此，可能跟具抗原或抗原決定基的類型而選擇合適的同型以降低於酸性 pH 範圍之抗原-結合活性(增加於酸性 pH 範圍之解離速率)。再者，由於鉸鏈區胺基酸序列的差異對於抗原-結合活性具有重大影響，於野生型同型之胺基酸序列之較加胺基酸取代係推測於鉸鏈區內。

**【0157】** 上述方法可藉由胺基酸取代或插入而自不具該等性質之抗原-結合分子製造於酸性 pH 範圍之抗原-結合活性係經降低(減弱)至低於中性 pH 範圍者(抗原-結合分子結合為 pH-依賴性方式)之抗原-結合分子。其他方法包含用於直接獲得具有上述性質之抗原-結合分子的方法。例如，具有所欲之感興

趣性質的抗體可使用 pH-依賴性抗原結合作為指示劑，由藉由以抗原將動物(小屬、大屬、倉鼠、兔、人類免疫球蛋白-基因轉殖鼠、人類免疫球蛋白-基因轉殖鼠、人類免疫球蛋白-基因轉殖兔、羊駝、駱駝等)免疫所獲得之抗體，藉由篩選而直接予以選擇。抗體可藉由融合瘤技術或 B-細胞選殖技術 (Bernasconi et al, Science(2002) 298, 2199-2202 ; 專利 WO2008/081008)予以製造，其為此項技術領域所習知之方法，但不限定為該等方法。或者，具有感興趣性質之抗體可使用 pH-依賴性抗原結合作為指示劑，於活體外自存在之抗原-結合域庫藉由篩選而直接予以選擇。該等庫包含此項技術領域者所習知庫之人類原始庫、由非-人類哺乳動物與人類之經免疫庫、半合成庫與合成庫 (Methods Mol Biol. 2002 ; 178 : 87-100 ; J Immunol Methods. 2004 Jun ; 289(1-2) : 65-80 ; and Expert Opin Biol Ther. 2007 May ; 7(5) : 763-79)，但不限於該等。然而，方法不特別限定於該等實例。

**【0158】 B) 離子化鈣-依賴性抗原-結合域**

較佳具體例中，本發明之抗原-結合分子包含鈣-離子依賴性抗原-結合域。該抗原-結合分子之抗原-結合活性依賴於鈣濃度，藉此抗原-結合活性於低鈣濃度係較低於高鈣濃度者。

**【0159】** 較佳地，抗原-結合活性包含抗原-結合活性於 0.5 至 10 微莫耳之離子化鈣濃度。更較佳地離子化鈣濃度包含於活體內早期內體中之離子化鈣濃度。具體地，抗原-結合活性包含活性於 1 至 5 微莫耳。同時，抗原-結合分子之抗原-結合活性於高鈣濃度不特別限定，限制條件為抗原-結合活性於

100 微莫耳至 10 mM 之離子化鈣濃度。較佳地，抗原-結合活性包含抗原-結合活性於 200 微莫耳至 5 mM 之離子化鈣濃度。較佳地，低鈣濃度為 0.1 至 30 微莫耳之離子化鈣濃度以及高鈣濃度為 100 微莫耳至 10 mM 之離子化鈣濃度。

【0160】較佳地，低鈣濃度為離子化鈣之內體內濃度以及高鈣濃度為離子化鈣之血漿濃度。更具體地，包含該鈣-依賴性抗原-結合域之抗原-結合分子包含抗原-結合分子其抗原-結合活性於活體內早期抗體之離子化鈣濃度(如 1 至 5 微莫耳之低鈣濃度)係較低於活體內血之離子化鈣濃度(如 0.5 至 2.5 mM 之高鈣濃度)。

【0161】相對於抗原-結合活性於低鈣濃度係較低於高鈣濃度者之抗原-結合分子之抗原-結合活性，並無特別於抗原-結合活性中之此差異，限制條件抗原-結合活性於低鈣濃度係較低於高鈣濃度者。甚至可接受抗原-結合分子之抗原-結合活性於低鈣濃度條件下僅些微較低。

【0162】較佳具體例中，對於本發明之其抗原-結合活性於低鈣濃度(低 Ca)係較低於高鈣濃度(高 Ca)之抗原-結合分子， $KD(\text{低鈣})/KD(\text{高鈣})$ 之值，其為低鈣濃度與高鈣濃度之間的 KD 比例，為 2 或更大，較佳  $KD(\text{低鈣})/KD(\text{高鈣})$ 之值為 10 或更大以及更較佳  $KD(\text{低鈣})/KD(\text{高鈣})$ 之值為 40 或更大。 $KD(\text{低鈣})/KD(\text{高鈣})$ 值之上限並不特別限定且可為任何值如 400、1,000 與 10,000，限制條件為其可藉由此項技術領域者所習知之技術予以製造。

【0163】較佳具體例中，對於包含其抗原-結合活性於低鈣

濃度係較低於高鈣濃度者之鈣-依賴性抗原-結合域之抗原-結合分子， $k_d(\text{低鈣})/k_d(\text{高鈣})$ 之值，其為低鈣濃度與 pH7.4 時的 KD 比例，為 2 或更大，較佳  $k_d(\text{低鈣})/k_d(\text{高鈣})$ 之值為 5 或更大，更較佳  $k_d(\text{低鈣})/k_d(\text{高鈣})$ 之值為 10 或更大以及再較佳  $k_d(\text{低鈣})/k_d(\text{高鈣})$ 之值為 30 或更大。 $k_d(\text{低鈣})/k_d(\text{高鈣})$ 值之上限並不特別限定且可為任何值如 50、100 與 200，限制條件為其可藉由此項技術領域者所習知之技術予以製造。

**【0164】** 抗原-結合分子之抗原-結合活性可藉由此項技術領域所習知之方法予以測定。合適的條件除了離子化鈣濃度之外可由此項技術領域者予以選擇。抗原-結合分子之抗原-結合活性可藉由使用 KD(解離常數)、表觀 KD(表觀解離常數)、解離速率  $k_d$ (解離速率)、表觀  $k_d$ (表觀解離：表觀解離速率)等予以評估。其等可藉由此項技術領域者所習知之方法予以測定，例如，使用 Biacore (GE Healthcare)、Scatchard plot、FACS 等。

**【0165】** 欲藉由本發明之篩選方法予以篩選之抗原-結合分子可為任何抗原-結合分子。其可篩選，例如，具有天然序列之抗原-結合分子或具有含取代之胺基酸序列之抗原-結合分子。欲藉由本發明之篩選方法予以篩選之包含鈣-離子依賴性抗原-結合域之抗原-結合分子可藉由任何方法製備。可能使用，例如，預先存在之抗體、預先存在之庫(噬菌體庫等)與自經免疫動物之 B 細胞或將動物免疫所製備之融合瘤而製備之抗體與庫、藉由將能螯合鈣之胺基酸(例如，天冬胺酸或麩胺酸)或非天然胺基酸突變導入至該等抗體或庫(具有高含量之非

天然胺基酸或能螯合鈣之胺基酸(例如，天冬胺酸或麩胺酸)之庫、經於特定位點導入非天然胺基酸突變或能螯合鈣之胺基酸突變之庫等)所獲得之抗體或庫等。

**【0166】** 抗原-結合分子其抗原-結合活性於低鈣濃度條件係較低於高鈣濃度條件者可使用習知於此項技術的方法(參照例如 PCT 申請案號 PCT/JP2011/077619)容易地予以篩選、鑑定與單離。該等篩選方法之實例包對於具有至少一種選自下述功能之抗原-結合分子進行分析的步驟：

- 促進抗原攝入至細胞的功能；
- 結合至抗原二次或更多次的功能；
- 促進降低血漿抗原濃度的功能；以及
- 優異血漿滯留的功能。

**【0167】** 具體地，本發明提供篩選包含鈣-離子依賴性抗原-結合域之抗原-結合分子的方法，其包含下述步驟：

- 測定抗原-結合分子於低鈣濃度條件之抗原-結合活性；
- 測定抗原-結合分子於高鈣濃度條件之抗原-結合活性；以及

選擇抗原-結合分子其抗原-結合活性於低鈣濃度條件係較低於高鈣濃度條件者。

**【0168】** 製造具有鈣-離子依賴性抗原-結合域之抗原-結合分子的方法式例如包含下述步驟之方法：

- 測定抗原-結合分子於低鈣濃度條件之抗原-結合活性；
- 測定抗原-結合分子於高鈣濃度條件之抗原-結合活性；以及

選擇抗原-結合分子其抗原-結合活性於低鈣濃度條件係較低於高鈣濃度條件者。

**【0169】** 製造具有鈣-離子依賴性抗原-結合域之抗原-結合分子的另一方法是例如包含下述步驟之方法：

使抗原與抗原-結合分子或抗原-結合分子庫於高鈣濃度條件接觸；

獲得步驟(a)中之結合至抗原的抗原-結合分子；

使步驟(b)獲得之抗原-結合分子置於低鈣濃度條件；

獲得抗原-結合分子其抗原-結合活性於步驟(c)係較低於步驟(b)選擇之活性；

獲得編碼步驟(d)所獲得之抗原-結合分子的基因；以及

使用步驟(e)所獲得之基因製造抗原-結合分子。

步驟(a)至(e)可重複二次或更多次。因此，本發明提供進一步包括於上述方法中步驟(a)至(e)重複二次或更多次的方法。步驟(a)至(e)重複的數目不特別限定；然而，該數目通常為 10 或更少。

**【0170】** 使用於本發明製造方法之抗原-結合分子可藉由任何傳統方法製備。例如，可能使用預先存在之抗體、預先存在之庫(噬菌體庫等)、自經將動物免疫所製備之融合瘤或免疫動物之 B 細胞所製備之抗體與庫、藉由將組氨酸或非天然胺基酸突變導入至上述抗體與庫(具有高含量之組氨酸或非天然胺基酸之庫、經於特定位點導入組氨酸或非天然胺基酸之庫等)所製備之抗體或庫等。

篩選該等鈣-離子依賴性抗原-結合分子或鈣-離子依賴性

抗原-結合域之進一步的方法係揭示於 PCT 專利申請案號 PCT/JP2011/077619。

【0171】 抗原

藉由本發明之抗原-結合分子所辨識之抗原，例如本發明之抗體，不特別限定。該等本發明之抗原-結合分子可辨識任何抗原。藉由本發明之抗原-結合分子所辨識之抗原的具體實例包含但不限於：17-IA、4-1 BB、4Dc、6-酮基-PGF1a、8-異-PGF2a、8-側氧基-dG、A1 腺苷受體、A33、ACE、ACE-2、活化素、活化素 A、活化素 AB、活化素 B、活化素 C、活化素 RIA、活化素 RIA ALK-2、活化素 RIB ALK-4、活化素 RIIA、活化素 RIIB、ADAM、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17/TACE、ADAM8、ADAM9、ADAMTS、ADAMTS4、ADAMTS5、地址素、脂聯素、ADP 核糖基環化酶-1、aFGF、AGE、ALCAM、ALK、ALK-1、ALK-7、過敏原、 $\alpha$ 1-抗胰凝乳蛋白酶、 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶、 $\alpha$ -突觸核素、 $\alpha$ -V/ $\beta$ -1 拮抗劑、阿密寧(aminin)、澱粉不溶素、澱粉樣蛋白  $\beta$ 、澱粉樣蛋白免疫球蛋白重鏈可變區、澱粉樣蛋白免疫球蛋白輕鏈可變區、雄激素、ANG、血管升壓素、血管生成素 配體-2、抗-Id、抗凝血素 III、Anthrax、APAF-1、APE、APJ、apo A1、apo 血清澱粉樣蛋白 A、Apo-SAA、APP、APRIL、AR、ARC、ART、Artemin、ASPARTIC、心房肽因子、心房肽、心房肽 A、心房肽 B、心房肽 C、av/b3 整合素、Axl、B7-1、B7-2、B7-H、BACE、BACE-1、炭疽桿菌保護性抗原、Bad、BAFF、BAFF-R、Bag-1、BAK、Bax、BCA-1、BCAM、Bcl、BCMA、BDNF、b-ECGF、 $\beta$ -2-微

球蛋白、 $\beta$  內醯胺酶、bFGF、BID、Bik、BIM、BLC、BL-CAM、BLK、B-淋巴球刺激子(BIyS)、BMP、BMP-2(BMP-2a)、BMP-3(成骨素)、BMP-4(BMP-2b)、BMP-5、BMP-6(Vgr-1)、BMP-7(OP-1)、BMP-8(BMP-8a)、BMPR、BMPR-IA(ALK-3)、BMPR-IB(ALK-6)、BMPR-II(BRK-3)、BMPs、BOK、蛙皮素、骨-衍生神經營養因子、骨生長荷爾蒙、BPDE、BPDE-DNA、BRK-2、BTC、B-淋巴球細胞黏附分子、C10、C1-i 抑制劑、C1q、C3、C3a、C4、C5、C5a(補體 5a)、CA125、CAD-8、鈣黏著蛋白-3、抑鈣素(Calcitonin)、cAMP、碳酸酞媒-IX、癌胚胎抗原(CEA)、癌-關聯抗原、心肌營養素-1、組織蛋白酶 A、組織蛋白酶 B、組織蛋白酶 C/DPPI、組織蛋白酶 D、組織蛋白酶 E、組織蛋白酶 H、組織蛋白酶 L、組織蛋白酶 O、組織蛋白酶 S、組織蛋白酶 V、組織蛋白酶 X/Z/P、CBL、CCI、CCK2、CCL、CCL1/I-309、CCL11/嗜酸細胞活化驅化因子、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- $\alpha$ 、CCL21/SLC、CCL22/MDC、CCL23/MPIF-1、CCL24/嗜酸細胞活化驅化因子-2、CCL25/TECK、CCL26/嗜酸細胞活化驅化因子-3、CCL27/CTACK、CCL28/MEC、CCL3/M1P-1- $\alpha$ 、CCL3L1/LD-78- $\beta$ 、CCL4/MIP-1- $\beta$ 、CCL5/RANTES、CCL6/C10、CCL7/MCP-3、CCL8/MCP-2、CCL9/10/MTP-1- $\beta$ 、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 蛋白質)、CD34、CD37、  
 CD38、CD3E、CD4、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、  
 CD49a、CD49b、CD5、CD51、CD52、CD54、CD55、CD56、  
 CD6、CD61、CD64、CD66e、CD7、CD70、CD74、CD8、  
 CD80(B7-1)、CD89、CD95、CD105、CD158a、CEA、CEACAM5、  
 CFTR、cGMP、CGRP 受體、CINC、CKb8-1、緊密連結蛋白  
 18、CLC、肉毒桿菌毒素、困難梭狀芽孢桿菌毒素、產氣莢膜  
 梭狀芽孢桿菌毒素、c-Met、CMV、CMV UL、CNTF、CNTN-1、  
 補體因子 3(C3)、補體因子 D、皮質類固醇結合球蛋白、菌落  
 刺激因子-1 受體、COX、C-Ret、CRG-2、CRTH2、CT-1、CTACK、  
 CTGF、CTLA-4、CX3CL1/Fractalkine、CX3CR1、CXCL、  
 CXCL1/Gro- $\alpha$ 、CXCL10、CXCL11/I-TAC、CXCL12/SDF-1- $\alpha/\beta$ 、  
 CXCL13/BCA-1、CXCL14/BRAK、CXCL15/Lungkine、  
 CXCL16、CXCL16、CXCL2/Gro- $\beta$ 、CXCL3/Gro- $\beta$ 、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、血清胱蛋白 C、  
 細胞角質蛋白腫瘤-關聯抗原、DAN、DCC、DcR3、DC-SIGN、  
 破壞加速因子、類  $\delta$  蛋白質配體 4、des(1-3)-IGF-1(腦 IGF-1)、  
 Dhh、DHICA 氧化酶、Dickkopf-1、毛地黃、二肽醯肽酶 IV、  
 DK1、DNAM-1、Dnase、Dpp、DPPIV/CD26、Dtk、ECAD、EDA、

EDA-A1、EDA-A2、EDAR、EGF、EGFR(ErbB-1)、含類 EGF 域蛋白質 7、彈性蛋白酶、彈性素、EMA、EMMPRIN、ENA、ENA-78、內皮唾液酸蛋白、內皮受體、內毒素、腦啡肽酶、eNOS、Eot、嗜酸細胞活化驅化因子、嗜酸細胞活化驅化因子-2、嗜酸細胞活化驅化因子、EpCAM、Ephrin B2/EphB4、Epha2 酪胺酸激酶受體、表皮生長因子受體(EGFR)、ErbB2 受體、ErbB3 酪胺酸激酶受體、ERCC、紅血球生成素(EPO)、紅血球生成素受體、E-選擇素、ET-1、Exodus-2、RSV 之 F 蛋白質、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 $\alpha$ R、Fc $\epsilon$ RI、Fc $\beta$ IIb、Fc $\beta$ RI、Fc $\beta$ RIIa、Fc $\beta$ RIIIa、Fc $\beta$ RIIIb、FcRn、FEN-1、鐵蛋白、FGF、FGF-19、FGF-2、FGF-2 受體、FGF-3、FGF-8、FGF-酸性、FGF-鹼性、FGFR、FGFR-3、纖維蛋白、纖維母細胞激活蛋白 (FAP)、纖維母細胞生長因子、纖維母細胞生因子-10、纖維連蛋白、FL、FLIP、Flt-3、FLT3 配體、葉酸受體、濾泡刺激荷爾蒙(FSH)、Fractalkine(CX3C)、游離重鏈、游離輕鏈、FZD1、FZD10、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、G250、Gas 6、GCP-2、GCSF、G-CSF、G-CSF 受體、GD2、GD3、GDF、GDF-1、GDF-15(MIC-1)、GDF-3(Vgr-2)、GDF-5(BMP-14/CDMP-1)、GDF-6(BMP-13/CDMP-2)、GDF-7(BMP-12/CDMP-3)、GDF-8(肌肉生長抑制素)、GDF-9、GDNF、凝溶膠蛋白、GFAP、GF-CSF、GFR- $\alpha$ 1、GFR- $\alpha$ 2、GFR- $\alpha$ 3、GF- $\beta$ 1、gH 套膜糖蛋白、GITR、升糖素、升糖素受體、類升糖素肽 1 受體、Glut 4、麩胺酸羧

肽酶 II、糖蛋白荷爾蒙受體、糖蛋白 IIb/IIIa(GP IIb/IIIa)、磷脂醯肌醇蛋白聚糖-3、GM-CSF、GM-CSF 受體、gp130、gp140、gp72、顆粒球-CSF(G-CSF)、GRO/MGSA、生長荷爾蒙釋放因子、GRO- $\beta$ 、GRO- $\beta$ 、幽門螺旋桿菌、半抗原(NP-cap 或 NIP-cap)、HB-EGF、HCC、HCC 1、HCMV gB 套膜糖蛋白、HCMV UL、造血生長因子(HGF)、Hep B gp120、乙醯肝素酶、肝素輔因子 II、肝細胞生長因子、炭疽桿菌保護抗原、肝炎 C 病毒 E2 糖蛋白、肝炎 E、鐵調素、Her1、Her2/neu(ErbB-2)、Her3(ErbB-3)、Her4(ErbB-4)、單純疱疹病毒(HSV) gB 糖蛋白、HGF、HGFA、高分子量黑色素瘤-關聯抗原(HMW-MAA)、HIV 套膜蛋白質 such as GP120、HIV MIB gp 120 V3 環、HLA、HLA-DR、HM1.24、HMFG PEM、HMG B-1、HRG、Hrk、HSP47、Hsp90、HSV gD 糖蛋白、人類心肌肌球蛋白、人類巨細胞病毒(HCMV)、人類生長荷爾蒙(hGH)、人類血清白蛋白、人類組織型纖維蛋白溶原活化劑(t-PA)、Huntingtin、HVEM、IAP、ICAM、ICAM-1、ICAM-3、ICE、ICOS、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\beta$ 、IgA、IgA 受體、IgE、IGF、IGF 結合蛋白質、IGF-1、IGF-1 R、IGF-2、IGFBP、IGFR、IL、IL-1、IL-10、IL-10 受體、IL-11、IL-11 受體、IL-12、IL-12 受體、IL-13、IL-13 受體、IL-15、IL-15 受體、IL-16、IL-16 受體、IL-17、IL-17 受體、IL-18(IGIF)、IL-18 受體、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-1 受體、IL-2、IL-2 受體、IL-20、IL-20 受體、IL-21、IL-21 受體、IL-23、IL-23 受體、IL-2 受體、IL-3、IL-3 受體、IL-31、IL-31 受體、IL-3 受體、IL-4、IL-4 受體 IL-5、IL-5 受體、IL-6、IL-6 受體、IL-7、IL-7 受

體、IL-8、IL-8 受體、IL-9、IL-9 受體、免疫球蛋白免疫複合物、免疫球蛋白、INF- $\alpha$ 、INF- $\alpha$  受體、INF- $\beta$ 、INF- $\beta$  受體、INF- $\beta$ 、INF- $\beta$  受體、IFN type-I、IFN type-I 受體、流感病毒、抑制素、抑制素  $\alpha$ 、抑制素  $\beta$ 、iNOS、胰島素、胰島素 A-鏈、胰島素 B-鏈、類胰島素生長因子 1、類胰島素生長因子 2、類胰島素生長因子結合蛋白質、整合素、整合素  $\alpha 2$ 、整合素  $\alpha 3$ 、整合素  $\alpha 4$ 、整合素  $\alpha 4/\beta 1$ 、整合素  $\alpha-V/\beta-3$ 、整合素  $\alpha-V/\beta-6$ 、整合素  $\alpha 4/\beta 7$ 、整合素  $\alpha 5/\beta 1$ 、整合素  $\alpha 5/\beta 3$ 、整合素  $\alpha 5/\beta 6$ 、整合素  $\alpha-\delta(\alpha V)$ 、整合素  $\alpha-\theta$ 、整合素  $\beta 1$ 、整合素  $\beta 2$ 、整合素  $\beta 3$ (GPIIb-IIIa)、IP-10、I-TAC、JE、激肽釋放酶(kallikrein)、激肽釋放酶 11、激肽釋放酶 12、激肽釋放酶 14、激肽釋放酶 15、激肽釋放酶 2、激肽釋放酶 5、激肽釋放酶 6、激肽釋放酶 L1、激肽釋放酶 L2、激肽釋放酶 L3、激肽釋放酶 L4、激肽釋放酶抑制劑(kallistatin)、KC、KDR、角化細胞生長因子(KGF)、角化細胞生長因子-2(KGF-2)、KGF、類殺手免疫球蛋白受體、kit 配體(KL)、Kit 酪胺酸激酶、層黏連蛋白 5、LAMP、LAPP(澱粉不溶素、islet-澱粉樣蛋白多肽)、LAP(TGF-1)、潛伏關聯肽、潛 TGF-1、潛 TGF-1 bp1、LBP、LDGF、LDL、LDL 受體、LECT2、Lefty、瘦體素、促黃體荷爾蒙(LH)、Lewis-Y 抗原、Lewis-Y 相關抗原、LFA-1、LFA-3、LFA-3 受體、Lfo、LIF、LIGHT、脂蛋白類、LIX、LKN、Lptn、L-選擇素、LT-a、LT-b、LTB4、LTBP-1、肺表面活性劑、促黃體荷爾蒙、淋巴細胞驅化因子、淋巴細胞毒素 B 受體、Lyso 鞘脂受體、Mac-1、巨噬細胞-CSF(M-CSF)、MAdCAM、MAG、MAP2、MARC、乳腺

絲胺酸蛋白酶抑制因子、MCAM、MCK-2、MCP、MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-I(MCAF)、M-CSF、MDC、MDC(67 a.a.)、MDC(69 a.a.)、絲胺酸蛋白酶抑制因子(megsin)、Mer、MET 酪胺酸激酶受體家族、METALLOPROTEASES、膜糖蛋白 OX2、間皮素、MGDF 受體、MGMT、MHC(HLA-DR)、微生物蛋白質、MIF、MIG、MIP、MIP-1  $\alpha$ 、MIP-1  $\beta$ 、MIP-3  $\alpha$ 、MIP-3  $\beta$ 、MIP-4、MK、MMAC1、MMP、MMP-1、MMP-10、MMP-11、MMP-12、MMP-13、MMP-14、MMP-15、MMP-2、MMP-24、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、單核細胞吸引蛋白質、單核細胞菌落抑制性因子、小鼠促性腺激素關聯肽、MPIF、Mpo、MSK、MSP、MUC-16、MUC18、黏蛋白(Mud)、穆勒氏-抑制物質、Mug、MuSK、髓鞘關聯糖蛋白、骨髓原始抑制劑因子-1(MPIF-I)、NAIP、奈米抗體、NAP、NAP-2、NCA 90、NCAD、N-鈣黏著素、NCAM、腦啡肽酶、神經細胞黏著分子、神經絲抑蛋白(neroserpín)、神經細胞生長因子(NGF)、神經營養蛋白-3、神經營養蛋白-4、神經營養蛋白-6、神經鞭毛素蛋白 1、神經鐵蛋白(Neurturin)、NGF- $\beta$ 、NGFR、NKG20、N-甲硫基人類生長荷爾蒙、nNOS、NO、Nogo-A、Nogo 受體、來自 C 型肝炎病毒之非結構蛋白型 3(NS3)、NOS、Npn、NRG-3、NT、NT-3、NT-4、NTN、OB、OGG1、抑瘤素 M、OP-2、OPG、OPN、OSM、OSM 受體、骨誘導因子、谷橋蛋白、OX40L、OX40R、經氧化 LDL、p150、p95、PADPr、副甲狀腺荷爾蒙、PARC、PARP、PBR、PBSF、PCAD、P-鈣黏著素、PCNA、PCSK9、PDGF、PDGF 受體、PDGF-AA、PDGF-AB、

PDGF-BB、PDGF-D、PDK-1、PECAM、PEDF、PEM、PF-4、  
 PGE、PGF、PGI<sub>2</sub>、PGJ<sub>2</sub>、PIGF、PIN、PLA<sub>2</sub>、胎盤生長因子、  
 胎盤鹼性磷酸酶 (PLAP)、胎盤催乳激素、血纖維蛋白溶解  
 酶原活化劑抑制劑-1、血小板生長因子、p1gR、PLP、不同尺  
 寸之聚二醇鏈(例如 PEG-20、PEG-30、PEG40)、PP14、前激肽  
 釋放酶、普里昂(prion)蛋白質、前降鈣素、計劃性胞死亡蛋白  
 質 1、pro 胰島素、泌乳素、前驅蛋白質轉化素 PC9、弛激素  
 原、前列腺特異性膜抗原(PSMA)、蛋白質 A、蛋白質 C、蛋  
 白質 D、蛋白質 S、蛋白質 Z、PS、PSA、PSCA、PsmAr、  
 PTEN、PTHrp、Ptk、PTN、P-選擇素糖蛋白配體-1、R51、RAGE、  
 RANK、RANKL、RANTES、弛激素、弛激素 A-鏈、弛激素 B-  
 鏈、腎素、呼吸道合瘤病毒(RSV) F、Ret、網狀蛋白(reticulon)  
 4、類風濕性因子、RLI P76、RPA2、RPK-1、RSK、RSV Fgp、  
 S100、RON-8、SCF/KL、SCGF、Sclerostin、SDF-1、SDF1  $\alpha$ 、  
 SDF1  $\beta$ 、絲胺酸、血清澱粉樣蛋白 P、血清白蛋白、sFRP-3、  
 Shh、類志賀氏毒素 II、SIGIRR、SK-1、SLAM、SLPI、SMAC、  
 SMDF、SMOH、SOD、SPARC、鞘胺醇 1-磷酸酯受體 1、葡萄  
 球菌脂磷壁酸、Stat、STEAP、STEAP-II、幹細胞因子(SCF)、  
 鏈激酶、超氧化物歧化酶、多配體蛋白聚醣(syndecan)-1、  
 TACE、TACI、TAG-72(腫瘤關聯糖蛋白-72)、TARC、TB、  
 TCA-3、T-cell 受體  $\alpha/\beta$ 、TdT、TECK、TEM1、TEM5、TEM7、  
 TEM8、肌腱蛋白、TERT、睪丸類 PLAP 鹼性磷酸酶、TfR、  
 TGF、TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、TGF- $\beta$  Pan 特異性、TGF- $\beta$  RII、TGF- $\beta$   
 RIIb、TGF- $\beta$  RIII、TGF- $\beta$  R1(ALK-5)、TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2、

TGF- $\beta$ 3、TGF- $\beta$ 4、TGF- $\beta$ 5、TGF-I、凝血酶、促血小板生成素 (TPO)、胸腺間質淋巴生成素受體、胸腺 Ck-1、甲狀腺刺激荷爾蒙 (TSH)、甲狀腺素、甲狀腺素-結合球蛋白、Tie、TIMP、TIQ、組織因子、組織因子蛋白酶抑制劑、組織因子蛋白質、TMEFF2、Tmpto、TMPRSS2、TNF 受體 I、TNF 受體 II、TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、TNF- $\beta$ 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 (DR3 Apo-3/LARD/TR-3/TRAMP/WSL-1)、TNFRSF26 (TNFRH3)、TNFRSF3 (LTbR TNF RIII/TNFC R)、TNFRSF4 (OX40 ACT35/TXGP1 R)、TNFRSF5 (CD40 p50)、TNFRSF6 (Fas Apo-1/APT1/CD95)、TNFRSF6B (DcR3 M68/TR6)、TNFRSF7 (CD27)、TNFRSF8 (CD30)、TNFRSF9 (4-1 BB CD137/ILA)、TNFRST23 (DcTRAIL R1 TNFRH1)、TNFSF10 (TRAIL Apo-2 配體/TL2)、TNFSF11 (TRANCE/RANK

配體 ODF/OPG 配體)、TNFSF12(TWEAK Apo-3 配體/DR3 配體)、TNFSF13(APRIL TALL2)、TNFSF13B(BAFF BLYS/TALL1/THANK/TNFSF20)、TNFSF14(LIGHT HVEM 配體/LTg)、TNFSF15(TL1A/VEGI)、TNFSF18(GITR 配體 AITR 配體/TL6)、TNFSF1A(TNF- $\alpha$  Conectin/DIF/TNFSF2)、TNFSF1B(TNF- $\beta$  LTa/TNFSF1)、TNFSF3(LTb TNFC/p33)、TNFSF4(OX40 配體 gp34/TXGP1)、TNFSF5(CD40 配體 CD154/gp39/HIGM1/IMD3/TRAP)、TNFSF6(Fas 配體 Apo-1 配體/APT1 配體)、TNFSF7(CD27 配體 CD70)、TNFSF8(CD30 配體 CD153)、TNFSF9(4-1 BB 配體 CD137 配體)、TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、TNIL-I、毒性代謝物、TP-1、t-PA、Tpo、TRAIL、TRAIL R、TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRANCE、轉鐵蛋白受體、轉型生長因子(TGF)如 TGF- $\alpha$  與 TGF- $\beta$ 、穿膜糖蛋白 NMB、運甲狀腺蛋白(Transthyretin)、TRF、Trk、TROP-2、滋養母細胞糖蛋白、TSG、TSLP、腫瘤壞死因子(TNF)、腫瘤關聯抗原 CA 125、表現 Lewis Y 相關羧化酶之腫瘤關聯抗原、TWEAK、TXB2、Ung、uPAR、uPAR-1、尿激酶、VAP-1、血管內皮生長因子(VEGF)、脂肪特異性絲胺酸蛋白酶抑制劑(vaspin)、VCAM、VCAM-1、VECAD、VE-鈣黏著素、VE-鈣黏著素-2、VEGFR-1(flt-1)、VEGFR-2、VEGF 受體(VEGFR)、VEGFR-3(flt-4)、VEGI、VIM、病毒抗原、VitB12 受體、Vitronectin 受體、VLA、VLA-1、VLA-4、VNR 整合素、von Willebrand 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- $\beta$ 、XCL1/淋巴細胞驅化因子(Lymphotactin)、XCR1、XEDAR、XIAP、XPD、HMGB1、IgA、Aa、CD81、CD97、CD98、DDR1、DKK1、EREG、Hsp90、IL-17/IL-17R、IL-20/IL-20R、oxidized LDL、PCSK9、pre 激肽釋放酶、RON、TMEM16F、SOD1、嗜鉻粒蛋白 A、嗜鉻粒蛋白 B、tau、VAP1、高分子量激肽原、IL-31、IL-31R、Nav1.1、Nav1.2、Nav1.3、Nav1.4、Nav1.5、Nav1.6、Nav1.7、Nav1.8、Nav1.9、EPCR、C1、C1q、C1r、C1s、C2、C2a、C2b、C3、C3a、C3b、C4、C4a、C4b、C5、C5a、C5b、C6、C7、C8、C9、因子 B、因子 D、因子 H、備解素、硬化蛋白、纖維蛋白原、纖維蛋白、凝血原、凝血酶、組織因子、因子 V、因子 Va、因子 VII、因子 VIIa、因子 VIII、因子 VIIIa、因子 IX、因子 IXa、因子 X、因子 Xa、因子 XI、因子 XIa、因子 XII、因子 XIIa、因子 XIII、因子 XIIIa、TFPI、抗凝血酶 III、EPCR、調節蛋白、TAPI、tPA、血漿素原、血漿素、PAI-1、PAI-2、GPC3、多配體蛋白聚醣(Syndecan)-1、Syndecan-2、Syndecan-3、Syndecan-4、LPA、S1P。

**【0172】** 揭示於本發明之抗原結合分子能降低血漿中上述抗原的濃度。揭示於本發明之抗原結合分子亦能藉由結合至病毒、細菌與真菌之結構性組分而清除病毒、細菌與真菌。特別地，RSV、葡萄球菌磷脂壁酸、困難梭狀芽孢桿菌毒素、類志賀氏毒素 II、炭疽菌保護性抗原與 C 型肝炎病毒 E2 醣蛋白之 F 蛋白質可使用作為病毒、細菌與真菌之結構性組分。

**【0173】 用途**

本發明亦提供上述本發明之抗原-結合分子之多種用途。

**【0174】** 因此，本發明提供本發明之經改質抗原-結合分子用於改良抗原-結合分子-媒介抗原攝入至細胞的用途。再者，本發明亦提供用於改良抗原-結合分子-媒介抗原攝入至細胞的方法，包括改變包含親代 FcRn-結合域之抗原-結合分子，藉由取代胺基酸於親代 FcRn-結合域於選自下述所成群組之一個或多個位置： EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 與 EU436，且因而相較於具有完整 FcRn-結合域之抗原-結合分子於中性 pH 增加 FcRn-結合活性。

**【0175】** 本文中，詞語藉由抗原-結合分子媒介之「攝入至細胞的抗原」意指抗原被攝入至細胞係藉由胞吞作用。同時，本文中，詞語「有助於攝入至細胞」意指結合至抗原之抗原-結合分子於血漿中之細胞內攝入的速率係增加的及/或經射入抗原至血漿的循環量係降低的。此意指相較於 FcRn-結合域改質前之抗原-結合分子，係有助於攝入至細胞的速率且因此於增加抗原-結合分子於中性 pH 範圍之人類 FcRn-結合活性之前，或於增加抗原-結合分子於酸性 pH 範圍之人類 FcRn-結合活性且降低抗原-結合活性(結合能力)之前，係低於其中性 pH 範圍之抗原-結合活性。該速率係經改良較佳為相較於完整 IgG 與更較佳為相較於完整人類 IgG。因此，本發明，其抗原攝入至細胞係藉由抗原-結合分子而有所助益的，可以抗原攝入至細胞的速率為基準而予以評估。抗原攝入至細胞的速率可藉

由，例如，偵測於含有人類 FcRn-表現細胞之培養基於添加抗原與抗原-結合分子至該培養基後於該培養基中之抗原濃度的歷時降低，或偵測抗原攝入至人類 FcRn-表現細胞之歷時的量而予以計算。使用本發明之方法用以助於抗原-結合分子-媒介抗原攝入至細胞的速率，例如，藉由投藥本發明之抗原-結合分子可增加抗原自血漿清除的速率。因此，抗原-結合分子-媒介抗原攝入至細胞是否有助益的可藉由，例如，藉由投藥本發明之抗原-結合分子測試抗原自血漿清除的速率是否加速或血漿中總抗原濃度是否降低而予以評估。

【0176】本文中，詞語「血漿中總抗原濃度」意指結合抗原與未結合抗原之抗原-結合分子濃度之加總，「血漿中游離抗原濃度」為未結合抗原之抗原-結合分子濃度。測定「血漿中總抗原濃度」的各種方法如同後文所揭示之習知於此項技術領域。

【0177】本發明亦提供本發明之抗原-結合分子的用途，用以增加抗原於其將藉之前可結合至單一抗原-結合分子之總數。本發明亦提供用以增加抗原可結合至單一抗原-結合分子之數目的方法，係藉由使用本發明之抗原-結合分子。具體第，本發明亦提供用以增加抗原可結合至單一抗原-結合分子之數目的方法，係藉由取代胺基酸於該抗原-結分子之親代 FcRn-結合域於選自下述所成群組之一個或多個位置： EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 與 EU436 且因而相較於具有完整 FcRn-結合域之抗原-結合分子

於中性 pH 增加 FcRn-結合活性。

**【0178】** 「傳統抗體」於其將解於內體中前通常僅可結合一種或二種抗原。本發明之抗原-結合分子可增加循環數直到該抗原-結合分子降解，因此各循環由下述所組成：抗原於血漿中結合至抗原-結合分子，結合至抗原之抗原-結合分子之細胞內攝入以及於內體中自抗原解離，接著抗原-結合分子回至血漿。此意指相較於 FcRn-結合域改質前且因此於中性 pH 或酸性範圍增加抗原-結合分子之人類 FcRn-結合活性之前，或於增加人類 FcRn-結合活性與降低抗原-結合分子於酸性 pH 範圍之抗原-結合活性(結合能力)至低於其中性範圍之抗原-結合活性之前的抗原-結合分子，循環數係增加的。因此，循環述是否增加可藉由測試是否上述「有助於細胞內攝入」或是下述之「藥物動力學經改良」而予以評估。

**【0179】** 本發明亦提供本發明之抗原-結合分子用以改良自哺乳動物(亦即人類)血液之抗原-移除的用途。特別地，本發明提供本發明之抗原-結合分子用以降低特定抗原之血漿濃度的用途，其中該抗原-結合分子包括可結合至該抗原之抗原-結合域。本發明亦提供用以降低特定抗原之血漿濃度的方法，其中該抗原-結合分子包括可結合至該抗原之抗原-結合域，藉由取代胺基酸於親代 FcRn-結合域於選自下述所成群組之一個或多個位置： EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 與 EU436 且因而相較於具有完整 FcRn-結合域之抗原-結合分子於中性 pH 增加 FcRn-結合活性。

**【0180】** 本發明亦提供本發明之抗原-結合分子用以有助於抗原-游離抗原-結合分子之細胞外釋放之用途，該抗原-結合分子係以抗原-結合形式被攝入至細胞。更具體地，本發明亦提供用以有助於抗原-游離抗原-結合分子之細胞外釋放的方法，該抗原-結合分子係以抗原-結合形式被攝入至細胞，而相較於親代抗體不顯著增加於中性 pH 對於預先存在之 ADA 之結合活性，藉由取代胺基酸於親代 FcRn-結合域於選自下述所成群組之一個或多個位置： EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 與 EU436 且因於相較於具有完整 FcRn-結合域之抗原-結合分子於中性 pH 增加 FcRn-結合活性。

**【0181】** 本文中，「以抗原-結合形式被攝入至細胞之抗原-游離抗原-結合分子之細胞外釋放」不必然意指所有被攝入至細胞之結合至抗原之抗原-結合分子以抗原-游離形式被釋放至細胞外側。可接受的是相較於 FcRn-結合域改質前且因此於酸性 pH 範圍增加抗原-結合分子之抗原-結合活性之前至低於其中性 pH 範圍以及降低於酸性 pH 範圍之人類 FcRn-結合活性之前，以抗原-游離形式被釋放至細胞外側之抗原-結合分子的比例係增加的。釋放至細胞外側之抗原-結合分子較佳保留抗原-結合活性。

**【0182】** 本發明亦提供本發明之 FcRn-結合域的用途，用以增加抗原-結合分子清除血漿抗原的能力。本發明中，「用以增加清除血漿抗原的能力」為「使抗原-結合分子自血漿清除抗原的能力加倍的方法」之同意詞。更具體地，本發明亦提供

用以增加抗原-結合分子清除血漿抗原之能力的方法，藉由取代胺基酸於親代 FcRn-結合域於選自下述所成群組之一個或多個位置： EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 與 EU436 且因而相較於具有完整 FcRn-結合域之抗原-結合分子於中性及/或酸性 pH 增加增加 FcRn-結合活性。

**【0183】**本文中，詞語「清除血漿抗原之能力」意指當於活體內投藥或分泌抗原-結合分子時，自血漿移除抗原的能力。因此，本文中「增加抗原-結合分子清除血漿抗原的能力」意指相較於 FcRn-結合域改質前且因此於中性 pH 增加抗原-結合分子之人類 FcRn-結合活性之前，或於酸性 pH 範圍增加人類 FcRn-結合活性同時降低抗原-結合分子之抗原-結合活性(結合能力)至低於其中性範圍之抗原-結合活性之前，一旦投藥該抗原-結合分子，抗原自血漿清除的速率為加速的。抗原-結合分子自血漿清除抗原的能力的增加可藉由，例如，活體內投藥可溶性抗原與抗原-結合分子以及測定投藥後血漿中可溶性抗原的濃度而予以評估。當投藥可溶性抗原與經改質抗原-結合分子後血漿中可溶性抗原的濃度為降低時，抗原-結合分子清除血漿抗原的能力可判斷為增加的。可溶性抗原的形式可為 A form of soluble 抗原 can be 結合抗原之抗原-結合分子或未結合抗原之抗原-結合分子，其濃度可分別測定為「血漿中結合抗原-結合分子之抗原濃度」以及「血漿中為結核抗原-結合分子之抗原濃度」。後者係與「血漿中游離抗原濃度」為同義詞。

由於「血漿中總抗原濃度」意指結合抗原-結合分子之抗原濃度與未結合抗原-結合分子之抗原濃度之加總，或「血漿中游離抗原濃度」為為結合抗原-結合分子之抗原濃度，可溶性抗原的濃度可測定為「血漿中總抗原濃度」。如揭示於後文中之用於測定「血漿中總抗原濃度」或「血漿中游離抗原濃度」之各種方法為此項技術所習知。

【0184】本發明亦提供本發明之 FcRn-結合域用以改良抗原-結合分子之藥物動力學的用途。更具體地，本發明亦提供用以改良抗原-結合分子之藥物動力學的方法，係藉由取代胺基酸於親代 FcRn-結合域於選自下述所成群組之一個或多個位置： EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 與 EU436 且因而相較於具有完整 FcRn-結合域之抗原-結合分子於中性及/或酸性 pH 增加 FcRn-結合活性。

【0185】本文中，詞語「藥物動力學的增強」、「藥物動力學的改良」與「優異的藥物動力學」可再敘述為「血漿(血液)滯留的增強」、「血漿(血液)滯留的改良」或「優異的血漿(血液)滯留」與「延長的血漿(血液)滯留」。該等用語於本文中用作為同義詞。

改良藥物動力學特別涵括：

延後的清除：相較於對照抗原-結合分子(例如具有完整 FcRn-結合域之抗原-結合分子)，延長抗原-結合分子之投藥與清除之間的時間；及/或

延長抗原-結合分子之血漿滯留時間，較佳地為可結合至

其抗原之抗體或抗體衍生物，投藥抗原-結合分子後相較於對照抗原-結合分子之血漿滯留時間； 及/或

相較於對照抗原-結合分子，縮短於抗原-結合分子之投藥與清除之間抗原為游離的期間(相較於對照抗原-結合分子，延長於個體體內抗原-結合分子係結合至其抗原期間之投藥與清除之間的期間(例如具有完整 FcRn-結合域之抗原-結合分子)；及/或

於抗體降解之前，相較於抗原結合至對照抗原-結合分子(例如具有完整 FcRn-結合域之抗原-結合分子)之比例，增加體內結合至抗原-結合分子之抗原相對於總抗原之比例(相較於投藥與降解之間對照抗原-結合分子之結合個案數，增加抗體或抗體衍生物之投藥與降解之間抗原-結合分子與其抗原結合個案數)。

相較於投藥對照抗原-結合分子後之血漿總抗原或游離抗原濃度，降低投藥抗原-結合分子後之血漿總抗原或游離抗原濃度。

**【0186】** 本發明亦提供用以於個體中延後抗原-結合分子之清除的方法，包括導入改質至該抗原-結合分子之 FcRn-結合域於選自下述所成群組之一個或多個位置的步驟：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 與 EU436。

**【0187】** 使用於本文之詞語「改良的藥物動力學」意指不僅延長對個體投藥(人類，或非人類動物如小鼠、大鼠、猴、

兔與犬)抗原-結合分子與自血漿清除(例如，直到抗原-結合分子於細胞內降解等且不能回至血漿)之間的期間，也延長抗原-結合分子以於自抗原-結合分子之投藥質導降解之期間，抗原-結合分子以使抗原結合之形式(例如，以抗原-結合分子之無抗原形式)之抗原-結合分子的血漿滯留。

所以，本發明亦提供延長抗原-結合分子之血漿治療時間的方法，包括導入改質至該抗原-結合分子之 FcRn-結合域於選自下述所成群組之一個或多個位置的步驟：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 與 EU436。完整人類 IgG 可結合至非人類哺乳動物 5 FcRn。例如，由於完整人類 IgG 可結合至小鼠 FcRn 較強於結合至人類 FcRn，投藥至小鼠較佳使用於確認發明之抗原-結合分子之性質 (Int Immunol. 2001 Dec; 13(12): 1551-9)。作為另一實例，其本質之 FcRn 基因係經破壞且人類 FcRn 基因之轉殖基因經攜帶用以表現的小鼠 (Methods Mol Biol. 2010; 602: 93-104) 亦可較佳使用於投藥以確認後文揭示之本發明抗原-結合分子之性質。

具體地，「藥物動力學的改良」亦包含於抗原-結合分子之投藥與降解之間不結合至抗原(抗原-結合分子之無抗原形式)的期間延長。當抗原-結合分子已經結合至抗原時，抗原-結合分子於血漿中不能結合至新抗原。因此，抗原-結合分子不能結合至抗原的期間越長，期具有結合至新抗原的潛力期間越長(結合至性另一抗原的機會越高)換言之，於較短的時間期間

更多抗原為結合的。因此，抗原-結合分子之無抗原形式的血漿濃度可為增加的且抗原結合至抗原-結合分子之總期間可藉由投藥經改質抗原-結合分子加速自血漿之抗原清除而予以延長。

**【0188】** 具體地，本文之「抗原-結合分子之藥物動力學的改良」包含抗原-結合分子之無抗原形式之藥物動力學參數的改良(血漿半衰期的延長、血漿中平均滯留的延長與血漿廓清的損傷)，投藥經改質抗原-結合分子後抗原結合至抗原-結合分子之期間的延長以及自血漿之抗原-結合分子-媒介抗原清除的加速。

**【0189】** 抗原-結合分子之藥物動力學的改良可藉由測定抗原-結合分子或其無抗原形式之任何參數、血漿半衰期、平均血漿滯留時間與血漿廓清而予以評估(「Pharmacokinetics: Enshu ni yoru Rikai(Understanding through practice)」Nanzando)。例如，抗原-結合分子或其無抗原形式之脂血漿濃度係於投藥抗原-結合分子至小鼠、大鼠、猴、兔、犬或人類之後予以測定。然後，測定各參數。當血漿半衰期或平均血漿滯留時間為延長時，抗原-結合分子之藥物動力學可判斷為獲得改良。參數可藉由此項技術領域者所習知方法予以測定。參數可藉由，例如，根據隨附的操作手冊使用藥物動力學分析軟體 WinNonlin(Pharsight)藉由非模室數據分析而予以評估。無抗原之抗原-結合分子之血漿濃度可藉由此項技術領域者所習知方法予以測定，例如，使用揭示於 Clin Pharmacol. 2008 Apr; 48(4): 406-17 之分析方法。

【0190】本文中，詞語「藥物動力學的改良」亦包含延長投藥抗原-結合分子後抗原結合至該抗原-結合分子的期間。投藥該抗原-結合分子後抗原結合至該抗原-結合分子的期間是否延長可藉由測定游離抗原之血漿濃度而予以評估。延長可根據所測定之游離抗原之血漿濃度或游離抗原濃度對總抗原濃度之比例增加所需時間期間而予以判斷。

【0191】本發明亦提供本發明之抗原-結合分子用以降低特定抗原之總游離抗原血漿濃度或游離抗原血漿濃度的用途，其中該抗原-結合分子包括可結合該抗原之抗原-結合域。更具體地，本發明亦提供用以降低總抗原血漿濃度或游離抗原血漿濃度的方法，該方法包括下述步驟：

提供包括親代 FcRn-結合域之抗原-結合分子，其中該抗原-結合分子包括可結合至該抗原之抗原-結合域，

取代胺基酸於親代 FcRn-結合域於選自下述所成群組之一個或多個位置： EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 與 EU436 且因而相較於具有完整 FcRn-結合域之抗原-結合分子於中性 pH 增加 FcRn-結合活性。

【0192】再者，本發明亦提供，包括導入改質至該抗原-結合分子之 FcRn-結合域於選自下述所成群組之一個或多個位置的步驟： EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 與 EU436。使用於本文之詞語「抗原-清除速率」意指於抗體或抗體衍生物之投藥與清除(亦即，降解)之間的時

間，抗原-結合分子可自血漿移除的抗原數目。

**【0193】** 未結合至抗原-結合分子之游離抗原的血漿濃度或游離抗原濃度對總濃度的比例可藉由此項技術領域者所習知方法，例如，揭示於 *Pharm Res.* 2006 Jan ; 23(1) : 95-103 之方法而予以測定。或者，當抗原於活體內顯示特別功能時，抗原是否結合至中和抗原功能之抗原-結合分子(結抗性分子)可藉由測試抗原功能是否被中和而予以評估。抗原功能是否被中和可藉由分析反應抗原功能之活體內標記而予以評估。抗原是否結合至活化抗原功能之抗原-結合分子(促效性分子)可藉由分析反應抗原功能之活體內標記而予以評估。

**【0194】** 游離抗原漿濃度的測定以及血漿中游離抗原量與血漿中總抗原量之比例，活體內標記分析與該等測量不特別限定；然而，該等分析較佳可於投藥抗原-結合分子後歷經某時間期間而進行。本發明中，該投藥抗原-結合分子後的期間不特別限定；此項技術領域者可取決於所投藥脂抗原-結合分子的性質等而決定合適的期間。該等期間包含，例如，投藥該抗原-結合分子後一日、投藥該抗原-結合分子後三日、投藥該抗原-結合分子後七日、投藥該抗原-結合分子後 14 日投藥該抗原-結合分子後 28 日。本文中，詞語「血漿抗原濃度」意指「血漿中總抗抗原濃度」其為結合抗原或未結合抗原之抗原-結合分子濃度之加總或「血漿中游離抗原濃度」其為未結合抗原脂抗原-結合分子濃度。

**【0195】** 血漿中總抗原濃度相較於投藥包括作為人類 FcRn-結合域之完整人類 IgG Fc 區域之參考抗原-結合分子或

相較於當本發明之抗原-結合域分子為投藥時，藉由投藥本發明之抗原-結合分子可較低於 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。

**【0196】** 分子抗原/抗原-結合分子比例可計算如下所示；

A 值：於各時間點之分子抗原濃度

B 值：於各時間點分子抗原-結合分子濃度

C 值：於各時間點之各分子抗原-結合分子濃度之分子抗原濃度(分子抗原/抗原-結合分子比例)

$C=A/B$ 。

**【0197】** 較小的 C 值表示抗原-結合分子之較高的抗原清除效率，反之，較高的 C 值表示各抗原-結合分子之較低的抗原清除效率。

**【0198】** 分子抗原/抗原-結合分子比例相較於投藥包含完整人類 IgG Fc 區域作為人類 FcRn-結合域之參考抗原-結合分子，藉由投藥本發明之抗原-結合分子可較低於 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。

**【0199】** 本文中，完整人類 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 較佳使用於作為完整人類 IgG 而用於欲與抗原-結合分子比較其等之人類 FcRn 結合活性或活體內活性之參考完整人類 IgG 的目的。較佳地，可適宜地使用包含相同抗原-結合域作為有興趣的抗原-結合分子以及完整人類 IgG Fc 區域作為人類 FcRn-結合域之參考抗原-結合分子。更較佳地，完整人類 IgG1 係使用作為欲與抗原-結合分子相比較其等之人類 FcRn 結合活性或

活體內活性之參考完整人類的目的。

**【0200】** 降低血漿中總抗原濃度或分子抗原/抗體比例可如專利 WO2011/122011 之實施例 6、8 與 13 揭示之方法予以評估。更具體地，使用人類 FcRn 基因轉殖小鼠株 32 或株 276(Jackson Laboratories, Methods Mol Biol.(2010) 602 : 93-104.)，當有興趣之抗原-結合分子不與小鼠之對應抗原不交叉反應時，其等可藉由抗原-抗體共注射模式或穩態抗原輸注模式而予以評估。當抗原-結合分子與對應抗原交叉反應時，其等可藉由簡單地注射抗原-結合分子至人類 FcRn 基因轉殖小鼠株 32 或株 276(Jackson Laboratories)而予以評估。於共注射模式中，抗原-結合分子與抗原之混合物係投藥至小鼠。於穩態抗原輸注模式中，含有抗原溶液之輸注泵係植入至小鼠以達到恆定血漿抗原濃度且然後注射該抗原-結合分子至小鼠。對所有經投藥之測試抗原-結合分子細使用相同劑量。血漿中總抗原濃度、血漿中游離抗原濃度與血漿係於抗原-結合分子濃度係使用此項技術領域者所習知方法於適當時間點測定。

**【0201】** 總或血漿中游離抗原濃度與分子抗原/抗原-結合分子比例可藉由於投藥後之 2、4、7、14、28、56 或 84 日予以測定以評估本發明之長期效果。換言之，長期血漿抗原濃度係藉由於投藥抗原-結合分子後之 2、4、7、14、28、56 或 84 日，測定總或血漿中游離抗原濃度與分子抗原/抗原-結合分子比例而予以決定，以評價本發明之抗原-結合分子性質。血漿抗原濃度或分子抗原/抗原-結合分子比例降低是否藉由本發明所揭示之抗原-結合分子達成可藉由評價於上述時間點之任一

者或多者的降低而決定。

**【0202】** 總或血漿中游離抗原濃度與分子抗原/抗原-結合分子比例可藉由於投藥後之 15 分鐘 1、2、4、8、12 或 24 小時予以測定而評價本發明之短期效果。換言之，短期血漿抗原濃度係藉由於投藥抗原-結合分子後之 15 分鐘 1、2、4、8、12 或 24 小時，測定總或血漿中游離抗原濃度與分子抗原/抗原-結合分子比例而予以決定，以評價本發明之抗原-結合分子性質。

**【0203】** 更具體地，如本發明所揭示之該等於清除血漿中抗原活性具有長期效果之抗原-結合分子，於 pH 7.0 與 25°C 具有人類 FcRn-結合活性於 28-倍至 440-倍的範圍內較強於完整人類 IgG1 或 KD 於 3.0 微莫耳至 0.2 微莫耳的範圍內。較佳地，KD 於 700 微毫莫耳至 0.2 微毫莫耳的範圍內，更較佳地，KD 於 500 微毫莫耳至 3.5 微毫莫耳的範圍內，更較佳地，於 150 微毫莫耳至 3.5 微毫莫耳的範圍內。長期血漿抗原濃度係藉由於投藥抗原-結合分子後之 2、4、7、14、28、56 或 84 日，測定總或血漿中游離抗原濃度與分子抗原/抗原-結合分子比例而予以決定，以評價本發明之抗原-結合分子對於血漿中清除抗原之活性的長期效果。血漿抗原濃度或分子抗原/抗原-結合分子比例的降低是否藉由本發明所揭示之抗原-結合分子達成，可藉由評價於上述時間點之任一者或多者的降低而決定。

**【0204】** 又更具體地，如本發明所揭示之該等於清除血漿中抗原活性具有短期效果之抗原-結合分子，於 pH 7.0 與 25°C 具有人類 FcRn-結合活性 440-倍較強於完整人類 IgG1 或 KD

強於 0.2 微莫耳，較佳地強於 700 微毫莫耳，更較佳地強於 500 微毫莫耳，最較佳地，強於 150 微毫莫耳。短期血漿抗原濃度係藉由於投藥抗原-結合分子後之 15 分鐘 1、2、4、8、12 或 24 小時，測定總或血漿中游離抗原濃度與分子抗原/抗原-結合分子比例而予以決定，以評價本發明之抗原-結合分子對於血漿中清除抗原之活性的短期效果。

【0205】本發明之抗原-結合分子之投藥途徑可選擇自皮內、靜脈內、玻璃體內、皮下、腹膜內、腸道外與肌肉內注射。

【0206】本發明之內容中，較佳為人類之藥物動力學的改良。當於人類之血漿滯留難以測定時，可根據小鼠(例如，正常小鼠、表現人類抗原之基因轉殖小鼠、表現人類 FcRc 之基因轉殖小鼠)或猴(例如，食蟹猴)之血漿滯留而予以預測。

【0207】本文中，詞語「降低抗原-結合分子之抗原-結合活性於酸性 pH 範圍至較低於中性 pH 範圍者」意指相較於 pH6.7 至 pH10.0 之抗原-結合活性該抗原-結合分子於 pH 4.0 至 pH 6.5 之抗原-結合活性係減弱的。較佳地，上述片語意指抗原-結合分子之抗原-結合活性於 pH5.5 至 pH 6.5 相較於 pH7.0 至 pH8.0 係減弱的，更較佳地意指活體內其抗原-結合活性於早期內體之 pH 相較於其抗原-結合活性於血漿之 pH 係減弱的。具體地，相較於 pH7.4 之抗原-結合活性該抗原-結合分子於 pH 5.8 至 pH 6.0 之抗原-結合活性係減弱的。

本文中，詞語「降低抗原-結合分子於中性 pH 範圍之抗原-結合活性至較低於酸性 pH 範圍者」意指相較於 pH4.0 至 pH6.5 之抗原-結合活性該抗原-結合分子於 pH 6.7 至 pH 10.0 之抗原

-結合活性係減弱的。較佳地，上述片語意指抗原-結合分子之抗原-結合活性於 pH7.0 至 pH 8.0 相較於 pH5.5 至 pH6.5 係減弱的，更較佳地意指活體內其抗原-結合活性於血漿之 pH 相較於其抗原-結合活性於早期內體之 pH 係減弱的。具體地，相較於 5.8 至 pH 6.0 之抗原-結合活性該抗原-結合分子於 pH 7.4 之抗原-結合活性係減弱的。

【0208】同時，本文中之一表示「降低降低抗原-結合分子之抗原-結合活性於酸性 pH 範圍至較低於中性 pH 範圍者」亦表示為「增加抗原-結合分子於中性 pH 範圍之抗原-結合活性至較高於酸性 pH 範圍者」。具體地，本發明中，可能增加抗原-結合分子於酸性與中性 pH 範圍之間之抗原結合活性的比例。例如，於下述之具體中  $KD(pH\ 5.8)/KD(pH\ 7.4)$  之值係增加的。抗原-結合分子於酸性與中性 pH 範圍之間之抗原結合活性的比例可增加，例如，藉由降低其酸性 pH 範圍之抗原-結合活性或增加其中性 pH 範圍之抗原-結合活性，或二者。

表示「降低抗原-結合分子於中性 pH 範圍之抗原-結合活性至較低於酸性 pH 範圍者」亦表示為「增加抗原-結合分子於酸性 pH 範圍之抗原-結合活性至較高於中性 pH 範圍者」。具體地，本發明中，可能增加抗原-結合分子於酸性與中性 pH 範圍之間之抗原結合活性的比例。例如，於下述之具體中  $KD(pH\ 7.4)/KD(pH\ 5.8)$  之值係增加的。抗原-結合分子於酸性與中性 pH 範圍之間之抗原結合活性的比例可增加，例如，藉由降低其中性 pH 範圍之抗原-結合活性或增加其酸性 pH 範圍之抗原-結合活性，或二者。

【0209】使用於本文之詞語「降低於低鈣-離子濃度之抗原-結合活性(結合能力)至較低於高鈣-離子濃度之抗原-結合活性者」意指相較於該抗原-結合域於高鈣-離子濃度對於抗原之結合親和性，降低該抗原-結合域於低鈣-離子濃度對於抗原之結合親和性。低鈣濃度較佳為 0.5 至 10 微莫耳，更較佳為 0.1 至 30 微莫耳之離子化鈣以及高鈣濃度為 100 微莫耳至 10 mM，更較佳為 200 微莫耳至 5 mM 之離子化鈣。

【0210】本文中，表示「相較於中性 pH 範圍，損害於酸性 pH 範圍之抗原-結合活性」有時以「降低於酸性 pH 範圍之抗原-結合活性至較低於中性 H 範圍者」。

【0211】本文中，於酸性 pH 範圍人類 FcRn-結合活性意指 pH4.0 至 pH6.5 之人類 FcRn-結合活性，較佳為 pH5.5 至 pH6.5 之人類 FcRn-結合活性人類 FcRn-結合活性以及特別較佳為 pH5.8 至 pH6.0 之人類 FcRn-結合活性，其係相較於活體內早期內體 pH。同時，本文中於中性 pH 範圍人類 FcRn-結合活性意指 pH6.7 至 pH10.0 之人類 FcRn-結合活性，較佳為 pH7.0 至 pH8.0 之人類 FcRn-結合活性人類 FcRn-結合活性以及特別較佳為 pH7.4 之人類 FcRn-結合活性，其係相較於活體內血漿 pH。

【0212】雖然本發明之抗原-結合分子與用途不為任何特病理論所限制，降低(損害)抗原-結合分子於酸性 pH 範圍抗原-結合能力至較低於中性 pH 範圍者及/或增加(增強)於中性 pH 範圍之人類 FcRn-結合活性以及增加單一抗原-結合分子可結合之抗原數目之間的關係，起因於有助於抗原-結合分子攝入

至細胞與自血漿之抗原清除的增強，可如下文解釋。

**【0213】** 例如，當抗原-結合分子為結合至膜抗原時，投藥至深體的抗體結合至抗原且然後在抗體仍結合至抗原的情況下，經由與抗原內化至細胞中的內體。然後在抗體仍結合至抗原的情況下，抗體轉位至溶酶體且然後抗體係藉由溶酶體與抗原一起被降解。內化-媒介之自血漿的清除被稱為抗原-依賴性清除且該清除已與數種抗體分子被報導 (Drug Discov Today. 2006 Jan; 11(1-2): 81-8)。當 IgG 抗體之單一分子以二價方式結合至抗原時，該單一抗體分子在抗體仍維持結合至二個抗原分子的情況下被內化且於溶酶體中被降解。因此，於典型抗體的情況中，一分子的 IgG 抗體不能結合至三個或更多個抗原分子。例如，具有中和活性之單一 IgG 抗體分子不能中和三個或更多個抗原分子。

**【0214】** IgG 分子於血漿之相對延長的滯留(慢清除)係起因於已知為 IgG 分子之搶救受體之人類 FcRn 的功能。當經由包飲作用被攝入至細胞時，IgG 分子於內體酸性條件下結合至表現於內體之人類 FcRn。雖然不結合至人類 FcRn 之 IgG 分子轉移至溶酶體(其於該處被降解)，結合至人類 FcRn 的 IgG 分子轉位至細胞表面且藉由於血漿之中性條件下自人類 FcRn 解離而再次回至血漿。

**【0215】** 或者，當抗原-結合分子為結合至可溶性抗原之抗體時，經投藥至深體的抗體結合至抗原且然後在抗體維持結合至抗原的情況下被攝入至細胞。被攝入至細胞之許多抗體經由 FcRn 被釋放至細胞外側。然而，由於抗體被釋放至細胞外側，

抗體仍維持結合至抗原，抗體不能再次結合至抗原。因此，類似於結合至膜抗原脂抗體，於典型抗體的情況中，一分子 IgG 抗體不能結合至三個或更多個抗原分子。

**【0216】** 於血漿之中性條件下強烈地結合至抗原氦於內體之酸性條件下自抗原解離的 pH-依賴性抗原-結合抗體(亦即，於中性條件結合但於酸性條件解離的抗體)可於內體中自抗原解離。該 pH-依賴性抗原-結合抗體當抗原解離後藉由 FcRn 循環至血漿時，可再次結合至抗原；因此，各抗體可重複地結合至數個抗原。再者，結合至抗原-結合分子之抗原於內體中解離且不循環至血漿。此有助於抗原-結合分子-媒介抗原攝入至細胞。因此，投藥抗原-結合分子可增強抗原清除且因而降低血漿抗原濃度。

**【0217】** 鈣濃度-依賴性抗原-結合抗體，其於血漿之高鈣濃度條件下強烈地結合至抗原且於內體之低鈣濃度條件下自抗原解離，可於內體中自抗原解離。鈣濃度-依賴性抗原-結合抗體當於抗原解離後經由 FcRn 循環至血漿時可再次結合至抗原。因此，該單一抗體可重複的結合至多述抗原。同時，因為內體中之抗原解離，結合至抗原-結合分子之抗原不循環至血漿且因此，抗原-結合分子促進抗原攝入至細胞。抗原-結合分子的投藥促進抗原清除且使血漿中抗原濃度減低。

**【0218】** 抗原-結合分子-媒介抗原攝入至細胞可進一步藉由於中性條件(pH 7.4)對以 pH-依賴性方式(於中性條件結合但於酸性條件解離)結合至抗原之抗體授予人類 FcRn-結合活性而有助益。因此，抗原-結合分子的投藥可增強抗原清除且因

而降低血漿抗原濃度。正常地，抗體與抗原-抗體複合物二者係藉由非特異性胞飲作用被攝入至細胞且然後於內體之酸性條件下藉由結合至 FcRn 被轉運至細胞表面。抗體與抗原-抗體複合物於細胞表面之中性條件下經由自 FcRn 解離而循環至血漿。因此，當於抗原結合顯現充分的 pH 依賴性(於中性條件結合但於酸性條件解離)之抗體於血漿中結合至抗原且然後於內體中自所結合之抗原解離時，抗原清除速率係假設為相等於經由非特異性胞飲作用之抗原攝入至細胞的速率。另一方面，當 pH 依賴性不充分時，於內體中不解離之抗原亦循環至血漿。同時，當 pH 依賴性充分時，抗清除之速率-決定步驟為藉由非特異性胞飲作用之攝入至細胞。因為 FcRn 自內體轉運抗體至細胞表面，所以若干 FcRn 係推測位於細胞表面。

**【0219】** 本發明假設 IgG-type 免疫球蛋白，其為抗原-結合分子之一，典型地於中性 pH 範圍具有少的 FcRn-結合能力但其等於中性 pH 範圍顯現 FcRn-結合能力，可於細胞表面結合至 FcRn 且然後藉由結合至細胞表面 FcRn 以 FcRn-依賴性方式被攝入至細胞。FcRn-媒介攝入至細胞的速率係較解由非特異性胞飲作用之攝入至細胞的速率為更快速。因此，抗原清除速率可藉由於中性 pH 範圍授予 FcRn-結合能力而進一步地加速。具體地，於中性 pH 範圍具有 FcRn-結合能力之抗原-結合分子轉運抗原至細胞更快速於典型(完整人類) IgG-型免疫球蛋白且然後該抗原-結合分子於內體中自抗原解離。抗原-結合分子循環至細胞表面或血漿且再次結合至另一抗原且經由 FcRn 被攝入至細胞。此循環速率可藉由改良於中性 pH 範圍之

FcRn-結合能力而予以加速，藉此加速自血漿之抗原清除速率。再者，係進一步藉由降低抗原-結合分子於酸性 pH 範圍之抗原-結合活性至較低於中性 pH 範圍者而進一步改良。此外，單一抗原-結合分子可結合之抗原數，係假設為藉由單一抗原-結合分子所達成之循環數增加而隨之增加。本發明之抗原-結合分子包括抗原-結合域與 FcRn-結合域。由於 FcRn-結合域不影響抗原結合，或由上述機制的觀點，抗原-結合分子-媒介抗原攝入至細胞的助長，可表現為無關於抗原的類型且結果為藉由降低抗原-結合分子於酸性 pH 範圍之抗原-結合活性(結合能力)至較低於中性 pH 範圍者及/或增加於血漿 pH 其 FcRn-結合活性而增加抗原清除速率。

**【0220】** 前述本發明之抗原-結合分子之用途中，除了取代於所述之一個或多個位置之外，亦可包括取代於位置 EU256。較佳地，胺基酸於位置 EU256 係經以麩胺酸取代。再者，所有前述用途的方法，除了取代於選自下述所成群組之一個或多個位置之外，亦可包括取代於位置 EU256：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 與 EU436，藉此胺基酸於位置 EU256 係較佳地經以麩胺酸取代。

**【0221】** 所有前述用途與方法之較佳具體例中，FcRn-結合域為 Fc 區域，更較佳地，其為人類 Fc 區域。

**【0222】** 再者，用於中性或酸性 pH 增加 FcRn-結合活性之取代於親代 FcRn-結合域之胺基酸序列較佳於位置 EU252 與 EU434 以及選自下述所成群組之一個或多個位置：EU238、

EU250、EU254、EU255、EU256、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433 與 EU436。更較佳地，取代係於三個或更多個位置，其中該三個或更多個位置為表 2、4 至 7 所示組合之一。甚至更較佳地，取代為表 3 所示組合之一。

**【0223】** 再者，前述用途的方法可額外地包括導入胺基酸取代於選自下述所成群組之一個或多個位置的步驟：EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438 與 EU440 且藉此降低對於預先存在之 ADA 之增加的結合活性。較佳地，取代為選自表 11 之組合。

**【0224】** 此外，前述用途的方法亦可包括額外的步驟之導入胺基酸取代於 FcRn-結合域於選自下述所成群組之一個或多個位置：EU234、EU235、EU236、EU237、EU238、EU239、EU265、EU266、EU267、EU269、EU270、EU271、EU295、EU296、EU297、EU298、EU300、EU324、EU325、EU327、EU328、EU329、EU331 與 EU332(根據 EU 編號系統)。較佳地，矽導入取代 L235R / S239K。較佳地，取代為選自表 14 之組合。

**【0225】** 所有前述用途與方法之抗原-結合分子可包括 pH-依賴性抗原-結合域或鈣離子-依賴性抗原-結合域。藉由本發明之抗原-結合分子所媒介之抗原攝入至細胞係藉由降低上述抗原-結合分子於酸性 pH 範圍之抗原-結合活性(結合能力)至較低於其抗原-結合活性於中性 pH 範圍者而進一步改良。亦較佳地為藉由降低本發明抗原-結合分子於低鈣-離子濃度(亦即 0.5 至 10 微莫耳)之抗原-結合活性(結合能力)至較低於其於高鈣-

離子濃度(亦即 100 微莫耳至 10mM)者而進一步改良抗原攝入至細胞，例如藉由取代具有離子化鈣-濃度依賴性抗原-結合域之抗原-結合分子之抗原-結合域。或者，親代抗原-結合分子已包括離子化鈣-濃度依賴性抗原-結合域。用於藉由改變上述抗原-結合分子之抗原-結合域之至少一個胺基酸而降低於酸性範圍之抗原-結合活性(結合能力)的方法係如上所述。較佳地，抗原-結合域係藉由於上述抗原-結合分子之抗原-結合域中導入組胺酸用於至少一個胺基酸或插入至少一個胺基酸改變，其有助於抗原攝入至細胞。

**【0226】** 當該等改質增加抗原-結合分子對於預先存在之 ADA(例如，類風濕性因子)的親和性時，於中性或酸性 pH 範圍具有增加的 FcRn-結合活性之經改質抗原-結合分子的廓清可降低。此意指藉由進一步改質該抗體且因而降低對於預先存在之 ADA 的親和性，相較於第二改質前之抗原-結合分子，循環數可增加且因此相較於之前對於預先存在之 ADA 的親和性為減少的。

該等於中性 pH 範圍相較於野生型 Fc 區域，對於預先存在之抗-藥物抗體的親和性不顯著增加之本發明之抗原-結合分子，特別是該等包括於 FcRn 結合域之胺基酸取代於選自下述所成群組之一個或多個位置者：EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438 與 EU440，特別有用於作為用於治療罹患自體免疫疾病、移植排斥(移植物-相對-宿主的疾病)、其他炎性及並與過敏性疾病之人類患者的治療性抗體。

**【0227】** 自體免疫疾病為當身體組織受到其免疫系統攻擊

時所發生的病況。本文所涵括之自體免疫疾病的實例包含全身性紅斑狼瘡、狼瘡性腎炎、類天疱瘡、天疱瘡、皮膚炎、自體免疫性肝炎、薛格連氏症候群、橋本甲狀腺炎、類風濕性關節炎、青少年糖尿病(1型)、多發性肌炎、硬皮症、愛迪生氏病、乳糜瀉、格林－巴利綜合症、擴張型心肌症，混合性結締組織症、韋格納肉芽腫、抗磷脂質抗體症候群、白斑症、惡性貧血、腎小球性腎炎、與肺部纖維化、重症肌無力、葛瑞夫茲氏病、特發性血小板減少紫斑症、溶血性貧血、糖尿病、發炎性腸道疾病、克隆氏症、潰瘍性大腸炎、多發性硬化症、乾癬予藥物誘發之自體免疫疾病，例如，藥物誘發之狼瘡。較佳地，自體免疫疾病為全身性紅斑狼瘡或狼瘡性腎炎。移植排斥包含移植物-相對-宿主的疾病，為移植接受者的免疫系統攻擊所移植的器官或組織的過程。其他炎性與過敏性疾病包含動脈粥樣硬化症與花粉症。

**【0228】** 對於預先存在之 ADA 之增加的結合親和性可降治療性抗體之臨床使用與藥效。由於該等 ADA 可影響其藥效與藥物動力學(例如降解速率)，所以該治療性抗體之使用可受到預先存在之 ADA 的限制。有些時候，此結合可導致嚴重的副作用。再者，本發明亦提供用以降低包含 Fc 區域之抗原-結合域於中性 pH 對於預先存在之 ADA 之結合活性，該 Fc 區域於中性或酸性 pH 對於 FcRn 具有增加的結合活性且於中性 pH 對於預先存在之 ADA 具有增加的結合活性。

本發明亦提供包含經改質 FcRn-結合域之本發明之抗原-結合分子之用途，用以降低抗原-結合分子於中性 pH 對於預先

存在之 ADA 之結合活性，該抗原-結合分子於中性或酸性 pH 對於 FcRn 具有增加的結合活性且於中性 pH 對於預先存在之 ADA 具有增加的結合活性。

**【0229】** 特別地，本發明亦提供用以降低抗原-結合分子之 Fc 區域之於中性 pH 對於預先存在之 ADA 的結合活性的方法，該抗原-結合分子於中性或酸性 pH 對於 FcRn 具有增加的結合活性，該方法包括

提供於中性或酸性 pH 對於 FcRn 具有增加的結合活性且於中性 pH 對於預先存在之 ADA 具有增加的結合活性之 Fc 區域以及

取代胺基酸於選自下述所成群組之一個或多個位置：EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438 與 EU440。

較佳 Fc 區域為步驟 a) 為人類 Fc 區域。較佳地，於中性或酸性 pH 對於 FcRn 且於中性 pH 對於預先存在之 ADA 具有增加的結合活性之 Fc 區域包括胺基酸取代於 於選自下述所成群組之一個或多個位置：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU256、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 與 EU436。更較佳地，其包括取代於選自表 2 與 4 至 7 之位置組合之任一者。甚至更較佳地，其包括表 3 與 17 至 20 之任一者所示取代或取代組合。

**【0230】** 較佳地，步驟 b) 包括取代胺基酸於表 8 之任一位置。更較佳地，步驟 b) 包括導入選自表 11 之取代或組合之一者。

【0231】亦較佳地，抗原-結合分子額外地包括 pH-依賴性抗原-結合域或鈣離子-依賴性抗原-結合域。

【0232】再者，本發明亦提供用以降低抗原-結合分子之對於預先存在之 ADA 的結合活性的方法，該抗原-結合分子包括於中性 pH 對於 FcRn 具有增加的結合活性之 Fc 區域，該方法包括下述步驟：

提供包括於酸性 pH 對於 FcRn 以及於於中性 pH 對於預先存在之 ADA 均具有增加的結合活性之 Fc 區域之抗原-結合分子以及

取代胺基酸於 Fc 區域於選自下述所成群組之一個或多個位置：EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438 與 EU440。

【0233】步驟 a) 中較佳的 Fc 區域為人類 Fc 區域。較佳地，於中性 pH 對於 FcRn 以及於於中性 pH 對於預先存在之 ADA 均具有增加的結合活性之 Fc 區域包括胺基酸取代於選自下述所成群組之一個或多個位置：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 與 EU436。除了取代於上述一或多個位置之外，其亦可包括取代於位置 EU256，藉此胺基酸於位置 EU256 係較佳地經以麩胺酸取代。更較佳地，其包括取代於選自表 2 及 4 至 7 之位置組合之任一位置。甚至更較佳地，其包括選自表 3 與 17 至 20 之任一者之取代或取代組合之任一者。

【0234】較佳地，步驟 b) 包括取代胺基酸於表 10 之任一

置。更較佳地，該位係選自下述所成群組：a) EU387、b) EU422、c) EU424、d) EU438、e) EU440、f) EU422/EU424 與 g) EU438/EU440。甚至更較佳地，步驟 b)包括導入選自表 11 之取代或組合之一者。

**【0235】**再者，本發明亦提供用以降低抗原-結合分子對於預先存在之 ADA 之結合活性的方法，該抗原-結合分子包括於酸性 pH 對於 FcRn 具有增加的結合活性之 Fc 區域，該方法包括下述步驟：

提供包括於酸性 pH 對於 FcRn 且於中性 pH 對於預先存在之 ADA 具有增加的結合活性之 Fc 區域之抗原-結合分子以及

取代胺基酸於 Fc 區域於選自下述所成群組之一個或多個位置：EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438 與 EU440。

步驟 a)之較佳 Fc 區域為人類 Fc 區域。較佳地，於酸性 pH 對於 FcRn 且於中性 pH 對於預先存在之 ADA 具有增加的結合活性之 Fc 區域包括胺基酸取代其包括取代

於位置 EU434，或

ii) 於二個或更多個位置，其中該二個或更多個位置為下述所成群組之組合之一者 a) EU252/EU254 / EU256；b) EU428 / EU434；與 c) EU250 / EU428。較佳地，Fc 區域包括 i) 取代 M434H；或 ii) 下述所成群組之組合之一者：a) M252Y/S254T/T256E；b) M428L/N434S；與 c) T250Q 與 M428L(EU 編號)。

較佳具體例中，步驟 b)中胺基酸係經取代於 a)位置 EU424

或 b)位置 EU438/EU440。更較佳地，取代為 a) EU424N 或 b) 組合 EU438R/EU440E。

【0236】進一步較佳具體例中，用於降低對於預先存在之 ADA 的結合活性的方法進一步包括步驟 c) 確認該具有經改質 Fc 域之抗原-結合分子相較於如前述步驟 a)所示之包括完整 Fc 域之原始抗原-結合分子，對於內生性 ADA 具有降低的結合活性。

【0237】亦較佳地，抗原-結合分子額外地包括 pH-依賴性抗原-結合域或鈣離子-依賴性抗原-結合域。

【0238】本發明亦提供 the use of an 本發明之抗原-結合分子用以自哺乳動物血液增加抗原移除的用途，該部乳動物較佳地為罹患自體免疫疾病的人類。

【0239】本發明進一步提供用以增加單一抗原-結合分子可結合之抗原數，而相較於親代抗體不顯著增加於中性 pH 對於預先存在之 ADA 之結合活性的方法，該方法包括下述步驟

提供包括親代 FcRn 結合域之抗原-結合分子，

改變步驟 a)之親代 FcRn 結合域，藉由取代胺基酸於親代 FcRn 結合域之胺基酸序列於選自下述所成群組之一個或多個位置：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU256、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 與 EU436；以及

改變步驟 b)之經改質 FcRn-結合域，藉由取代胺基酸於親代 FcRn-結合域之胺基酸序列於選自下述所成群組之一個或多個位置：EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、

EU438 與 EU440。

【0240】本發明進一步提供有助於經以抗原-結合形式攝入至細胞之無抗原-結合分子的細胞外釋放，而相較於親代抗體不顯著增加該抗原-結合分子於中性 pH 對於預先存在之 ADA 的結合活性的方法，該方法包括下述步驟

提供包括親代 FcRn-結合域之抗原-結合分子，

改變親代 FcRn 結合域，藉由取代胺基酸於親代 FcRn-結合域之胺基酸序列於選自下述所成群組之一個或多個位置：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU256、EU258 EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 與 EU436 與 EU428；以及

改變步驟 b)之經改質 FcRn-結合域，藉由取代胺基酸於親代 FcRn-結合域之胺基酸序列於選自下述所成群組之一個或多個位置：EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438 與 EU440。

【0241】本發明進一步提供用於增加抗原-結合分子清除血漿抗原的能力，而相較於親代抗體不顯著增加於中性 pH 對於預先存在之 ADA 的結合活性的方法，該方法包括下述步驟

提供包括親代 FcRn-結合域之抗原-結合分子，

改變親代 FcRn 結合域，藉由取代胺基酸於親代 FcRn-結合域之胺基酸序列 於選自下述所成群組之一個或多個位置：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU256、EU258 EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 與 EU436 與 EU428；以及

改變步驟 b)之經改質 FcRn-結合域，藉由取代胺基酸於親代 FcRn-結合域之胺基酸序列於選自下述所成群組之一個或多個位置：EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438 與 EU440。

**【0242】** 本發明進一步提供用於改良抗原-結合分子之藥物動力學，相較於親代抗體不顯著增加於中性 pH 對於預先存在之 ADA 的結合活性的方法，該方法包括下述步驟

提供包括親代 FcRn-結合域之抗原-結合分子，

改變親代 FcRn-結合域，藉由取代胺基酸於親代 FcRn-結合域之胺基酸序列於選自下述所成群組之一個或多個位置：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU256、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 與 EU436；以及

改變步驟 b)之經改質 FcRn-結合域，藉由取代胺基酸於親代 FcRn-結合域之胺基酸序列於選自下述所成群組之一個或多個位置：EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438 與 EU440。

**【0243】** 本發明進一步提供用以降低總或游離抗原血漿濃度，相較於親代抗體不顯著增加於中性 pH 對於預先存在之 ADA 的結合活性的方法，該方法包括下述步驟

提供包括親代 FcRn-結合域之抗原-結合分子，其中該抗原-結合分子包括可結合該抗原之抗原-結合域，

改變親代 FcRn-結合域藉由取代胺基酸於親代 FcRn-結合域之胺基酸序列於選自下述所成群組之一個或多個位置：

EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU256、EU258 EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 與 EU436；以及

改變步驟 b)之經改質 FcRn-結合域，藉由取代胺基酸於親代 FcRn-結合域之胺基酸序列於選自下述所成群組之一個或多個位置：EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438 與 EU440。

**【0244】** 錢術用途之方法之步驟 a)之較佳 Fc 區域為人類 Fc 區域。較佳具體例中，步驟 b)之胺基酸取代於一個或多個位置為取代於選自下述所成群組之一個或多個位置：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 與 EU436，藉此步驟 b)之 Fc 區域於中性 pH 對於預先存在之 ADA 具有增加的結合活性。除了取代於上述一或多個位置之外，其亦可包括取代於位置 EU256，藉此胺基酸於位置 EU256 係較佳地經以麩胺酸取代。更較佳地，其包括取代於選自表 2 及 4 至 7 之位置組合之任一位置。甚至更較佳地，其包括選自表 3 與 17 至 20 之任一者之取代或取代組合之任一者。

**【0245】** 較佳地，步驟 c)包括取代胺基酸於表 10 之任一位置。更較佳地，該位置選自下述所成群組：a) EU387、b) EU422、c) EU424、d) EU438、e) EU440、f) EU422/EU424 與 g) EU438/EU440。甚至更較佳地，步驟 c)包括導入選自表 11 之取代或組合之一者。

**【0246】** 另一較佳具體例中，步驟 b)之胺基酸取代於一個

或更多個位置係取代

於位置 EU434，或

ii) 於二個或更多個位置，其中該二個或更多個位置係選自下述所成群組之組合之一者：a) EU252/EU254 / EU256； b) EU428 / EU434； 以及 c) EU250 / EU428，藉此步驟 b 之 Fc 區域具有於酸性範圍具有增加的 FcRn-結合活性且於中性 pH 範圍對於預先存在之 ADA 具有增加的結合活性。較佳地，Fc 區域包括 i) 取代 M434H；或 ii) 下述所成群組之組合之一者：a) M252Y/S254T/T256E；b) M428L/N434S；與 c) T250Q 與 M428L(EU 編號)。較佳具體例中，步驟 c)之 胺基酸係經取代於 a)位置 EU424 或 b) 位置 EU438/EU440。更較佳地，取代為 a) EU424N 或 b) 組合 EU438R/EU440E。

#### 【0247】醫藥組成物

本發明亦提供相關之醫藥組成物，其包含本發明之抗原-結合分子或藉由本發明之造方法所製造之抗原-結合分子。本發明之抗原-結合分子與藉由本發明之造方法所製造之抗原-結合分子，相較於典型的抗原-結合分子，藉由投藥具有較大的降低血漿抗原濃度的能力且因而有用於作為醫藥組成物。本發明之醫藥組成物可包含醫藥可接受載劑。本發明中，醫藥組成物常規一只用於治療或預防、或測試與診斷疾病之藥劑。

【0248】本發明之醫藥組成物可藉由此項技術領域者所習知方法予以調配。例如，其可使用於腸道外，以包含水或其它醫藥可接受液體之無菌溶液或懸浮液的形式。例如，該組成物可藉由混合一般醫藥品製造實務上所核可之單位劑量形式而

調配，藉由合適地與醫藥可接受載劑或媒劑組合，具體地係與無菌水、生理鹽水、蔬菜油、乳化劑、懸浮劑、界面活性劑、安定化劑、矯味劑、賦形劑、沒記、防腐劑、黏合劑等。該等調配物中，活性成分的量可容易地且常堆地予以判斷而於預先測定範圍中獲得合適量。

**【0249】** 用於注射之無菌組成物，可根據標準調配食物，為使用如注射用蒸餾水之媒劑而予以調配。用於注射之水溶液包含，例如，生理鹽水與含有葡萄糖或其他佐劑(例如，D-山梨醇、D-甘露糖、D-甘露醇與氯化鈉)之等張溶液。亦可能使用組合合適溶解助劑，例如，醇類(乙醇等)、聚醇類(丙二醇、聚乙二醇等)、非離子性界面活性劑(聚山梨醇酯、80(TM)、HCO-50 等)。

**【0250】** 油類包含芝麻油與大豆油。苯甲酸苄酯及/或苄醇可使用於組合作為溶解助劑。亦可能組合緩衝液(例如，磷酸鹽緩衝液與乙酸鈉緩衝液)、舒緩劑(例如，鹽酸普卡因)、安定化劑(例如，苄醇與酚)及/或抗氧化劑。所製備之注射物係經填充於合適的安瓿。

**【0251】** 本發明之醫藥組成物較佳為腸道外投藥。例如，組成物可為用於注射之劑量形式、經鼻投藥、經肺投藥或經埤頭藥。該組成物可藉由靜脈內注射、肌肉內注射、腹腔內注射、皮下注射等而為全身性投藥或局部性投藥。

**【0252】** 投藥方法可考慮患者的年齡與症狀的條件而合適地選擇。含有抗原-結合分子之醫藥組成物之劑量可為，例如，每次投藥由 0.0001 至 1,000 毫克/kg。或者，劑量可為，例如，

每位患者 0.001 至 100,000 毫克。然而，本發明不限定為上述數值。劑量與投藥方法依據患者的體重、年齡、症狀等有所改變。此項技術領域者可考慮上述因子的條件而設定合適的劑量與投藥方法。

**【0253】** 本發明之胺基酸序列所含有之胺基酸可為經轉譯後改質的。例如，藉由此項技術領域者所習知之焦麩胺醯化將 N-末端麩胺醯胺改質為焦麩胺酸。自然地，該等經轉譯後改質的胺基酸包含於本發明之胺基酸序列。

#### **【0254】 製造方法**

本發明亦提供用以製造本發明之抗原-結合分子的方法。特別地，本發明亦提供用以製造具有 FcRn-結合域之抗原-結合分子，相較於包含野生型 Fc 區域之抗原-結合分子，於中性 pH 對於 FcRn-結合域具有增加的結合活性。

本發明亦提供用以製造抗原-結合分子的方法，其包括下述步驟：

選擇親代 FcRn-結合域且以胺基酸取代於胺基酸序列而改變親代 FcRn，該胺基酸序列具有另一胺基酸於選自下述所成群組之一個或多個位置：EU252、EU434、EU436、EU315、EU311、EU308、EU307、EU286、EU254、EU250、EU238、EU387、EU422、EU424、EU428、EU438 與 EU440；

選擇抗原-結合分子之抗原-結合域且改變抗原-結合域之至少一個胺基酸以獲得 pH-依賴性抗原-結合域或鈣-離子依賴性抗原-結合域；

獲得編碼抗原-結合分子之基因，其中於步驟(a)與(b)所製

備之人類 FcRn-結合域與抗原-結合域係經連結；以及  
使用製備於步驟(c)的基因製造抗原-結合分子。

**【0255】** 較佳地，所選擇之抗原-結合分子包括抗原-結合域，其於 pH 5.5 至 6.5 相較於 pH7 至 8 對於抗原具有較低結合活性或具有鈣依賴性抗原結合活性。較佳地，步驟 a)之 FcRn-結合域為本發明之 FcRn-結合域。更較佳地，FcRn-結合域包括胺基酸取代三個或更多個位置，其中該三個或更多個位置為表 2 與 4 至 7 所示之組合之一者。甚至更較佳地，FcRn-結合域包括三個或更多個取代中該三個或更多個取代為表 3、17 至 20 所示組合之一者。

步驟(a)可包括包括取代胺基酸取代於選自下述所成群組之一個或多個位置：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 與 EU436 且選擇於中性 pH 範圍具有較強於 KD 3.2 微莫耳之人類 FcRn-結合活性之 FcRn-結合域。

步驟(b)可包括選擇抗原-結合域且如上述之改變抗原-結合域之至少一個胺基酸以獲得 pH-依賴性抗原-結合域或選擇鈣-離子依賴性抗原-結合域。改變胺基酸係較佳地取代組胺酸作為至少一個胺基酸或插入至少一個組胺酸。同時，經導入至少一個組胺酸突變處之位點並不特別限定且因此可導入至任何位置，只要組胺酸突變降低抗原-結合活性於酸性 pH 範圍至較低於於中性 pH 範圍者。該組胺酸突變可經導入於單一位點或二個或更多個位點。步驟 a)與 b)可重複二次或更多次。步驟 a)與 b)之重複數目不特別限定；然而，該數目典型地為 10

次或更少。

**【0256】** 操作式連接 (a)與 (b)所製備之 FcRn-結合域與抗原-結合域之連接子不限定為任何形式。人類 FcRn-結合域與抗原-結合域可藉由共價力或非-共價力連接。特別地，連接子可為肽連接子或化學連接子或結合對連接子如生物素與鏈黴親和素的組合。包括人類 FcRn-結合域與抗原-結合域之多肽的改質係習知於此項技術領域。另一具體例中，本發明之人類 FcRn-結合域與抗原-結合域可藉由於人類 FcRn-結合域與抗原-結合域之間形成融合蛋白質而予以連接。為了構築人類 FcRn-結合域與抗原-結合域之間的融合蛋白質，編碼人類 FcRn-結合域與抗原-結合域的基因可操作式地連接以形成框架融合多肽。合適地，包含由數個胺基酸所組成之連接子可插入至人類 FcRn-結合域與抗原-結合域之間。例如其序列由 (GGGGS)<sub>n</sub>(序列編號：11)所組成之多個可變化之連接子已知於此項技術領域。

**【0257】** 本發明進一步提供用以製造包含 FcRn-結合域之抗原-結合分子的方法，相較於包含野生型 Fc 區域之抗原-結合分子，於中性或酸性 pH 對於 FcRn 具有增加的結合活性且不顯著增加於中性 pH 對於預先存在之 ADA 之結合活性。

較佳地，用以製造包含 Fc 區域之抗原-結合分子的方法，於中性或酸性 pH 對於 FcRn 具有增加的結合活性且於中性 pH 對於預先存在之 ADA 具有減低的結合活性，包括下述步驟：

提供於中性或酸性 pH 對於 FcRn 具有增加的結合活性且於中性 pH 範圍對於預先存在之 ADA 具有增加的結合活性之 Fc 區域，

取代胺基酸於 Fc 區域之胺基酸序列於選自下述所成群組之一個或多個位置：EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438 與 EU440。

(c) 改變抗原-結合分子之抗原-結合域之至少一個胺基酸且選擇具有抗原-結合活性於中性 pH 範圍較強於酸性範圍者之抗原-結合分子；

(d) 獲得編碼抗原-結合分子之基因，其中(b)所製備之人類 FcRn-結合域與(c)所製備之抗原-結合域係經連接，以及

(e) 使用(d)所製備之基因製造抗原-結合分子。

**【0258】** 步驟 a)之較佳 Fc 區域為人類 Fc 區域。較佳地，於中性或酸性 pH 範圍對於 FcRn 與於中性 pH 範圍預先存在之 ADA 具有增加的結合活性之 Fc 區域包括胺基酸取代於於選自下述所成群組之一個或多個位置：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 與 EU436。更較佳地，其包括取代於選自表 2 與 4 至 7 之位置組合之任一位置。甚至更較佳地，其包括選自表 3 與 17 至 20 之任一者所示取代或取代組合之任一者。較佳地，步驟 a)包含提供編碼於於中性或酸性 pH 範圍對於 FcRn 與預先存在之 ADA 具有增加的結合活性之 Fc 區域的核苷酸序列。

較佳地，步驟 b)之胺基酸取代之取代於表 10 所示一個或更多個位置或位置組合。更較佳地，步驟 b)之取代為表 11 所示取代或取代組合之一者。步驟 b)之胺基酸於選自下述所成群組之一個或多個位置：EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、

EU436 EU438 與 EU440 較佳地係藉由於核苷酸序列中置換一個或多個核苷酸而予以取代。

步驟(b)與(c)可依任一順序進行。再者，步驟 c)可包括於如上述之抗原-結合域改變至少一個胺基酸以獲得 pH-依賴性抗原-結合域，或選擇鈣-離子依賴性抗原-結合域。步驟(c)中，改變胺基酸係較佳地取代組胺酸做為至少一個胺基酸或插入至少一個組胺酸。同時，經導入至少一個組胺酸突變處之位點並不特別限定且因此可導入至任何位置，只要組胺酸突變降低抗原-結合活性於酸性 pH 範圍至較低於於中性 pH 範圍者。該組胺酸突變可經導入於單一位點或二個或更多個位點。步驟 b)與 c)可重複二次或更多次。步驟(b)與(c)之重複數目不特別限定；然而，該數目典型地為 10 次或更少。

**【0259】** 操作式連接(b)與(c)所製備之 FcRn-結合域與抗原-結合域之連接子不限定為任何形式。人類 FcRn-結合域與抗原-結合域可藉由共價力或非-共價力連接。特別地，連接子可為肽連接子或化學連接子或結合對連接子如生物素與鏈黴親和素的組合。包括人類 FcRn-結合域與抗原-結合域之多肽的改質係習知於此項技術領域。另一具體例中，本發明之人類 FcRn-結合域與抗原-結合域可藉由於人類 FcRn-結合域與抗原-結合域之間形成融合蛋白質而予以連接。為了構築人類 FcRn-結合域與抗原-結合域之間的融合蛋白質，編碼人類 FcRn-結合域與抗原-結合域的基因可操作式地連接以形成框架融合多肽。合適地，包含由數個胺基酸所組成之連接子可插入至人類 FcRn-結合域與抗原-結合域之間。例如其序列由 (GGGGS)<sub>n</sub>(序列編

號：11)所組成之多個可變化之連接子已知於此項技術領域。

**【0260】** 因此，本發明之製造方法可進一步包括下述步驟：改變上述胺基酸且取代或插入組胺酸。本發明之製造方法中，可使用非天然胺基酸取代組胺酸。因此，本發明亦可理解為以非天然胺基酸置換上述組胺酸。

**【0261】** 本發明製造方法之步驟 a) 除了取代於上述一或多個位置之外，亦可包括取代於位置 EU256，藉此胺基酸於位置 EU256 係較佳地經以麩胺酸取代。

再者，本發明之製造方法可進一步包括步驟，其包括取代胺基酸於 Fc 區域之胺基酸序列於選自下述所成群組之一個或多個位置：EU234、EU235、EU236、EU237、EU238、EU239、EU265、EU266、EU267、EU269、EU270、EU271、EU295、EU296、EU297、EU298、EU300、EU324、EU325、EU327、EU328、EU329、EU331 與 EU332(根據 EU 編號系統)。較佳地，係導入取代 L235R / S239K。

**【0262】** 使用於本發明之製造方法之親代 FcRn-結合域與包含其等之抗原-結合分子可藉由任何方法製備。例如，可使用預先存在之抗體、預先存預先存在之庫(噬菌體庫等)、自經免疫動物之 B 細胞或將動物免疫所製備之融合瘤而製備之抗體與庫、藉由將隨機的胺基酸取代導入至上述抗體與庫所製備之抗體與庫、藉由導入組胺酸或非天然胺基酸突變至上述抗體與庫所製備之抗體與庫(高含量之組胺酸或非天然胺基酸之庫、於特定位點經導入組胺酸或非天然胺基酸之庫等)等。

**【0263】** 抗原-結合分子之抗原-結合活性與人類 FcRn 結合

活性可藉由此項技術領域者所習知方法予以測定。除了 pH 以外的條件可由此項技術領域者合適地決定。

【0264】上述製造方法中，抗原與抗原-結合分子可以任何狀態彼此結合以及人類 FcRn 與抗原-結合分子可以任何狀態彼此結合。該狀態不特別限定；例如，抗原或人類 FcRn 可與經固定之抗原-結合分子接觸以結合至抗原-結合分子。或者，抗原-結合分子可與經固定之抗原或人類 FcRn 接觸以結合至抗原-結合分子。或者，抗原-結合分子可與抗原或人類 FcRn 於溶液中接觸以結合至抗原-結合分子。

【0265】由上述方法所製造之抗原-結合分子可為任何本發明之抗原-結合分子；以及較佳的抗原-結合分子包含，例如，其具有抗原-結合域為離子化鈣-濃度依賴性抗原-結合域者或具有抗原-結合域為組胺酸取代作為胺基酸或插入至少一個組胺酸者，且該抗原-結合分子進一步包括人類 FcRn-結合域，其包括胺基酸取代於選自下述所成群組之一個或多個位置：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 與 EU436(EU 編號)。本發明之抗原-結合分子除了取代於上述一個或多個位置之外，亦可包括取代於位置 EU256。較佳地，胺基酸於位置 EU256 係經以麩胺酸取代。更較佳地，FcRn-結合域包括胺基酸取代三個或更多個位置，其中該三個或更多個位置為表 2 與 4 至 7 所示組合之一者。甚至更較佳地，FcRn-結合域包括三個或更多個取代，其中該三個或更多個取代為表 3、17 至 20 所示組合之一者。

**【0266】** 進一步較佳的抗原-結合分子包含例如，其具有抗原-結合域為離子化鈣-濃度依賴性抗原-結合域者或具有抗原-結合域為組胺酸取代作為胺基酸或插入至少一個組胺酸者，且該抗原-結合分子進一步包括人類 Fc 區域，其具有胺基酸取代於選自下述所成群組之一個或多個位置：EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438 與 EU440。更較佳地，FcRn-結合域胺基酸取代於人類 FcRn-結合域於三個或更多個位置，其中該三個或更多個位置為表 9 與 10 所示組合之一者。

**【0267】** 更較佳之抗原-結合分子包含該等具有為離子化鈣-濃度依賴性抗原-結合域者或具有抗原-結合域為組胺酸取代作為胺基酸或插入至少一個組胺酸者，且該抗原-結合分子進一步包括人類 Fc 區域具有取代胺基酸

於選自下述所成群組之一個或多個位置：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU256、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 與 EU436 以及

於選自下述所成群組之一個或多個位置：EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438 與 EU440(EU 編號)。

較佳地，胺基酸於位置 EU256 係經以麩胺酸取代。

更較佳地，抗原-結合分子包括表 11 至 13 所示取代組合。

**【0268】** 具有所欲活性之抗體可藉由篩選自下述之抗體庫或融合瘤所獲得之多數抗體予以選擇。

**【0269】** 當改變抗原-結合分子之胺基酸時，其可使用已知序列作為改變前之抗原-結合分子的胺基酸序列或藉由此項技

術領域者所習知方法新鑑定之抗原-結合分子的胺基酸序列。例如，當抗原-結合分子為抗體時，可自抗體庫或自產生單株抗體之融合瘤選殖編碼抗體之基因而獲得。

**【0270】** 關於抗體庫，許多抗體庫為已知且用於製造抗體庫的方法亦為已知；因此，此項技術領域者可合適地獲得抗體庫。例如，關於噬菌體庫，可參考文獻例如 Clackson et al., *Nature*(1991) 352 : 624-8 ; Marks et al., *J. Mol. Biol.*(1991) 222 : 581-97 ; Waterhouses et al., *Nucleic Acids Res.*(1993) 21 : 2265-6 ; Griffiths et al., *EMBO J.*(1994) 13 : 324.0-60 ; Vaughan et al., *Nature Biotechnology*(1996) 14 : 309-14 ; 以及日本專利申請案公表公開案(JP-A) H20-504970(對應於非日本之國家內公開之未審查之日本國家階段公開案)。此外，可能使用方法如使用真核細胞作為庫(WO 95/15393)以及核糖體顯示方法。再者，使用人類抗體庫藉由淘選(panning)以獲得人類抗體的技術亦為已知。例如，人類抗體的可變區可使用噬菌體顯示方法予選擇結合至抗原的噬菌體而表現於噬菌體之表面作為單鏈抗體(scFvs)。所選擇之噬菌體的基因分析可決定編碼結合至抗原之人類抗體的可變區的 DNA 序列。一旦結合至抗原之 scFvs 的 DNA 序列被解明，根據該等序列可製造合適的表現宰體以獲得人類抗體。該等方法為已知且可參考專利 WO 92/01047、WO 92/20791、WO 93/06213、WO 93/11236、WO 93/19172、WO 95/01438 與 WO 95/15388。

**【0271】** 關於自融合瘤獲得編碼基因的方法，基本上可使用已知技術，其涉及使用所欲抗原或表現所欲抗原之細胞作為

敏化抗原，使用該等抗原根據傳統免疫方法進行免疫，以已知的親代細胞藉由傳統的細胞融合方法融合所得的免疫細胞，藉由傳統篩選方法篩選單株抗體產生細胞(融合瘤)、使用反轉錄酵素由所獲得之融合瘤的 mRNA 合成抗體可變區(V 區)的 cDNA 以及將該等 cDNA 與編碼所欲抗體恆定區(C 區)之 DNA 連接。

**【0272】** 更具體地，敏化抗原以獲得上述編碼 H 鏈與 L 鏈之抗原-結合分子基因可包含，例如，具有免疫性之完全抗原與包括半抗原而無免疫原性之不完全抗原二者；然而其等不限制於該等實例。例如，可使用全蛋白質與膽興趣的蛋白質的部分肽。此外，已知包括多醣類、核酸、脂類等之物質可為抗原。因此，本發明之抗原-結合分子之抗原不特別限定。抗原可藉由此項技術領域者所習知方法製備，例如，藉由以桿狀病毒為主的方法(例如，WO 98/46777)等。融合瘤可藉由，例如，Milstein 等人的方法(G. Kohler and C. Milstein, *Methods Enzymol.*(1981) 73: 3-46)等而製造。當抗原之免疫原性低時，免疫可於將抗原與具有免疫原性之巨分子(例如白蛋白)連接後進行。或者，必要時，抗原可藉由其等與其它分子連接而轉化為可溶性抗原。當使用如膜抗原(例如，受體)之穿膜分子作為抗原時，該膜抗原之細胞外區域的部份可使用作為片段，或表現穿膜分子的細胞外錫細胞表面可使用作為免疫原。

**【0273】** 抗原-結合分子-產生細胞可使用如上述之合適的敏化抗原藉由免疫動物而獲得。或者，抗原-結合分子-產生細胞可藉由於活體外將可製造抗原-結合分子之淋巴球免疫而製

備。多種哺乳動物可使用於免疫；該等通常使用之動物包含嚙齒類、兔形目與靈長類。該等動物包含，例如，如小鼠、大鼠與倉鼠之嚙齒類；如兔之兔形目；以及包含如食蟹猴、獼猴、狒狒與黑猩猩之靈長類。此外，帶有人類抗體基因目錄之基因轉殖動物亦為已知且人類抗體可藉由該等動物獲得(參照專利 WO 96/34096； Mendez et al., Nat. Genet.(1997) 15：146-56)。替代使用該等基因轉殖動物，例如，具有對抗抗原之結合活性的所欲人類抗體可藉由於活體外以所欲抗原或表現所欲抗原之細胞敏化淋巴球，然後將經敏化之淋巴球與如 U266 之人類骨髓瘤細胞融合(參照日本專利申請案公表公開案 No.(JP-B) H01-59878(未審查，用於異議之經核准公開之日本專利申請案))。再者，所欲人類抗體可藉由使用所欲抗原將帶有完整目錄之人類抗體基因的基因轉殖動物敏化而獲得(參照 WO 93/12227、WO 92/03918、WO 94/02602、WO 96/34096 與 WO 96/33735)。

**【0274】** 動物免疫可藉由將敏化抗原合適的稀釋與懸浮於磷酸鹽緩衝液(PBAS)、生理鹽水等而進行，或必要時將該等與佐劑乳化。然後將其以腹腔內或皮下注射至動物。然後，與弗佐氏不完全作驢混合之敏化抗原係較佳地每 4 至 21 日投藥數次。抗體產生可使用傳統方法於動物血清藉由測量感興趣抗體之力價而予以確認。

**【0275】** 自淋巴球或以所欲抗原免疫化之動物所獲得之抗原-結合分子-產生細胞，可使用傳統融合劑(例如，聚乙二醇)與骨髓瘤融合以製造融合瘤(Goding, Monoclonal Antibodies：

Principles and Practice, Academic Press,(1986) 59-103)。當需要時，融合瘤細胞可培養與生長以及自該等融合瘤所產生之抗原-結合分子之結合特異性，可使用已知分析方法，例如免疫沉澱、放射免疫分析(RIA)與酵素連接免疫吸附分析(ELISA)，而予以測量。之後，若必要時，生感興趣之抗原-結合分子之融合瘤之特異性、親和性或活性，可藉由如限制性稀釋之方法予一次選殖而測定。

**【0276】** 其次，編碼所選擇之抗原-結合分子的基因可使用特異性結合至抗原-結合分子(例如，互補於編碼抗體恆定區之序列之寡核苷酸)之探針，自融合瘤或抗原-結合分子-產生細胞(經敏化之淋巴球等)選殖。譯可能使用 RT-PCR 自 mRNA 選殖基因。免疫球蛋白分類為 5 種不同類型，IgA、IgD、IgE、IgG 與 IgM。該等類型可進一步分成數種亞型(同型物)(例如，IgG-1、IgG-2、IgG-3 與 IgG-4；IgA-1 與 IgA-2；等)。使用於本發明以生產抗原-結合分子的 H 鏈與 L 鏈不特別限定且可為源自屬於任何該等型或亞型之抗體；然而，IgG 特別較佳。

**【0277】** 本文中，可能使用遺傳工程技術改變 H-鏈-編碼基因與 L-鏈-編碼基因。遺傳改變抗體，如嵌合抗體與人源化抗體，其已經人工化改變以具有降低對抗人類等異源免疫原性目的，可合適地製造抗體如小鼠抗體、大鼠抗體、兔抗體、倉鼠抗體、山羊抗體與駱駝抗體。嵌合抗體為抗體包含非人類哺乳動物抗體之 H-鏈與 L-鏈可變區，如小鼠抗體，以及人類抗體之 H-鏈與 L-鏈之恆定區。嵌合抗體可藉由將編碼鼠抗體之可變區的 DNA 接合至編碼人類抗體之恆定區 DNA，插入至表

現載體且將載體導入至宿主以產生抗體。人源化抗體，亦稱為重塑人類抗體，可使用數種寡核苷酸藉由 PCR 合成，該寡核苷酸係經製造使其 DNA 序列之終端具有重疊部分，該 DNA 序列係經設計連接如小鼠之非人類哺乳動物之抗體的互補決定區(CDR)。所得 DNA 可接合至編碼人類抗體恆定區之 DNA。所接合之 DNA 可插入至表現載體且該載體可導入至宿主以產生抗體(參照 EP 239400 與 WO 96/02576)。嗜 CDR 型呈較佳的抗原-接合位點時，選擇經由 CDR 接合之人類抗體 FR。必要時，抗體可變區之框架區的胺基酸可經置換，以使重塑人類抗體之 CDR 形成合適的抗原-結合位點(K. Sato et al., *Cancer Res.*(1993) 53 : 10.01-10.06)。

**【0278】**除上述人源化之外，抗體可經改變以改良其生物性質，例如，結合至抗原。本發明中，該改變可藉由如定點突變(參照例如，Kunkel(1910.0) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 : 488)、PCR 突變與盒式突變之方法而達成。一般而言，其生物性質經改良之突變抗體，當相較於原始抗體可變區之胺基酸序列時，顯示序列同源性及/或相似性為 70%或更高、更較佳為 80%或更高以及甚至較佳為 90%或更高 (例如，95%或更高、97%、98%或 99%)。本文中，序列同源性及/或相似性係經定義為在序列同源性之值已藉由序列對準以及必要時之間隙導入而予以最佳化後，對於原始抗體殘基為同源(相同殘基)或類似(根據胺基酸側鏈之一般性質將胺基酸殘基分類為相同群組)之胺基酸殘基的比例。一般而言，天然胺基酸殘基係根據其側鏈而分類為下述群組：

疏水性：丙胺酸、異白胺酸、纈胺酸、甲硫胺酸與白胺酸；

中性親水性：天冬醯胺、麩胺醯胺、半胱胺酸、蘇胺酸與絲胺酸；

酸性：天冬胺酸與麩胺酸；

鹼性：精胺酸、組胺酸與離胺酸；

影響鏈定向之殘基：甘胺酸與脯胺酸；以及

芳香性：酪胺酸、色胺酸與苯丙胺酸。

**【0279】** 再者，本發明亦提供編碼本發明之 FcRn-結合域與本發明之抗原-結合分子的基因。編碼本發明之抗原-結合分子的基因可為任何基因且可為 DNA、RNA、核酸類似物等。

**【0280】** 再者，本發明亦提供戴有上述基因之宿主細胞。宿主細胞不特別限定且包含，例如，大腸桿菌(*E. coli*)與各種動物細胞。宿主細胞可使用，例如，作為生產系統亦生產與表現本發明之抗體。可得活體外與活體內的生產系統用於多肽生產系統。該等活體外生產系統包含，例如，使用真核細胞或原核細胞之生產系統。

**【0281】** 可使用作為宿主細胞之真核細胞包含，例如，動物細胞、植物細胞與真菌細胞。動物細胞包含：哺乳動物細胞，例如，CHO(中國倉鼠卵細胞株)、COS(猴腎細胞株)、骨髓瘤(Sp2/O, NS0 etc)、BHK(胎兒倉鼠腎細胞株)Hela, Vero, HEK293(具有經剪切之腺病毒(Ad)5 DNA 之人類胚胎腎細胞)、PER.C6 細胞(經轉形有腺病毒第 5 型(Ad5)E1A 與 E1B 基因之人類胚胎眼細胞株) 293 等(參照 *Current Protocols in Protein Science*(May, 2001, Unit 5.9, Table 5.9.1))，兩棲細胞

如爪蟾卵母細胞 (*Xenopus laevis* oocytes)(Valle et al., Nature(1981) 291 : 338-340) ; 以及昆蟲系包如 Sf9、Sf21 與 Tn5。較佳使用 CHO-DG44、CHO-DX11B、COS7 細胞、HEK293 細胞與 BHK 細胞表現本發明之抗體。動物細胞中，CHO 細胞特別教家用於大規模表現。可將載體導入至宿主細，例如，藉由鈣磷酸鹽方法、DEAE-葡萄糖方法、使用陽離子微脂體 DOTAP(Boehringer-Mannheim)的方法、電穿孔方法與脂質體轉染方法。

**【0282】** 關於植物細胞，例如，菸草-衍生細胞與浮萍 (*Lemna minor*) 已知作為蛋白生產系統。由該等細胞培養之癒合組織以生產本發明之抗原-結合分子。關於真菌細胞，已知蛋白質生產系統係使用酵母細胞者，例如，酵母菌屬(如釀酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 與裂殖酵母 (*Saccharomyces pombe*))之細胞；以及絲狀真菌的細胞，例如，麴菌屬 (如黑麴菌 (*Aspergillus niger*))。該等細胞可使用作為宿主以生產本發明之抗原-結合分子。

**【0283】** 細菌細胞可使用於真核細胞生產系統。關於細菌細胞，除上述之使用大腸桿菌之生產系統之外，亦已知使用枯草桿菌之生產系統。該等系統可使用於生產本發明之抗原-結合分子。

**【0284】** 由本發明之生產方法所獲得之基因，典型地藉由合適的載體攜帶(插入)且然後導入至宿主細胞。載體不特別限定只要其安定地保留經插入的核酸即可。例如，當使用 *E. coli* 作為宿主時，較佳的選殖載體包含 pBluescript 載體

(Stratagene)；然而，可使用各種市售可得載體。當使用載體生產本發明之抗原-結合分子時，表現載體特別有用。該等表現載體不特別限定只要該載體於活體外、於大腸桿菌中、於培養細胞中或於有機體之體內表現抗原-結合分子即可。例如，pBEST 載體 (Promega) 係較佳用於活體外表現；pET 載體 (Invitrogen) 係較佳用於 E. coli；pME18S-FL3 載體 (GenBank Accession No. AB009864) 係較佳用於培養細胞；以及 pME18S 載體 (Mol Cell Biol.(1988) 8 : 466-472) 係較佳用於有機體體內。此外，EBNA1 蛋白質可共表現以增加感興趣基因的拷貝數。於此情況中，使用包含複製起始點之載體 (Biotechnol Bioeng. 2001 Oct 20 ; 75(2) : 197-203, Biotechnol Bioeng. 2005 Sep 20 ; 91(6) : 670-7.)。本發明之 DNA 可藉由傳統方法插入至載體，例如，藉由使用限制性酵素位點之接合 (Current protocols in Molecular Biology, edit. Ausubel et al.,(1987) Publish. John Wiley & Sons, Section 11.4-11.11)。

**【0285】** 上述宿主細胞不特別限定且各種宿主細胞可根據目的而使用。用於表現抗原-結合分子之細胞的實例包含細菌細胞(如鏈球菌、葡萄球菌、大腸桿菌、鏈黴菌與枯草桿菌之細胞)、真核細胞(如酵母菌與麴菌之細胞)、昆蟲細胞(如果蠅 S2 與夜蛾 SF9)、動物細胞(如 CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293 與黑色素瘤細胞)與植物細胞。載體可藉由習知方法導入至宿主細胞，例如，鈣磷酸鹽沉澱方法、電穿孔方法 (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al.(1987) Publish. John Wiley & Sons, Section 9.1-9.9)、脂質體

轉染方法與微注射方法。

【0286】 宿主細胞可藉由習知方法培養。例如，當使用動物細胞作為宿主時，可使用 DMEM、MEM、RPMI1640 或 IMDM 作為培養基。其等可與血清補充物如 FBS 或胎牛血清(FCS)一起使用。細胞可培養於無血清培養基。較佳 pH 於培養期間為 6 至 8。培養典型地係於 30 至 40°C 培養 15 至 200 小時。根據需要，更換培養基、充氣或攪動。

【0287】 合適的分泌信號可併入感興趣之多肽，以使表現於宿主細胞之抗原-結合分子分泌至內質網的內腔、至周質空間或至細胞外環境。該等信號可為內源性至感興趣之抗原-結合分子或可為異源性信號。

【0288】 另一方面，例如，使用動物或植物之生產系統可使用作為活體內生產多肽的系統。感興趣之多肽係導入至動物或植物且該多肽係於動物獲質物體內生產而後予以收集。本發明之「宿主」包含該等動物與植物。

【0289】 使用動物之生產系統包含使用動物或昆蟲者。可能使用之動物如山羊、豬、綿羊、小鼠與牛(Vicki Glaser SPECTRUM Biotechnology Applications(1993))。該等哺乳動物可為基因轉殖動物。

【0290】 例如，編碼本發明之抗原-結合分子之多核苷酸係與編碼專一生產於乳中之多肽，如山羊的基因  $\beta$ -酪蛋白，一起製備為融合基因。其次，以含有融合基因之多核苷酸片段注射山羊胚胎，以及然後移植至雌山羊。所欲之抗原-結合分子可自基因轉殖山羊所生產之乳中獲得，其係自接受胚胎之山羊產

得，或自其等之後代獲得。可投藥荷爾蒙以合適的增加由基因轉殖山羊所生產之含有抗原-結合分子之乳量(Ebert et al., *Bio/Technology*(1994) 12 : 699-702)。

【0291】如蠶之昆蟲可使用於生產本發明之抗原-結合分子。當使用蠶時，帶有編碼感興趣之抗原-結合分子之多核苷酸可使用於感染蠶以及感興趣之抗原-結合分子可自其等之體液獲得。

【0292】再者，當植物使用於生產本發明之抗原-結合分子，例如，可使用菸草。當使用菸草時，編碼感興趣之抗原-結合分子之多核苷酸係經插入至植物表現載體，例如，pMON 530，然後該載體係經導入至細菌，如根癌農桿菌(*Agrobacterium tumefaciens*)。然後使該細菌感染菸草如 *Nicotiana tabacum*，以及所欲之抗原-結合分子可自其葉子收集(Ma et al., *Eur. J. Immunol.*(1994) 24 : 131-138)。或者，可以類似細菌感染浮萍(*Lemna minor*)。選殖後，所欲之抗原-結合分子可自浮萍細胞獲得 (Cox KM et al., *Nat. Biotechnol.* 2006 Dec ; 24(12) : 1591-1597)。

【0293】由此所得之抗原-結合分子可自宿主細胞的內側或外側(如培養基或乳)單離且純化為實質純的與均質抗原-結合分子。用於單離與純化抗原-結合分子的方法不特別限定，以及可使用通常使用於多肽純化之單離與純化方法。抗原-結合分子可藉由合適選擇與組合予以單離與純化，例如，層析管柱、過濾、超過濾、鹽析、溶劑沉澱、溶劑萃取、蒸餾、免疫沉澱、SDS-聚丙烯醯胺膠體電泳、等電點電泳、透析與再結晶。

【0294】層析技術的實例包括，但不限於，親和性層析、離子交換層析、輸水性層析、膠體過濾、逆相層析與吸附層析 (Strategies for Protein Purification and Characterization : A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., (1996) Cold Spring Harbor Laboratory Press)。該等層析方法可使用液相層析如 HPLC 與 FPLC 進行。使用於親和性層析的管柱包含蛋白質 A 管柱與蛋白質 G 管柱。使用蛋白質 A 之管柱包含，例如，Hyper D、POROS 與 Sepharose F. F.(Pharmacia)。

【0295】必要時，抗原-結合分子可為任意地經改質以及肽可藉由合適的蛋白質改質酵素部分地經刪除以作為純化之前或之後的抗原-結合分子。該等蛋白質改質酵素包括胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、肽鏈內切酶、蛋白質激酶與葡萄糖苷酶。

[實施例]

【0296】雖然本發明於本文中詳細的且參考其具體例詳細地說明，但應了解前述敘述為力示性且例示於本質，且意圖闡明本發明與期較佳具體例。經由常規的試驗，此項技術領域中具有通常知識者可不悖於本發明的精神與範疇而容易地辨識可於其中完成各種變化與修改，其公認範圍將由隨附之申請專利範圍界定。

【0297】[實施例 1]構築新穎的中性 pH 之 FcRn 結合親和性經改良的 Fc 變異體

與 FcRn 交互作用之抗原-結合分子(抗體)之 Fc 區域(Nat Rev Immunol. 2007 Sep ; 7(9) : 715-25)係經工程化以於中性 pH 對於 FcRn 具有經改良的結合親和性以增加由血漿之抗原清

除。以於中性 pH 對於 FcRn 具有經改良的結合親和性的 pH- 依賴性抗原結合抗體之由血漿之抗原清除機制與傳統抗體的比較係示於圖 1A。

【0298】專利 WO2011/122011 之實施例 1 至 17 揭示於中性 pH 改良對於 FcRn 之結合親和性之突變(胺基酸取代)且說明產生具有於抗體的中性 pH 改良對於 FcRn 的結合親和性的變異體 F1 至 F599(表 16)。然而，對於包含該等 Fc 變異體的抗體開發，不僅是其藥理性質(亦即經改良的 FcRn 結合)，亦須考量安定性、純度與免疫原性。顯示較差安定性與純度之抗體不是合作為藥物，而且不佳的免疫原性將阻礙其鄰床發展。

【0299】具有於中性 pH 對 hFcRn 經改良之結合親和性的 Fc 變異體的設計與產生

設計具有於中性 pH 對於 hFcRn 經改良之結合親和性而仍維持高安定性、高純度與低免疫原性風險的各種 Fc 變異體。對於各 Fc 變異體之導入至野生型 IgG1 之 Fc 區域的突變(胺基酸取代)係示於表 M 16(IgG1-F1 至 F1434)。藉由揭示於專利 WO2011/122011 的參考例 1 之此項技術領域所習知的方法，胺基酸取代係經導入至 VH3-IgG1(序列編號：1)以產生 Fc 變異體。

【0300】 [表 16]

Fc 變異體

變異體名稱	hFcRn KD (N)	Ma(C)	HMW (%)	免疫原性分數	突變
IgG	8.8E-5	nd	nd	nd	無
M73	1.4E-05	nd	nd	nd	(參照 W0209/125825)
F1	8.1E-07	67.6	12.64	91	N434W
F2	3.2E-06	64.7	2.96	39	M252Y / S254T/T256E
F3	2.5E-06	68.5	1.43	112	N434Y
F4	5.8E-06	68.5	0.58	38	N434S
F5	6.8E-06	69.2	0.29	16	N434A
F7	5.6E-06	65.5	0.60	131	M252Y
F8	4.2E-06	64.3	0.97	84	M252W
F9	1.4E-07	62.6	0.72	152	M252Y/S254T / T256E /N434Y
F10	6.9E-08	61.7	0.94	130	M252Y / S254T / T256E / N434W
F11	3.1E-07	64.6	0.73	243	M252Y / N434Y
F12	1.7E-07	63.8	10.11	222	M252Y / N434W
F13	3.2E-07	63.7	1.21	196	M252W / N434Y
F14	1.8E-07	62.9	17.73	175	M252W / N434W
F19	4.6E-07	63.8	2.88	228	P257L / N434Y
F20	4.6E-07	54.8	1.96	327	V308F / N434Y
F21	3.0E-08	56.6	0.81	424	M252Y / V308P / N434Y
F22	2.0E-06	69.8	1.26	116	M428L / N434S
F25	9.2E-09	54.9	9.95	311	M252Y / S254T / T256E / V308P / N434W
F26	1.0E-06	68.4	0.31	2	I332V
F27	7.4E-06	69.6	0.85	113	G237M
F29	1.4E-06	67.1	0.79	114	I332V / N434Y
F31	2.8E-06	56.3	0.97	328	G237M / V308F
F32	8.0E-07	67.7	11.90	122	S254T / N434W
F33	2.3E-06	68.4	0.49	144	S254T / N434Y
F34	2.8E-07	64.6	10.22	93	T256E / N434W
F35	8.4E-07	66.1	1.15	115	T256E /N434Y
F36	3.6E-07	64.9	14.88	118	S254T / T256E / N434W

F37	1.1E-06	65.6	0.68	140	S254T / T256E / N434Y
F38	1.0E-07	64.1	11.74	193	M252Y / S254T / N434W
F39	3.0E-07	64.8	0.84	214	M252Y / S254T / N434Y
F40	8.2E-08	61.4	11.54	130	M252Y / T256E / N434W
F41	1.5E-07	61.7	0.77	152	M252Y / T256E / N434Y
F42	1.0E-06	63.2	0.81	56	M252Y / S254T / T256E / N434A
F43	1.7E-06	64.3	0.63	147	M252Y / N434A
F44	1.1E-06	64.5	1.81	100	M252W / N434A
F47	2.4E-07	62.4	7.75	153	M252Y / T256Q / N434W
F48	3.2E-07	64.2	0.82	175	M252Y / T256Q / N434Y
F49	5.1E-07	61.2	16.63	173	M252F / T256D / N434W
F50	1.2E-06	63.7	1.20	195	M252F / T256D / N434Y
F51	8.1E-06	69.1	2.64	68	N434F / Y436H
F52	3.1E-06	69.7	1.07	68	H433K / N434F / Y436H
F53	1.0E-06	66.5	8.01	92	I332V / N434W
F54	8.4E-08	64.2	8.27	271	V308P / N434W
F56	9.4E-07	66.7	1.22	169	I332V / M428L / N434Y
F57	1.1E-05	70.4	1.76	0	G385D / Q386P / N389S
F58	7.7E-07	67.9	6.43	91	G385D / Q386P / N389S / N434W
F59	2.4E-06	68.7	2.12	112	G385D / Q386P / N389S / N434Y
F60	1.1E-05	69	2.17	14	G385H
F61	9.7E-07	67.6	10.94	104	G385H / N434W
F62	1.9E-06	68.5	0.98	126	G385H / N434Y
F63	2.5E-06	68.5	1.18	95	N434F
F64	5.3E-06	69	0.78	24	N434H
F65	2.9E-07	62.9	4.38	135	M252Y / S254T / T256E / N434F
F66	4.3E-07	63.3	2.96	63	M252Y / S254T / T256E / N434H
F67	6.3E-07	63.1	1.08	227	M252Y / N434F
F68	9.3E-07	63.6	0.89	155	M252Y / N434H
F69	5.1E-07	67.9	7.45	167	M428L / N434W
F70	1.5E-06	69	1.82	167	M428L / N434Y
F71	8.3E-08	59.7	1.49	207	M252Y / S254T / T256E / M428L / N434W

F72	2.0E-07	62.6	2.46	207	M252Y / S254T / T256E / M428L / N434Y
F73	1.7E-07	63.4	1.86	298	M252Y / M428L / N434W
F74	4.6E-07	64.6	1.52	298	M252Y / M428L / N434Y
F75	1.4E-06	62.6	0.98	226	M252Y / M428L / N434A
F76	1.0E-06	62.4	1.08	134	M252Y / S254T / T256E / M428L / N434A
F77	9.9E-07	66.7	1.62	170	T256E / M428L / N434Y
F78	7.8E-07	67.9	10.76	199	S254T / M428L / N434W
F79	5.9E-06	67.7	0.96	44	S254T / T256E / N434A
F80	2.7E-06	63.8	0.86	79	M252Y / T256Q / N434A
F81	1.6E-06	63.3	1.85	56	M252Y / T256E / N434A
F82	1.1E-06	67.4	10.30	120	T256Q / N434W
F83	2.6E-06	65.4	1.37	142	T256Q / N434Y
F84	2.8E-07	62.5	13.96	139	M252W / T256Q / N434W
F85	5.5E-07	59.9	1.61	161	M252W / T256Q / N434Y
F86	1.5E-06	67.6	10.35	118	S254T / T256Q / N434W
F87	4.3E-06	68.6	1.36	139	S254T / T256Q / N434Y
F88	1.9E-07	63.5	10.67	128	M252Y / S254T / T256Q / N434W
F89	3.6E-07	64	1.38	149	M252Y / S254T / T256Q / N434Y
F90	1.9E-08	64	10.23	311	M252Y / T256E / V308P / N434W
F91	4.8E-08	53.7	1.63	479	M252Y / V308P / M428L / N434Y
F92	1.1E-08	56.2	11.80	388	M252Y / S254T / T256E / V308P / M428L / N434W
F93	7.4E-07	62.2	12.74	252	M252W / M428L / N434W
F94	3.7E-07	63.4	11.86	283	P257L / M428L / N434Y
F95	2.6E-07	53.2	1.36	212	M252Y / S254T / T256E / M428L / N434F
F99	6.2E-07	62.9	1.27	63	M252Y / T256E / N434H
F101	1.1E-07	60.7	4.54	179	M252W / T256Q / P257L / N434Y
F103	4.4E-08	48.3	1.21	541	P238A / M252Y / V308P / N434Y
F104	3.7E-08	48.6	1.03	424	M252Y / D265A / V308P / N434Y
F105	7.5E-08	55.1	1.06	441	M252Y / T307A / V308P / N434Y
F106	3.7E-08	53.9	1.31	415	M252Y / V303A / V308P / N434Y

F107	3.4E-08	53.2	1.85	562	M252Y / V308P / D376A / N434Y
F108	4.1E-08	53	0.98	414	M252Y / V305A / V308P / N434Y
F109	3.2E-08	56.8	1.13	454	M252Y / V308P / Q311A / N434Y
F111	3.2E-08	56.3	1.36	446	M252Y / V308P / K317A / N434Y
F112	6.4E-08	48.4	2.11	510	M252Y / V308P / E380A / N434Y
F113	3.2E-08	54.6	0.71	466	M252Y / V308P / E382A / N434Y
F114	3.8E-08	57.1	0.97	467	M252Y / V308P / S424A / N434Y
F115	6.6E-06	70	0.53	228	T307A / N434A
F116	8.7E-06	64.2	0.91	102	E380A / N434A
F118	1.4E-05	71.2	0.96	77	M428L
F119	5.4E-06	65.3	1.23	112	T250Q / M428L
F120	6.3E-08	54.2	3.54	464	P257L / V308P / M428L / N434Y
F121	1.5E-08	49.2	2.37	388	M252Y / T256E / V308P / M428L / N434W
F122	1.2E-07	61.4	1.71	207	M252Y / T256E / M428L / N434W
F123	3.0E-08	49.3	1.79	332	M252Y / T256E / V308P / N434Y
F124	2.9E-07	62.7	1.49	207	M252Y / T256E / M428L / N434Y
F125	2.4E-08	49.1	1.35	388	M252Y / S254T / T256E / V308P / M428L / N434Y
F128	1.7E-07	63.8	7.11	283	P257L / M428L / N434W
F129	2.2E-07	64.8	3.28	244	P257A / M428L / N434Y
F131	3.0E-06	61.6	7.07	229	P257G / M428L / N434Y
F132	2.1E-07	61.3	8.23	288	P257I / M428L / N434Y
F133	4.1E-07	62.7	6.78	254	P257M / M428L / N434Y
F134	2.7E-07	57.6	8.30	268	P257N / M428L / N434Y
F135	7.5E-07	63.3	8.81	251	P257S / M428L / N434Y
F136	3.8E-07	62	10.86	251	P257T / M428L / N434Y
F137	4.6E-07	65	13.28	283	P257V / M428L / N434Y
F139	1.5E-08	55	5.08	356	M252W / V308P / N434W
F140	3.6E-08	62.4	3.51	483	S239K / M252Y / V308P / N434Y
F141	3.5E-08	60.2	8.80	438	M252Y / S298G / V308P / N434Y
F142	3.7E-08	60.8	1.35	454	M252Y / D270F / V308P / N434Y
F143	2.0E-07	61.1	6.55	444	M252Y / V308A / N434Y
F145	5.3E-08	48	17.47	458	M252Y / V308F / N434Y

F147	2.4E-07	65.4	7.78	419	M252Y / V308I / N434Y
F149	1.9E-07	58.9	1.49	430	M252Y / V308L / N434Y
F150	2.0E-07	56.3	1.64	447	M252Y / V308M / N434Y
F154	1.8E-07	59.3	1.05	436	M252Y / V308T / N434Y
F157	1.5E-07	53.3	1.24	425	P257A / V308P / M428L / N434Y
F158	5.9E-08	45.7	6.38	431	P257T / V308P / M428L / N434Y
F159	4.4E-08	53.3	9.24	464	P257V / V308P / M428L / N434Y
F160	8.5E-07	63	1.96	240	M252W / M428I / N434Y
F162	1.6E-07	66.9	1.11	216	M252W / M428Y / N434Y
F163	4.2E-07	66.8	1.22	208	M252W / M428F / N434Y
F164	3.7E-07	57.6	1.50	313	P238A / M252W / N434Y
F165	2.9E-07	58.1	1.53	196	M252W / D265A / N434Y
F166	1.5E-07	64.6	1.37	342	M252W / T307Q / N434Y
F167	2.9E-07	60.7	2.02	429	M252W / V303A / N434Y
F168	3.2E-07	59.8	2.33	335	M252W / D376A / N434Y
F169	2.9E-07	61.5	1.18	377	M252W / V305A / N434Y
F170	1.7E-07	63.3	1.46	335	M252W / Q311A / N434Y
F171	1.9E-07	55.3	1.58	249	M252W / D312A / N434Y
F172	2.2E-07	62.7	1.18	218	M252W / K317A / N434Y
F173	7.7E-07	58.1	1.40	283	M252W / E380A / N434Y
F174	3.4E-07	61.9	5.58	238	M252W / E382A / N434Y
F175	2.7E-07	63.6	0.88	239	M252W / S424A / N434Y
F176	2.9E-07	68.8	0.98	255	S239K / M252W / N434Y
F177	2.8E-07	66.7	5.20	210	M252W / S298G / N434Y
F178	2.7E-07	67.1	2.39	226	M252W / D270F / N434Y
F179	3.1E-07	66.8	1.32	286	M252W / N325G / N434Y
F182	6.6E-08	62.8	4.26	244	P257A / M428L / N434W
F183	2.2E-07	59.6	10.28	251	P257T / M428L / N434W
F184	2.7E-07	63.3	11.21	283	P257V / M428L / N434W
F185	2.6E-07	62.1	0.98	198	M252W / I332V / N434Y
F188	3.0E-06	59.2	3.09	282	P257I / Q311I
F189	1.9E-07	65.3	1.35	456	M252Y / T307A / N434Y
F190	1.1E-07	65.5	0.98	389	M252Y / T307Q / N434Y
F191	1.6E-07	62.4	0.91	495	P257L / T307A / M428L / N434Y

F192	1.1E-07	63.2	0.82	456	P257A / T307A / M428L / N434Y
F193	8.5E-08	58.6	7.10	463	P257T / T307A / M428L / N434Y
F194	1.2E-07	62.2	0.61	495	P257V / T307A / M428L / N434Y
F195	5.6E-08	63.2	1.22	429	P257L / T307Q / M428L / N434Y
F196	3.5E-08	64.3	0.73	390	P257A / T307Q / M428L / N434Y
F197	3.3E-08	60.9	8.30	396	P257T / T307Q / M428L / N434Y
F198	4.8E-08	63.3	3.41	429	P257V / T307Q / M428L / N434Y
F201	2.1E-07	61.9	0.74	331	M252Y / T307D / N434Y
F203	2.4E-07	60.3	6.07	415	M252Y / T307F / N434Y
F204	2.1E-07	63.3	0.70	397	M252Y / T307G / N434Y
F205	2.0E-07	62.6	0.70	369	M252Y / T307H / N434Y
F206	2.3E-07	61.7	3.45	392	M252Y / T307I / N434Y
F207	9.4E-07	64.6	0.62	379	M252Y / T307K / N434Y
F208	3.9E-07	60.8	6.14	416	M252Y / T307L / N434Y
F209	1.3E-07	62.1	1.19	416	M252Y / T307M / N434Y
F210	2.9E-07	63.4	0.72	398	M252Y / T307N / N434Y
F211	2.4E-07	69	0.60	390	M252Y / T307P / N434Y
F212	6.8E-07	65.6	0.99	414	M252Y / T307R / N434Y
F213	2.3E-07	64.5	0.94	423	M252Y / T307S / N434Y
F214	1.7E-07	63.4	1.28	415	M252Y / T307V / N434Y
F215	9.6E-08	59.4	3.41	392	M252Y / T307W / N434Y
F216	2.3E-07	61.3	1.03	430	M252Y / T307Y / N434Y
F217	2.3E-07	62.3	1.08	268	M252Y / K334L / N434Y
F218	2.6E-07	64.2	0.91	257	M252Y / G385H / N434Y
F219	2.5E-07	62.6	0.87	266	M252Y / T289H / N434Y
F220	2.5E-07	63.3	0.92	318	M252Y / Q311H / N434Y
F221	3.1E-07	58.6	1.13	282	M252Y / D312H / N434Y
F222	3.4E-07	62.2	0.98	243	M252Y / N315H / N434Y
F223	2.7E-07	64.4	1.44	243	M252Y / K360H / N434Y
F225	1.5E-06	61.5	0.92	265	M252Y / L314R / N434Y
F226	5.4E-07	61	0.94	265	M252Y / L314K / N434Y
F227	1.2E-07	62.5	0.94	306	M252Y / N286E / N434Y
F228	2.3E-07	65.3	0.69	330	M252Y / L309E / N434Y
F229	5.1E-07	61.2	0.83	241	M252Y / R255E / N434Y

F230	2.5E-07	66.2	0.66	243	M252Y / P387E / N434Y
F236	8.9E-07	67.7	2.23	229	K248I / M428L / N434Y
F237	2.3E-07	64.3	1.02	270	M252Y / M428A / N434Y
F238	7.4E-07	63.9	0.97	255	M252Y / M428D / N434Y
F240	7.2E-07	66.9	0.69	255	M252Y / M428F / N434Y
F241	1.5E-06	62.5	1.41	278	M252Y / M428G / N434Y
F242	8.5E-07	68.7	0.73	220	M252Y / M428H / N434Y
F243	1.8E-07	63.8	0.81	286	M252Y / M428I / N434Y
F244	1.3E-06	58.1	1.87	253	M252Y / M428K / N434Y
F245	4.7E-07	63.1	0.82	279	M252Y / M428N / N434Y
F246	1.1E-06	54.8	8.29	286	M252Y / M428P / N434Y
F247	4.4E-07	59.9	1.00	275	M252Y / M428Q / N434Y
F249	6.4E-07	64.2	0.72	273	M252Y / M428S / N434Y
F250	2.9E-07	62.5	0.74	271	M252Y / M428T / N434Y
F251	1.9E-07	63.4	1.20	289	M252Y / M428V / N434Y
F252	1.0E-06	68.4	0.83	255	M252Y / M428W / N434Y
F253	7.1E-07	67.2	0.79	263	M252Y / M428Y / N434Y
F254	7.5E-08	69	1.30	362	M252W / T307Q / M428Y / N434Y
F255	1.1E-07	66.5	1.23	355	M252W / Q311A / M428Y / N434Y
F256	5.4E-08	67.7	1.27	403	M252W / T307Q / Q311A / M428Y / N434Y
F257	5.0E-07	67.9	0.60	475	M252Y / T307A / M428Y / N434Y
F258	3.2E-07	68.2	0.63	409	M252Y / T307Q / M428Y / N434Y
F259	2.8E-07	68.1	1.15	273	M252Y / D270F / N434Y
F260	1.3E-07	64.4	0.78	496	M252Y / T307A / Q311A / N434Y
F261	8.4E-08	64.9	0.82	430	M252Y / T307Q / Q311A / N434Y
F262	1.9E-07	64.1	0.82	448	M252Y / T307A / Q311H / N434Y
F263	1.1E-07	64.6	0.80	358	M252Y / T307Q / Q311H / N434Y
F264	2.8E-07	62.9	1.15	285	M252Y / E382A / N434Y
F265	6.8E-07	65.1	0.57	305	M252Y / E382A / M428Y / N434Y
F266	4.7E-07	65.9	0.77	517	M252Y / T307A / E382A / M428Y / N434Y
F267	3.2E-07	66.4	0.81	450	M252Y / T307Q / E382A / M428Y / N434Y

F268	6.3E-07	61.4	0.81	371	P238A / M252Y / M428F / N434Y
F269	5.2E-07	65.2	0.65	435	M252Y / V305A / M428F / N434Y
F270	6.6E-07	70.3	0.41	344	M252Y / N325G / M428F / N434Y
F271	6.9E-07	63.3	0.87	393	M252Y / D376A / M428F / N434Y
F272	6.8E-07	60	1.15	341	M252Y / E380A / M428F / N434Y
F273	6.5E-07	65.3	0.69	297	M252Y / E382A / M428F / N434Y
F274	7.6E-07	58.4	2.46	392	M252Y / E380A / E382A / M428F / N434Y
F275	4.2E-08	61.3	0.69	525	S239K / M252Y / V308P / E382A / N434Y
F276	4.1E-08	59.2	0.74	496	M252Y / D270F / V308P / E382A / N434Y
F277	1.3E-07	65.5	0.57	503	S239K / M252Y / V308P / M428Y / N434Y
F278	3.0E-08	55	0.62	411	M252Y / T307Q / V308P / E382A / N434Y
F279	6.1E-08	53.5	0.67	462	M252Y / V308P / Q311H / E382A / N434Y
F280	4.1E-08	65.5	0.58	513	S239K / M252Y / D270F / V308P / N434Y
F281	9.2E-08	57.2	0.71	477	M252Y / V308P / E382A / M428F / N434Y
F282	2.9E-08	49.2	0.82	521	M252Y / V308P / E382A / M428L / N434Y
F283	1.0E-07	57	0.49	485	M252Y / V308P / E382A / M428Y / N434Y
F284	1.0E-07	59.3	0.79	444	M252Y / V308P / M428Y / N434Y
F285	9.9E-08	59.4	0.60	436	M252Y / V308P / M428F / N434Y
F286	1.2E-07	63.6	0.64	544	S239K / M252Y / V308P / E382A / M428Y / N434Y
F287	1.0E-07	47	2.92	573	M252Y / V308P / E380A / E382A / M428F / N434Y
F288	1.9E-07	60.9	1.04	193	M252Y / T256E / E382A / N434Y
F289	4.8E-07	65.2	1.13	171	M252Y / T256E / M428Y / N434Y

F290	4.6E-07	63.2	0.98	213	M252Y / T256E / E382A / M428Y / N434Y
F292	2.3E-08	60.8	1.16	568	S239K / M252Y / V308P / E382A / M428I / N434Y
F293	5.3E-08	46.3	3.40	604	M252Y / V308P / E380A / E382A / M428I / N434Y
F294	1.1E-07	65	0.64	495	S239K / M252Y / V308P / M428F / N434Y
F295	6.8E-07	65.5	1.58	451	S239K / M252Y / E380A / E382A / M428F / N434Y
F296	4.9E-07	66.6	0.76	401	M252Y / Q311A / M428Y / N434Y
F297	5.1E-07	59.1	0.81	315	M252Y / D312A / M428Y / N434Y
F298	4.8E-07	58.5	1.09	464	M252Y / Q311A / D312A / M428Y / N434Y
F299	9.4E-08	64.8	0.71	532	S239K / M252Y / V308P / Q311A / M428Y / N434Y
F300	8.3E-08	56.6	1.39	555	S239K / M252Y / V308P / D312A / M428Y / N434Y
F301	7.2E-08	56	1.08	627	S239K / M252Y / V308P / Q311A / D312A / M428Y / N434Y
F302	1.9E-07	67.2	0.77	298	M252Y / T256E / T307P / N434Y
F303	6.7E-07	71.8	0.59	409	M252Y / T307P / M428Y / N434Y
F304	1.6E-08	58.9	1.10	397	M252W / V308P / M428Y / N434Y
F305	2.7E-08	48.9	0.76	374	M252Y / T256E / V308P / E382A / N434Y
F306	3.6E-08	53.5	0.93	419	M252W / V308P / E382A / N434Y
F307	3.6E-08	60	1.76	478	S239K / M252W / V308P / E382A / N434Y
F308	1.9E-08	63.2	1.19	497	S239K / M252W / V308P / E382A / M428Y / N434Y
F310	9.4E-08	59.8	2.44	521	S239K / M252W / V308P / E382A / M428I / N434Y
F311	2.8E-08	64.1	0.98	448	S239K / M252W / V308P / M428F / N434Y

F312	4.5E-07	64.3	1.33	404	S239K / M252W / E380A / E382A / M428F / N434Y
F313	6.5E-07	77.9	0.77	468	S239K / M252Y / T307P / M428Y / N434Y
F314	3.2E-07	56.1	1.27	372	M252Y / T256E / Q311A / D312A / M428Y / N434Y
F315	6.8E-07	72.8	0.80	322	S239K / M252Y / M428Y / N434Y
F316	7.0E-07	75.3	1.07	351	S239K / M252Y / D270F / M428Y / N434Y
F317	1.1E-07	68.5	0.84	532	S239K / M252Y / D270F / V308P / M428Y / N434Y
F318	1.8E-08	62	0.96	526	S239K / M252Y / V308P / M428I / N434Y
F320	2.0E-08	63.9	1.00	657	S239K / M252Y / V308P / N325G / E382A / M428I / N434Y
F321	3.2E-08	65.6	0.80	602	S239K / M252Y / D270F / V308P / N325G / N434Y
F322	9.2E-08	61.8	0.87	448	S239K / M252Y / D270F / T307P / V308P / N434Y
F323	2.7E-08	63.1	1.10	421	S239K / M252Y / T256E / D270F / V308P / N434Y
F324	2.8E-08	63	1.07	458	S239K / M252Y / D270F / T307Q / V308P / N434Y
F325	2.1E-08	62.4	0.84	473	S239K / M252Y / D270F / T307Q / V308P / Q311A / N434Y
F326	7.5E-08	73.2	0.90	518	S239K / M252Y / D270F / T307Q / Q311A / N434Y
F327	6.5E-08	70.4	1.19	427	S239K / M252Y / T256E / D270F / T307Q / Q311A / N434Y
F328	1.9E-08	62.3	0.76	556	S239K / M252Y / D270F / V308P / M428I / N434Y
F329	1.2E-08	64.2	0.97	575	S239K / M252Y / D270F / N286E / V308P / N434Y
F330	3.6E-08	65.5	0.75	414	S239K / M252Y / D270F / V308P / L309E / N434Y

F331	3.0E-08	63.8	0.77	513	S239K / M252Y / D270F / V308P / P387E / N434Y
F333	7.4E-08	75.3	1.00	418	S239K / M252Y / D270F / T307Q / L309E / Q311A / N434Y
F334	1.9E-08	65.2	1.25	645	S239K / M252Y / D270F / V308P / N325G / M428I / N434Y
F335	1.5E-08	63.2	1.15	464	S239K / M252Y / T256E / D270F / V308P / M428I / N434Y
F336	1.4E-08	64.7	0.95	516	S239K / M252Y / D270F / T307Q / V308P / Q311A / M428I / N434Y
F337	5.6E-08	72.9	1.20	562	S239K / M252Y / D270F / T307Q / Q311A / M428I / N434Y
F338	7.7E-09	63.4	1.03	618	S239K / M252Y / D270F / N286E / V308P / M428I / N434Y
F339	1.9E-08	65.2	1.09	457	S239K / M252Y / D270F / V308P / L309E / M428I / N434Y
F343	3.2E-08	60.2	1.28	568	S239K / M252Y / D270F / V308P / M428L / N434Y
F344	3.0E-08	56.3	0.92	538	S239K / M252Y / V308P / M428L / N434Y
F349	1.5E-07	57.8	0.97	530	S239K / M252Y / V308P / L309P / M428L / N434Y
F350	1.7E-07	58.2	1.01	538	S239K / M252Y / V308P / L309R / M428L / N434Y
F352	6.0E-07	67.7	1.12	496	S239K / M252Y / L309P / M428L / N434Y
F353	1.1E-06	73.1	1.01	504	S239K / M252Y / L309R / M428L / N434Y
F354	2.8E-08	57.5	0.86	483	S239K / M252Y / T307Q / V308P / M428L / N434Y
F356	3.4E-08	67.2	0.85	414	S239K / M252Y / D270F / V308P / L309E / P387E / N434Y
F357	1.6E-08	62.7	1.16	554	S239K / M252Y / T256E / D270F / V308P / N325G / M428I / N434Y
F358	1.0E-07	70.8	0.79	448	S239K / M252Y / T307Q / N434Y

F359	4.2E-07	63.5	7.84	417	P257V / T307Q / M428I / N434Y
F360	1.3E-06	63.9	4.93	419	P257V / T307Q / M428V / N434Y
F362	5.4E-08	70.1	13.44	518	P257V / T307Q / N325G / M428L / N434Y
F363	4.1E-08	63.3	15.02	470	P257V / T307Q / Q311A / M428L / N434Y
F364	3.5E-08	68.9	3.25	559	P257V / T307Q / Q311A / N325G / M428L / N434Y
F365	5.1E-08	60.2	3.22	458	P257V / V305A / T307Q / M428L / N434Y
F367	1.5E-08	59.4	1.25	500	S239K / M252Y / E258H / D270F / T307Q / V308P / Q311A / N434Y
F368	2.0E-08	64	0.97	687	S239K / M252Y / D270F / V308P / N325G / E382A / M428I / N434Y
F369	7.5E-08	62.8	4.07	408	M252Y / P257V / T307Q / M428I / N434Y
F372	1.3E-08	65.4	1.09	456	S239K / M252W / V308P / M428Y / N434Y
F373	1.1E-08	64.5	1.89	485	S239K / M252W / V308P / Q311A / M428Y / N434Y
F374	1.2E-08	63	1.30	399	S239K / M252W / T256E / V308P / M428Y / N434Y
F375	5.5E-09	63.5	1.18	518	S239K / M252W / N286E / V308P / M428Y / N434Y
F376	9.6E-09	61.9	14.59	483	S239K / M252Y / T256E / D270F / N286E / V308P / N434Y
F377	1.3E-07	77.7	0.95	421	S239K / M252W / T307P / M428Y / N434Y
F379	9.0E-09	62.2	54.64	428	S239K / M252W / T256E / V308P / Q311A / M428Y / N434Y
F380	5.6E-09	60.8	0.97	461	S239K / M252W / T256E / N286E / V308P / M428Y / N434Y
F381	1.1E-07	61.7	7.47	536	P257V / T307A / Q311A / M428L / N434Y

F382	8.7E-08	58.6	3.55	489	P257V / V305A / T307A / M428L / N434Y
F386	3.2E-08	56.7	2.02	325	M252Y / V308P / L309E / N434Y
F387	1.5E-07	57.9	1.64	330	M252Y / V308P / L309D / N434Y
F388	7.0E-08	57.4	1.12	401	M252Y / V308P / L309A / N434Y
F389	1.7E-08	59.2	1.19	298	M252W / V308P / L309E / M428Y / N434Y
F390	6.8E-08	60.2	1.29	302	M252W / V308P / L309D / M428Y / N434Y
F391	3.6E-08	59.4	0.91	374	M252W / V308P / L309A / M428Y / N434Y
F392	6.9E-09	60.3	0.92	588	S239K / M252Y / N286E / V308P / M428I / N434Y
F393	1.2E-08	61.1	0.83	545	S239K / M252Y / N286E / V308P / N434Y
F394	5.3E-08	70.3	0.99	532	S239K / M252Y / T307Q / Q311A / M428I / N434Y
F395	2.4E-08	60.1	1.46	391	S239K / M252Y / T256E / V308P / N434Y
F396	2.0E-08	71.7	1.53	624	S239K / M252Y / D270F / N286E / T307Q / Q311A / M428I / N434Y
F397	4.5E-08	75.1	1.23	562	S239K / M252Y / D270F / T307Q / Q311A / P387E / M428I / N434Y
F398	4.4E-09	63.3	1.14	578	S239K / M252Y / D270F / N286E / T307Q / V308P / Q311A / M428I / N434Y
F399	6.5E-09	63.2	1.02	563	S239K / M252Y / D270F / N286E / T307Q / V308P / M428I / N434Y
F400	6.1E-09	63.4	1.22	647	S239K / M252Y / D270F / N286E / V308P / Q311A / M428I / N434Y
F401	6.9E-09	65.3	1.11	618	S239K / M252Y / D270F / N286E / V308P / P387E / M428I / N434Y
F402	2.3E-08	63.7	11.07	429	P257V / T307Q / M428L / N434W
F403	5.1E-08	61.9	11.06	495	P257V / T307A / M428L / N434W

F404	9.4E-08	66.3	2.14	342	P257A / T307Q / L309P / M428L / N434Y
F405	1.7E-07	68.1	6.73	381	P257V / T307Q / L309P / M428L / N434Y
F406	1.5E-07	66.7	1.14	342	P257A / T307Q / L309R / M428L / N434Y
F407	1.6E-07	64.3	7.87	381	P257V / T307Q / L309R / M428L / N434Y
F408	2.5E-07	63.2	8.96	345	P257V / N286E / M428L / N434Y
F409	2.0E-07	64.4	10.17	283	P257V / P387E / M428L / N434Y
F410	2.2E-07	62.1	10.56	408	P257V / T307H / M428L / N434Y
F411	1.3E-07	62.4	10.50	438	P257V / T307N / M428L / N434Y
F412	8.8E-08	60.4	8.29	437	P257V / T307G / M428L / N434Y
F413	1.2E-07	66.9	7.29	430	P257V / T307P / M428L / N434Y
F414	1.1E-07	63.6	9.61	463	P257V / T307S / M428L / N434Y
F415	5.6E-08	61.1	8.69	558	P257V / N286E / T307A / M428L / N434Y
F416	9.4E-08	62.5	6.73	495	P257V / T307A / P387E / M428L / N434Y
F418	6.2E-07	81.7	0.58	558	S239K / M252Y / T307P / N325G / M428Y / N434Y
F419	1.6E-07	64.2	5.96	448	M252Y / T307A / Q311H / K360H / N434Y
F420	1.5E-07	65.9	1.10	448	M252Y / T307A / Q311H / P387E / N434Y
F421	1.3E-07	63.4	0.56	474	M252Y / T307A / Q311H / M428A / N434Y
F422	1.8E-07	62.4	0.46	489	M252Y / T307A / Q311H / E382A / N434Y
F423	8.4E-08	58.2	1.22	405	M252Y / T307W / Q311H / N434Y
F424	9.4E-08	57.9	1.25	484	S239K / P257A / V308P / M428L / N434Y
F425	8.0E-08	54.7	1.36	326	P257A / V308P / L309E / M428L / N434Y
F426	8.4E-08	65.3	3.50	374	P257V / T307Q / N434Y

F427	1.1E-07	63.1	3.79	411	M252Y / P257V / T307Q / M428V / N434Y
F428	8.0E-08	63.9	10.27	420	M252Y / P257V / T307Q / M428L / N434Y
F429	3.7E-08	63.5	10.07	365	M252Y / P257V / T307Q / N434Y
F430	8.1E-08	64.7	2.99	385	M252Y / P257V / T307Q / M428Y / N434Y
F431	6.5E-08	64.9	4.77	377	M252Y / P257V / T307Q / M428F / N434Y
F432	9.2E-07	67.1	6.21	550	P257V / T307Q / Q311A / N325G / M428V / N434Y
F433	6.0E-08	68.4	2.56	504	P257V / T307Q / Q311A / N325G / N434Y
F434	2.0E-08	69.3	1.66	524	P257V / T307Q / Q311A / N325G / M428Y / N434Y
F435	2.5E-08	69.2	1.85	516	P257V / T307Q / Q311A / N325G / M428F / N434Y
F436	2.5E-07	63.4	4.67	380	P257A / T307Q / M428V / N434Y
F437	5.7E-08	65.3	0.75	335	P257A / T307Q / N434Y
F438	3.6E-08	68.6	0.74	354	P257A / T307Q / M428Y / N434Y
F439	4.0E-08	67.9	3.44	346	P257A / T307Q / M428F / N434Y
F440	1.5E-08	68.7	9.15	622	P257V / N286E / T307Q / Q311A / N325G / M428L / N434Y
F441	1.8E-07	64	2.87	383	P257A / Q311A / M428L / N434Y
F442	2.0E-07	63.5	1.91	318	P257A / Q311H / M428L / N434Y
F443	5.5E-08	64.5	8.58	431	P257A / T307Q / Q311A / M428L / N434Y
F444	1.4E-07	62.8	1.96	497	P257A / T307A / Q311A / M428L / N434Y
F445	6.2E-08	64.4	1.22	359	P257A / T307Q / Q311H / M428L / N434Y
F446	1.1E-07	62.6	1.00	448	P257A / T307A / Q311H / M428L / N434Y
F447	1.4E-08	63.9	1.20	452	P257A / N286E / T307Q / M428L / N434Y

F448	5.3E-08	61.9	1.05	519	P257A / N286E / T307A / M428L / N434Y
F449	5.7E-07	81.9	0.64	587	S239K / M252Y / D270F / T307P / N325G / M428Y / N434Y
F450	5.2E-07	82.5	0.67	501	S239K / M252Y / T307P / L309E / N325G / M428Y / N434Y
F451	1.0E-07	60.4	4.14	463	P257S / T307A / M428L / N434Y
F452	1.4E-07	60.8	4.31	466	P257M / T307A / M428L / N434Y
F453	7.8E-08	55.5	7.22	480	P257N / T307A / M428L / N434Y
F454	9.6E-08	60.4	5.16	500	P257I / T307A / M428L / N434Y
F455	2.7E-08	66.3	2.85	393	P257V / T307Q / M428Y / N434Y
F456	3.4E-08	66.2	2.45	385	P257V / T307Q / M428F / N434Y
F457	4.0E-08	61.2	5.82	523	S239K / P257V / V308P / M428L / N434Y
F458	1.5E-08	57.1	7.48	499	P257V / T307Q / V308P / N325G / M428L / N434Y
F459	1.3E-08	56.5	5.57	514	P257V / T307Q / V308P / Q311A / N325G / M428L / N434Y
F460	4.7E-08	55.5	8.56	570	P257V / T307A / V308P / N325G / M428L / N434Y
F462	8.5E-08	57.2	1.10	514	P257A / V308P / N325G / M428L / N434Y
F463	1.3E-07	53	0.92	442	P257A / T307A / V308P / M428L / N434Y
F464	5.5E-08	54.3	1.14	370	P257A / T307Q / V308P / M428L / N434Y
F465	2.1E-08	69.2	9.95	581	P257V / N286E / T307Q / N325G / M428L / N434Y
F466	3.5E-07	63.6	0.35	167	T256E / P257V / N434Y
F467	5.7E-07	60.5	0.52	142	T256E / P257T / N434Y
F468	5.7E-08	55.8	0.71	490	S239K / P257T / V308P / M428L / N434Y
F469	5.6E-08	48.6	1.49	521	P257T / V308P / N325G / M428L / N434Y

F470	5.4E-08	48.2	1.81	467	T256E / P257T / V308P / N325G / M428L / N434Y
F471	6.6E-08	48.4	1.43	563	P257T / V308P / N325G / E382A / M428L / N434Y
F472	5.4E-08	48.8	5.04	521	P257T / V308P / N325G / P387E / M428L / N434Y
F473	4.5E-07	48.7	2.13	513	P257T / V308P / L309P / N325G / M428L / N434Y
F474	3.5E-07	48.4	1.04	521	P257T / V308P / L309R / N325G / M428L / N434Y
F475	4.3E-08	61.9	3.67	368	T256E / P257V / T307Q / M428L / N434Y
F476	5.5E-08	61.8	4.57	471	P257V / T307Q / E382A / M428L / N434Y
F477	4.3E-08	62.8	2.35	429	P257V / T307Q / P387E / M428L / N434Y
F480	3.9E-08	53.8	2.30	409	P257L / V308P / N434Y
F481	5.6E-08	59.2	1.26	341	P257T / T307Q / N434Y
F482	7.0E-08	66.4	1.32	463	P257V / T307Q / N325G / N434Y
F483	5.7E-08	62.1	1.42	415	P257V / T307Q / Q311A / N434Y
F484	6.2E-08	58.6	1.84	403	P257V / V305A / T307Q / N434Y
F485	9.7E-08	60.4	2.64	503	P257V / N286E / T307A / N434Y
F486	3.4E-07	60.4	0.76	381	P257V / T307Q / L309R / Q311H / M428L / N434Y
F488	3.5E-08	56.4	3.69	553	P257V / V308P / N325G / M428L / N434Y
F490	7.5E-08	59.4	2.29	519	S239K / P257V / V308P / Q311H / M428L / N434Y
F492	9.8E-08	61.7	3.29	579	P257V / V305A / T307A / N325G / M428L / N434Y
F493	4.9E-07	84	0.52	456	S239K / D270F / T307P / N325G / M428Y / N434Y
F497	3.1E-06	58.2	4.34	453	P257T / T307A / M428V / N434Y
F498	1.3E-06	62.2	6.16	234	P257A / M428V / N434Y
F499	5.2E-07	61.3	2.03	447	P257A / T307A / M428V / N434Y

F500	4.3E-08	61	2.81	396	P257S / T307Q / M428L / N434Y
F506	1.9E-07	57.1	8.70	454	P257V / N297A / T307Q / M428L / N434Y
F507	5.1E-08	59.9	4.51	499	P257V / N286A / T307Q / M428L / N434Y
F508	1.1E-07	65.1	3.93	429	P257V / T307Q / N315A / M428L / N434Y
F509	5.8E-08	62.8	3.94	447	P257V / T307Q / N384A / M428L / N434Y
F510	5.3E-08	62.7	4.35	429	P257V / T307Q / N389A / M428L / N434Y
F511	4.2E-07	63	2.28	228	P257V / N434Y
F512	5.8E-07	60	3.41	195	P257T / N434Y
F517	3.1E-07	61.4	2.82	290	P257V / N286E / N434Y
F518	4.2E-07	58.5	4.05	258	P257T / N286E / N434Y
F519	2.6E-08	61.3	2.45	436	P257V / N286E / T307Q / N434Y
F521	1.1E-08	63.5	1.51	456	P257V / N286E / T307Q / M428Y / N434Y
F523	2.6E-08	62.6	1.39	422	P257V / V305A / T307Q / M428Y / N434Y
F526	1.9E-08	62.2	1.60	361	P257T / T307Q / M428Y / N434Y
F527	9.4E-09	60.6	0.94	463	P257V / T307Q / V308P / N325G / M428Y / N434Y
F529	2.5E-08	61.7	1.82	353	P257T / T307Q / M428F / N434Y
F533	1.2E-08	64.8	1.01	409	P257A / N286E / T307Q / M428F / N434Y
F534	1.2E-08	65.6	0.84	417	P257A / N286E / T307Q / M428Y / N434Y
F535	3.9E-08	63.3	4.36	449	T250A / P257V / T307Q / M428L / N434Y
F538	9.9E-08	66.7	2.57	484	T250F / P257V / T307Q / M428L / N434Y
F541	6.0E-08	65.9	3.53	484	T250I / P257V / T307Q / M428L / N434Y

F544	3.1E-08	64.5	4.00	484	T250M / P257V / T307Q / M428L / N434Y
F549	5.4E-08	61.8	5.82	415	T250S / P257V / T307Q / M428L / N434Y
F550	5.9E-08	66.6	3.19	484	T250V / P257V / T307Q / M428L / N434Y
F551	1.2E-07	65.1	3.72	484	T250W / P257V / T307Q / M428L / N434Y
F552	1.1E-07	65.4	2.98	484	T250Y / P257V / T307Q / M428L / N434Y
F553	1.7E-07	64.1	1.52	382	M252Y / Q311A / N434Y
F554	2.8E-08	62.8	1.39	454	S239K / M252Y / S254T / V308P / N434Y
F556	1.5E-06	66.5	0.96	318	M252Y / T307Q / Q311A
F559	8.0E-08	62.8	1.20	277	M252Y / S254T / N286E / N434Y
F560	2.8E-08	56.9	1.15	395	M252Y / S254T / V308P / N434Y
F561	1.4E-07	65.5	1.23	427	M252Y / S254T / T307A / N434Y
F562	8.3E-08	65.7	1.21	360	M252Y / S254T / T307Q / N434Y
F563	1.3E-07	64.2	1.02	353	M252Y / S254T / Q311A / N434Y
F564	1.9E-07	63.7	1.02	289	M252Y / S254T / Q311H / N434Y
F565	9.2E-08	65	1.00	467	M252Y / S254T / T307A / Q311A / N434Y
F566	6.1E-08	64.9	1.24	401	M252Y / S254T / T307Q / Q311A / N434Y
F567	2.2E-07	64.2	1.52	257	M252Y / S254T / M428I / N434Y
F568	1.1E-07	61.6	0.99	356	M252Y / T256E / T307A / Q311H / N434Y
F569	2.0E-07	64.4	0.96	379	M252Y / T256Q / T307A / Q311H / N434Y
F570	1.3E-07	64.5	1.04	419	M252Y / S254T / T307A / Q311H / N434Y
F571	8.1E-08	62.4	1.03	510	M252Y / N286E / T307A / Q311H / N434Y
F572	1.0E-07	63.6	1.33	491	M252Y / T307A / Q311H / M428I / N434Y

F576	1.6E-06	62.7	0.99	154	M252Y / T256E / T307Q / Q311H
F577	1.3E-06	64.4	1.44	447	M252Y / N286E / T307A / Q311A
F578	5.7E-07	64.3	1.33	380	M252Y / N286E / T307Q / Q311A
F580	8.6E-07	63.9	1.06	308	M252Y / N286E / T307Q / Q311H
F581	7.2E-08	59.8	1.22	214	M252Y / T256E / N286E / N434Y
F582	7.5E-07	64.5	1.10	371	S239K / M252Y / V308P
F583	7.8E-07	63	1.01	412	S239K / M252Y / V308P / E382A
F584	6.3E-07	61.8	1.45	279	S239K / M252Y / T256E / V308P
F585	2.9E-07	62.7	1.15	433	S239K / M252Y / N286E / V308P
F586	1.4E-07	62	1.21	498	S239K / M252Y / N286E / V308P / M428I
F587	1.9E-07	61.9	1.47	361	M252Y / N286E / M428L / N434Y
F592	2.0E-07	62.9	0.99	256	M252Y / S254T / E382A / N434Y
F593	3.1E-08	60.8	1.27	497	S239K / M252Y / S254T / V308P / M428I / N434Y
F594	1.6E-08	59.3	1.32	434	S239K / M252Y / T256E / V308P / M428I / N434Y
F595	1.8E-07	69.4	0.91	345	S239K / M252Y / M428I / N434Y
F596	4.0E-07	56.6	1.05	357	M252Y / D312A / E382A / M428Y / N434Y
F597	2.2E-07	64.6	0.78	283	M252Y / E382A / P387E / N434Y
F598	1.4E-07	58.1	1.06	296	M252Y / D312A / P387E / N434Y
F599	5.2E-07	68.9	0.76	263	M252Y / P387E / M428Y / N434Y
F600	2.8E-07	62.5	0.89	217	M252Y / T256Q / E382A / N434Y
F601	9.6E-09	54.7	0.96	486	M252Y / N286E / V308P / N434Y
F611	2.8E-07	69.5	0.96	358	M252Y / V305T / T307P / V308I / L309A / N434Y
F612	3.6E-07	70.8	0.92	360	M252Y / T307P / V308I / L309A / N434Y
F617	7.4E-07	71.6	1.41	149	S239K / N434W
F618	6.4E-07	60.7	2.70	386	S239K / V308F / N434Y
F619	3.1E-07	70	0.67	302	S239K / M252Y / N434Y
F620	2.1E-07	69.6	1.18	273	S239K / M252Y / S254T / N434Y

F621	1.5E-07	70	0.76	506	S239K / M252Y / T307A / Q311H / N434Y
F622	3.5E-07	69.9	0.74	234	S239K / M252Y / T256Q / N434Y
F623	1.8E-07	68	2.39	234	S239K / M252W / N434W
F624	1.4E-08	69.1	1.99	511	S239K / P257A / N286E / T307Q / M428L / N434Y
F625	7.6E-08	69.7	1.85	449	S239K / P257A / T307Q / M428L / N434Y
F626	1.3E-06	62.7	0.81	181	V308P
F629	3.9E-08	52	0.56	481	M252Y / V279L / V308P / N434Y
F630	3.7E-08	58.5	0.87	540	S239K / M252Y / V279L / V308P / N434Y
F633	2.4E-08	53.7	0.65	446	M252Y / V282D / V308P / N434Y
F634	3.2E-08	59.5	0.88	505	S239K / M252Y / V282D / V308P / N434Y
F636	4.8E-08	57.1	0.91	520	S239K / M252Y / V284K / V308P / N434Y
F637	1.5E-07	54.9	1.05	455	M252Y / K288S / V308P / N434Y
F638	1.4E-07	60.9	0.90	514	S239K / M252Y / K288S / V308P / N434Y
F639	2.7E-08	56.2	0.92	424	M252Y / V308P / G385R / N434Y
F640	3.6E-08	62.1	0.83	483	S239K / M252Y / V308P / G385R / N434Y
F641	3.0E-08	56.3	0.83	438	M252Y / V308P / Q386K / N434Y
F642	3.0E-08	62.2	0.87	497	S239K / M252Y / V308P / Q386K / N434Y
F643	3.2E-08	62.4	0.73	479	L235G / G236R / S239K / M252Y / V308P / N434Y
F644	3.0E-08	62.1	0.80	518	G236R / S239K / M252Y / V308P / N434Y
F645	3.3E-08	54.6	1.25	551	S239K / M252Y / V308P / L328R / N434Y
F646	3.8E-08	48.5	3.58	509	S239K / M252Y / N297A / V308P / N434Y
F647	2.9E-08	43	8.59	502	P238D / M252Y / V308P / N434Y

F649	1.2E-07	68.3	0.90	364	S239K / M252Y / N286E / N434Y
F650	1.7E-07	68.1	1.19	210	S239K / M252Y / T256E / N434Y
F651	1.8E-07	69.4	0.69	441	S239K / M252Y / Q311A / N434Y
F652	2.4E-07	54.8	0.95	322	P238D / M252Y / N434Y
F654	3.2E-08	62.2	0.80	493	L235K / S239K / M252Y / V308P / N434Y
F655	3.4E-08	62.5	0.50	489	L235R / S239K / M252Y / V308P / N434Y
F656	3.3E-08	60	0.74	482	G237K / S239K / M252Y / V308P / N434Y
F657	3.2E-08	61.3	0.54	485	G237R / S239K / M252Y / V308P / N434Y
F658	3.2E-08	48.4	6.06	531	P238K / S239K / M252Y / V308P / N434Y
F659	3.0E-08	47.2	9.54	547	P238R / S239K / M252Y / V308P / N434Y
F660	3.1E-08	60.3	0.82	564	S239K / M252Y / V308P / P329K / N434Y
F661	3.4E-08	61	0.66	541	S239K / M252Y / V308P / P329R / N434Y
F663	6.4E-09	60.7	0.81	506	S239K / M252Y / N286E / T307Q / V308P / Q311A / N434Y
F664	3.9E-08	54.4	0.90	494	M252Y / N286A / V308P / N434Y
F665	2.0E-08	56.9	1.09	438	M252Y / N286D / V308P / N434Y
F666	2.1E-08	52.7	1.06	494	M252Y / N286F / V308P / N434Y
F667	3.0E-08	56.1	0.59	486	M252Y / N286G / V308P / N434Y
F668	4.0E-08	56.2	0.55	486	M252Y / N286H / V308P / N434Y
F670	2.1E-07	52.1	0.13	486	M252Y / N286K / V308P / N434Y
F671	2.2E-08	49.5	0.67	494	M252Y / N286L / V308P / N434Y
F672	2.4E-08	53.4	0.87	494	M252Y / N286M / V308P / N434Y
F673	2.3E-08	48.2	5.02	486	M252Y / N286P / V308P / N434Y
F674	3.2E-08	53.3	0.39	486	M252Y / N286Q / V308P / N434Y
F675	5.1E-08	49.3	0.67	494	M252Y / N286R / V308P / N434Y
F676	3.2E-08	55.6	0.64	494	M252Y / N286S / V308P / N434Y
F677	4.7E-08	57.1	0.92	486	M252Y / N286T / V308P / N434Y

F679	1.7E-08	48.7	4.00	486	M252Y / N286W / V308P / N434Y
F680	1.5E-08	56	0.80	494	M252Y / N286Y / V308P / N434Y
F681	4.9E-08	54.4	0.95	455	M252Y / K288A / V308P / N434Y
F682	8.2E-08	54.5	0.98	424	M252Y / K288D / V308P / N434Y
F683	5.0E-08	56.2	1.17	432	M252Y / K288E / V308P / N434Y
F684	5.1E-08	56.6	1.27	458	M252Y / K288F / V308P / N434Y
F685	5.3E-08	48.5	1.14	432	M252Y / K288G / V308P / N434Y
F686	4.6E-08	56.3	1.00	455	M252Y / K288H / V308P / N434Y
F687	4.9E-08	59.1	1.13	463	M252Y / K288I / V308P / N434Y
F688	2.8E-08	56.5	1.07	466	M252Y / K288L / V308P / N434Y
F689	4.1E-08	56.4	0.95	455	M252Y / K288M / V308P / N434Y
F690	1.0E-07	54.9	0.98	455	M252Y / K288N / V308P / N434Y
F692	3.9E-08	56	1.18	440	M252Y / K288Q / V308P / N434Y
F693	3.6E-08	56.2	0.82	478	M252Y / K288R / V308P / N434Y
F694	4.7E-08	57.5	0.88	466	M252Y / K288V / V308P / N434Y
F695	4.0E-08	55	1.09	481	M252Y / K288W / V308P / N434Y
F696	4.4E-08	56.4	0.93	486	M252Y / K288Y / V308P / N434Y
F697	3.1E-08	65.1	0.56	572	S239K / M252Y / V308P / N325G / N434Y
F698	2.2E-08	62.8	0.69	492	M252Y / N286E / T307Q / Q311A / N434Y
F699	2.3E-08	68.3	0.74	551	S239K / M252Y / N286E / T307Q / Q311A / N434Y
F705	7.1E-09	53.7	0.71	530	M252Y / N286E / V308P / M428I / N434Y
F706	1.8E-08	62	0.86	535	M252Y / N286E / T307Q / Q311A / M428I / N434Y
F707	5.9E-09	54.5	0.73	447	M252Y / N286E / T307Q / V308P / Q311A / N434Y
F708	4.1E-09	53.6	0.43	490	M252Y / N286E / T307Q / V308P / Q311A / M428I / N434Y
F709	2.0E-08	68.3	0.77	594	S239K / M252Y / N286E / T307Q / Q311A / M428I / N434Y
F710	1.5E-08	48.6	1.68	614	P238D / M252Y / N286E / T307Q / Q311A / M428I / N434Y

F711	6.5E-08	70.7	0.79	489	S239K / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y
F712	6.0E-08	55.2	0.89	508	P238D / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y
F713	2.0E-08	52.7	0.88	571	P238D / M252Y / N286E / T307Q / Q311A / N434Y
F714	2.3E-07	57.9	0.70	437	P238D / M252Y / N325S / N434Y
F715	2.3E-07	57.6	2.42	451	P238D / M252Y / N325M / N434Y
F718	2.8E-07	56.3	0.52	348	P238D / M252Y / Q295M / N434Y
F719	7.4E-08	57.3	0.76	411	P238D / M252Y / N325G / N434Y
F720	2.4E-08	56.4	0.66	385	M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y
F721	1.5E-08	55.3	0.77	428	M252Y / T307Q / V308P / Q311A / M428I / N434Y
F722	2.7E-07	53.7	0.43	322	P238D / M252Y / A327G / N434Y
F723	2.8E-07	45.3	7.75	347	P238D / M252Y / L328D / N434Y
F724	2.5E-07	43	24.31	355	P238D / M252Y / L328E / N434Y
F725	4.2E-08	61.5	0.56	485	L235K / G237R / S239K / M252Y / V308P / N434Y
F729	9.2E-07	68.3	0.61	365	T307A / Q311A / N434Y
F730	6.0E-07	69.1	0.52	299	T307Q / Q311A / N434Y
F731	8.5E-07	67.9	0.63	316	T307A / Q311H / N434Y
F732	6.8E-07	69	0.66	227	T307Q / Q311H / N434Y
F733	3.2E-07	48.8	2.59	276	M252Y / L328E / N434Y
F734	3.1E-07	46.8	9.34	340	G236D / M252Y / L328E / N434Y
F736	3.1E-07	52.2	2.27	298	M252Y / S267M / L328E / N434Y
F737	3.1E-07	48.6	2.82	298	M252Y / S267L / L328E / N434Y
F738	3.5E-07	59.8	0.91	468	P238D / M252Y / T307P / N434Y
F739	2.2E-07	68.1	0.77	430	M252Y / T307P / Q311A / N434Y
F740	2.9E-07	67.7	0.76	360	M252Y / T307P / Q311H / N434Y
F741	3.1E-07	52.9	1.14	322	P238D / T250A / M252Y / N434Y
F744	9.9E-07	58.6	1.09	357	P238D / T250F / M252Y / N434Y
F747	2.8E-07	59.4	0.93	357	P238D / T250I / M252Y / N434Y
F749	5.1E-07	58.6	1.13	357	P238D / T250L / M252Y / N434Y

F750	3.0E-07	53	1.34	357	P238D / T250M / M252Y / N434Y
F753	1.8E-07	45	6.13	345	P238D / T250Q / M252Y / N434Y
F755	3.5E-07	47.8	1.24	322	P238D / T250S / M252Y / N434Y
F756	3.7E-07	59.9	0.81	357	P238D / T250V / M252Y / N434Y
F757	1.2E-06	55.3	1.29	357	P238D / T250W / M252Y / N434Y
F758	1.4E-06	60	0.77	357	P238D / T250Y / M252Y / N434Y
F761	1.1E-06	59.7	0.56	191	P238D / N434Y
F762	3.6E-08	68.8	0.79	561	L235K / S239K / M252Y / N286E / T307Q / Q311A / N434Y
F763	3.5E-08	69.2	0.76	557	L235R / S239K / M252Y / N286E / T307Q / Q311A / N434Y
F764	6.3E-07	60	0.48	377	P238D / T307Q / Q311A / N434Y
F765	8.5E-08	56.8	1.06	407	P238D / M252Y / T307Q / L309E / Q311A / N434Y
F766	6.0E-07	69.2	0.61	286	T307A / L309E / Q311A / N434Y
F767	4.3E-07	69.9	0.63	198	T307Q / L309E / Q311A / N434Y
F768	6.4E-07	68.8	0.65	286	T307A / L309E / Q311H / N434Y
F769	4.6E-07	69.5	0.77	190	T307Q / L309E / Q311H / N434Y
F770	3.0E-07	61.8	0.84	226	M252Y / T256A / N434Y
F771	4.0E-07	60	0.57	275	M252Y / E272A / N434Y
F772	3.8E-07	62.7	0.57	293	M252Y / K274A / N434Y
F773	3.9E-07	62	0.50	285	M252Y / V282A / N434Y
F774	4.0E-07	61.5	0.64	314	M252Y / N286A / N434Y
F775	6.2E-07	56.1	9.28	243	M252Y / K338A / N434Y
F776	3.9E-07	61.9	0.64	273	M252Y / K340A / N434Y
F777	3.9E-07	64.2	0.59	278	M252Y / E345A / N434Y
F779	3.9E-07	64.2	0.56	273	M252Y / N361A / N434Y
F780	3.9E-07	64.3	0.65	256	M252Y / Q362A / N434Y
F781	3.7E-07	64.2	0.58	307	M252Y / S375A / N434Y
F782	3.5E-07	63.9	0.93	243	M252Y / Y391A / N434Y
F783	4.0E-07	64.2	0.50	514	M252Y / D413A / N434Y
F784	5.0E-07	65.6	0.70	367	M252Y / L309A / N434Y
F785	7.4E-07	64.7	0.70	359	M252Y / L309H / N434Y

F786	2.8E-08	62.6	0.61	463	M252Y / S254T / N286E / T307Q / Q311A / N434Y
F787	8.8E-08	66.1	0.72	300	M252Y / S254T / T307Q / L309E / Q311A / N434Y
F788	4.1E-07	65.5	0.53	251	M252Y / N315A / N434Y
F789	1.5E-07	64.3	0.67	243	M252Y / N315D / N434Y
F790	2.7E-07	63.9	0.97	265	M252Y / N315E / N434Y
F791	4.4E-07	60.6	1.27	243	M252Y / N315F / N434Y
F792	4.4E-07	65	0.59	243	M252Y / N315G / N434Y
F793	3.3E-07	61.4	0.75	251	M252Y / N315I / N434Y
F794	4.1E-07	62.8	0.64	243	M252Y / N315K / N434Y
F795	3.1E-07	62.8	0.85	265	M252Y / N315L / N434Y
F796	3.4E-07	64.4	0.85	251	M252Y / N315M / N434Y
F798	3.5E-07	64.3	0.72	273	M252Y / N315Q / N434Y
F799	4.1E-07	62.7	1.36	243	M252Y / N315R / N434Y
F800	3.8E-07	65.8	0.61	243	M252Y / N315S / N434Y
F802	3.3E-07	61.5	0.67	273	M252Y / N315V / N434Y
F803	3.6E-07	59.6	0.86	251	M252Y / N315W / N434Y
F804	4.0E-07	60.5	1.55	251	M252Y / N315Y / N434Y
F805	3.0E-07	65	0.70	397	M252Y / N325A / N434Y
F806	3.1E-07	64.3	0.70	262	M252Y / N384A / N434Y
F807	3.2E-07	64.2	0.71	243	M252Y / N389A / N434Y
F808	3.2E-07	64.1	0.69	274	M252Y / N389A / N390A / N434Y
F809	2.2E-07	63.3	0.56	202	M252Y / S254T / T256S / N434Y
F810	2.2E-07	65.2	0.68	360	M252Y / A378V / N434Y
F811	4.9E-07	59.4	1.03	301	M252Y / E380S / N434Y
F812	2.7E-07	62.8	0.69	267	M252Y / E382V / N434Y
F813	2.8E-07	64.3	0.77	284	M252Y / S424E / N434Y
F814	1.2E-07	63.3	0.90	188	M252Y / N434Y / Y436I
F815	5.5E-07	62.4	0.65	218	M252Y / N434Y / T437R
F816	3.6E-07	63.1	0.73	503	P238D / T250V / M252Y / T307P / N434Y
F817	9.8E-08	60.6	0.78	543	P238D / T250V / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y

F819	1.4E-07	49.1	0.74	384	P238D / M252Y / N286E / N434Y
F820	3.4E-07	70.4	0.56	312	L235K / S239K / M252Y / N434Y
F821	3.1E-07	71	0.67	309	L235R / S239K / M252Y / N434Y
F823	1.1E-06	44.2	10.39	367	P238D / T250Y / M252Y / W313F / N434Y
F828	2.5E-06	60.8	0.80	361	P238D / T250V / M252Y / I253V / N434Y
F831	1.6E-06	59.1	0.70	333	P238D / T250V / M252Y / R255A / N434Y
F832	2.6E-06	52.6	1.46	290	P238D / T250V / M252Y / R255D / N434Y
F833	8.0E-07	56.6	0.82	343	P238D / T250V / M252Y / R255E / N434Y
F834	8.1E-07	55	0.96	386	P238D / T250V / M252Y / R255F / N434Y
F836	5.0E-07	58.9	0.66	317	P238D / T250V / M252Y / R255H / N434Y
F837	5.6E-07	49.1	2.06	365	P238D / T250V / M252Y / R255I / N434Y
F838	4.3E-07	56.2	1.02	351	P238D / T250V / M252Y / R255K / N434Y
F839	3.4E-07	58.1	0.76	376	P238D / T250V / M252Y / R255L / N434Y
F840	4.2E-07	56.6	0.77	379	P238D / T250V / M252Y / R255M / N434Y
F841	1.1E-06	59.6	0.70	330	P238D / T250V / M252Y / R255N / N434Y
F843	6.6E-07	57.2	0.72	343	P238D / T250V / M252Y / R255Q / N434Y
F844	1.3E-06	58.3	0.69	347	P238D / T250V / M252Y / R255S / N434Y
F847	3.4E-07	47.1	3.82	355	P238D / T250V / M252Y / R255W / N434Y
F848	8.3E-07	55.7	0.87	368	P238D / T250V / M252Y / R255Y / N434Y

F849	3.3E-07	61.1	0.84	331	M252Y / D280A / N434Y
F850	2.9E-07	62.2	0.64	310	M252Y / D280E / N434Y
F852	3.3E-07	61.8	0.61	285	M252Y / D280G / N434Y
F853	3.2E-07	58.4	2.55	302	M252Y / D280H / N434Y
F855	3.2E-07	52.9	6.55	366	M252Y / D280K / N434Y
F858	3.2E-07	62.6	0.60	357	M252Y / D280N / N434Y
F860	3.3E-07	61.1	0.82	365	M252Y / D280Q / N434Y
F861	3.2E-07	49.2	9.26	363	M252Y / D280R / N434Y
F862	3.0E-07	61	0.72	310	M252Y / D280S / N434Y
F863	2.7E-07	55.3	16.98	326	M252Y / D280T / N434Y
F867	2.8E-07	64.4	0.75	262	M252Y / N384A / N389A / N434Y
F870	7.3E-08	69.9	0.93	499	L235K / S239K / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y
F871	7.1E-08	70.7	0.92	495	L235R / S239K / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y
F872	1.3E-07	68.8	0.85	374	L235K / S239K / M252Y / N286E / N434Y
F873	1.2E-07	69	0.92	371	L235R / S239K / M252Y / N286E / N434Y
F875	4.8E-07	63.7	0.88	165	M252Y / N434Y / Y436A
F877	8.3E-07	65.2	0.99	147	M252Y / N434Y / Y436E
F878	1.9E-07	65	0.68	210	M252Y / N434Y / Y436F
F879	9.2E-07	64.2	0.89	172	M252Y / N434Y / Y436G
F880	3.9E-07	65	0.81	170	M252Y / N434Y / Y436H
F881	3.1E-07	62.7	0.93	183	M252Y / N434Y / Y436K
F882	1.3E-07	64	1.04	188	M252Y / N434Y / Y436L
F883	2.1E-07	64.5	0.83	222	M252Y / N434Y / Y436M
F884	4.0E-07	64.1	0.84	177	M252Y / N434Y / Y436N
F888	4.8E-07	63.9	0.83	163	M252Y / N434Y / Y436S
F889	2.2E-07	63.4	0.84	171	M252Y / N434Y / Y436T
F890	1.1E-07	63.4	0.73	200	M252Y / N434Y / Y436V
F891	1.7E-07	62.9	2.54	208	M252Y / N434Y / Y436W
F892	7.1E-08	63.9	1.83	159	M252Y / S254T / N434Y / Y436I

F893	9.8E-08	70.2	0.73	257	L235K / S239K / M252Y / N434Y / Y436I
F894	9.2E-08	70.6	0.87	253	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436I
F895	2.1E-08	68.7	0.76	573	L235K / S239K / M252Y / N286E / T307Q / Q311A / N315E / N434Y
F896	2.0E-08	68.7	0.65	569	L235R / S239K / M252Y / N286E / T307Q / Q311A / N315E / N434Y
F897	9.7E-08	64.6	0.87	262	M252Y / N315D / N384A / N389A / N434Y
F898	1.7E-07	64.1	0.92	283	M252Y / N315E / N384A / N389A / N434Y
F899	1.1E-07	58.4	0.72	243	M252Y / N315D / G316A / N434Y
F900	1.7E-07	52.3	2.50	243	M252Y / N315D / G316D / N434Y
F901	1.3E-07	55.6	0.67	243	M252Y / N315D / G316E / N434Y
F902	2.2E-07	57.2	0.90	266	M252Y / N315D / G316F / N434Y
F903	2.3E-07	58.6	0.84	243	M252Y / N315D / G316H / N434Y
F904	1.0E-07	48.6	3.34	266	M252Y / N315D / G316I / N434Y
F905	1.3E-07	54.7	0.70	243	M252Y / N315D / G316K / N434Y
F906	1.5E-07	54	0.59	266	M252Y / N315D / G316L / N434Y
F907	1.3E-07	55.8	0.62	266	M252Y / N315D / G316M / N434Y
F908	1.5E-07	58.1	0.87	243	M252Y / N315D / G316N / N434Y
F910	1.4E-07	55.8	0.68	243	M252Y / N315D / G316Q / N434Y
F911	1.3E-07	56.3	0.71	243	M252Y / N315D / G316R / N434Y
F912	1.2E-07	59.1	0.57	243	M252Y / N315D / G316S / N434Y
F913	1.1E-07	53.6	0.58	243	M252Y / N315D / G316T / N434Y
F914	1.5E-07	48.9	2.04	266	M252Y / N315D / G316V / N434Y
F915	2.3E-07	54.8	0.61	243	M252Y / N315D / G316W / N434Y
F917	2.5E-07	63.4	0.64	314	M252Y / N286S / N434Y
F918	2.8E-07	61.8	0.72	329	M252Y / D280E / N384A / N389A / N434Y
F919	3.3E-07	61.7	0.67	303	M252Y / D280G / N384A / N389A / N434Y
F920	2.5E-07	63.3	0.72	332	M252Y / N286S / N384A / N389A / N434Y

F921	1.2E-07	62.3	0.74	324	M252Y / N286E / N384A / N389A / N434Y
F922	5.9E-08	69	0.88	319	L235K / S239K / M252Y / N286E / N434Y / Y436I
F923	6.0E-08	68.9	0.87	316	L235R / S239K / M252Y / N286E / N434Y / Y436I
F924	3.4E-08	70.5	0.78	444	L235K / S239K / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Y436I
F925	3.2E-08	70.8	0.75	440	L235R / S239K / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Y436I
F926	1.1E-07	70.6	0.87	228	L235K / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436I
F927	1.0E-07	70.8	0.80	224	L235R / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436I
F928	2.9E-08	63.9	0.76	375	M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Y436I
F929	2.9E-08	64.2	0.87	346	M252Y / S254T / T307Q / Q311A / N434Y / Y436I
F930	1.4E-07	58.6	0.78	419	P238D / T250V / M252Y / N286E / N434Y
F931	1.2E-07	60.1	1.00	301	P238D / T250V / M252Y / N434Y / Y436I
F932	3.2E-07	69.7	0.60	278	T250V / M252Y / N434Y
F933	3.0E-07	63.2	0.67	323	L234R / P238D / T250V / M252Y / N434Y
F934	3.1E-07	63.2	0.70	361	G236K / P238D / T250V / M252Y / N434Y
F935	3.2E-07	64.2	0.61	354	G237K / P238D / T250V / M252Y / N434Y
F936	3.2E-07	64.2	0.73	382	G237R / P238D / T250V / M252Y / N434Y
F937	3.1E-07	66.2	0.65	320	P238D / S239K / T250V / M252Y / N434Y
F938	1.6E-07	69.9	0.85	269	L235K / S239K / M252Y / N434Y / Y436V

F939	1.5E-07	70	0.83	265	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V
F940	1.5E-07	59.9	1.04	313	P238D / T250V / M252Y / N434Y / Y436V
F941	1.2E-08	61.4	1.17	449	M252Y / N286E / T307Q / Q311A / N434Y / Y436V
F942	4.2E-08	70.3	0.98	455	L235K / S239K / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Y436V
F943	4.0E-08	70.4	0.77	452	L235R / S239K / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Y436V
F944	1.7E-07	69.2	1.06	235	T250V / M252Y / N434Y / Y436V
F945	1.7E-08	61	0.95	416	T250V / M252Y / V308P / N434Y / Y436V
F946	4.3E-08	69	1.25	421	T250V / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Y436V
F947	1.1E-08	60.5	1.18	376	T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V
F954	5.3E-07	62.5	3.12	217	M252Y / N434Y / H435K / Y436V
F957	7.7E-07	62.4	3.82	186	M252Y / N434Y / H435N / Y436V
F960	8.0E-07	62.3	1.36	191	M252Y / N434Y / H435R / Y436V
F966	3.1E-07	63.1	1.06	246	M252Y / S254A / N434Y
F970	2.5E-06	64.8	0.90	214	M252Y / S254G / N434Y
F971	2.6E-06	64.7	0.75	230	M252Y / S254H / N434Y
F972	2.6E-07	58.7	2.25	239	M252Y / S254I / N434Y
F978	1.3E-06	63.4	0.82	235	M252Y / S254Q / N434Y
F980	1.8E-07	59.7	0.81	261	M252Y / S254V / N434Y
F987	4.0E-08	59.5	0.87	500	P238D / T250V / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Y436V
F988	6.9E-08	56.8	1.08	375	P238D / T250V / M252Y / N286E / N434Y / Y436V
F989	1.4E-08	61.6	0.82	446	L235R / S239K / M252Y / V308P / N434Y / Y436V
F990	9.4E-09	61	0.88	406	L235R / S239K / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V

F991	1.3E-08	68.4	1.24	514	L235R / S239K / M252Y / N286E / T307Q / Q311A / N434Y / Y436V
F992	5.1E-08	66.7	1.34	495	L235R / S239K / M252Y / T307Q / Q311A / M428I / N434Y / Y436V
F993	3.8E-08	63.4	0.93	387	M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Y436V
F994	2.8E-07	67	0.67	333	M252Y / N325G / N434Y
F995	2.9E-07	59.9	0.71	279	L235R / P238D / S239K / M252Y / N434Y
F996	1.3E-07	58.6	1.04	235	L235R / P238D / S239K / M252Y / N434Y / Y436V
F997	3.8E-07	69.1	2.40	300	K248I / T250V / M252Y / N434Y / Y436V
F998	8.5E-07	66.2	2.51	262	K248Y / T250V / M252Y / N434Y / Y436V
F999	2.1E-07	67.4	1.13	273	T250V / M252Y / E258H / N434Y / Y436V
F1008	1.7E-07	74.5	1.18	300	L235R / S239K / T250V / M252Y / N434Y / Y436V
F1009	1.2E-08	66.6	0.37	441	L235R / S239K / T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V
F1010	1.9E-07	70.6	0.29	513	L235R / S239K / M252Y / T307A / Q311H / N434Y
F1011	4.5E-08	62.2	0.43	459	T250V / M252Y / V308P / N434Y
F1012	4.7E-08	67.9	0.31	524	L235R / S239K / T250V / M252Y / V308P / N434Y
F1013	3.0E-08	61.8	0.44	419	T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y
F1014	3.2E-08	67.2	0.40	485	L235R / S239K / T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y
F1015	2.2E-08	63	0.34	450	L235R / S239K / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y
F1016	3.8E-09	58.5	0.61	438	T250V / M252Y / N286E / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V

F1017	4.2E-09	65.1	0.56	504	L235R / S239K / T250V / M252Y / N286E / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V
F1018	3.2E-09	60	0.52	469	L235R / S239K / M252Y / N286E / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V
F1019	3.4E-07	62.4	0.45	446	P238D / T250V / M252Y / N325G / N434Y
F1020	8.5E-08	63	0.54	633	P238D / T250V / M252Y / T307Q / Q311A / N325G / N434Y
F1021	3.3E-07	61.9	0.47	510	P238D / T250V / M252Y / N325A / N434Y
F1026	8.4E-08	63.3	0.47	404	M252Y / T307A / Q311H / N434Y / Y436V
F1027	8.6E-08	70.1	0.39	469	L235R / S239K / M252Y / T307A / Q311H / N434Y / Y436V
F1032	4.3E-08	61.7	0.67	589	P238D / T250V / M252Y / T307Q / Q311A / N325G / N434Y / Y436V
F1033	1.0E-06	58.1	1.89	169	P238D / N434W
F1034	1.5E-08	61.1	0.83	450	L235K / S239K / M252Y / V308P / N434Y / Y436V
F1035	1.0E-08	60.1	1.69	410	L235K / S239K / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V
F1036	1.4E-08	68.9	0.87	518	L235K / S239K / M252Y / N286E / T307Q / Q311A / N434Y / Y436V
F1037	6.1E-08	67.7	1.44	498	L235K / S239K / M252Y / T307Q / Q311A / M428I / N434Y / Y436V
F1038	2.8E-07	60.3	0.78	264	L235K / P238D / S239K / M252Y / N434Y
F1039	1.3E-07	58.9	0.81	220	L235K / P238D / S239K / M252Y / N434Y / Y436V
F1040	2.0E-07	74.4	1.08	304	L235K / S239K / T250V / M252Y / N434Y / Y436V

F1041	1.4E-08	63.5	0.84	445	L235K / S239K / T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V
F1042	2.0E-07	70.3	0.82	516	L235K / S239K / M252Y / T307A / Q311H / N434Y
F1043	5.2E-08	64.8	0.64	528	L235K / S239K / T250V / M252Y / V308P / N434Y
F1044	3.5E-08	64	0.53	488	L235K / S239K / T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y
F1045	2.5E-08	62.8	0.59	453	L235K / S239K / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y
F1046	4.5E-09	64.5	0.96	507	L235K / S239K / T250V / M252Y / N286E / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V
F1047	3.4E-09	60	0.96	472	L235K / S239K / M252Y / N286E / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V
F1048	9.9E-08	69.9	1.16	473	L235K / S239K / M252Y / T307A / Q311H / N434Y / Y436V
F1050	3.5E-09	58.2	0.90	481	T250V / M252Y / N286E / T307Q / V308P / Q311A / M428I / N434Y / Y436V
F1051	3.9E-09	65	0.72	547	L235R / S239K / T250V / M252Y / N286E / T307Q / V308P / Q311A / M428I / N434Y / Y436V
F1052	3.2E-09	59.6	1.08	512	L235R / S239K / M252Y / N286E / T307Q / V308P / Q311A / M428I / N434Y / Y436V
F1058	1.3E-07	63.7	0.74	214	M252Y / Q386E / N434Y / Y436V
F1059	1.4E-07	63.1	0.63	214	M252Y / Q386R / N434Y / Y436V
F1060	1.4E-07	63.3	0.62	214	M252Y / Q386S / N434Y / Y436V
F1061	1.2E-07	64.7	0.60	200	M252Y / P387E / N434Y / Y436V
F1062	1.2E-07	61	0.58	208	M252Y / P387R / N434Y / Y436V
F1063	1.4E-07	63	0.58	214	M252Y / P387S / N434Y / Y436V
F1064	1.3E-07	63	0.73	200	M252Y / V422E / N434Y / Y436V

F1065	1.4E-07	62.9	0.54	242	M252Y / V422R / N434Y / Y436V
F1066	1.4E-07	62.9	0.75	223	M252Y / V422S / N434Y / Y436V
F1067	1.3E-07	63.5	0.73	241	M252Y / S424E / N434Y / Y436V
F1068	1.7E-07	62.7	0.47	250	M252Y / S424R / N434Y / Y436V
F1069	1.4E-07	62.9	0.87	186	M252Y / N434Y / Y436V / Q438E
F1070	1.7E-07	62.9	0.62	209	M252Y / N434Y / Y436V / Q438R
F1071	1.2E-07	63.1	0.57	235	M252Y / N434Y / Y436V / Q438S
F1072	1.3E-07	63.3	0.75	133	M252Y / N434Y / Y436V / S440E
F1073	1.3E-07	63	0.56	166	M252Y / N434Y / Y436V / S440R
F1074	1.3E-07	57.7	0.67	200	S239D / M252Y / N434Y / Y436V
F1075	1.4E-07	58.8	0.74	237	M252Y / K326D / L328Y / N434Y / Y436V
F1076	1.3E-07	52.8	0.55	237	S239D / M252Y / K326D / L328Y / N434Y / Y436V
F1077	2.0E-06	58	2.77	271	K248N / M252Y / N434Y
F1078	4.7E-07	57.3	1.26	324	M252Y / E380N / E382S / N434Y
F1079	3.4E-07	62.2	0.75	270	M252Y / E382N / N384S / N434Y
F1080	3.2E-07	64	0.66	286	M252Y / S424N / N434Y
F1081	6.2E-07	63.6	0.93	169	M252Y / N434Y / Y436N / Q438T
F1082	2.8E-07	64.5	8.15	261	M252Y / N434Y / Q438N
F1083	3.5E-07	64	0.81	188	M252Y / N434Y / S440N
F1094	2.6E-07	63.8	0.61	230	M252Y / N434Y / S442N
F1095	2.9E-07	64.3	0.64	265	M252Y / S383N / G385S / N434Y
F1096	2.7E-07	64.3	0.66	257	M252Y / Q386T / N434Y
F1097	2.8E-07	64.2	0.69	279	M252Y / G385N / P387S / N434Y
F1098	2.6E-07	58.9	0.63	243	S239D / M252Y / N434Y
F1099	2.6E-07	60	0.48	280	M252Y / K326D / L328Y / N434Y
F1100	2.4E-07	54.5	0.61	280	S239D / M252Y / K326D / L328Y / N434Y
F1101	6.6E-08	59.4	0.47	430	S239D / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y
F1102	6.5E-08	60.2	0.58	467	M252Y / T307Q / Q311A / K326D / L328Y / N434Y

F1103	6.1E-08	54.8	0.83	467	S239D / M252Y / T307Q / Q311A / K326D / L328Y / N434Y
F1104	1.8E-07	62.9	0.61	242	M252Y / V422E / S424R / N434Y / Y436V
F1105	1.5E-07	62.6	0.59	258	M252Y / V422S / S424R / N434Y / Y436V
F1106	1.4E-07	63.1	0.60	158	M252Y / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1107	1.2E-07	63.2	0.75	208	M252Y / V422D / N434Y / Y436V
F1108	1.3E-07	63.2	0.59	234	M252Y / V422K / N434Y / Y436V
F1109	1.3E-07	63.4	0.58	200	M252Y / V422T / N434Y / Y436V
F1110	1.3E-07	63.4	0.61	208	M252Y / V422Q / N434Y / Y436V
F1111	1.6E-07	63.1	0.65	242	M252Y / S424K / N434Y / Y436V
F1112	1.2E-07	63.1	0.57	209	M252Y / N434Y / Y436V / Q438K
F1113	1.2E-07	63.6	0.68	133	M252Y / N434Y / Y436V / S440D
F1114	1.3E-07	63.5	0.57	145	M252Y / N434Y / Y436V / S440Q
F1115	1.3E-07	64	0.75	243	M252Y / S424N / N434Y / Y436V
F1116	7.4E-08	64.4	0.58	473	M252Y / T307Q / Q311A / S424N / N434Y
F1117	4.9E-08	69.3	0.71	465	T250V / M252Y / T307Q / Q311A / S424N / N434Y / Y436V
F1118	1.3E-08	61	0.72	419	T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / S424N / N434Y / Y436V
F1119	1.0E-08	60.5	0.72	376	T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / V422E / N434Y / Y436V
F1120	1.0E-08	59.7	0.61	426	T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / S424R / N434Y / Y436V
F1121	1.0E-08	59.9	0.54	418	T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / V422E / S424R / N434Y / Y436V
F1122	1.4E-08	59.6	0.41	385	T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V / Q438R
F1123	9.5E-09	60.8	0.61	309	T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V / S440E

F1124	1.2E-08	59.9	0.61	334	T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1125	5.2E-08	64.3	0.59	346	M252Y / T307Q / N434Y / Y436V
F1126	9.0E-08	64.3	0.58	412	M252Y / T307A / N434Y / Y436V
F1127	7.9E-08	62.8	0.53	338	M252Y / Q311A / N434Y / Y436V
F1128	1.2E-07	62.3	0.41	274	M252Y / Q311H / N434Y / Y436V
F1129	4.5E-08	63.2	0.51	315	M252Y / T307Q / Q311H / N434Y / Y436V
F1130	5.5E-08	63.7	0.54	453	M252Y / T307A / Q311A / N434Y / Y436V
F1131	1.3E-07	69.5	0.81	265	L235R / S239K / M252Y / V422E / N434Y / Y436V
F1132	1.4E-07	69.1	0.87	288	L235R / S239K / M252Y / V422S / N434Y / Y436V
F1133	1.6E-07	69.5	0.71	316	L235R / S239K / M252Y / S424R / N434Y / Y436V
F1134	1.7E-07	70.4	0.58	274	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V / Q438R
F1135	1.3E-07	69.8	0.72	198	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V / S440E
F1136	1.6E-07	68.5	0.74	308	L235R / S239K / M252Y / V422E / S424R / N434Y / Y436V
F1137	1.6E-07	69.4	0.82	323	L235R / S239K / M252Y / V422S / S424R / N434Y / Y436V
F1138	1.7E-07	70.5	0.67	223	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1139	1.5E-07	71.2	0.58	308	L235R / S239K / M252Y / S424N / N434Y / Y436V
F1140	1.6E-07	62.6	0.89	201	M252Y / V422E / S424R / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1141	1.8E-07	62.7	0.94	216	M252Y / V422S / S424R / N434Y / Y436V / Q438R / S440E

F1142	1.9E-07	70	0.80	266	L235R / S239K / M252Y / V422E / S424R / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1143	2.0E-07	70.2	0.90	281	L235R / S239K / M252Y / V422S / S424R / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1144	1.4E-08	66.7	0.81	400	L235R / S239K / T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1145	5.2E-08	68.9	0.89	380	T250V / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1146	6.2E-08	75.6	0.85	445	L235R / S239K / T250V / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1147	7.2E-08	64.1	0.68	367	M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Q438R / S440E
F1148	7.6E-08	70.9	0.69	432	L235R / S239K / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Q438R / S440E
F1151	2.5E-07	71.3	0.52	352	L235R / S239K / M252Y / S424N / N434Y
F1152	7.4E-08	71.3	0.56	538	L235R / S239K / M252Y / T307Q / Q311A / S424N / N434Y
F1153	4.8E-08	76.7	0.90	530	L235R / S239K / T250V / M252Y / T307Q / Q311A / S424N / N434Y / Y436V
F1154	1.3E-08	67.6	0.68	484	L235R / S239K / T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / S424N / N434Y / Y436V
F1157	2.1E-07	64.2	0.13	180	M252Y / N434Y / Q438R / S440E
F1158	2.4E-07	70.9	0.67	245	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Q438R / S440E
F1159	4.8E-07	67.9	0.54	134	S424N / N434W
F1160	2.9E-07	54	2.75	370	V308F / S424N / N434Y
F1161	1.1E-06	67.3	0.77	157	I332V / S424N / N434Y

F1162	3.4E-07	58.1	0.93	313	P238D / T250Y / M252Y / N434Y / Y436V
F1163	1.5E-07	60.2	0.84	543	P238D / T250Y / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y
F1164	7.0E-08	58.2	0.91	500	P238D / T250Y / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Y436V
F1165	1.6E-08	46.6	1.26	454	P238D / T250Y / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V
F1174	4.9E-07	60.3	1.38	145	P257I / N434H
F1176	2.0E-06	57	1.10	215	V308F
F1178	8.7E-07	60.1	1.09	353	V259I / V308F / M428L
F1183	1.3E-06	63.9	0.61	203	E380A / M428L / N434S
F1184	1.0E-06	70.1	0.40	329	T307A / M428L / N434S
F1185	9.2E-07	64.6	0.55	415	T307A / E380A / M428L / N434S
F1188	1.7E-06	64.3	0.56	322	T307A / E380A / N434H
F1189	1.6E-07	63	0.52	161	M252Y / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1190	2.4E-07	63.7	0.58	161	M252Y / H433E / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1191	2.1E-07	63	0.70	147	M252Y / N434Y / Y436V / T437A / Q438R / S440E
F1192	1.3E-07	62.3	0.82	133	M252Y / N434Y / Y436V / T437G / Q438R / S440E
F1194	1.6E-07	60.3	0.84	168	M252Y / N434Y / Y436V / Q438R / K439D / S440E
F1195	1.8E-07	60.5	2.91	156	M252Y / N434Y / Y436V / Q438R / S440E / L441A
F1196	1.5E-07	60.4	0.90	161	M252Y / N434Y / Y436V / Q438R / S440E / L441E
F1197	9.5E-08	63.2	0.48	129	M252Y / S254T / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1198	7.8E-08	60.8	0.68	67	M252Y / T256E / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1199	6.2E-08	61.2	0.74	67	M252Y / S254T / T256E / N434Y / Y436V / Q438R / S440E

F1200	1.3E-07	68.8	0.68	164	T250V / M252Y / S254T / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1201	1.1E-07	66.3	0.97	101	T250V / M252Y / T256E / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1202	8.8E-08	66	0.77	101	T250V / M252Y / S254T / T256E / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1203	1.5E-07	62.4	0.60	90	M252Y / T256Q / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1204	1.2E-07	62.6	0.35	64	M252Y / S254T / T256Q / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1205	2.0E-07	68.4	0.87	125	T250V / M252Y / T256Q / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1206	1.7E-07	68.5	0.71	99	T250V / M252Y / S254T / T256Q / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1207	1.1E-06	59.6	0.70	116	I332E / M428L / N434S
F1208	5.7E-07	57.5	2.22	114	L251A / M252Y / N434Y / Y436V
F1211	1.2E-06	55.8	3.02	89	L251H / M252Y / N434Y / Y436V
F1216	1.2E-06	55.8	3.33	91	L251S / M252Y / N434Y / Y436V
F1217	1.1E-06	55.5	2.65	116	L251T / M252Y / N434Y / Y436V
F1218	2.5E-07	57.3	1.11	200	L251V / M252Y / N434Y / Y436V
F1229	2.8E-06	62.9	0.76	204	M252Y / I253V / N434Y / Y436V
F1230	1.1E-07	63.1	0.68	145	M252Y / N434Y / Y436V / Q438R / S440D
F1231	9.7E-08	63	0.87	145	M252Y / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1232	9.8E-08	63.2	0.86	145	M252Y / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1243	1.3E-07	70.6	0.73	194	L235R / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1244	1.0E-07	69.2	0.85	132	L235R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1245	8.2E-08	69.3	0.97	132	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / N434Y / Y436V / Q438R / S440E

F1246	1.7E-07	75.1	0.74	229	L235R / S239K / T250V / M252Y / S254T / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1247	1.5E-07	72.9	1.20	167	L235R / S239K / T250V / M252Y / T256E / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1248	1.2E-07	73	0.94	167	L235R / S239K / T250V / M252Y / S254T / T256E / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1249	2.1E-07	70.5	0.78	155	L235R / S239K / M252Y / T256Q / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1250	1.7E-07	70.7	0.72	129	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256Q / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1251	2.8E-07	74.6	1.13	190	L235R / S239K / T250V / M252Y / T256Q / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1252	2.3E-07	75	0.90	164	L235R / S239K / T250V / M252Y / S254T / T256Q / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1253	1.1E-07	70.9	0.87	436	L235R / S239K / M252Y / T307A / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1254	6.4E-08	71.6	0.67	369	L235R / S239K / M252Y / T307Q / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1255	1.1E-07	69.9	0.74	362	L235R / S239K / M252Y / Q311A / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1256	1.6E-07	69.6	0.74	298	L235R / S239K / M252Y / Q311H / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1257	7.8E-08	70.5	0.83	477	L235R / S239K / M252Y / T307A / Q311A / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1258	1.1E-07	70.1	0.60	428	L235R / S239K / M252Y / T307A / Q311H / N434Y / Y436V / Q438R / S440E

F1259	4.5E-08	71	0.79	410	L235R / S239K / M252Y / T307Q / Q311A / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1260	6.5E-08	70.7	0.49	338	L235R / S239K / M252Y / T307Q / Q311H / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1261	1.4E-07	70.3	0.69	210	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V / Q438R / S440D
F1262	1.3E-07	70.1	0.70	210	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1263	1.2E-07	70.3	0.67	210	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1264	1.3E-07	68.6	0.67	206	L235R / S239K / M252Y / T256A / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1265	1.6E-07	65.8	0.72	182	L235R / S239K / M252Y / T256G / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1266	1.0E-07	69.7	0.70	210	L235R / S239K / M252Y / T256N / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1267	1.5E-07	69	0.73	226	L235R / S239K / M252Y / S254A / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1268	2.0E-07	70.3	0.70	226	L235R / S239K / M252Y / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1269	1.7E-07	70.5	0.80	212	L235R / S239K / M252Y / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1270	1.2E-07	69	0.66	212	L235R / S239K / M252Y / S254A / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1271	2.0E-07	69	0.69	228	L235R / S239K / M252Y / S254A / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1272	1.7E-07	69.2	0.86	215	L235R / S239K / M252Y / S254A / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1273	1.5E-07	70.4	0.79	142	L235R / S239K / M252Y / T256Q / N434Y / Y436V / Q438K / S440D

F1274	2.5E-07	70.4	0.70	158	L235R / S239K / M252Y / T256Q / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1275	2.1E-07	70.7	0.78	144	L235R / S239K / M252Y / T256Q / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1276	1.0E-07	68.7	0.77	192	L235R / S239K / M252Y / T256A / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1277	1.7E-07	68.8	0.69	208	L235R / S239K / M252Y / T256A / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1278	1.4E-07	68.9	0.97	195	L235R / S239K / M252Y / T256A / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1279	1.2E-07	66.2	0.79	169	L235R / S239K / M252Y / T256G / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1280	2.1E-07	66.1	1.03	185	L235R / S239K / M252Y / T256G / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1281	1.7E-07	66.4	0.99	171	L235R / S239K / M252Y / T256G / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1282	7.7E-08	69.8	0.77	196	L235R / S239K / M252Y / T256N / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1283	1.3E-07	69.8	0.81	212	L235R / S239K / M252Y / T256N / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1284	1.1E-07	70	1.02	198	L235R / S239K / M252Y / T256N / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1285	9.4E-08	70.4	0.72	181	L235R / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1286	1.6E-07	70.4	0.86	197	L235R / S239K / M252Y / S254T / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E

F1287	1.5E-07	71.2	0.63	183	L235R / S239K / M252Y / S254T / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1288	7.9E-08	68.8	0.92	118	L235R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1289	1.3E-07	68.8	0.76	134	L235R / S239K / M252Y / T256E / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1290	1.1E-07	69.2	0.91	121	L235R / S239K / M252Y / T256E / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1291	1.5E-07	70.4	0.62	275	L235R / S239K / M252Y / H433D / N434Y / Y436V
F1292	4.2E-07	71.1	0.66	95	L235R / S239K / H433D / N434W / Y436V / Q438R / S440E
F1293	1.6E-07	68.6	0.73	153	L235R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Q438R / S440E
F1294	2.0E-07	68.9	0.90	106	L235R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Y436T / Q438R / S440E
F1295	9.8E-08	68.7	0.81	128	L235R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Y436F / Q438R / S440E
F1296	2.3E-07	68.8	0.76	152	L235R / S239K / M252Y / T256E / H433D / N434Y / Q438R / S440E
F1297	2.5E-07	69.1	0.81	107	L235R / S239K / M252Y / T256E / H433D / N434Y / Y436T / Q438R / S440E
F1298	1.5E-07	69.1	0.82	106	L235R / S239K / M252Y / T256E / H433D / N434Y / Y436F / Q438R / S440E
F1299	1.5E-07	68.7	0.72	140	L235R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Q438K / S440D
F1300	1.6E-07	69	0.86	118	L235R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Y436T / Q438K / S440D
F1301	8.3E-08	69	0.85	140	L235R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Y436F / Q438K / S440D

F1302	2.2E-07	69.2	0.75	138	L235R / S239K / M252Y / T256E / H433D / N434Y / Q438K / S440D
F1303	2.1E-07	69.1	0.81	119	L235R / S239K / M252Y / T256E / H433D / N434Y / Y436T / Q438K / S440D
F1304	1.2E-07	69.4	0.75	118	L235R / S239K / M252Y / T256E / H433D / N434Y / Y436F / Q438K / S440D
F1305	2.0E-07	70.8	0.77	212	L235R / S239K / M252Y / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440D
F1306	1.9E-07	70.5	0.70	238	L235R / S239K / M252Y / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1307	1.4E-07	69.5	0.68	337	L235R / S239K / M252Y / V422A / S424A / N434Y / Y436V
F1308	2.1E-07	68.5	0.56	345	L235R / S239K / M252Y / V422L / S424L / N434Y / Y436V
F1309	1.3E-07	70.2	0.83	284	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V / Q438A / S440A
F1310	2.3E-07	68.2	1.27	325	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V / Q438L / S440L
F1311	1.7E-07	70.6	0.59	347	L235R / S239K / M252Y / V422A / S424A / H433D / N434Y / Y436V
F1312	1.8E-07	70.4	0.55	355	L235R / S239K / M252Y / V422L / S424L / H433D / N434Y / Y436V
F1313	1.8E-07	70.5	0.75	300	L235R / S239K / M252Y / H433D / N434Y / Y436V / Q438A / S440A
F1314	2.3E-07	69.4	1.15	302	L235R / S239K / M252Y / H433D / N434Y / Y436V / Q438L / S440L
F1315	1.5E-07	67.5	0.67	258	G237K / S239K / M252Y / N434Y / Y436V
F1316	1.5E-07	67.7	0.70	260	G237R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V
F1317	1.4E-07	65.8	0.59	340	S239K / M252Y / P329K / N434Y / Y436V

F1318	1.4E-07	66.2	0.57	317	S239K / M252Y / P329R / N434Y / Y436V
F1319	2.7E-07	60.2	0.54	310	M252Y / L328Y / N434Y
F1320	1.2E-07	70.5	0.71	181	L235R / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436V / Q438R / S440D
F1321	1.0E-07	70.4	0.73	181	L235R / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1322	1.6E-07	70.7	0.77	183	L235R / S239K / M252Y / S254T / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440D
F1323	1.5E-07	70.8	0.88	209	L235R / S239K / M252Y / S254T / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1324	1.3E-07	63.8	0.52	223	L234A / L235A / M252Y / N434Y / Y436V
F1325	2.1E-07	55.1	1.87	249	L234A / L235A / M252Y / N297A / N434Y / Y436V
F1326	1.1E-08	60.4	0.62	399	L234A / L235A / T250V / M252Y / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V
F1327	1.4E-08	48.2	0.91	425	L234A / L235A / T250V / M252Y / N297A / T307Q / V308P / Q311A / N434Y / Y436V
F1328	1.5E-07	71.2	0.68	258	L235R / G236R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1329	1.3E-07	71.2	0.74	229	L235R / G236R / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1330	1.0E-07	69.8	0.80	167	L235R / G236R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1331	7.7E-08	70	0.90	167	L235R / G236R / S239K / M252Y / S254T / T256E / N434Y / Y436V / Q438R / S440E

F1333	1.2E-07	70.4	0.60	300	L235R / G236R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V
F1334	1.0E-07	71.1	0.59	245	L235R / G236R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1335	8.8E-08	71.3	0.54	216	L235R / G236R / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1336	7.2E-08	69.8	0.84	153	L235R / G236R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Y436V / Q438K / S440D
F1337	7.4E-08	68.9	0.69	118	L235R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1338	1.0E-07	69.2	0.84	146	L235R / S239K / M252Y / T256E / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1339	2.5E-07	69.5	0.59	144	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / H433D / N434Y / Y436T / Q438K / S440E
F1340	5.6E-08	69.1	0.76	118	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1341	3.2E-07	70.7	0.44	181	L235R / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436T / Q438K / S440E
F1342	2.5E-07	69.2	0.68	118	L235R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Y436T / Q438K / S440E
F1343	2.0E-07	69.1	0.56	118	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / N434Y / Y436T / Q438K / S440E
F1344	4.0E-07	70.5	0.53	210	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436T / Q438K / S440E
F1345	1.0E-07	71.2	0.77	245	L235R / G236R / S239K / M252Y / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1346	8.6E-08	71.3	0.70	216	L235R / G236R / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436V / Q438K / S440E

F1347	7.1E-08	69.9	0.95	153	L235R / G236R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1348	5.5E-08	70.1	0.72	153	L235R / G236R / S239K / M252Y / S254T / T256E / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1349	3.4E-07	70.2	0.67	198	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436T / Q438R / S440E
F1350	1.2E-07	70.6	0.70	232	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436F / Q438K / S440E
F1351	1.6E-07	70.4	0.68	220	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436F / Q438R / S440E
F1352	3.9E-07	70.5	0.75	236	L235R / S239K / M252Y / H433D / N434Y / Y436T / Q438K / S440E
F1353	4.3E-07	70.4	0.73	199	L235R / S239K / M252Y / H433D / N434Y / Y436T / Q438R / S440E
F1354	2.3E-07	70.7	0.66	210	L235R / S239K / M252Y / H433D / N434Y / Y436F / Q438K / S440E
F1355	2.5E-07	70.8	0.64	198	L235R / S239K / M252Y / H433D / N434Y / Y436F / Q438R / S440E
F1356	1.6E-07	58.9	0.62	412	G236R / M252Y / L328R / N434Y / Y436V
F1357	2.8E-07	70.5	0.61	169	L235R / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436T / Q438R / S440E
F1358	9.1E-08	71	0.64	203	L235R / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436F / Q438K / S440E
F1359	1.3E-07	71.1	0.67	191	L235R / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436F / Q438R / S440E
F1360	3.1E-07	70.6	0.57	207	L235R / S239K / M252Y / S254T / H433D / N434Y / Y436T / Q438K / S440E
F1361	3.5E-07	70.5	0.63	170	L235R / S239K / M252Y / S254T / H433D / N434Y / Y436T / Q438R / S440E

F1362	1.4E-07	71	0.67	181	L235R / S239K / M252Y / S254T / H433D / N434Y / Y436F / Q438K / S440E
F1363	1.9E-07	71	0.48	169	L235R / S239K / M252Y / S254T / H433D / N434Y / Y436F / Q438R / S440E
F1364	7.5E-08	69	0.84	140	L235R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Y436F / Q438K / S440E
F1365	3.1E-07	69.1	0.78	144	L235R / S239K / M252Y / T256E / H433D / N434Y / Y436T / Q438K / S440E
F1366	1.2E-07	69.3	0.71	118	L235R / S239K / M252Y / T256E / H433D / N434Y / Y436F / Q438K / S440E
F1367	1.8E-07	69.2	0.68	106	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / N434Y / Y436T / Q438R / S440E
F1368	5.5E-08	69	0.89	140	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / N434Y / Y436F / Q438K / S440E
F1369	7.6E-08	69.2	0.84	128	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / N434Y / Y436F / Q438R / S440E
F1370	9.1E-08	69.5	0.77	146	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1371	1.1E-07	69.1	0.51	134	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1372	2.3E-07	69.4	0.70	107	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / H433D / N434Y / Y436T / Q438R / S440E
F1373	8.7E-08	69.5	0.77	118	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / H433D / N434Y / Y436F / Q438K / S440E

F1374	1.2E-07	69.3	0.54	106	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / H433D / N434Y / Y436F / Q438R / S440E
F1375	1.0E-07	69.9	0.47	236	L235R / S239K / M252Y / S254T / N434Y / Y436V
F1376	9.1E-08	68.7	0.70	173	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / N434Y / Y436V
F1377	8.3E-08	68.4	0.73	173	L235R / S239K / M252Y / T256E / N434Y / Y436V
F1378	3.6E-07	70.6	0.65	236	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436T
F1379	2.8E-07	71.1	0.68	275	L235R / S239K / M252Y / N434Y / Y436F
F1410	1.9E-06	61.1	0.59	183	V308P / I332V
F1411	1.7E-07	60.2	0.55	299	V308P / I332V / M428L / N434S
F1413	3.7E-08	68.3	2.19	332	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / T307Q / Q311A / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1414	5.6E-08	69.7	0.76	292	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / T307Q / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1415	5.9E-08	68.4	2.01	284	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / Q311A / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1416	1.3E-08	60.1	1.20	327	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / V308P / H433D / N434Y / Y436V / Q438K / S440E
F1417	5.9E-08	68.6	1.72	121	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / H433D / N434W / Y436V / Q438K / S440E
F1418	7.5E-08	68.4	1.25	134	L235R / S239K / M252Y / S254T / T256E / H433D / N434W / Y436V / Q438R / S440E
F1419	1.5E-07	69.5	0.71	226	L235R / S239K / M252Y / H433D / N434W / Y436V / Q438R / S440E

F1420	1.3E-07	69.5	0.70	212	L235R / S239K / M252Y / H433D / N434W / Y436V / Q438K / S440E
F1421	3.2E-08	58.9	2.59	348	V308P / M428L / N434W
F1422	1.9E-08	59.8	1.27	315	L235R / S239K / M252Y / T256E / V308P / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1423	1.6E-08	45.4	4.03	157	L235R / S239K / M252Y / T256E / V302D / V308P / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1424	1.6E-08	49	0.90	159	L235R / S239K / M252Y / T256E / V302E / V308P / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1425	1.9E-08	49.4	2.04	185	L235R / S239K / M252Y / T256E / V303D / V308P / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1426	1.8E-08	59.7	1.53	212	L235R / S239K / M252Y / T256E / V303E / V308P / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1428	1.5E-08	45	8.91	243	L235R / S239K / M252Y / T256E / S304E / V308P / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1430	3.1E-08	48.6	1.97	156	L235R / S239K / M252Y / T256E / V305E / V308P / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1433	4.5E-08	46.2	9.04	181	L235R / S239K / M252Y / T256E / T307D / V308P / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E
F1434	3.6E-08	49.5	2.54	206	L235R / S239K / M252Y / T256E / T307E / V308P / H433D / N434Y / Y436V / Q438R / S440E

【0301】變異體(IgG1-F600 至 IgG-F1434)各包含如上述方法所製備之重鏈與 L(WT)-CK(序列編號：2)係藉由專利 WO2011/122011 之參考例 2 所揭示知此項技術領域者所習知之方法予以表現與純化。

【0302】使用 Biacore 之 Fc 變異體的 FcRn 結合親和性的

## 評估

製備於實施例 1(F600 至 F1434)的新 Fc 變異體與製備於專利 WO2011/122011(F1 至 F599)的實施例 1 的先前技術 Fc 變異體的 hFcRn 結合親和性係使用 Biacore T100(GE Healthcare)評估。為此目的，以揭示於參考例 A2 之方法製備人類 FcRn。藉由胺基偶合方法將合適量之蛋白質 L(ACTIGEN)固定至感應器晶片 CM4(GE Healthcare)，且使該晶片捕捉有興趣的抗體。然後，注射經稀釋之 FcRn 溶液與泳動緩衝液(作為參考溶液)以使人類 FcRn 與經捕捉於感應器晶片的抗體交互作用。所使用之泳動緩衝液包含 50 毫莫耳/升之磷酸鈉、150 毫莫耳/升之 NaCl 與 0.05%(w/v)之 Tween 20(pH 7.0)。FcRn 各使用緩衝液稀釋。該晶片使用 10 毫莫耳/升之甘胺酸-HCl(pH 1.5)再生。分析於 25°C 排他性地進行。結合率常數  $k_a$ (1/Ms)與解離率常數  $k_d$ (1/s)，二者皆為動力學參數，係根據分析所得之感應圖譜而計算，以及各抗體對於人類 FcRn 的  $K_D$ (M)係由該等值計算。各參射係使用 Biacore T100 Evaluation Software(GE Healthcare)計算。所有 Fc 變異體的結合親和性係顯示於表 16。

**【0303】** 使用差示掃描螢光光譜儀(DSF)之 Fc 變異體安定性的評估

製備於實施例 1(F600 至 F1434)的新 Fc 變異體與製備於專利 WO2011/122011(F1 至 F599)的實施例 1 的先前技術 Fc 變異體的安定性係使用差示掃描螢光光譜儀(DSF)評估。此方法係由於逐漸增加的溫度測量極性敏感探針的螢光強度，以及

獲得蛋白質之疏水性區域之暴露的瞬時溫度所組成。已有報導使用 DSF 獲得之瞬時溫度係與使用差示掃描熱量儀所獲得的熔解溫度有相關(Journal of Pharmaceutical Science 2010 ; 4 : 1707-1720)。將 SYPRO 橘色染料(Molecular Probes)稀釋於 PBS(Sigma)，且添加至蛋白質溶液。各樣品係與 20 毫升之染料溶液使用。螢光發射係以固定激發於 470nm 而於 555nm 收集。於 DSF 試驗期間，溫度由 30 增加至 99°C，且於測量前於各溫度以 6 秒平衡時間以 4°C 增加。數據使用 Rotor-Gene Q Series Software(QIAGEN)分析。螢光傳遞的溫度係定義為熔解溫度(T<sub>m</sub>)。Fc 變異體 F1 至 F1434 的 T<sub>m</sub> 值係顯示於表 16。

**【0304】** 使用尺寸排除層析(SEC)之 Fc 變異體的純度評估製備於實施例 1(F600 至 F1434)的新 Fc 變異體與製備於專利 WO2011/122011(F1 至 F599)的實施例 1 的先前技術 Fc 變異體的高分子量物種百分比(HMW(%)) 係使用尺寸排除層析(SEC)評估。SEC 係於 ACQUITY UPLC H-Class 系統(Waters)進行。將抗體注射至 BEH200 SEC 管柱(1.7 微米，4.6 x 150 mm，Waters)。移動相為 0.05M 磷酸鈉、0.3M 氯化鈉(pH7.0，Isekyu)，運行係不隨時間改變的以流速為 0.3 毫升/分鐘。經溶洗之蛋白質係於 215nm 以 UV 吸收偵測。使用 Empower2(waters)分析數據。溶洗早於抗體單體峰之峰係記錄為 HMW 成分百分比。所有 Fc 變異體(F1-F1434)的 HMW(%) 係顯示於表 16。

**【0305】** 使用 silico 免疫原性預測工具 Epibase 評估 Fc 變異體之免疫原性

治療性抗體之臨床利用與藥效可因抗-藥物抗體(ADA)的產生而受到限制，此乃因 ADA 可影響其藥效與藥物動力學，有時導致嚴重的副作用。雖然許多因子影響治療性抗體的免疫原性，已有多個報導敘述起效子 T-細胞抗原決定基存在於治療性蛋白質的重要性。

【0306】於 silico 工具預測 T-細胞抗原決定基中，已開發如 Epibase(Lonza)、iTope/TCED(Antitope)與 EpiMatrix(EpiVax)。藉由於 silico 工具中使用該等，可預測 T-細胞抗原決定基於各胺基酸序列之存在(Expert Opin Biol Ther. 2007 Mar; 7(3): 405-18.)，允許 Fc 變異體之潛在免疫原性的評估。Epibase Light(Lonza)係使用於評估 Fc 變異體之潛在免疫原性。

【0307】Epibase Light(Lonza)係於 silico 工具中使用 FATER 演算法計算 9-聚體肽對主要 DRB1 等位基因之結合親和性(Expert Opin Biol Ther. 2007 Mar; 7(3): 405-18.)。Epibase Light(Lonza)鑑定具有強結合之 T-細胞抗原決定基以及對 MHC 第 II 型之中等結合。對於各 Fc 變異體之 silico 免疫原性分數係使用併入 Epibase Light(Lonza)系統之下述公式計算。免疫原性分數=加總(各 DRB1 異型族群頻率)×(臨界抗原決定基之數目)。

【0308】對於使用於該公示中之 DRB1 異型族群頻率，係使用根據高加索族群之 DRB1 異型族群頻率。

DRB1\*0701(25.3%)、DRB1\*1501(23.1%)、DRB1\*0301(21.7%)、DRB1\*0101(15.3%)、DRB1\*0401(13.8%)、DRB1\*1101(11.8%)、DRB1\*1302(8.0%)、DRB1\*1401(4.9%)、DRB1\*0403

(2.3%)、DRB1\*0901(1.8%)

**【0309】** 藉由 FASTER 演算法於變異體之恆定區(CH1-絞鏈-CH2-CH3)所鑑定之任何強的與中等的結合抗原決定基的總數係使用作為該是中林藉抗原決定基之數目。經過濾之抗原決定基為具有人類抗體生殖線序列或於可電驅予行定區之間的接合區域以及位過濾之抗原決定基係考慮於(計算為臨界抗原決定基)免疫原性分數計算中。

**【0310】** 揭示於實施例 1(F600 至 F1434)之新的 Fc 變異體之胺基酸序列的免疫原分數以及揭示於專利 WO2011/122011(F1 至 F599)之實施例 1 的先前的 Fc 變異體係使用上述 Epibase Light(Lonza)系統計算。所有 Fc 變異體(F1 至 F1434)之免疫原性分數係揭示於表 16。

**【0311】** [實施例 2] 鑑定 FcRn 結合之具有高的安定性、低的高分子量物種與低的免疫原性風險之經改良的 Fc 變異體

2-1. 藉由對於 hFcRn 結合親和性作圖 Tm、HMW(%)與免疫原性分數之先前與新的 Fc 變異體的分析揭示於專利 WO2011/122011 之實施例 1 之先前的 Fc 變異體(F1 至 F599)及於實施例 1 所製造與評估之新的 Fc 變異體(F600 至 F1052)的 hFcRn 結合親和性與 Tm 係作圖且顯示於圖 2。先前的與新的 Fc 變異體之 hFcRn 結合親和性與 HMW(%)係作圖且顯示於圖 3。Fc 變異體 F1 至 F599 與新的 Fc 變異體(F600 至 F1052)之 hFcRn 結合親和性與免疫原性分數係作圖且顯示於圖 4。

**【0312】** 新的 Fc 變異體(F600 至 F1052)與先前的 Fc 變異體(F1 至 F599)之具有 Ser239Lys 或 Asp270Phe 突變之變異體係

自該等途刪除。由於 Ser239Lys 與 Asp270Phe 突變改良安定性(T<sub>m</sub>)而其不改良對 FcRn 結合親和性且降低對所有人類 Fc $\gamma$  受體之結合親和性，於下述群組 1 至 4 的詳細分析中，Fc 變異體之安定性應於不具有 Ser239Lys 或 Asp270Phe 突變之變異體相比較。

【0313】此外，新的 Fc 變異體(F600 至 F1052)與先前的 Fc 變異體(F1 至 F599)之具有 Pro257Xxx(Xxx 為 Ala 或 Val 或 Ile 或 Leu 或 Thr)或 Met252Trp 突變之變異體係由該等圖刪除，雖然該等變異體改良 FcRn 結合親和性。Pro257Xxx 與 Met252Trp 突變於 T<sub>m</sub> 不顯示顯著的降低，建議具有 Pro257Xxx 與 Met252Trp 突變之變異體具有高安定性。然而該等具有 Pro257Xxx 與 Met252Trp 突變之變異體於加速安定性的研究期間或當冷藏儲存時，顯示顯著的凝集與沉澱。由於其不利的安定性，具有 Pro257Xxx 與 Met252Trp 突變之 Fc 變異體不為醫藥開發所接受，且因而於下述群組 1 至 4 的詳細分析中，該 Fc 變異體應自該等圖刪除。

【0314】2-2.群組 1(對 hFcRn 之結合親和性強於 15nM) 之詳細分析

於實施例 1 製造與評估的新的 Fc 變異體(F600 至 F1052)與揭示於專利 WO2011/122011 之實施例 1 的先前 Fc 變異體(F1 至 F599)，對於 hFcRn 具有結合親和性強於 15nM(後文揭示為群組 1)，係藉由作圖 hFcRn 結合親和性於 X-軸以及 T<sub>m</sub>、HMW(%) 與免疫原性分數於 Y-軸而詳細分析。

藉由作圖 hFcRn 結合親和性(KD 強於 15nM)於 X-軸以及

T<sub>m</sub>、HMW(%)與免疫原性分數於 Y-軸之群組 1 的詳細分析係分別顯示於圖 5、6 及 7。

【0315】作為群組 1 之 Fc 變異體之發展能力標準，T<sub>m</sub> 標準係設定高於 57.5 °C、HMW(%) 標準係設定低於 2%、與免疫原性分數係設定低於 500。

【0316】群組 1 之滿足所有發展能力標準(T<sub>m</sub> 高於 57.5 °C、HMW(%) 低於 2%、與免疫原性分數低於 500)之 Fc 變異體係顯示於表 17。

【0317】 [表 17]

變異體名稱	hFcRn KD(M)	T <sub>m</sub> (°C)	HMW (%)	免疫原性分數	突變
F941	1.2E-08	61.4	1.2	449	M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F947	1.1E-08	60.5	1.2	376	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1016	3.8E-09	58.5	0.6	438	T250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1050	3.5E-09	58.2	0.9	481	T250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y/Y436V

【0318】先前的 Fc 變異體(F1 至 F599)無任一者具有親和性強於 15nM，反之，於實施例 1 製造之數個新的 Fc 變異體係強於 15nM 且符合所有發展能力標準。揭示於表 17 之該群組 1 之新的 Fc 變異體，對於 Fc 域極有價值能使其非常快速且延長的自血漿之抗原清除，特別是當與 pH-依賴性抗原-結合域組合使用時。

【0319】2-3.群組 2(對 hFcRn 之結合親和性界於 15nM 與 50nM 之間)之詳細分析

於實施例 1 製造與評估的新的 Fc 變異體(F600 至 F1052)

與揭示於專利 WO2011/122011 之實施例 1 的先前 Fc 變異體(F1 至 F599)，對於 hFcRn 具有結合親和性界於 15nM 與 50nM 之間(後文揭示為群組 2)，係藉由作圖 hFcRn 結合親和性於 X-軸以及 T<sub>m</sub>、HMW(%) 與免疫原性分數於 Y-軸而詳細分析。

【0320】藉由作圖 hFcRn 結合親和性(KD 界於 15nM 與 50nM 之間)於 X-軸以及 T<sub>m</sub>、HMW(%)與免疫原性分數於 Y-軸之群組 2 的詳細分析係分別顯示於圖 8、9 及 10。

【0321】作為群組 2 之 Fc 變異體之發展能力標準，T<sub>m</sub> 標準係設定高於 60 °C、HMW(%)標準係設定低於 2%、與免疫原性分數係設定低於 500。

【0322】群組 2 之滿足所有發展能力標準(T<sub>m</sub> 高於 60°C、HMW(%)低於 2%、與免疫原性分數低於 500)之 Fc 變異體係顯示於表 18。

【0323】 [表 18]

變異體名稱	hFcRn KD(M)	T <sub>m</sub> (°C)	HMW (%)	免疫原性分數	突變
F928	2.9E-08	63.9	0.8	375	M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436I
F929	2.9E-08	64.2	0.9	346	M252Y/S254T/T307Q/Q311A/N434Y/Y436I
F945	1.7E-08	61	1	416	T250V/M252Y/V308P/N434Y/Y436V
F946	4.3E-08	69	1.3	421	T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F993	3.8E-08	63.4	0.9	387	M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F1011	4.5E-08	62.2	0.4	459	T250V/M252Y/V308P/N434Y

【0324】先前的 Fc 變異體(F1 至 F599)無任一者符合所有發展能力標準，但於實施例 1 製造之數個新的 Fc 變異體符合所有發展能力標準。該群組 2 之該等符合所有發展能力標準之

Fc 變異體，極有價值能使其非常快速且延長的自血漿之抗原清除，特別是當與 pH-依賴性抗原-結合域組合使用時。

【0325】 2-4. 群組 3(對 hFcRn 之結合親和性界於 50nM 與 150nM 之間)之詳細分析

於實施例 1 製造與評估的新的 Fc 變異體(F600 至 F1052)與揭示於專利 WO2011/122011 之實施例 1 的先前 Fc 變異體(F1 至 F599)，對於 hFcRn 具有結合親和性界於 50nM 與 150nM 之間(後文揭示為群組 3)，係藉由作圖 hFcRn 結合親和性於 X-軸以及 T<sub>m</sub>、HMW(%) 與免疫原性分數於 Y-軸而詳細分析。

【0326】 藉由作圖 hFcRn 結合親和性(KD 界於 50nM 與 150nM 之間)於 X-軸以及 T<sub>m</sub>、HMW(%)與免疫原性分數於 Y-軸之群組 3 的詳細分析係分別顯示於圖 11、12 及 13。

【0327】 作為群組 3 之 Fc 變異體之發展能力標準，T<sub>m</sub> 標準係設定高於 63 °C、HMW(%)標準係設定低於 2%、與免疫原性分數係設定低於 250。

【0328】 群組 3 之滿足所有發展能力標準(T<sub>m</sub> 高於 63°C、HMW(%)低於 2%、與免疫原性分數低於 250)之 Fc 變異體係顯示於表 19。

【0329】 [表 19]

變異體名稱	hFcRn KD(M)	T <sub>in</sub> (°C)	HMW (%)	免疫原性分數	突變
F789	1.5E-07	64.3	0.7	243	M252Y/N315D/N434Y
F814	1.2E-07	63.3	0.9	188	M252Y/N434Y/Y436I
F882	1.3E-07	64	1	188	M252Y/N434Y/Y436L
F890	1.1E-07	63.4	0.7	200	M252Y/N434Y/Y436V
F892	7.1E-08	63.9	1.8	159	M252Y/S254T/N434Y/Y436I

【0330】 先前的 Fc 變異體(F1 至 F599)無任一者符合所有發

展能力標準，反之，於實施例 1 製造之數個新的 Fc 變異體符合所有發展能力標準。該群組 3 之該等符合所有發展能力標準之 Fc 變異體極有價值為能使其非常快速且延長的自血漿之抗原清除，特別是當與 pH-依賴性抗原-結合域組合使用時。

**【0331】** 2-5. 群組 4(對 hFcRn 之結合親和性界於 150nM 與 700nM 之間)之詳細分析

於實施例 1 製造與評估的新的 Fc 變異體(F600 至 F1052)與揭示於專利 WO2011/122011 之實施例 1 的先前 Fc 變異體(F1 至 F599)，對於 hFcRn 具有結合親和性界於 150nM 與 700nM 之間(後文揭示為群組 4)，係藉由作圖 hFcRn 結合親和性於 X-軸以及 T<sub>m</sub>、HMW(%) 與免疫原性分數於 Y-軸而詳細分析。

**【0332】** 藉由作圖 hFcRn 結合親和性(KD 界於 50nM 與 150nM 之間)於 X-軸以及 T<sub>m</sub>、HMW(%)與免疫原性分數於 Y-軸之群組 4 的詳細分析係分別顯示於圖 14、15 及 16。

**【0333】** 作為群 43 之 Fc 變異體之發展能力標準，T<sub>m</sub> 標準係設定高於 66.5 °C、HMW(%)標準係設定低於 2%、與免疫原性分數係設定低於 250。

**【0334】** 群組 3 之滿足所有發展能力標準(T<sub>m</sub> 高於 66.5°C、HMW(%)低於 2%、與免疫原性分數低於 250)之 Fc 變異體係顯示於表 20。

**【0335】** [表 20]

變異體名稱	hFcRn KD(M)	T <sub>m</sub> (°C)	HMW (%)	免疫原性分數	突變
F732	6.8E-07	69	0.7	227	T307Q/Q311H/N434Y
F767	4.3E-07	69.9	0.6	198	T307Q/L309E/Q311A/N434Y
F769	4.6E-07	69.5	0.8	190	T307Q/L309E/Q311H/N434Y
F944	1.7E-07	69.2	1.1	235	T250V/M252Y/N434Y/Y436V

【0336】先前的 Fc 變異體 (F1 至 F599) 無任一者符合所有發展能力標準，反之，於實施例 1 製造之數個新的 Fc 變異體符合所有發展能力標準。該群組 4 之該等符合所有發展能力標準之 Fc 變異體極有價值為能使其非常快速且延長的自血漿之抗原清除，特別是當與 pH-依賴性抗原-結合域組合使用時。

【0337】總結而言，揭示於表 17 至 20 的新的 Fc 變異體具有高 T<sub>m</sub>、低 HMW(%) 與低免疫原性分數，其係適合於能自血漿移除抗原之抗原-結合分子的醫藥開發。

【0338】[實施例 3] 使用人類 FcRn 基因轉殖研究於人類 IL-6 受體穩態融合模式中之新的 Fc 變異體之活體內抗原清除

### 3-1. 製備用於活體內研究之抗體

pH-依賴性抗-人類 IL6 受體 IgG1 抗體、包括 VH3-IgG1(序列編號：1) 與 VL3-CK(序列編號：3) 之 Fv4-IgG1、包括 VH3-F11(序列編號：4) 與 VL3-CK(序列編號：3) 之先前的 Fc 變異體 Fv4-F11、新的 Fc 變異體、包括 VH3-F652(序列編號：5) 與 VL3-CK(序列編號：3) 之 Fv4-F652 與包括 VH3-F890(序列編號：6) 與 VL3-CK(序列編號：3) Fv4-F890 與包括 VH3-F946(序列編號：7) 與 VL3-CK(序列編號：3) 之 Fv4-F946 係藉由揭示於專利參考例 2 of WO2011/122011 之參考例 2 知此項技術領域中具有通常知識者所習知之方法表現與純化。

【0339】Fv4-IgG1、Fv4-F11、Fv4-F652、Fv4-F890 與 Fv4-F946 之活體內抗原清除研究係於使用人類 FcRn 基因轉殖於人類 IL-6 受體穩態融合模式中進行。

【0340】 3-2. 使用人類 FcRn 基因轉殖小鼠株 32 藉由穩態輸注模式之抗體活體內研究

活體內測試係使用人類 FcRn 基因轉殖小鼠株 30 藉由穩態輸注模式進行。含有可溶性人類 IL-6 受體之輸注泵 (MINI-OSMOTIC PUMP MODEL 2004; alzet) 係植入於人類 FcRn 基因轉殖小鼠株 32 (B6.mFcRn-/- .hFcRn Tg line 32 +/- mouse(B6.mFcRn-/- hFCRN Tg32 B6.Cg-Fcgrt<tm1Dcr> Tg(FCGRT)32Dcr), Jackson Laboratories ; Methods Mol Biol.(2010) 602:93-104) 的背部皮膚下, 以製備可溶性人類 IL-6 受體的血漿濃度保持恆定的模式動物。抗-人類 IL-6 受體抗體係投藥治模式動物以評估投藥可溶性人類 IL-6 受體後之活體內動力學。單株抗-小鼠 CD4 抗體(內部的)係以 20 毫克/kg 於植入輸注泵之前以及於抗體投藥至尾靜脈後 7 與 17 日投藥, 以抑制對抗可溶性人類 IL-6 受體之中和抗體的產生。然後, 含有 92.8 微克/毫升之可溶性人類 IL-6 受體輸注泵係植入至小鼠背部皮膚下。輸注泵植入 3 日後, 投藥抗-人類 IL-6 受體抗體一次至尾靜脈。研究 1 中, Fv4-IgG1、Fv4-F652、Fv4-F890 與 Fv4-F946 係以劑量 1 毫克/kg 與約 1g/kg 之 Sanglopor(CSL Behring) 一起投藥, 以及研究 2 中, Fv4-IgG1、Fv4-F11 與 Fv4-F652 係以 1 毫克/kg 投藥。於二研究中, 無抗體投藥至對照組(無抗體注射)。於投藥抗-人類 IL-6 受體抗體後之合適時間點收集血液。所收集的血液立即以 15,000rpm 於 4 °C 離心 15 分鐘以分離血漿。經分離之血漿於分析前儲存於 -20 °C 或更低溫的冷凍箱。

**【0341】** 3-3. 藉由 ELISA 之抗-人類 IL-6 受體抗體血漿濃度的測定

小鼠血漿中之抗-人類 IL-6 受體抗體的濃度係藉由 ELISA 測量。抗-人類 IgG( $\gamma$ -鏈專一性) F(ab')<sub>2</sub> 抗體片段(Sigma)係分注於 Nunc-ImmunoPlate MaxiSorp(Nalge Nunc International)且使其於 4°C 靜置隔夜以製備抗-人類 IgG-經固定化盤。製備具有血漿濃度 0.8、0.4、0.2、0.1、0.05、0.025 與 0.0125 微克/毫升之校正曲線樣品以及經稀釋 100-倍或更高倍之小鼠血漿樣品。200 微升之 20 ng/毫升 hsIL-6R 係添加至 100 微升之校正曲線樣品與血漿樣品，然後使該等樣品於室溫靜置一小時。接著，將樣品分注入抗-人類 IgG-經固定化盤且使其於室溫靜置一小時。然後，添加生物素化抗-人類 IL-6R 抗體(R&D)於室溫反應一小時。接著，添加 Streptavidin-PolyHRP80(Stereospecific Detection Technologies)於室溫反應一小時且使用 TMP One Component HRP Microwell Substrate(BioFX Laboratories)作為基質進行發色性反應。以 1N 硫酸(Showa Chemical)中止反應後，藉由微孔盤測讀儀測定於 450nm 的吸收。小鼠血漿之濃度係使用分析軟體 SOFTmax PRO(Molecular Devices)由校正曲線的吸收予以計算。

**【0342】** 3-4. 藉由電化學發光分析之 hsIL-6R 血漿濃度的測定

小鼠血漿中 hsIL-6R 之濃度係藉由電化學發光予以測定。製備經調整為濃度 2,000、1,000、500、250、125、62.5 與 31.25 pg/毫升之 hsIL-6R 校正曲線樣品與經稀釋 50-倍或更高備之小

鼠血漿樣品。樣品與以 Sulfo-Tag NHS Ester(Meso Scale Discovery)經鈎標記之單株抗-人類 IL-6R 抗體(R&D)、生物素化抗-人類 IL-6R 抗體(R&D、Systems Inc.、USA)與托珠單抗(tocilizumab)(Chugai Pharmaceutical Co.、Ltd.)之溶液混合後與使其於 37 °C 反應隔夜。作為抗-人類 IL-6 受體抗體之托珠單抗的最終濃度為 333 微克/毫升，其為過量於包含於樣品之抗-人類 IL-6 受體抗體濃度，用以結合幾乎所有樣品中之 hsIL-6R 分子至托珠單抗的目的。接著，樣品分注至 MA400 PR Streptavidin Plate(Meso Scale Discovery)與使其於室溫反應一小時後進行清洗。於分注 Read Buffer T(x4)(Meso Scale Discovery)後，立即藉由 Sector PR 400 Reader(Meso Scale Discovery)進行測量。使用分析軟體 SOFTmax PRO(Molecular Devices)基於校正曲線的回應計算 hsIL-6R 濃度。

**【0343】** 3-5. 研究 1 之結果；新的 Fc 變異體之活體內抗原清除效果

圖 17 顯示血漿 hsIL-6R 濃度之時間趨勢以及圖 18 顯示注射 Fv4-IgG1、Fv4-F652、Fv4-F890 與 Fv4-F946 後之血漿抗體濃度的時間趨勢。相較於 Fv4-IgG1 與對照(無抗體注射)，具有新的 Fc 變異體(具有於中性 pH 經改良的結合至 FcRn)之 Fv4-F652、Fv4-F890 與 Fv4-F946 顯示顯著的血漿 hsIL-6R 濃度降低，其顯示具有於中性 pH 之改良的結合至 FcRn 的 pH-依賴性抗原結合抗體之活體內抗原清除效果。雖然相較於 Fv4-IgG1，Fv4-F652 與 Fv4-F890 於第 7 日分別顯示 30-倍與 10-倍之抗原清除效果，Fv4-F652 與 Fv4-F890 之血漿抗體濃度

時間趨勢係相當於 Fv4-IgG1。

【0344】因此，此研究顯示 Fv4-F652 與 Fv4-F890 能選擇性第自血漿清除可溶性抗原而維持抗體藥物動力學相當於 Fv4-IgG1 者。Fv4-F890 屬於群組 3 且此研究顯示群組 3 之 Fc 變異體可降低血漿抗原濃度接浸 10-倍而仍維持抗體藥物動力學相當於 IgG1。此意味應用群組 3 Fc 變異體至結合 IgG1 抗體之 pH-依賴性抗原，可降低抗體 10-倍。該具由群組 3Fc 變異體之抗體劑量的降低，當抗體劑量需要被降低而同時需要析少的用藥時，特別有意義。

【0345】另一方面，相較於 Fv4-IgG1，Fv4-F946 顯示血漿 hsIL-6R 濃度的 100-倍降低，以及 Fv4-F946 之抗體廓清係大於 Fv4-IgG1。Fv4-F946 屬於群組 2 且此研究顯示群組 2 之 Fc 變異體可降低血漿抗原濃度接近 100-倍，即便抗體廓清大於 IgG1。此意味應用群組 2 Fc 變異體至結合 IgG1 抗體之 pH-依賴性抗原，可降低總血漿抗原濃度接近 100-倍。於藉由實際抗體劑量(亦即 100 毫克/kg)欲中和之標靶血漿抗原濃度過高時，抗原濃度的 100-倍降低而無關於群組 2Fc 變異體之抗原廓清的增加，意味標靶抗原可藉由低於 10 毫克/kg 之實際抗體劑量予以中和。

【0346】hFcRn 結合親和性 of Fv4-F652 與 Fv4-F890 之 hFcRn 結合親和性係以多重複測定以及對抗 hFcRn 之親和性對於 F652 為  $2.4E-07$  M(n=7)與對於 F890 為  $1.1E-07$  M(n=12)。揭示於專利 for F890. Previous studies described in 實施例 1 of WO2011/122011 之實施例 1 的先前研究解明抗原清除與抗

體廓清的程度係相關於於中性 pH 對於 FcRn 之結合親和性。如示於圖 17，相較於 Fv4-F890，Fv4-F652 顯示較大程度的抗原清除而抗體藥物動力學係相當於 Fv4-F890。因此，其建議於 F652 之特異突變有助於增強抗原掃除效果。

【0347】為了鍵定哪一個殘基有助於增強 F652 之抗原掃除效果，使用 F11(Met252Tyr、Asn434Tyr 雙突變)與 F652(Pro238Asp、Met252Tyr、Asn434Tyr 三突變進行研究 2)。對抗 hFcRn 之親和性對於 F11 為  $3.1E-07$  M(n=12)，其相當於對於 F652 所測定之親和性。

【0348】3-6. 研究 2 之結果；Pro238Asp 突變之活體內之抗原清除效果

圖 19 顯示血漿 hsIL-6R 濃度時間趨勢以及圖 20 顯示注射 Fv4-IgG1、Fv4-F1 與 Fv4-F652 後之血漿抗體濃度時間趨勢。雖然 Fv4-F11 顯示降低血漿 hsIL-6R 濃度，Fv4-F652 顯示較大的降低血漿 hsIL-6R 濃度。Fv4-F11 與 Fv4-F652 顯示相當之血漿抗體濃度時間趨勢。

【0349】因此，此研究顯示 Pro238Asp 突變能增強抗原清除血漿而仍然維持相當於 Fv4-IgG1 之抗體藥物動力學。因此，Pro238Asp 突變對於增強藉由 pH-依賴性抗原結合抗體之抗原清除極有價值。

【0350】[實施例 4] 結合至 FcRn(其結合藉由定點導向突變而改良之 Fc 變異體)之類風濕性因子的清除

治療性抗體之臨床利用與藥效可因抗-藥物抗體(ADA)的產生而受到限制，此乃因 ADA 可影響其藥效與藥物動力學，

有時導致嚴重的副作用。許多因子影響治療性抗體的免疫原性以及起效子或 T-細胞抗原決定基存在為因子之一。此外，對抗治療性抗體之預先存在之抗體的存在，由 ADA 的觀點亦可能成為問題。特別是於治療性抗體用於罹患例如類風濕性關節炎、類風濕性因子、對抗人類 IgG 之自體抗體之患者，預先存在之抗體可成為重點。近來，已有報導具有 Asn434His 突變之人源化抗-CD4 IgG1 抗體引起顯著的類風濕性因子結合 (Clin Pharmacol Ther. 2011 Feb; 89(2): 283-90)。詳細的研究已確認於人類 IgG1 之 Asn434His 突變，相較於親代人類 IgG1，增加類風濕性因子對抗體之 Fc 區域的結合。

【0351】類風濕性因子為對抗人類 IgG 之多株自體抗體且其於人類 IgG 之抗原決定基於各株之間有變異，但其等之抗原決定基似乎位於 CH2/CH3 界面以及可與 FcRn 結合之抗原決定基重疊之 CH3 域。因此，使對於 FcRn 之結合親和性增加之突變，亦可能增加對類風濕性因子之特異株的結合親和性。

【0352】先前的研究顯示 Fc-工程化以增加於酸性 pH 對於 FcRn 的結合親和性，改良抗體之內體循環效率且延長藥物動力學。對於實施例，M252Y/S254T/T256E(YTE)變異體 (J Biol Chem 2006 281: 23514-23524.)、M428L/N434S(LS)變異體 (Nat Biotechnol、2010 28: 157-159.)與 N434H 變異體 (Clinical Pharmacology & Therapeutics(2011) 89(2): 283-290.)顯示相對於原始 IgG1，於半衰期有改良。

【0353】為達成自血漿之抗原清除，與 FcRn 交互作用之抗原-結合分子(抗體)之 Fc 區域 (Nat Rev Immunol. 2007 Sep;

7(9)：715-25)係經工程化以於中性 pH 對於 FcRn 具有改良的結合親和性，該經工程化之 Fc 變異體 包含 F11 變異體、F68 變異體、F890 變異體與 F947 變異體。相較於傳統抗體，藉由於中性 pH 對於 FcRn 具有改良的結合親和性之 pH-依賴性抗原結合抗體自血漿之抗原清除的機制係示於圖 1。

【0354】該等具有改良的 FcRn-結合(於 pH6.0 及/或中性 pH)之 Fc 變異體，如先前所報導之 Asn434His 突變的情況，對於可顯示增加的結合。因此，本發明人們測試該等結合經改良 Fc 變異體之 FnRc 對於類風濕性因子是否顯示增加的結合。使用於下述研究之變異體抗體為 Fv4-hIgG1、Fv4-YTE、Fv4-LS、Fv4-N434H、Fv4-F11、Fv4-F68、Fv4-890 與 Fv4-F947。

【0355】4-1.結合經改良 Fc 變異體之 FnRc 之類風濕性因子結合研究

對抗類風濕性因子之結合分析係於 pH7.4 藉由電化學(ECL)發光進行。該等分析係以 15 或 30 個各別 RA 患者(Proteogenex)的血清進行。混何經 50-倍稀釋之血清樣品、生物素標記測試抗體(1 微克/毫升)與經 SULFO-TAG NHS Ester(Meso Scale Discovery)標記測試抗體(1 微克/毫升)且於室溫培養 3 小時。然後，該混合物添加至 Streptavidin 包覆之 MULTI-ARRAY 96 孔盤(Meso Scale Discovery)且該等盤於室溫培養 2 小時後清洗。對各孔添加 Read Buffer T(x4)(Meso Scale Discovery)後，立即將盤置於 SECTOR imager 2400 Reader(Meso Scale Discovery)且測定電化學發光。

【0356】此研究之結果示於圖 21 與 22。圖 21 與 22 為來自

15 或 30 個各別 RA 患者血清之 ECL 回應。具有原始人類 IgG1(圖 21-1 與 22-1)地 Fv4-hIgG1 僅顯示若的類風濕性因子結合，反之所有結合經改良 Fc 變異體之 FnRc(Fv4-YTE(圖 21-2)、Fv4-LS(圖 21-3)、Fv4-N434H(圖 22-2)、Fv4-F11(圖 22-3)、Fv4-F68(圖 22-4)、Fv4-890(圖 22-5)與 Fv4-F947(圖 22-6)) 於多於二個捐贈者中顯著地增加類風濕性因子結合。此研究清楚顯示，當考慮對於 FcRn 具有改良的結合親和性之治療性抗體對於例如類風濕性關節炎之自體免疫疾病的臨床發展時，相對於預先存在之類風濕性因子之免疫原性可為重點。圖 23 顯示上述 15 個 RA 患者之抗體變異體之血清的 ECL 回應之平均、幾何平均與中間值。

**【0357】** 因此，於其次之研究中，本發明人者以製造能有利地降低多株類風濕性因子結合而仍維持 FcRn 結合能力之變異體名單。

**【0358】** 4-2.結合經改良 Fc 變異體之 FnRc 藉由導入突變於 Fc 區域之類風濕性因子結合的降低

為了製造具有降低的多株類風濕性因子結合而仍維持 FcRn 結合能力之變異體，將突變合理地導入至假設不干擾人類 FcRn/人類 IgG 交互作用之接近 CH2/CH3 界面的表面殘基。

**【0359】** Fv4-F890 係選擇作為親代 Fc 變異體以及單一突變與單一突變之組合的 Fc 變異體系導入至 Fv4-F890。製造揭示於表 21 之新穎的 Fc 變異體 F1058 至 F1073、F1107 至 F1114、F1104 至 F1106 與 F1230 至 F1232。此外，Fv4-F947 係選擇作為親代 Fc 變異體以及導入若干單一與組合突變。製造揭示

於表 21 之新穎的 Fc 變異體 F1119 至 F1124。首先評估該變異體其等於 pH7.0 對於人類 FcRn 之結合親和性。結果亦揭示於表 21。相較於其親代 Fv4-F890 或 Fv4-F947，該等變異體對抗人類 FcRn 不顯示顯著降低的結合親和性，說明該等突變不影響人類 FcRn 結合。

【0360】 [表 21]

變異體名稱	於 pH7.0 之 hFcRn KD(M)	突變
F890	1.07E-07	M252Y/N434Y/Y436V
F1058	1.30E-07	M252Y/Q386E/N434Y/Y436V
F1059	1.40E-07	M252Y/Q386R/N434Y/Y436V
F1060	1.40E-07	M252Y/Q386S/N434Y/Y436V
F1061	1.20E-07	M252Y/P387E/N434Y/Y436V
F1062	1.20E-07	M252Y/P387R/N434Y/Y436V
F1063	1.40E-07	M252Y/P387S/N434Y/Y436V
F1064	1.30E-07	M252Y/V422E/N434Y/Y436V
F1065	1.40E-07	M252Y/V422R/N434Y/Y436V
F1066	1.40E-07	M252Y/V422S/N434Y/Y436V
F1067	1.30E-07	M252Y/S424E/N434Y/Y436V
F1068	1.70E-07	M252Y/S424R/N434Y/Y436V
F1069	1.40E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438E
F1070	1.70E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438R
F1071	1.20E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438S
F1072	1.30E-07	M252Y/N434Y/Y436V/S440E
F1073	1.34E-07	M252Y/N434Y/Y436V/S440R
F1107	1.20E-07	M252Y/V422D/N434Y/Y436V
F1108	1.30E-07	M252Y/V422K/N434Y/Y436V
F1109	1.30E-07	M252Y/V422T/N434Y/Y436V
F1110	1.30E-07	M252Y/N422Q/N434Y/Y436V
F1111	1.60E-07	M252Y/S424K/N434Y/Y436V
F1112	1.20E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438K
F1113	1.20E-07	M252Y/N434Y/Y436V/S440D
F1114	1.30E-07	M252Y/N434Y/Y436V/S440Q
F1104	1.80E-07	M252Y/N422E/S424R/N434Y/Y436V
F1105	1.50E-07	M252Y/V422S/S424R/N434Y/Y436V
F1106	1.40E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1230	1.12E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1231	9.73E-08	M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1232	9.79E-08	M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F947	1.11E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V

F1119	1.00E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/V422E/N434Y/Y436V
F1120	1.00E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/S424R/N434Y/Y436V
F1121	1.00E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/V422E/S424R/N434Y/Y436V
F1122	1.40E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R
F1123	9.50E-09	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V/S440E
F1124	1.20E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E

【0361】然後，本發明人們進行表 21 之變異體於 pH7 之類風濕性因子結合研究。此研究之結果示於圖 24 至 29。該等圖顯示來自 15 個各別 FA 患者之血清，對於下述抗體之變異體的 ECL 回應：Fv4-IgG1、Fv4-F890、Fv4-F1058 至 Fv4-1073(圖 24)、Fv4-F1104 至 Fv4-F1106(圖 26)、Fv4-F1107 to Fv4-F1114(圖 27)、Fv4-F1230 至 Fv4-F1232(圖 28)、Fv4-947 與 Fv4-F1119 至 Fv4-F1124(圖 29)。圖 25-1、25-2 與 25-3 來自 15 個各別 FA 患者之血清對於變異體 Fv4-IgG1、Fv4-F890 與 Fv4-F1058 至 Fv4-1073 之 ECL 回應的平均、幾何平均與中間值。

意外地，相較於顯示強的類風濕性因子結合之 F890，對 F890 具有單一突變之新穎的 Fc 變異體，如 F1062、F1064 至 F1072 與 F1107 至 F1114 顯示顯著降低的類風濕性因子結合。特別地，F1062、F1064、F1068、F1070、F1072、F1107 至 F1109 與 F1111 至 F1113 顯示相當於原始 IgG1 之類風濕性因子結合，說明 F890 變異體之增加的免疫原性風險係完全地藉由導入額外的單一突變而清除以降低類風濕性因子結合而不影響人類 FcRn 結合。由於患者之類風濕性因子為結合至 Fc 區域之複數個抗原決定基的多株抗體，意外地單一突變顯著地清除類

風濕性因子對 Fc 區域之結合。

【0362】再者，相較於經單一突變之 Fc F1070(Q438R)或 F1072(S440E)，經雙突變之 Fc F1106(Q438R/S440E)顯示顯著降低的類風濕性因子結合。同樣地，經雙突變之 Fc F1230(Q438R/S440D)、F1231(Q438K/S440E)與 F1232(Q438K/S440D)，藉由突變之組合，亦顯示額外降低的類風濕性因子結合。同時，F1104(V422E/S424R)或 F1105(V422S/S424R)不顯示任何組合效果。

【0363】此外，具有經選擇做為親代 Fc 變異體之 Fv4-F939，評估其他突變對於增加 FcRn 結合(S254T 或 T256E)與降低類風濕性因子結合(H433D)。製造揭示於表 22 之新穎的 Fc 變異體(F1291、F1268、F1269、F1243、F1245、F1321、F1340 與 F1323)。首先，評估該變異體其等於 pH7.0 對於人類 FcRn 之結合親和性。結果揭示於表 22。

【0364】 [表 22]

變異體名稱	於 pH7.0 之 hFcRn KD(M)	突變
F939	1.5E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V
F1291	1.5E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V
F1268	2.0E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1269	1.7E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1243	1.3E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1245	8.2E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1321	1.0E-07	L235RJS239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1340	5.6E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1323	1.5E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E

【0365】然後本發者們對於上述該等變異體進行類風濕性因子結合研究。研究結果示於圖 30。意外地，相較於 F939、F1291(單一 H433D 突變於 F939)於若干捐贈者顯示顯著降低的

類風濕性因子結合。類似地，相較於 F1321、F1323(單一 H433D 突變於 F1321) 於若干捐贈者顯示顯著降低的類風濕性因子結合。再者，Q438R/S440E、Q438K/S440D 與 Q438K/S440E 突變顯示降低的類風濕性因子結合於具有其他突變用以增加 FcRn 結合(S254T 或 T256E)之變異體。

**【0366】** 4-3. 結合經改良 Fc 變異體之 FnRc 藉由於 Fc 區域導入額外的 N-糖基化之類風濕性因子結合的降低

導入額外的 N-糖基化於接近類風濕性因子結合之抗原決定基亦可消除類風濕性因子結合，此乃因具有巨大 N 糖基化之立體阻礙。突變可選擇自該點，而使突變導入 N-糖基化序列(Asn-Xxx-Ser/Thr)而仍維持 FcRn 結合。為了導入額外的 N-糖基化序列至 Fc 區域，單一或雙突變係導入至 Fv4-F11。製造揭示於表 23 之新穎的 Fc 變異體(F1077 至 F1083、F1094 至 F1097)。評估該變異體其等於 pH7.0 對於人類 FcRn 之結合親和性以及藉由 SDS-Page 評估額外糖基化的存在。結果示於表 23。發現 F1077(K248N)、F1080(S424N)、F1081(Y436N/Q438T) 與 F1082(Q438N)具有額外的糖基化且特別是 F1080(S424N)維持對抗人類 FcRn 之結合親和性。

**【0367】** [表 23]

變異體名稱	於 pH7.0 之 hFcRn KD(M)	糖基化作用	突變
F11	3.3E-07		M252Y/N434Y
F1077	2.0E-06	++	K248N/M252Y/N434Y
F1078	4.7E-07	-	M252Y/E380N/E382S/N434Y
F1079	3.4E-07	-	M252Y/E382N/N384S/N434Y
F1080	3.2E-07	++	M252Y/S424N/N434Y
F1081	6.2E-07	++	M252Y/N434Y/Y436N/Q438T
F1082	2.8E-07	+	M252Y/N434Y/Q438N

F1083	3.5E-07	-	M252Y/N434Y/S440N
F1094	2.6E-07	-	M252Y/N434Y/S442N
F1095	2.9E-07	-	M252Y/S383N/G385S/N434Y
F1096	2.7E-07	-	M252Y/Q386T/N434Y
F1097	2.8E-07	-	M252Y/G385N/P387S/N434Y

【0368】因此，其次之研究中，製造經 S424N 突變導入至揭示於表 24 之 Fv4-F890、Fv4-F1115 以及評估其等於 pH7.0 對於人類 FcRn 之結合親和性。結果亦揭示於表 24。

【0369】 [表 24]

變異體名稱	於 pH7.0 之 hFcRn KD(M)	突變
F890	1.1E-07	M252Y/N434Y/Y436V
F1115	1.3E-07	M252Y/S424N/N434Y/Y436V

【0370】然後本發者們對於上述該等變異體進行類風濕性因子結合研究。研究結果示於圖 31。意外地，單一 S424N 突變株、Fv4-F1115，顯示顯著降低的類風濕性因子結合。此結果建議額外的 N-糖基化的導入，對於消除類風濕性因子結合為有效的方案。

【0371】 4-4. YTE、N434H 與 LS 變異體之類風濕性因子結合的降低

為了降低 Fv4-YTE、Fv4-N434H 與 Fv4-LS 變異體之類風濕性因子結合、其改良於酸性 pH 之 FcRn 結合且延長抗體藥物動力學，Q438R/S440E 突變或 S424N 突變係導入至該等變異體。製造揭示於表 25 之新穎的 Fc 變異體(F1166、F1167、F1172、F1173、F1170 與 F1171)。首先該變異體其等於 pH6.0 對於人類 FcRn 之結合親和性。結果亦示於表 25。

【0372】 [表 25]

變異體名稱	於 pH6.0 之 hFcRn KD(M)	突變
IgG1	2.4E-06	無

YTE	2.1E-07	M252Y/S254T/T256E
F1166	2.1E-07	M252Y/S254T/T256E/Q438R/S440E
F1167	2.5E-07	M252Y/S254T/T256E/S424N
LS	1.6E-07	M428L/N434S
F1170	1.5E-07	M428L/N434S/Q438R/S440E
F1171	2.4E-07	S424N/M428L/N434S
N434H	4.3E-07	N434H
F1172	4.0E-07	N434H/Q438R/S440E
F1173	5.3E-07	S424N/N434H

【0373】然後本發明者們對於上述該等變異體 (Fv4-F1166、F1167、F1172、F1173、F1170 與 F1171)進行類風濕性因子結合研究。此研究結果示於圖 32。相較於二個捐贈者(90216S 與 90214S)顯示強的類風濕性因子結合的 YTE，F1166(Q438R/S440E)與 F1167(S424N)顯示顯著降低的類風濕性因子結合。再者，F1173 與 F1171 顯示 S424N 突變亦能消除 N434H 與 LS 變異體之類風濕性因子結合。然而，Q438R/S440E 突變不能完全消除 N434H 與 LS 變異體之類風濕性因子結合，類風濕性因子結合可見於一或二個捐贈者。

【0374】4-5. LS 變異體之類風濕性因子結合的降低之替代突變

製造揭示於表 26 之新穎的單一突變經導入之 Fv4-LS、Fc 變異體(Fv4-F1380 至 Fv4-F1392)。

【0375】[表 26]

變異體名稱	於 pH6.0 之 hFcRn KD(M)	突變
F22(=LS)	7.1E-08	M428L/N434S
F1380	7.3E-08	S426D/M428L/N434S
F1381	8.6E-08	S426E/M428L/N434S
F1382	1.3E-07	S426K/M428L/N434S
F1383	1.6E-07	S426R/M428L/N434S
F1384	8.6E-08	S426A/M428L/N434S
F1385	7.7E-08	S426Q/M428L/N434S
F1386	1.6E-07	S426Y/M428L/N434S

F1387	1.5E-07	M428L/N434S/Y436M
F1388	8.0E-08	M428L/N434S/Y436F
F1389	6.8E-08	M428L/N434S/Y436T
F1390	4.0E-07	M428L/N434S/Y436H
F1391	4.2E-07	M428L/N434S/Y436N
F1392	2.7E-07	M428L/N434S/Y436K

【0376】然後本發明者們對於該等於 pH6.0 仍維持 FcRn 結合之變異體 (Fv4-F1380、F1384-F1386、F1388 與 F1389) 進行類風濕性因子結合研究。此研究結果示於圖 33。該等變異體於若干捐贈者顯示顯著降低的類風濕性因子結合。特別地，Fv4-F1389 顯示相當於原始 IgG1 之類風濕性因子結合。

【0377】因此，突變如 Pro387Arg、Val422Glu、Val422Arg、Val422Ser、Val422Asp、Val422Lys、Val422Thr、Val422Gln、Ser424Glu、Ser424Arg、Ser424Lys、Ser424Asn、Ser426Asp、Ser426Ala、Ser426Gln、Ser426Tyr、His433Asp、Tyr436Thr、Gln438Glu、Gln438Arg、Gln438Ser、Gln438Lys、Ser440Glu、Ser440Asp、Ser440Gln(位置係提供於 EU 編號)對於降低含有 FcRn 結合增加的 Fc 區域(對於實施例 F1 至 F1434)之抗原-結合分子免疫原性極有價值，該抗原-結合分子例如於中性 pH 對於 FcRn 具有經改良之結合親和性之 pH-依賴性抗原結合抗體其能自血漿清除抗原，以及於酸性 pH 對於 FcRn 具有增加的結合親和性之抗體其能改良抗體藥物動力學。

【0378】除了 EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438 與 EU440 以外，用於降低類風濕性因子的結合而不影響人類 FcRn 結合之突變位點，可選擇自 EU 編號 248 至 257、305 至 314、342-352、380 至 386、388、414 至 421、

423、425 至 437、439 與 441 至 444。

**【0379】** [實施例 5]於中性 pH 對於人類 FcRn 具有經改良的結合之新穎的 Fc 變異體之類風濕性因子結合的降低

製造揭示於表 27 之新穎的 Fc 變異體 (F939、F1378、F1379、F1262、F1138、F1344、F1349、F1350、F1351、F1261、F1263、F1305、F1306、F1268、F1269、F1413、F1416、F1419、F1420、F1370、F1371、F1599、F1600、F1566、F1448、F1601-F1603、F1531、F1604、F1605、F1586、F1592、F1610-F1615、F1567、F1572、F1576、F1578、F1579、F1641-F1655、F1329、F1331)。首先評估該等變異體於 pH7.0 對於人類 FcRn 之結合親和性。結果亦示於表 27。

【0380】 [表 27]

變異體 名稱	於 pH7.0 之 hFcRn KD(M)	突變
F939	1.5E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V
F1378	3.6E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436T
F1379	2.8E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436F
F1262	1.3E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1138	1.7E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1344	4.0E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1349	3.4E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1350	1.2E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1351	1.6E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1261	1.4E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1263	1.2E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1305	2.0E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1306	1.9E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1268	2.0E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1269	1.7E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1413	3.7E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/T307Q/Q311A/H433D/ N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1416	1.3E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/V308P/H433D/N434Y/ Y436V/Q438K/S440E
F1419	1.5E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434W/Y436V/Q438R/S440E
F1420	1.3E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434W/Y436V/Q438K/S440E
F1370	9.1E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/ Q438K/S440E
F1371	1.1E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/ Q438R/S440E
F1599	7.4E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/ Q438K/S440D
F1600	8.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/ Q438R/S440D
F1566	4.0E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/ Y436V/Q438K/S440E

F1448	4.9E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/ Y436V/Q438R/S440E
F1601	3.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/ Y436V/Q438K/S440D
F1602	3.6E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/ Y436V/Q438R/S440D
F1603	5.9E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/ Y436V/Q438K/S440E
F1531	7.6E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/ Y436V/Q438R/S440E
F1604	6.0E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/ Y436V/Q438K/S440D
F1605	6.1E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/ Y436V/Q438R/S440D
F1586	5.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/ N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1592	5.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/ N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1610	4.8E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/ N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1611	5.2E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/ N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1612	4.9E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/ N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1613	5.2E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/ N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1614	5.1E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/ N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1615	6.0E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/ N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1567	4.8E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V/ Q438R/S440E
F1572	4.1E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V/ Q438R/S440E
F1576	4.3E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V/ Q438R/S440E

F1578	4.6E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V/ Q438R/S440E
F1579	5.4E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V/ Q438R/S440E
F1641	4.1E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V/ Q438K/S440E
F1642	4.1E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V/ Q438R/S440D
F1643	3.9E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V/ Q438K/S440D
F1644	3.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V/ Q438K/S440E
F1645	3.6E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V/ Q438R/S440D
F1646	3.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V/ Q438K/S440D
F1647	3.8E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V/ Q438K/S440E
F1648	3.8E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V/ Q438R/S440D
F1649	3.7E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V/ Q438K/S440D
F1650	4.0E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V/ Q438K/S440E
F1651	4.4E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V/ Q438R/S440D
F1652	4.0E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V/ Q438K/S440D
F1653	4.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V/ Q438K/S440E
F1654	4.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V/ Q438R/S440D
F1655	4.4E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V/ Q438K/S440D
F1329	1.3E-07	L235R/G236R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438R/ S440E
F1331	7.7E-08	L235R/G236R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/ Q438R/S440E

【0381】 然後本發明者們進行表 27 之該等變異體於 pH7.4 之類風濕性因子結合研究。此研究結果示於圖 34 至 94。

用於降低類風濕性因子結合之雙突變(Q438R/S440E、Q438R/S440D、Q438K/S440E 與 Q438K/S440D)顯示顯著降低的類風濕性因子結合對用以於中性 pH 增加 FcRn 結合之其他突變。

**【0382】** 5-1.於酸性 pH 對於人類 FcRn 具有經改良的結合之新穎的 Fc 變異體之類風濕性因子結合的降低

製造揭示於表 28 之新穎的 Fc 變異體(F1718-F1721、F1671、F1670、F1711 至 F1713、F1722 至 F1725、F1675、F1714 至 F1717、F1683、F1756 至 F1759、F1681、F1749 至 F1751、F1760 至 F1763、F1752 至 F1755、F1685)。首先評估該等變異體其等於 pH6.0 對於人類 FcRn 之結合親和性。結果亦示於表 28。

【0383】 [表 28]

變異體 名稱	於 pH6.0 之 hFcRn KD(M)	突變
F1718	6.1E-08	N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1719	5.2E-08	N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1720	4.5E-08	N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1721	5.5E-08	N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1671	9.5E-08	L235R/S239K/N434Y/Y436V
F1670	6.4E-08	L235R/S239K/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1711	5.5E-08	L235R/S239K/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1712	5.5E-08	L235R/S239K/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1713	5.1E-08	L235R/S239K/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1722	1.0E-07	H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1723	9.6E-08	H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1724	9.9E-08	H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1725	9.3E-08	H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1675	9.7E-08	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436V
F1714	1.1E-07	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1715	1.1E-07	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1716	9.6E-08	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1717	9.5E-08	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1683	5.7E-08	L235R/S239K/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1756	8.0E-08	N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1757	7.2E-08	N434Y/Y436T/Q438R/S440D
F1758	7.0E-08	N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1759	6.3E-08	N434Y/Y436T/Q438K/S440D
F1681	8.4E-08	L235R/S239K/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1749	8.7E-08	L235R/S239K/N434Y/Y436T/Q438R/S440D
F1750	7.0E-08	L235R/S239K/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1751	6.9E-08	L235R/S239K/N434Y/Y436T/Q438K/S440D
F1760	1.2E-07	H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1761	1.3E-07	H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440D
F1762	1.1E-07	H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1763	1.1E-07	H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440D
F1752	1.5E-07	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440E

F1753	1.3E-07	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440D
F1754	1.2E-07	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1755	1.3E-07	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440D
F1685	8.7E-08	L235R/S239K/N434Y/Q438R/S440E

【0384】然後本發明者們對於表 28 之變異體於 pH7.4 進行類風濕性因子結合研究。此研究之結果示於圖 95 至 130。

用於降低類風濕性因子結合之雙突變 (Q438R/S440E、Q438R/S440D、Q438K/S440E 與 Q438K/S440D) 顯示顯著降低的類風濕性因子結合對用以於酸性 pH 增加 FcRn 結合之其他突變。

【0385】[實施例 6] 使用人類 FcRn 基因轉殖小鼠於人類 IL-6 受體穩態輸注模式中新穎的 Fc 變異體之活體內抗原清除研究

#### 6-1. 製備用於活體內研究之抗體

藉由揭示於專利 WO2011/122011 之實施例 2 之此項技術領域者所習知方法表現與純化 pH-依賴性抗-人類 IL6 受體 IgG1 抗體、包括 VH3-IgG1(序列編號：1)與 VL3-CK(序列編號：3)之 Fv4-IgG1、新的 Fc 變異體、包括 VH3-F1243(序列編號：8)與 VL3-CK(序列編號：3)之 Fv4-F1243 以及包括 VH3-F1245(序列編號：9)與 VL3-CK(序列編號：3)之 Fv4-F1245。

【0386】如揭示於實施例 4，Fv4-F1243 與 Fv4-F1245 具有新穎的 Fc 區域(其於中性 pH 對於人類 FcRn 具有改良的結合親和性)，但顯著降低結合至類風濕性因子。為了評估該等變異體之抗原清除效果，使用人類 FcRn 基因轉殖小鼠於人類

IL-6 受體穩態輸注模式中進行 Fv4-IgG1、Fv4-F1243 與 Fv4-F1245 之活體內研究。

**【0387】** 6-2. 使用人類 FcRn 基因轉殖小鼠株 32 藉由穩態輸注模式之抗體的活體內研究

使用人類 FcRn 基因轉殖小鼠株 32 藉由穩態輸注模式之活體內測試係以揭示於專利 WO2011/122011 之實施例 13 相同方法進行。

**【0388】** 6-3. 研究結果；新的 Fc 變異體之活體內抗原清除效果

圖 131 顯示血漿 hsIL-6R 濃度時間趨勢以及圖 132 顯示注射 Fv4-IgG1、Fv4-F1243 與 Fv4-F1245 後之血漿抗體濃度時間趨勢。相較於 Fv4-IgG1 與對照(無抗體注射)，具有新穎的 Fc 變異體(其於中性 pH 對於 FcRn 具有經改良的結合)之 Fv4-F1243 與 Fv4-F1245 顯示顯著降低的血漿 hsIL-6R 濃度，說明於中性 pH 對於 FcRn 具有將改良的結合之 pH-依賴性抗原結合抗體之活體內抗原清除。相較於 Fv4-IgG1，Fv4-F1243 與 Fv4-F1245 於 21 日或 7 日分別顯示 10-倍抗原清除效果，反之 Fv4-F1243 與 Fv4-F1245 之血漿抗體濃度時間趨勢相當於 Fv4-IgG1。

**【0389】** [實施例 7] 使用人類 FcRn 基因轉殖小鼠之新穎的 Fc 變異體之活體內 PK 研究

7-1. 製備用於活體內研究之抗體

藉由揭示於專利 WO2011/122011 之參考例 2 之此項技術領域者所習知方法表現與純化 pH-依賴性抗-人類 IL6 受體

IgG1 抗體、包括 VH3-IgG1(序列編號：1)與 VL3-CK(序列編號：3)之 Fv4-IgG1、新的 Fc 變異體、包括 VH3-F1389(序列編號：10)與 VL3-CK(序列編號：3)之 Fv4-F1389。

**【0390】** 如揭示於實施例 4， Fv4-F1389 具有新穎的 Fc 區域(其於酸性 pH 對於人類 FcRn 具有改良的結合親和性)，但顯著降低結合至類風濕性因子。為了評估此變異體之藥物動力學，使用人類 FcRn 基因轉殖小鼠進行 Fv4-IgG1 與 Fv4-F1389 之活體內研究。

**【0391】** 7-2. 使用人類 FcRn 基因轉殖小鼠株 32 之抗體的活體內研究

使用人類 FcRn 基因轉殖小鼠株 32 之活體內測試係以揭示於專利 WO2011/122011 之實施例 13 相同方法進行。

**【0392】** 7-3.新的 Fc 變異體之活體內 PK 研究的結果

圖 133 顯示注射 Fv4-IgG1 與 Fv4-F1389 後之血漿抗體濃度時間趨勢。相較於 Fv4-IgG1，具有新穎的 Fc 變異體(其於酸性 pH 對於 FcRn 具有改良的結合以及對於類風濕性因子之降低的結合)之 Fv4-F1389，顯示經改良的藥物動力學。揭示於表 28 之新穎的 Fc 變異體於 pH6.0 對於 FcRn 具有與 F1389 同程度之增加的結合親和性。因此，該等變異體亦期望使用人類 FcRn 基因轉殖小鼠株 32 顯現經改良的藥物動力學而對於類風濕性因子仍具有降低的結合。

**【0393】** [實施例 8] 製備以鈣-依賴性方式結合至人類 IgA 之抗體

8-1. 製備人類 IgA(hIgA)

人類 IgA(後文簡稱為「hIgA」)係藉由使用下述重組技術製備作為抗原。hIgA(可變區係衍生自抗-人類 IL-6 受體抗體)係藉由培養帶有經插入有 H(WT)-IgA1(序列編號：12)與 L(WT)(序列編號：13)之重組載體之宿主細胞而予以表現且藉由使用離子交換層析與膠體過濾沉澱之此項技術領域所習知方法予以純化。

**【0394】 8-2. 結合至 hIgA 之抗體的表現與純化**

GA2-IgG1(重鏈序列編號：14； 輕鏈序列編號：15)為結合至 hIgA 之抗體。編碼 GA2-IgG1 重鏈(序列編號：14)與 GA2-IgG1 輕鏈(序列編號：15)之 DNA 序列，係藉由此項技術領域中具有通常知識者所習知方法插入至動物細胞表現質體。抗體係藉由下述方法表現。人類胎腎細胞衍生之細胞株 FreeStyle 293-F(Invitrogen)之細胞懸浮於 FreeStyle 293 Expression Medium(Invitrogen)。細胞懸浮物係以細胞密度  $1.33 \times 10^6$  cells/毫升接種至 6-孔盤(3 毫升/孔)。然後，所構築之質體藉由脂質體轉染方法導入至細胞。細胞於 CO<sub>2</sub> 培養箱(37 °C, 8% CO<sub>2</sub>, 90 rpm)培養 4 日。使用 rProtein A Sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow(Amersham Biosciences)藉由此項技術領域者所習知方法自經單離之細胞培養上清部份純化抗體。使用分光光度計測定經純化抗體溶液之吸收(波長 280nm)。藉由 PACE 方法(Protein Science(1995) 4、2411-2423)使用吸收係數計算自所測得之值決定抗體濃度。

**【0395】 8-3. 所得抗體對於鈣-依賴性 hIgA-結合活性之評估**

如揭示於 8-2 所單離之抗體係使用 Biacore T200(GE Healthcare)評估其 hIgA-結合活性(解離常數  $K_D$ (M))。使用於測量之泳動緩衝液為 0.05% tween20/20 mmol/L ACES/150 mmol/L NaCl(pH 7.4 or 5.8)含有 3  $\mu$ M 或 1.2 mM  $CaCl_2$ 。

使抗體結合至藉由胺基偶合方法固定有適當量之重組蛋白質 A/G(Thermo Scientific)之感應器晶片 CM5(GE Healthcare)。然後，注射合適濃度之 hIgA(揭示於 8-1)作為分析物而使其與感應器晶片上的抗體交互作用。測量係於 37 °C 進行。測量後，注射 10 mmol/L 甘胺酸-HCl(pH 1.5)以重生該感應器晶片。解離常數  $K_D$ (M)係使用 Biacore T200 Evaluation Software(GE Healthcare)藉由曲線配適分析與平衡參數分析自測量結果計算。結果與所得感應圖譜係分別示於表 29 與圖 134。其係解明 GA2-IgG1 於 1.2 mM 之  $Ca^{2+}$ 濃度強烈地結合至 hIgA 而抗體於 3  $\mu$ M 之  $Ca^{2+}$ 濃度微弱地結合至 hIgA。再者，於 1.2 mM 之  $Ca^{2+}$ 濃度，GA2-IgG1 係顯示於 pH7.4 強烈地結合至人類 IgA 但於 pH5.8 則為微弱的。更具體地，係解明 GA2-IgG1 以 pH-與鈣-依賴方式結合至人類 IgA。

【0396】 [表 29]

抗體名稱	條件	Fit	ka	kd	KD [M]
GA2-IgG1	pH 7.4, 1.2 mM Ca	1 : 1 結合模式	4.0E+05	1.6E-02	3.9E-08
	pH 7.4, 3 $\mu$ M Ca	穩態親和性	-	-	6.7E-06
	pH 5.8, 1.2 mM Ca	穩態親和性	-	-	4.0E-06
	pH 5.8, 3 $\mu$ M Ca	穩態親和性	-	-	5.0E-06

【0397】 [實施例 9] 製備具有經改質之以鈣-依賴方式結合至 hIgA 之 Fc 區域的抗體

其次，為了評估 FcRn 結合對於自血漿之抗原(hIgA)清除

的效果， GA2-F760(重鏈序列編號：16；輕鏈序列編號：15)係藉由導入胺基酸取代 L235R 與 S239K 至 GA2-IgG1 以清除結合至 Fc $\gamma$ R 而構築。再者藉由導入胺基酸取代 G236R、M252Y、S254T、T256E、N434Y、Y436V、Q438R 與 S440E 至 GA2-F760 而構築 GA2-F1331(重鏈序列編號：17；輕鏈序列編號：15)，其於 pH7.4 對於 FcRn 結合強於 GA2-F760。經改質抗體係藉由上述方法使用藉由此項技術領域所習知方法插入編碼 GA2-F1331(重鏈序列編號：17；輕鏈序列編號：15)與 GA2-F760(重鏈序列編號：16；輕鏈序列編號：15)之 DNA 序列之動物表現質體而予以表現。抗體濃度係於純化後測定。評估 GA2-F760 對於其結合至小鼠 Fc $\gamma$ R(mFc $\gamma$ RI、mFc $\gamma$ RII、mFc $\gamma$ RIII 與 mFc $\gamma$ RIV)。結果顯示 GA2-F760 不結合至任何受體。

**【0398】** [實施例 10] 使用人類 FcRn 基因轉殖小鼠評估抗原之 Ca-依賴性 hIgA-結合抗體於血漿滯留的效果

#### 10-1. 使用人類 FcRn 基因轉殖小鼠之活體內測試

hIgA 與抗-hIgA 抗體之藥物動力學係於 hIgA(人類 IgA；如揭示於實施例 8 之方式製備)單獨或與抗-hIgA 抗體組合投藥至人類 FcRn 基因轉殖小鼠(B6.mFcRn-/- .hFcRn Tg line 32 +/- mouse、Jackson Laboratories；Methods Mol Biol.(2010) 602：93-104)之後評估。A mixture of hIgA 與抗-hIgA 抗體之混合物係以劑量 10 毫升/kg 經由尾靜脈投藥一次。上述之 GA2-F760 與 GA2-F1331 為所使用之抗-hIgA 抗體。

**【0399】** 各混合物中，hIgA 濃度為 80 微克/毫升以及抗

-hIgA 抗體濃度為 2.69 毫克/毫升。於上述條件中，由於抗-hIgA 抗體係以充分過量於 hIgA 存在，主要部份的 hIgA 係預測結合至抗體。於投藥後 15 分鐘、1 小時、2 小時、7 小時、1 日、3 日、7 日與 14 日，自小鼠收集血液。所收集的血液立即以 12,000 於 4°C 離心 15 分鐘以獲得血漿。直到測量前，經分離之血將係儲存於 -20°C 或更低溫的冷凍箱。

**【0400】 10-2.** 藉由 ELISA 測量人類 FcRn 基因轉殖小鼠之血漿抗-hIgA 抗體濃度

小鼠血漿之抗-hIgA 抗體濃度係藉由 ELISA 測量。首先，抗-人類 IgG-固定盤係藉由分取抗-人類 IgG( $\gamma$ -鏈特異性)F(ab')<sub>2</sub> 片段抗體 (SIGMA) 至 Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp(Nalge nunc International)之各孔而製備使該等盤於 4 °C 靜置隔夜。抗-hIgA 抗體標準曲線樣品製備為 血漿濃度於 0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125、0.01563 與 0.007813 微克/毫升之標準溶液以及分析樣品係藉由稀釋 100-倍或更高所製備之小鼠血漿樣品細分取至抗-人類 IgG-固定盤，然後該等盤於 25 °C 培養 1 小時。其次，山羊抗-人類 IgG( $\gamma$ -鏈特異性)生物素(BIOT)接合物 (Southern Biotechnology Associates Inc.) 分取至該等盤之各孔，然後該等盤於 25 °C 培養 1 小時。然後，對該等盤之各孔添加 Streptavidin-PolyHRP80(Stereospecific Detection Technologies)，接著該等盤於 25 °C 培養 1 小時。使用 TMB One Component HRP Microwell Substrate(BioFX Laboratories)作為基質之發色反應係以 1N 硫酸 (Showa Chemical)中止，然後各孔中之反應混合物係使用微孔盤測讀儀

測量以測定於 450nm 的吸收。小鼠血漿之抗-hIgA 抗體濃度係使用分析軟體 SOFTmax PRO(Molecular Devices)由標準曲線之吸收計算。藉由上述方法測定，於人類基因轉殖小鼠之 GA2-F1331 與 GA2-F760 之血漿濃度抗體的時間歷程，係示於圖 135。

**【0401】 10-3. 藉由 ELISA 測定血漿之 hIgA 濃度**

小鼠血漿之 hIgA 濃度係藉由 ELISA 測定。首先，抗-人類 IgA-固定盤係藉由分取山羊抗-人類 IgA 抗體(BETHYL)至 Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp(Nalge nunc International)之各孔而製備且使該等盤於 4°C 靜置隔夜。製備 hIgA 標準曲線樣品於血漿濃度為 0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125 與 0.00625 微克/毫升以及分析樣品係藉由稀釋小鼠血漿樣品 100-倍或更高而製備。各樣品(100 微升)與 200 微升之 500 ng/毫升 hsIL-6R 於室溫混合 1 小時後，將其分取 100 微升/孔至抗-人類 IgA-固定盤。使所得盤於室溫靜置 1 小時。其次，添加生物素化抗-人類 IL-6R 抗體(R&D)至該等盤之各孔後，使該等盤於室溫培養 1 小時。然後，分取 Streptavidin-PolyHRP80(Stereospecific Detection Technologies)至該等盤之各孔後，該等盤於室溫培養 1 小時。使用作為基質之 TMB One Component HRP Microwell Substrate(BioFX Laboratories)之發色反應係以 1N 硫酸(Showa Chemical)中止，然後各孔中之反應混合物係使用微孔盤測讀儀測量以測定於 450nm 的吸收。小鼠血漿之濃度係使用分析軟體 SOFTmax PRO(Molecular Devices)由標準曲線之吸收計算。藉由上述方法測定，於人類基因轉殖小鼠之靜脈投藥後血漿 hIgA

濃度的時間歷程，係示於圖 136。

**【0402】** 結果顯示，當 hIgA 與 GA2-F1331(其為顯示強的人類 FcRn 結合之抗體)組合投藥時，相較於當 hIgA 與 GA2-F760(其對於人類 FcRn 具有非常弱的親和性)組合投藥時，hIgA 之清除明顯地加速。

**【0403】** [實施例 11] 製備 pH-依賴性抗-IgE 抗體

#### 11-1. 製備抗-人類 IgE 抗體

為了製備 pH-依賴性抗-人類 IgE 抗體，作為抗原之人類 IgE(重鏈序列編號：18；輕鏈序列編號：19)(可變區係衍生自抗-人類 glypican3 抗體)係使用 FreeStyle293(Life Technologies)表現。人類 IgE 係使用此項技術領域所習知之傳統層析方法藉由純化所表現的人類 IgE 而製備。

**【0404】** 由多數之所獲得的抗體，選擇以 pH-依賴性方式結合至人類 IgE 之抗體。經選擇之抗-人類 IgE 抗體係使用人類 IgG1 重鏈恆定區與人類輕鏈恆定區表現後純化。所產生之抗體命名為 278(重鏈序列編號：20；輕鏈序列編號：21)。

**【0405】** 11-2. 評估抗-人類 IgE 抗體之結合活性與 pH-依賴性結合活性

能於內體中自抗原解離的抗體不僅可設計其以 pH-依賴性方式結合至抗原，亦可其以 Ca-依賴性方式結合至抗原而予以製造。因此，純株 278 與 IgE-結合活性不取決於 pH/Ca 之對照 Xolair(奧馬珠單抗(omalizumab)；Novartis)，係評估其人類 IgE(hIgE)-結合活性之 pH 依賴性與 pH/Ca 依賴性。

**【0406】** 更具體地，純株 278 與 Xolair 之 hIgE-結合活性(解

離常數  $K_D(M)$  係使用 Biacore T200(GE Healthcare) 評估。

分析中所使用之泳動緩衝液為：

1.2 mmol/l  $CaCl_2$  /0.05% tween20、20 mmol/l ACES、150 mmol/l NaCl、pH 7.4；

1.2 mmol/l  $CaCl_2$  /0.05% tween20、20 mmol/l ACES、150 mmol/l NaCl、pH 5.8；以及

3 uMol/l  $CaCl_2$  /0.05% tween20、20 mmol/l ACES、150 mmol/l NaCl、pH 5.8。

【0407】其 C-末端 Lys 係經生物素化之化學合成之具有人類 glypican 3 蛋白質-衍生的序列(序列編號：22)(後文簡稱為「生物素化 GPC3 肽」)的肽，係以合適量添加且基於生物素與鏈黴親和素之間的親和性固定化至感應器晶片 SA(GE Healthcare)。人類 IgE 係經由將其以合適濃度注射而固定化至晶片，而由生物素化 GPC3 肽所捕捉。作為分析物，純株 278 以合適濃度注射且使其與感應器晶片上的人類 IgE 交互作用。然後，注射 10 mmol/L 甘胺酸-HCl(pH 1.5)以再生感應器晶片。交互作用通常於 37 °C 測量。測量結果係使用 Biacore T200 Evaluation Software(GE Healthcare)藉由曲線配適分析以計算結合速率常數  $k_a(1/MS)$  與解離速率常數  $k_d(1/s)$ 。解離常數  $K_D(M)$  係自上述常數計算。再者，各抗體於 [pH 5.8, 1.2 mM Ca] 對 [pH 7.4, 1.2 mM Ca] 條件下之  $KD$  比例係計算以評估 pH-依賴性結合，而各抗體於 [pH 5.8, 3 uM Ca] to [pH 7.4, 1.2 mM Ca] 之  $KD$  比例係計算以評估 pH/Ca-依賴性結合。結果示於表 30。

【0408】 [表 30]

抗體名稱 (簡稱)	緩衝劑條件	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)	PH 依賴性	pH/Ca 依賴性
					KD(pH 5.8, 1.2 mM Ca)/KD(pH 7.4, 1.2 mM Ca)	KD(pH 5.8, 3 $\mu$ M Ca)/KD(pH 7.4, 1.2 mM Ca)
純株 278	pH 7.4, 1.2 mM Ca	1.5E+06	3.6E-03	2.4E-09	842.5	1636.5
	pH 5.8, 1.2 mM Ca	1.2E+05	2.3E-01	2.0E-06		
	pH 5.8, 3 $\mu$ M Ca	6.2E+04	2.4E-01	3.9E-06		
Xolair	pH 7.4, 1.2 mM Ca	2.5E+06	1.1E-02	4.4E-09	2.3	2.9
	pH 5.8, 1.2 mM Ca	2.4E+06	2.4E-02	9.9E-09		
	pH 5.8, 3 $\mu$ M Ca	1.4E+06	1.7E-02	1.3E-08		

**【0409】** [實施例 12] 製備用於活體內測試之結核製人類 IgE 之具有經改質 Fc 區域的抗體

其次，為了評估由血漿清除 FcRn 結合之抗原(人類 IgE)的效果，構築 278-F760(重鏈序列編號：23；輕鏈序列編號：21)以清除結合至 Fc $\gamma$ R。再者，藉由導入胺基酸取代 G236R、M252Y、S254T、T256E、N434Y、Y436V、Q438R 與 S440E 至 278-F760 而構築 278-F1331(重鏈序列編號：24；輕鏈序列編號：21)，其於 pH7.4 結合至 FcRn 較 278-F760 強。經改質抗體係藉由上述方法使用經以此項技術領域者所習知之方法插入編碼 278-F1331(重鏈序列編號：24；輕鏈序列編號：21)與 278-F760(重鏈序列編號：23；輕鏈序列編號：21)之 DNA 序列的動物表限載體而表現。純化後測量該抗體濃度。

**【0410】** [實施例 13]純株 278 之活體內評估

## 13-1. 製備用於活體內評估之人類 IgE(hIgE(Asp6))

hIgE(Asp6)(衍生自抗-人類磷脂醯肌醇聚糖(glypican)3 抗體之可變區域)，其為用於活體內評估由重鏈(序列編號：25)與輕鏈(序列編號：19)所組成之人類 IgE，係藉由與實施例 11 所述之相同方法產生。hIgE(Asp6)為於人類 IgE 的六個 N-連結的糖基化位點之天冬醯胺-至-天冬胺酸轉變所造成之經改質分子，因而於人類 IgE 之 N-連結糖鏈的異質性，不會被作為抗原之人類 IgE 的血漿中濃度的時間-依賴性變化所影響。

【0411】 13-2. 評估純株 278 對於使用人類 FcRn 基因轉殖小鼠之加速人類 IgE 清除的效果

hIgE(Asp6) 與 抗 - 人類 IgE 抗體的藥物動力學係於 hIgE(Asp6) 與 抗 -hIgE 抗體 (278-F760 與 278-F1331) 及 Sanglorpor(人類正常免疫球蛋白，CSL Behring) 組合對 人類 FcRn 基因轉殖小鼠 (B6.mFcRn-/- .hFcRn Tg line 32 +/- mouse，Jackson Laboratories；Methods Mol Biol.(2010) 602：93-104) 投藥後評估。hIgE(Asp6)、抗-人類 IgE 抗體與 Sanglorpor(濃度顯示於表 31) 的混合物，係以劑量 10 毫升/公斤 經由尾靜脈投藥一次。於上述條件中，由於各抗體相較於 hIgE(Asp6) 係充分過量地存在，係 hIgE(Asp6) 預測幾乎完全地結合至該抗體。於投藥後 5 分鐘、2 小時、7 小時、1 日、2 日、4 或 5 日、7 日、14 日、21 日及 28 日由小鼠收集血液。所收集的血液立即於 15,000rpm 及 4°C 離心 5 分鐘以獲得血漿。經分離的血漿儲存於 -20°C 或更低溫度直到測量。

【0412】 [表 31]

抗-hIgE 抗體	於投藥溶液之 hIgE(Asp6)濃度 (微克/毫升)	於投藥溶液之 抗-hIgE 抗體濃度 (微克/毫升)	於投藥溶液之 Sanglopor 濃度 (毫克/毫升)
278-F760	20	100	100
278-F1331	20	100	100

**【0413】** 13-3. 於人類 FcRn 基因轉殖小鼠測定血漿 抗-人類 IgE 抗體濃度

小鼠血漿中之抗-hIgE 抗體濃度係藉由電化學發光(ECL)分析而測定。標準曲線樣品係製備於血漿濃度 32、16、8、4、2、1、0.5 及 0.25 微克/毫升。標準曲線樣品與小鼠血漿分析樣品分曲至經固定有 hIgE(Asp6)的 ECL 盤。該等盤於 4°C 靜置隔夜。然後，抗兔子抗體(山羊)，經 SULFO-TAG 標示(Meso Scale Discovery)於室溫反應 1 小時。於分散讀取緩衝劑 T(x4)(Meso Scale Discovery)之後立即藉由 Sector Imager 2400 Reader(Meso Scale Discovery)進行測量。小鼠血漿中之濃度係使用分析軟體 SOFTmax PRO(Molecular Devices)由標準曲線的回應而計算。靜脈內投藥後之血漿抗體濃度的時間曲線，其係藉由上述方法測定，示於圖 137。

**【0414】** 13-4. 測定於人類 FcRn 基因轉殖小鼠之血漿 hIgE(Asp6)濃度

小鼠血漿中之 hIgE(Asp6)濃度係藉由 ELISA 測定。標準曲線樣品係製備於血漿濃度 192、96、48、24、12、6、與 3 ng/毫升。以 10 微克/毫升添加 Xolair(Novartis) 至標準取線樣品且小鼠血漿分析樣品係平衡於 hIgE(Asp6)與抗-hIgE 抗體的免疫複合物。於室溫培養 30 分鐘後，標準曲線樣品與小鼠血漿分析樣品分取至經固定有抗-人類 IgE 抗體之免疫盤(MABTECH)

或經固定有抗-人類 IE 抗體(純株 107; MABTECH)之免疫盤 Nunc F96 MicroWell Plate(Nalge nunc International)。使該等盤於室溫靜置 2 小時或於 4°C 靜至隔夜。然後，人類 GPC3 core protein(序列編號: 26)、經以 NHS-PEG4-Biotin(Thermo Fisher Scientific)生物素化之抗-GP3 抗體(於中外製藥股份有限公司製備)與鏈黴抗生物素蛋白(Sterptavidin)-PolyHRP80 (Stereospecific Detection Technologies)依序各反應 1 小時。發色反應使用作為基質的 TMB One Component HRP Microwell Substrate(BioFX Laboratories)以 N 硫酸(Showa Chemical)終止，然後，小鼠盤之濃度係藉由其中顯色係使用微孔盤測讀儀測量 450nm 的吸收的方法，或其中發光反應使用 SuperSignal(r) ELISA Pico Chemiluminescent Substrate(Thermo Fisher Scientific)作為基質且發光強度係使用微孔盤測讀儀測量而進行的方法。小鼠盤之濃度係使用分析軟體 SOFTmax PRO(Molecular Devices)由標準曲線的吸收或發光強度而計算。靜脈內投藥後之血漿 hIgE(Asp6)濃度的時間曲線，其係藉由上述方法測定，示於圖 138。

**【0415】** 結果顯示，當人類 IgE 與 278-F1331 合並投藥時，人類 IgE 的清除顯著地加速，該 278-F1331 結合至人類 FcRn 大幅地強於 278-F760。具體地，其顯示不僅於 IL6R 與 IgA 的情況，於 IgE 的情況亦然，對於 FcRn 具有增加的活性之 pH-依賴性抗原結合抗體可加速自血漿的抗原廓清且降低血漿中的抗原濃度。

**【0416】** [參考例 A1]製備可溶性人類 IL-6 受體(hsIL-6R)

作為抗原之重組人類 IL-6 受體如下述方式製備。如報導於 *J. Immunol.* 152: 4958-4968(1994)之持續地表現具有來自 N 終端之位置 1 至 357 的胺基酸序列的可溶性人類 IL-6 受體(後文稱為 hsIL-6R)的細胞株 係藉由此項技術領域中具有通常知識者所習知之方法建立。培養該細胞以表現 hsIL-6R。藉由下述二步驟由培養上清部分純化該 The hsIL-6R: Blue Sepharose 6 FF 管柱層析與膠體過濾層析。於最終步驟呈主峰之經溶洗之分液係使用作為最終純化產物。

**【0417】 [參考例 A2] 製備人類 FcRn**

FcRn 為 FcRn  $\alpha$  鏈與  $\beta$ 2-微球蛋白的異二聚體。Oligo-DNA 引子係根據已公開之人類 FcRn 基因序列(*J Exp Med.* 1994 Dec 1; 180(6): 2377-81)予以製備。編碼全基因的 DNA 片段係使用人類 cDNA(Human Placenta Marathon-Ready cDNA, Clontech)作為模板以及所製備的引子藉由 PCR 製備。使用所得之 DNA 片段作為模板,編碼含有信號區域(Met1-Leu290)的細胞外域的 DNA 片段藉由 PCR 擴增,且插入至哺乳細胞表現載體。同樣地, oligo-DNA 引子係根據已公開之人類  $\beta$ 2-微球蛋白基因序列(*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99(26): 16899-16903(2002)) 予以製備。編碼全基因的 DNA 片段係使用人類 cDNA(人類 Placenta Marathon-Ready cDNA, Clontech)作為模板以及所製備的引子藉由 PCR 製備。使用所得之 DNA 片段作為模板,編碼含有信號區域(Met1-Met119)的細胞外域的 DNA 片段藉由 PCR 擴增,且插入至哺乳細胞表現載體。

**【0418】** 可溶性人類 FcRn 係藉由下述步驟表現。經構築

之用於表現人類 FcRn  $\alpha$  鏈(序列編號：27)與  $\beta$ 2-微球蛋白(序列編號：28)的質體，使用 PEI(Polyscience)以脂質體轉染法(lipofection)導入至人類胚胎腎癌細胞衍生的細胞株 HEK293H(Invitrogen)的細胞中。收集所得培養上清部分，且使用 IgG Sepharose 6 Fast Flow(Amersham Biosciences)純化 FcRn，接著使用 HiTrap Q HP(GE Healthcare)進一步純化(J Immunol. 2002 Nov 1; 169(9): 5171-80)。

**【0419】** [參考例 A3] 製備人類 IgA(hIgA)

包含 H(WT)-IgA1(序列編號：12) 與 L(WT)(序列編號：13)的 hIgA 係經表現且使用 rProtein L-agarose(ACTigen)接著使用膠體過濾層析之此項技術領域中具有通常知識者所習知之方法予以純化。

**【0420】** [參考例 A4]製備可溶性人類 plexin A1(hsPlexin A1)

作為抗原之重組可溶性人類 plexin A1(後文稱為 hsPlexin A1)如下述方式製備。藉由參照 NCBI 參考序列(NP\_115618)構築 hsPlexin A1。特別地，包含於上述 NCBI Reference FLAG-tag(DYKDDDDK，序列編號：29) 位置 27 至 1243 的胺基酸序列的 hsPlexin A1 係連接至其 C 終端。使用 FreeStyle293(Invitrogen) 將 hsPlexin A1 瞬時表現且由下述二步驟由培養物純化：抗-FLAG 管柱層析與膠體過濾層析。於最終步驟呈主峰之經溶洗之分液係使用作為最終純化產物。

[產業上可利用性]

**【0421】** 當標靶可溶性抗原之傳統抗體投藥至個體時，該

抗原結合至抗體且安定地持續於血漿中。由於結合至抗體的抗原，相較於抗原單獨具有顯著較長的半衰期，於傳統抗體注射後抗原濃度由基線增加漿進總血漿抗原濃度的 10 至 1000 倍。對於治療性抗體而言，該總血漿抗原濃度的增加較不佳，此乃因相較於當總血漿抗原濃度無實質增加發生時所需者，抗體濃度必須為 10 至 1000-倍高。因此，由血漿清除抗原且亦降低總血漿抗原濃度之抗體相較於傳統抗體極為有價值，此乃因所需劑量為 10 至 1000-倍低於傳統抗體所需者。

**【0422】** 本發明者們對於於中性 pH 對於 FcRn 具有增強的親和性的經改質 FcRn-結合域以及包含具有低免疫原性、高安定性且僅形成少數凝集物之該 FcRn-結合預之抗原-結合分子，進行致力的研究。其結果，發現於 FcRn-結合域之特定位置的取代，增加於中性 pH 對於 FcRn 的親和性而不實質地增加高分子量物種的免疫原性與比例，且不實質地降低包含該 FcRn-結合預之抗原-結合分子的安定性。於本發明之包含該 FcRn-結合域之抗原-結合分子於藥物動力學優異而有助於降低血漿抗原濃度且符合低免疫原性、高安定性與非常少凝集物之可發展性要件。

**【0423】** 再者，Fc-工程化增加於中性或酸性 pH 對於 FcRn 的結合親和性可改良抗體的內體循環效率以及藥物動力學。然而，抗體的胺基酸序列的改質(例如胺基酸取代與插入)亦可增加治療性抗體的免疫原性，換言之，可導致抗藥物抗體(ADA)的細胞激素風暴及/或產生。

**【0424】** 本發明者們對於包含因於 FcRn-結合域的取代而

於中性 pH 或酸性 pH 對於 FcRn 增加親和性，而使其對於預先存在的抗-藥物抗體(ADA)的結合活性於中性 pH 經增加的經改質的 FcRn-結合域的抗原-結合分子進行致力的研究。其結果，發現於 FcRn-結合域的特定位置的其他取代，降低於中性 pH 對於預先存在的抗-藥物抗體(ADA)結合活性，而於各別的 pH 範圍維持高程度的增加的 FcRn-結合活性。本發明之抗原-結合分子於藥物動力學優異而有助於降低血漿抗原濃度且不增加抗體廓清。

#### 【符號說明】

無。



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

195

200

205

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>  
 <223> 人工合成肽序列

<400> 2

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190  
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 4  
 <211> 447  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工合成肽序列

<400> 4

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly

100

105

110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5  
 <211> 447  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工合成肽序列

&lt;400&gt; 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165

170

175

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 6

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

<210> 7

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Tyr Ile Ser  
 245 250 255

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

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

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val

290

295

300

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 8

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

&lt;400&gt; 8

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr  
 245 250 255

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

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

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

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

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

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

355

360

365

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

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

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

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

Ala Leu His Tyr His Val Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445

<210> 9

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400> 9

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

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

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

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

50

55

60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr  
 245 250 255

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

420

425

430

Ala Leu His Tyr His Val Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 447

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工合成肽序列

&lt;400&gt; 10

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115

120

125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Val Leu Thr 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 Leu His Glu  
420 425 430

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

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400> 11

Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5

<210> 12

<211> 464

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Leu Ser Leu Cys Ser Thr Gln Pro Asp Gly Asn Val Val Ile Ala  
 130 135 140

Cys Leu Val Gln Gly Phe Phe Pro Gln Glu Pro Leu Ser Val Thr Trp  
 145 150 155 160

Ser Glu Ser Gly Gln Gly Val Thr Ala Arg Asn Phe Pro Pro Ser Gln  
 165 170 175

Asp Ala Ser Gly Asp Leu Tyr Thr Thr Ser Ser Gln Leu Thr Leu Pro  
 180 185 190

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

Tyr Thr Asn Pro Ser Gln Asp Val Thr Val Pro Cys Pro Val Pro Ser  
 210 215 220

Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser  
 225 230 235 240

Cys Cys His Pro Arg Leu Ser Leu His Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu  
 245 250 255

Leu Leu Gly Ser Glu Ala Asn Leu Thr Cys Thr Leu Thr Gly Leu Arg  
 260 265 270

Asp Ala Ser Gly Val Thr Phe Thr Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Ser  
 275 280 285

Ala Val Gln Gly Pro Pro Glu Arg Asp Leu Cys Gly Cys Tyr Ser Val  
 290 295 300

Ser Ser Val Leu Pro Gly Cys Ala Glu Pro Trp Asn His Gly Lys Thr



&lt;400&gt; 13

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 14

<211> 451

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400> 14

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Pro Arg Trp Glu Thr Ala Ile Ser Ser Asp Ala Phe Asp Ile  
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

275

280

285

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

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 305 310 315 320

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

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

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

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

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

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

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 435 440 445

Leu Ser Pro  
 450

<210> 15  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工合成肽序列

<400> 15

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

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

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

Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
           50                   55                   60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 16  
 <211> 451  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工合成肽序列

<400> 16

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Pro Arg Trp Glu Thr Ala Ile Ser Ser Asp Ala Phe Asp Ile  
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
115 120 125

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

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

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

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

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

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

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
225 230 235 240

Arg Gly Gly Pro Lys Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr



Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 435 440 445

Leu Ser Pro  
 450

<210> 17  
 <211> 451  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工合成肽序列

<400> 17

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Pro Arg Trp Glu Thr Ala Ile Ser Ser Asp Ala Phe Asp Ile  
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
 225 230 235 240

Arg Arg Gly Pro Lys Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 245 250 255

Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 260 265 270

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

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser

290

295

300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 305 310 315 320

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

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

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

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

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

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

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Tyr His Val Thr Arg Lys Glu Leu Ser  
 435 440 445

Leu Ser Pro  
 450

<210> 18

<211> 543

<212> PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 18

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

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

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

Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe  
           50                    55                    60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65                    70                    75                    80

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

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

Val Ser Ser Ala Ser Thr Gln Ser Pro Ser Val Phe Pro Leu Thr Arg  
           115                    120                    125

Cys Cys Lys Asn Ile Pro Ser Asn Ala Thr Ser Val Thr Leu Gly Cys  
           130                    135                    140

Leu Ala Thr Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Met Val Thr Trp Asp Thr  
 145                    150                    155                    160

Gly Ser Leu Asn Gly Thr Thr Met Thr Leu Pro Ala Thr Thr Leu Thr  
           165                    170                    175

Leu Ser Gly His Tyr Ala Thr Ile Ser Leu Leu Thr Val Ser Gly Ala  
 180 185 190

Trp Ala Lys Gln Met Phe Thr Cys Arg Val Ala His Thr Pro Ser Ser  
 195 200 205

Thr Asp Trp Val Asp Asn Lys Thr Phe Ser Val Cys Ser Arg Asp Phe  
 210 215 220

Thr Pro Pro Thr Val Lys Ile Leu Gln Ser Ser Cys Asp Gly Gly Gly  
 225 230 235 240

His Phe Pro Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr  
 245 250 255

Pro Gly Thr Ile Asn Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp  
 260 265 270

Val Asp Leu Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser  
 275 285

Thr Gln Ser Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg  
 290 295 300

Thr Tyr Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser  
 305 310 315 320

Thr Lys Lys Cys Ala Asp Ser Asn Pro Arg Gly Val Ser Ala Tyr Leu  
 325 330 335

Ser Arg Pro Ser Pro Phe Asp Leu Phe Ile Arg Lys Ser Pro Thr Ile  
 340 345 350

Thr Cys Leu Val Val Asp Leu Ala Pro Ser Lys Gly Thr Val Asn Leu  
 355 360 365

Thr Trp Ser Arg Ala Ser Gly Lys Pro Val Asn His Ser Thr Arg Lys  
 370 375 380

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

Val Gly Thr Arg Asp Trp Ile Glu Gly Glu Thr Tyr Gln Cys Arg Val  
 405 410 415

Thr His Pro His Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr Thr Lys Thr  
 420 425 430

Ser Gly Pro Arg Ala Ala Pro Glu Val Tyr Ala Phe Ala Thr Pro Glu  
 435 440 445

Trp Pro Gly Ser Arg Asp Lys Arg Thr Leu Ala Cys Leu Ile Gln Asn  
 450 455 460

Phe Met Pro Glu Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu His Asn Glu Val Gln  
 465 470 475 480

Leu Pro Asp Ala Arg His Ser Thr Thr Gln Pro Arg Lys Thr Lys Gly  
 485 490 495

Ser Gly Phe Phe Val Phe Ser Arg Leu Glu Val Thr Arg Ala Glu Trp  
 500 505 510

Glu Gln Lys Asp Glu Phe Ile Cys Arg Ala Val His Glu Ala Ala Ser  
 515 520 525

Pro Ser Gln Thr Val Gln Arg Ala Val Ser Val Asn Pro Gly Lys  
 530 535 540

<210> 19  
 <211> 219  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 19

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
           20                   25                   30

Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
           35                   40                   45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
           50                   55                   60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn  
           85                   90                   95

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
           100                   105                   110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
           115                   120                   125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
           130                   135                   140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln





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

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

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

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

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

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

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
 370 375 380

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

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
 405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435

440

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 217

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工合成肽序列

&lt;400&gt; 21

Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Val Ala Val Gly  
 1                   5                   10                   15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Trp  
                   20                   25                   30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Cys  
 65                   70                   75                   80

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

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

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

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro

130

135

140

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

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

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

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工合成肽序列

&lt;400&gt; 22

Val Asp Asp Ala Pro Gly Asn Ser Gln Gln Ala Thr Pro Lys Asp Asn  
 1 5 10 15

Glu Ile Ser Thr Phe His Asn Leu Gly Asn Val His Ser Pro Leu Lys  
 20 25 30

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 443

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工合成肽序列

&lt;400&gt; 23

Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro  
 1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr His  
 20 25 30

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

Val Ile Asn Ser Ala Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly  
 50 55 60

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

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

Phe Ser Ser Gly Ser His Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val  
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala  
 145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly

165

170

175

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

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

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

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Arg Gly Gly Pro Lys Val Phe Leu  
 225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
 370 375 380

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

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
 405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
 420 425 430

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

<210> 24

<211> 443

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400> 24

Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro  
 1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr His  
 20 25 30

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

Val Ile Asn Ser Ala Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly  
 50 55 60

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

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

Phe Ser Ser Gly Ser His Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val  
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala  
 145 150 155 160

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

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

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

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

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Arg Arg Gly Pro Lys Val Phe Leu



Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Tyr  
 420 425 430

His Val Thr Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440

<210> 25  
 <211> 543  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工合成肽序列

<400> 25

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

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

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

Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

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

Val Ser Ser Ala Ser Thr Gln Ser Pro Ser Val Phe Pro Leu Thr Arg  
 115 120 125

Cys Cys Lys Asn Ile Pro Ser Asp Ala Thr Ser Val Thr Leu Gly Cys  
 130 135 140

Leu Ala Thr Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Met Val Thr Trp Asp Thr  
 145 150 155 160

Gly Ser Leu Asp Gly Thr Thr Met Thr Leu Pro Ala Thr Thr Leu Thr  
 165 170 175

Leu Ser Gly His Tyr Ala Thr Ile Ser Leu Leu Thr Val Ser Gly Ala  
 180 185 190

Trp Ala Lys Gln Met Phe Thr Cys Arg Val Ala His Thr Pro Ser Ser  
 195 200 205

Thr Asp Trp Val Asp Asp Lys Thr Phe Ser Val Cys Ser Arg Asp Phe  
 210 215 220

Thr Pro Pro Thr Val Lys Ile Leu Gln Ser Ser Cys Asp Gly Gly Gly  
 225 230 235 240

His Phe Pro Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr  
 245 250 255

Pro Gly Thr Ile Asp Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp  
 260 265 270

Val Asp Leu Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser  
 275 280 285

Thr Gln Ser Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg

290

295

300

Thr Tyr Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser  
 305 310 315 320

Thr Lys Lys Cys Ala Asp Ser Asn Pro Arg Gly Val Ser Ala Tyr Leu  
 325 330 335

Ser Arg Pro Ser Pro Phe Asp Leu Phe Ile Arg Lys Ser Pro Thr Ile  
 340 345 350

Thr Cys Leu Val Val Asp Leu Ala Pro Ser Lys Gly Thr Val Asp Leu  
 355 360 365

Thr Trp Ser Arg Ala Ser Gly Lys Pro Val Asp His Ser Thr Arg Lys  
 370 375 380

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

Val Gly Thr Arg Asp Trp Ile Glu Gly Glu Thr Tyr Gln Cys Arg Val  
 405 410 415

Thr His Pro His Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr Thr Lys Thr  
 420 425 430

Ser Gly Pro Arg Ala Ala Pro Glu Val Tyr Ala Phe Ala Thr Pro Glu  
 435 440 445

Trp Pro Gly Ser Arg Asp Lys Arg Thr Leu Ala Cys Leu Ile Gln Asn  
 450 455 460

Phe Met Pro Glu Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu His Asn Glu Val Gln  
 465 470 475 480

Leu Pro Asp Ala Arg His Ser Thr Thr Gln Pro Arg Lys Thr Lys Gly  
 485 490 495

Ser Gly Phe Phe Val Phe Ser Arg Leu Glu Val Thr Arg Ala Glu Trp  
 500 505 510

Glu Gln Lys Asp Glu Phe Ile Cys Arg Ala Val His Glu Ala Ala Ser  
 515 520 525

Pro Ser Gln Thr Val Gln Arg Ala Val Ser Val Asn Pro Gly Lys  
 530 535 540

<210> 26

<211> 545

<212> PRT

<213> 智人

<400> 26

Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro Asp Ala Thr Cys His Gln Val Arg Ser  
 1 5 10 15

Phe Phe Gln Arg Leu Gln Pro Gly Leu Lys Trp Val Pro Glu Thr Pro  
 20 25 30

Val Pro Gly Ser Asp Leu Gln Val Cys Leu Pro Lys Gly Pro Thr Cys  
 35 40 45

Cys Ser Arg Lys Met Glu Glu Lys Tyr Gln Leu Thr Ala Arg Leu Asn  
 50 55 60

Met Glu Gln Leu Leu Gln Ser Ala Ser Met Glu Leu Lys Phe Leu Ile  
 65 70 75 80

Ile Gln Asn Ala Ala Val Phe Gln Glu Ala Phe Glu Ile Val Val Arg  
 85 90 95

His Ala Lys Asn Tyr Thr Asn Ala Met Phe Lys Asn Asn Tyr Pro Ser  
 100 105 110

Leu Thr Pro Gln Ala Phe Glu Phe Val Gly Glu Phe Phe Thr Asp Val  
 115 120 125

Ser Leu Tyr Ile Leu Gly Ser Asp Ile Asn Val Asp Asp Met Val Asn  
 130 135 140

Glu Leu Phe Asp Ser Leu Phe Pro Val Ile Tyr Thr Gln Leu Met Asn  
 145 150 155 160

Pro Gly Leu Pro Asp Ser Ala Leu Asp Ile Asn Glu Cys Leu Arg Gly  
 165 170 175

Ala Arg Arg Asp Leu Lys Val Phe Gly Asn Phe Pro Lys Leu Ile Met  
 180 185 190

Thr Gln Val Ser Lys Ser Leu Gln Val Thr Arg Ile Phe Leu Gln Ala  
 195 200 205

Leu Asn Leu Gly Ile Glu Val Ile Asn Thr Thr Asp His Leu Lys Phe  
 210 215 220

Ser Lys Asp Cys Gly Arg Met Leu Thr Arg Met Trp Tyr Cys Ser Tyr  
 225 230 235 240

Cys Gln Gly Leu Met Met Val Lys Pro Cys Gly Gly Tyr Cys Asn Val  
 245 250 255

Val Met Gln Gly Cys Met Ala Gly Val Val Glu Ile Asp Lys Tyr Trp  
 260 265 270

Arg Glu Tyr Ile Leu Ser Leu Glu Glu Leu Val Asn Gly Met Tyr Arg  
 275 280 285

Ile Tyr Asp Met Glu Asn Val Leu Leu Gly Leu Phe Ser Thr Ile His  
 290 295 300

Asp Ser Ile Gln Tyr Val Gln Lys Asn Ala Gly Lys Leu Thr Thr Thr  
 305 310 315 320

Ile Gly Lys Leu Cys Ala His Ser Gln Gln Arg Gln Tyr Arg Ser Ala  
 325 330 335

Tyr Tyr Pro Glu Asp Leu Phe Ile Asp Lys Lys Val Leu Lys Val Ala  
 340 345 350

His Val Glu His Glu Glu Thr Leu Ser Ser Arg Arg Arg Glu Leu Ile  
 355 360 365

Gln Lys Leu Lys Ser Phe Ile Ser Phe Tyr Ser Ala Leu Pro Gly Tyr  
 370 375 380

Ile Cys Ser His Ser Pro Val Ala Glu Asn Asp Thr Leu Cys Trp Asn  
 385 390 395 400

Gly Gln Glu Leu Val Glu Arg Tyr Ser Gln Lys Ala Ala Arg Asn Gly  
 405 410 415

Met Lys Asn Gln Phe Asn Leu His Glu Leu Lys Met Lys Gly Pro Glu  
 420 425 430

Pro Val Val Ser Gln Ile Ile Asp Lys Leu Lys His Ile Asn Gln Leu  
 435 440 445

Leu Arg Thr Met Ser Met Pro Lys Gly Arg Val Leu Asp Lys Asn Leu  
 450 455 460

Asp Glu Glu Gly Phe Glu Ala Gly Asp Cys Gly Asp Asp Glu Asp Glu  
 465 470 475 480

Cys Ile Gly Gly Ala Gly Asp Gly Met Ile Lys Val Lys Asn Gln Leu  
 485 490 495

Arg Phe Leu Ala Glu Leu Ala Tyr Asp Leu Asp Val Asp Asp Ala Pro  
 500 505 510

Gly Asn Ser Gln Gln Ala Thr Pro Lys Asp Asn Glu Ile Ser Thr Phe  
 515 520 525

His Asn Leu Gly Asn Val His Ser Pro Leu Lys His His His His His  
 530 535 540

His  
 545

<210> 27  
 <211> 365  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 27

Met Gly Val Pro Arg Pro Gln Pro Trp Ala Leu Gly Leu Leu Leu Phe  
 1 5 10 15

Leu Leu Pro Gly Ser Leu Gly Ala Glu Ser His Leu Ser Leu Leu Tyr  
 20 25 30

His Leu Thr Ala Val Ser Ser Pro Ala Pro Gly Thr Pro Ala Phe Trp  
 35 40 45

Val Ser Gly Trp Leu Gly Pro Gln Gln Tyr Leu Ser Tyr Asn Ser Leu

50

55

60

Arg Gly Glu Ala Glu Pro Cys Gly Ala Trp Val Trp Glu Asn Gln Val  
65 70 75 80

Ser Trp Tyr Trp Glu Lys Glu Thr Thr Asp Leu Arg Ile Lys Glu Lys  
85 90 95

Leu Phe Leu Glu Ala Phe Lys Ala Leu Gly Gly Lys Gly Pro Tyr Thr  
100 105 110

Leu Gln Gly Leu Leu Gly Cys Glu Leu Gly Pro Asp Asn Thr Ser Val  
115 120 125

Pro Thr Ala Lys Phe Ala Leu Asn Gly Glu Glu Phe Met Asn Phe Asp  
130 135 140

Leu Lys Gln Gly Thr Trp Gly Gly Asp Trp Pro Glu Ala Leu Ala Ile  
145 150 155 160

Ser Gln Arg Trp Gln Gln Gln Asp Lys Ala Ala Asn Lys Glu Leu Thr  
165 170 175

Phe Leu Leu Phe Ser Cys Pro His Arg Leu Arg Glu His Leu Glu Arg  
180 185 190

Gly Arg Gly Asn Leu Glu Trp Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu Lys  
195 200 205

Ala Arg Pro Ser Ser Pro Gly Phe Ser Val Leu Thr Cys Ser Ala Phe  
210 215 220

Ser Phe Tyr Pro Pro Glu Leu Gln Leu Arg Phe Leu Arg Asn Gly Leu  
225 230 235 240

Ala Ala Gly Thr Gly Gln Gly Asp Phe Gly Pro Asn Ser Asp Gly Ser  
 245 250 255

Phe His Ala Ser Ser Ser Leu Thr Val Lys Ser Gly Asp Glu His His  
 260 265 270

Tyr Cys Cys Ile Val Gln His Ala Gly Leu Ala Gln Pro Leu Arg Val  
 275 280 285

Glu Leu Glu Ser Pro Ala Lys Ser Ser Val Leu Val Val Gly Ile Val  
 290 295 300

Ile Gly Val Leu Leu Leu Thr Ala Ala Ala Val Gly Gly Ala Leu Leu  
 305 310 315 320

Trp Arg Arg Met Arg Ser Gly Leu Pro Ala Pro Trp Ile Ser Leu Arg  
 325 330 335

Gly Asp Asp Thr Gly Val Leu Leu Pro Thr Pro Gly Glu Ala Gln Asp  
 340 345 350

Ala Asp Leu Lys Asp Val Asn Val Ile Pro Ala Thr Ala  
 355 360 365

<210> 28  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 28

Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser  
 1 5 10 15

Gly Leu Glu Ala Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg  
 20 25 30

His Pro Ala Glu Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser  
 35 40 45

Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu  
 50 55 60

Arg Ile Glu Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp  
 65 70 75 80

Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp  
 85 90 95

Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile  
 100 105 110

Val Lys Trp Asp Arg Asp Met  
 115

<210> 29

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400> 29

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
 1 5

## 發明摘要

### 【發明名稱】（中文/英文）

具有促進抗原清除之 FcRn 結合域的治療性抗原結合分子  
/THERAPEUTIC ANTIGEN-BINDING MOLECULE WITH A  
FcRn-BINDING DOMAIN THAT PROMOTES ANTIGEN  
CLEARANCE

### 【中文】

本發明提供：於中性 pH 對於 Fc 新生兒受體 (FcRn) 具有增強的親和性之經改質 FcRn 結合域；包含上述 FcRn 結合域之抗原結合分子，其具有低免疫原性、高安定性以及僅形成少數凝集物；於中性或酸性 pH 具有增加的 FcRn 結合活性而於中性 pH 對於預存在之抗藥物抗體無增加的結合活性之經改質之抗原結合分子；上述抗原結合分子用於改良抗原結合分子媒介之抗原攝入至細胞的用途；上述抗原分子用於減少特定抗原之血漿濃度的用途；上述經改質之 FcRn 結合域用於增加抗原對可於其降解之前結合之單一抗原結合分子的總數的用途；上述經改質 FcRn 結合域用於改良抗原結合分子之藥物動力學的用途；用於降低對於預存在之抗藥抗體的結合活性的方法；以及用於製造上述抗原結合分子的方法。

## 【英文】

The present invention provides: a modified FcRn-binding domain having an enhanced affinity for the Fc Receptor neonatal (FcRn) at neutral pH; an antigen-binding molecule comprising said FcRn-binding domain, which has low immunogenicity, high stability and form only a few aggregates; a modified antigen-binding molecule having an increased FcRn-binding activity at neutral or acidic pH without an increased binding activity at neutral pH for a pre-existing anti-drug antibody; use of the antigen-binding molecules for improving antigen-binding molecule-mediated antigen uptake into cells; use of the antigen-binding molecules for reducing the plasma concentration of a specific antigen; use of the modified FcRn-binding domain for increasing the total number of antigens to which a single antigen-binding molecule can bind before its degradation; use of the modified FcRn-binding domain for improving pharmacokinetics of an antigen-binding molecule; methods for decreasing the binding activity for a pre-existing anti-drug antibody; and methods for producing said antigen-binding molecules.

**【代表圖】**

**【本案指定代表圖】**：圖 1A。

**【本代表圖之符號簡單說明】**：無。

**【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】**：  
無。

## 申請專利範圍

1. 一種抗原-結合分子，包含經改質 FcRn 結合域，其中該經改質 FcRn 結合域包含於選自下列所成群組之一個或多個位置之胺基酸取代：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 及 EU436，其中該數字顯示根據 EU 編號之取代位置。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之抗原-結合分子，其中該 FcRn 結合域具有
  - a) 胺基酸於位置 EU252 及 EU434 之胺基酸取代；以及
  - b) 於選自下列所成群組之一個或多個位置之胺基酸取代：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU256、EU258、EU286、EU387、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 及 EU436。
3. 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之抗原-結合分子，其中該經改質 FcRn 結合域包含
  - 於位置 EU238 之天冬胺酸，
  - 於位置 EU250 之纈胺酸，
  - 於位置 EU252 之酪胺酸，
  - 於位置 EU254 之蘇胺酸，
  - 於位置 EU255 之白胺酸，
  - 於位置 EU256 之麩胺酸，
  - 於位置 EU258 之天冬胺酸或異白胺酸，
  - 於位置 EU286 之麩胺酸，

於位置 EU307 之麩胺醯胺，

於位置 EU308 之脯胺酸，

於位置 EU309 之麩胺酸，

於位置 EU311 之丙胺酸或組胺酸，

於位置 EU315 之天冬胺酸，

於位置 EU428 之異白胺酸，

於位置 EU433 之丙胺酸、離胺酸、脯胺酸、精胺酸或絲胺酸，

於位置 EU434 之酪胺酸或色胺酸，及/或

於位置 EU436 之異白胺酸、白胺酸、纈胺酸、蘇胺酸或苯丙胺酸。

4. 如申請專利範圍第 2 項所述之抗原-結合分子，其中該 FcRn 結合域包含胺基酸於選自下列所成群組之一個或多個位置組合之胺基酸取代

a) EU252、EU434 及 EU436；

b) EU252、EU307、EU311 及 EU434；

c) EU252、EU315 及 EU434；

d) EU252、EU308 及 EU434；

e) EU238、EU252 及 EU434；

f) EU252、EU434、EU307、EU311 及 EU436；以及

g) EU252、EU387 及 EU434。

5. 如申請專利範圍第 4 項所述之抗原-結合分子，其中該 FcRn 結合域包含：

a) 於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU315 之天冬胺酸及於

位置 EU434 之酪胺酸；或

b)於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸及於位置 EU436 之異白胺酸；或

c)於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸及於位置 EU436 之白胺酸；或

d)於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸及於位置 EU436 之纈胺酸；或

e)於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU254 之蘇胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸及於位置 EU436 之異白胺酸。

6. 如申請專利範圍第 2 項所述之抗原-結合分子，其中該 FcRn 結合域包含於三個或更多個位置之胺基酸取代，其中該三個或多個位置係下列所成群組之組合之一者

a)EU252/EU434/EU307/EU311/EU286；

b)EU252/EU434/EU307/EU311/EU286/EU254；

c)EU252/EU434/EU307/EU311/EU436；

d)EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU254；

e)EU252/EU434/EU307/EU311/EU436/EU250；

f)EU252/EU434/EU308/EU250；

g)EU252/EU434/EU308/EU250/EU436；以及

h)EU252/EU434/EU308/EU250/EU307/EU311。

7. 如申請專利範圍第 6 項所述之抗原-結合分子，其中該 FcRn 結合域包含：

a)於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU286 之麩胺酸，於位置 EU307 之麩胺醯胺，於位置 EU311 之丙胺酸以及於位置

EU434 之酪胺酸；或

b)於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU254 之蘇胺酸，於位置 EU286 之麩胺酸，於位置 EU307 之麩胺醯胺，於位置 EU311 之丙胺酸及於位置 EU434 之酪胺酸；或

c)於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU307 之麩胺醯胺，於位置 EU311 之丙胺酸、於位置 EU434 之酪胺酸及於位置 436 之異白胺酸；或

d)於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU254 之蘇胺酸，於位置 EU286 之麩胺酸，於位置 EU307 之麩胺醯胺，於位置 EU311 之丙胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸及於位置 EU436 之異白胺酸；或

e)於位置 EU250 之纈胺酸，於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU254 之蘇胺酸，於位置 EU308 之脯胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸及於位置 EU436 之纈胺酸；或

f)於位置 EU250 纈胺酸，於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU307 麩胺醯胺，於位置 EU311 丙胺酸、於位置 EU434 酪胺酸及於位置 EU436 之纈胺酸；或

g)於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU307 之麩胺醯胺，於位置 EU311 之丙胺酸、於位置 EU434 之酪胺酸及於位置 EU436 之纈胺酸；或

h)於位置 EU250 之纈胺酸，於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU308 之脯胺酸及於位置 EU434 酪胺酸；或

i)於位置 EU250 之纈胺酸，於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU307 之麩胺醯胺，於位置 EU308 之脯胺酸，於位置

EU311 之丙胺酸及於位置 EU434 之酪胺酸。

8. 如申請專利範圍第 2 項所述之抗原-結合分子，其中該 FcRn 結合域包含於三個或更多個位置之胺基酸取代，其中該三個或多個位置係下列所成群組之組合之一者

a) EU252 及 EU434 及 EU307 及 EU311 及 EU436 及 EU286；

b) EU252 及 EU434 及 EU307 及 EU311 及 EU436 及 EU250 及 EU308；

c) EU252 及 EU434 及 EU307 及 EU311 及 EU436 及 EU250 及 EU286 及 EU308；

d) EU252 及 EU434 及 EU307 及 EU311 及 EU436 及 EU250 及 EU286 及 EU308 及 EU428。

9. 如申請專利範圍第 8 項所述之抗原-結合分子，其中該 FcRn 結合域包含：

a) 於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU286 之麩胺酸，於位置 EU307 之麩胺醯胺，於位置 EU311 之丙胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸及於位置 EU436 之纈胺酸；或

b) 於位置 EU250 之纈胺酸，於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU307 之麩胺醯胺，於位置 EU308 之脯胺酸，於位置 EU311 之丙胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸及於位置 EU436 之纈胺酸；或

c) 於位置 EU250 之纈胺酸，於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU286 之麩胺酸，於位置 EU307 之麩胺醯胺，於位置 EU308 之脯胺酸，於位置 EU311 之丙胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸及於位置 EU436 之纈胺酸；或

d)於位置 EU250 之纈胺酸，於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU286 之麩胺酸，於位置 EU307 之麩胺醯胺，於位置 EU308 之脯胺酸，於位置 EU311 之丙胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸及於位置 EU436 之纈胺酸。

10.如申請專利範圍第 2 項所述之抗原-結合分子，其中該 FcRn 結合域包含於三個或更多個位置之胺基酸取代，其中該三個或多個位置係下列所成群組之組合之一者：

a)EU434 及 EU307 及 EU311；

b)EU434 及 EU307 及 EU309 及 EU311；或

c)EU434 及 EU250 及 EU252 及 EU436。

11.如申請專利範圍第 10 項所述之抗原-結合分子，其中該 FcRn 結合域包含：

a)於位置 EU307 之麩胺醯胺，於位置 EU311 之組胺酸及於位置 EU434 之酪胺酸；或

b)於位置 EU307 之麩胺醯胺，於位置 EU309 之麩胺酸，於位置 EU311 丙胺酸及於位置 EU434 之酪胺酸；或

c)於位置 EU307 之麩胺醯胺，於位置 EU309 之麩胺酸，於位置 EU311 之組胺酸及於位置 EU434 酪胺酸；或

d)於位置 EU250 之纈胺酸；於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸及於位置 EU436 之纈胺酸。

12.如申請專利範圍第 1 至 11 項中任一項所述之抗原-結合分子，其中該高分子量物之比例低於 2%。

13.如申請專利範圍第 1 至 12 項中任一項所述之抗原-結合分子，其中該抗原-結合分子包含具有下述者之抗原-結合域

- a)對於抗原於 pH5.5 至 6.5 具有相較於 pH7 至 8 為較低之結合活性或
- b)對於抗原「鈣濃度-依賴性結合活性」。
- 14.如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項所述之抗原-結合分子，其中該結合分子對於該 FcRn 之結合活性於 pH7 為 50 至 150nM，Tm 為高於 63.0°C 及 Epibase 分數低於 250。
- 15.如申請專利範圍第 1 至 3 項及 6 至 7 項中任一項所述之抗原-結合分子，其中該結合分子對於 FcRn 之結合活性於 pH7 為 15 至 50nM，Tm 為高於 60°C 及 Epibase 分數低於 500。
- 16.如申請專利範圍第 1 至 3 項及 8 至 9 項中任一項所述之抗原-結合分子，其中該結合分子對於 FcRn 之結合活性於 pH7 為強於 15nM，Tm 為高於 57.5°C 及 Epibase 分數低於 500。
- 17.如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項所述之抗原-結合分子，其中
- 該 FcRn 結合域包含胺基酸取代於
- a)於該位置 EU238、EU255 及/或 EU258，以及
- b)於三個或更多個位置，其中該三個或更多個位置為表 4 至表 7 所示組合之一者。
- 18.如申請專利範圍第 1 至 17 項中任一項所述之抗原-結合分子，其中
- a)於該 FcRn 結合域之位置 EU257 之胺基酸不為選自下列所成群組之胺基酸：丙胺酸、纈胺酸、異白胺酸、白胺酸及蘇胺酸，及/或
- b)於該 FcRn 結合域之位置 EU252 之胺基酸不為色胺酸。

- 19.如申請專利範圍第 1 至 18 項中任一項所述之抗原-結合分子，其中該抗原-結合分子對於預先存在之抗藥物抗體具有結合活性，相較於包含完整 FcRn 結合域之對照抗體得結合親和性，該預先存在之抗藥物抗體不顯著增加。
- 20.如申請專利範圍第 19 項所述之抗原-結合分子，其中該 FcRn 結合域進一步包含於選自下列所成群組之一個或多個位置之胺基酸取代：EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438 及 EU440。
- 21.如申請專利範圍第 20 項所述之抗原-結合分子，其中該 FcRn 結合域包含選自下列所成群組之一個或多個胺基酸取代於位置 EU387 之精胺酸；  
於位置 EU422 之麩胺酸，精胺酸，或絲胺酸，天冬胺酸，離胺酸，蘇胺酸或麩胺醯胺；  
於位置 EU424 之麩胺酸或精胺酸，離胺酸或天冬醯胺；  
於位置 EU426 之天冬胺酸，麩胺醯胺，丙胺酸或酪胺酸；  
於位置 EU433 之天冬胺酸；  
於位置 EU436 之蘇胺酸；  
於位置 EU438 之麩胺酸，精胺酸，絲胺酸或離胺酸；以及  
於位置 EU440 之麩胺酸，天冬胺酸或麩胺醯胺。
- 22.如申請專利範圍第 1 至 21 項中任一項所述之抗原-結合分子，其中該經改質 FcRn 結合域包含三個或更多個取代，其中該三個或更多個取代為表 12 至表 13 所示組合之一者。
- 23.如申請專利範圍第 1 至 22 項中任一項所述之抗原-結合分子，其中該經改質 FcRn 結合域包含三個或更多個取代，其

中該三個或更多個取代為表 14 至表 15 所示組合之一者。

24. 如申請專利範圍第 20 至 23 項中任一項所述之抗原-結合分子，其中該 FcRn 結合域包含：

a) 於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU387 之精胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸及於位置 EU436 之纈胺酸；或

b) 於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU422 之麩胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸及於位置 EU436 之纈胺酸；或

c) 於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU422 之精胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸及於位置 EU436 之纈胺酸；或

d) 於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU422 之絲胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸及於位置 EU436 之纈胺酸；或

e) 於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU424 之麩胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸及於位置 EU436 之纈胺酸；或

f) 於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU424 之精胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸及於位置 EU436 之纈胺酸；或

g) 於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸，於位置 EU436 之纈胺酸及於位置 EU438 之麩胺酸；或

h) 於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸，於位置 EU436 之纈胺酸及於位置 EU438 精胺酸；或

i) 於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸，於位置 EU436 之纈胺酸及於位置 EU438 之絲胺酸；或

j) 於位置 EU252 之酪胺酸，於位置 EU434 之酪胺酸，於位置 EU436 之纈胺酸及於位置 EU440 之麩胺酸。

25. 如申請專利範圍第 1 至 24 項中任一項所述之抗原-結合分

子，其中該抗原結合分子為抗體。

26. 一種申請專利範圍第 1 至 25 項中任一項所述之抗原-結合分子之用途，係用於改良抗原-結合分子-媒介之抗原攝入至細胞。
27. 一種申請專利範圍第 1 至 25 項中任一項所述之抗原-結合分子之用途，係用於降低特定抗原的血漿濃度，其中該抗原-結合分子包含可結合該抗原之抗原-結合域。
28. 一種用於改良抗原-結合分子之藥物動力學的方法，包含於選自下列所成群組之一個或多個位置將胺基酸取代導入該抗原-結合分子之 FcRn 結合域的步驟：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 及 EU436。
29. 一種用以延遲對象中抗原-結合分子之清除的方法，包含於選自下列所成群組之一個或多個位置將胺基酸取代導入該抗原-結合分子之 FcRn 結合域的步驟：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 及 EU436。
30. 一種延長抗原-結合分子之血漿滯留時間的方法，包含於選自下列所成群組之一個或多個位置將胺基酸取代導入該抗原-結合分子之 FcRn 結合域的步驟：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 及 EU436。
31. 一種增加抗原-結合分子之血漿抗原-清除速率的方法包含於選自下列所成群組之一個或多個位置將胺基酸取代導入

該抗原-結合分子之 FcRn 結合域的步驟：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 及 EU436。

32. 一種增加抗原-結合分子清除血漿抗原的能力，包含於選自下列所成群組之一個或多個位置將胺基酸取代導入該抗原-結合分子之 FcRn 結合域的步驟：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 及 EU436。

33. 如申請專利範圍第 28 至 32 項中任一項所述之方法，其中進一步於位置 EU256 將胺基酸取代導入該 FcRn 結合域。

34. 如申請專利範圍第 28 至 33 項中任一項所述之方法，其中該方法進一步包含於選自下列所成群組之一個或多個位置將胺基酸取代導入該 FcRn 結合域之步驟：EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438 及 EU440。

35. 一種製造申請專利範圍第 1 至 25 項中任一項所述之抗原-結合分子的方法，包含下列步驟

(a) 選擇親代 FcRn 結合域且藉由於選自下列所成群組之一個或多個位置導入胺基酸取代而改變親代 FcRn：EU238、EU250、EU252、EU254、EU255、EU258、EU286、EU307、EU308、EU309、EU311、EU315、EU428、EU433、EU434 及 EU436；

(b) 選擇抗原-結合分子之抗原-結合域且改變至少一個抗原-結合域之胺基酸以獲得 pH-依賴性抗原-結合域或鈣-離子依賴性抗原-結合域；

(c)獲得編碼抗原-結合分子之基因，其中該人類 FcRn 結合域與抗原-結合域係於(a)及(b)中製備與連接以及  
(d)使用於(c)中製備之基因製造抗原-結合分子。

36.如申請專利範圍第 35 項所述之方法，其中步驟(a)進一步將位置 EU256 胺基酸取代導入至該 FcRn 結合域。

37.如申請專利範圍第 35 至 36 項中任一項之方法，其中該方法進一步包含於選自下列所成群組之一個或多個位置將胺基酸取代導入至該 FcRn 結合域之步驟：EU387、EU422、EU424、EU426、EU433、EU436、EU438 及 EU440。



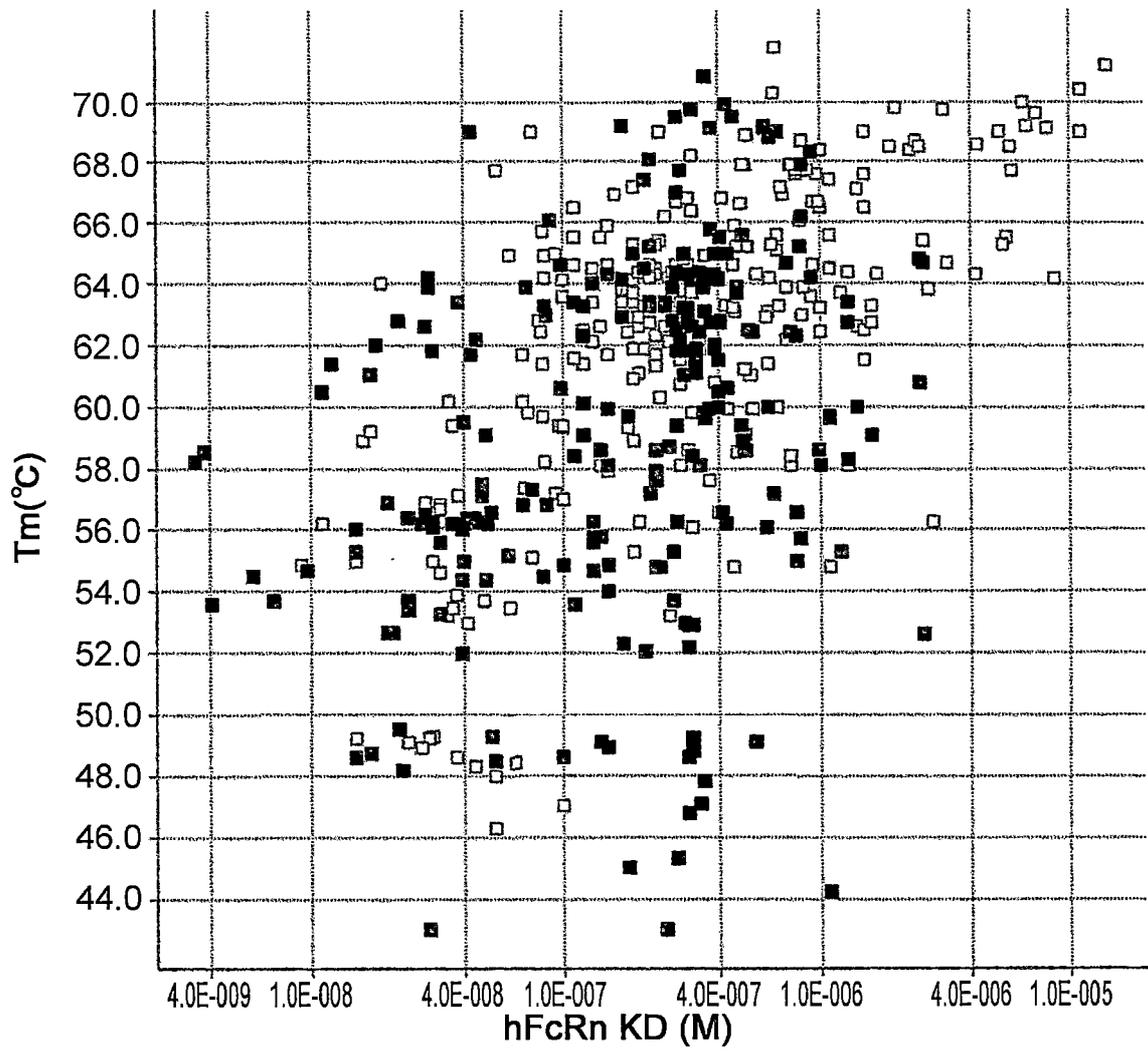


圖 2

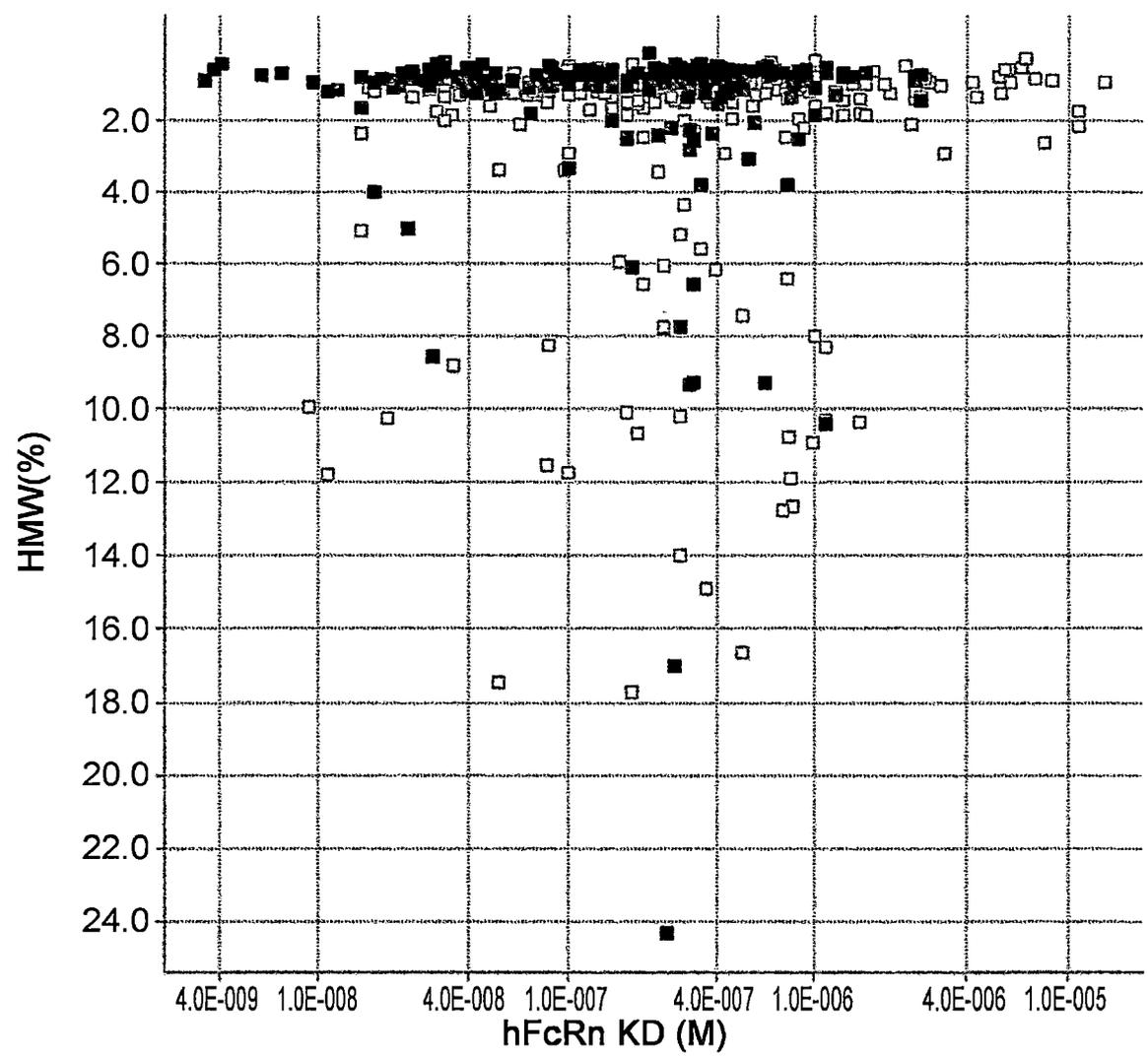


圖 3

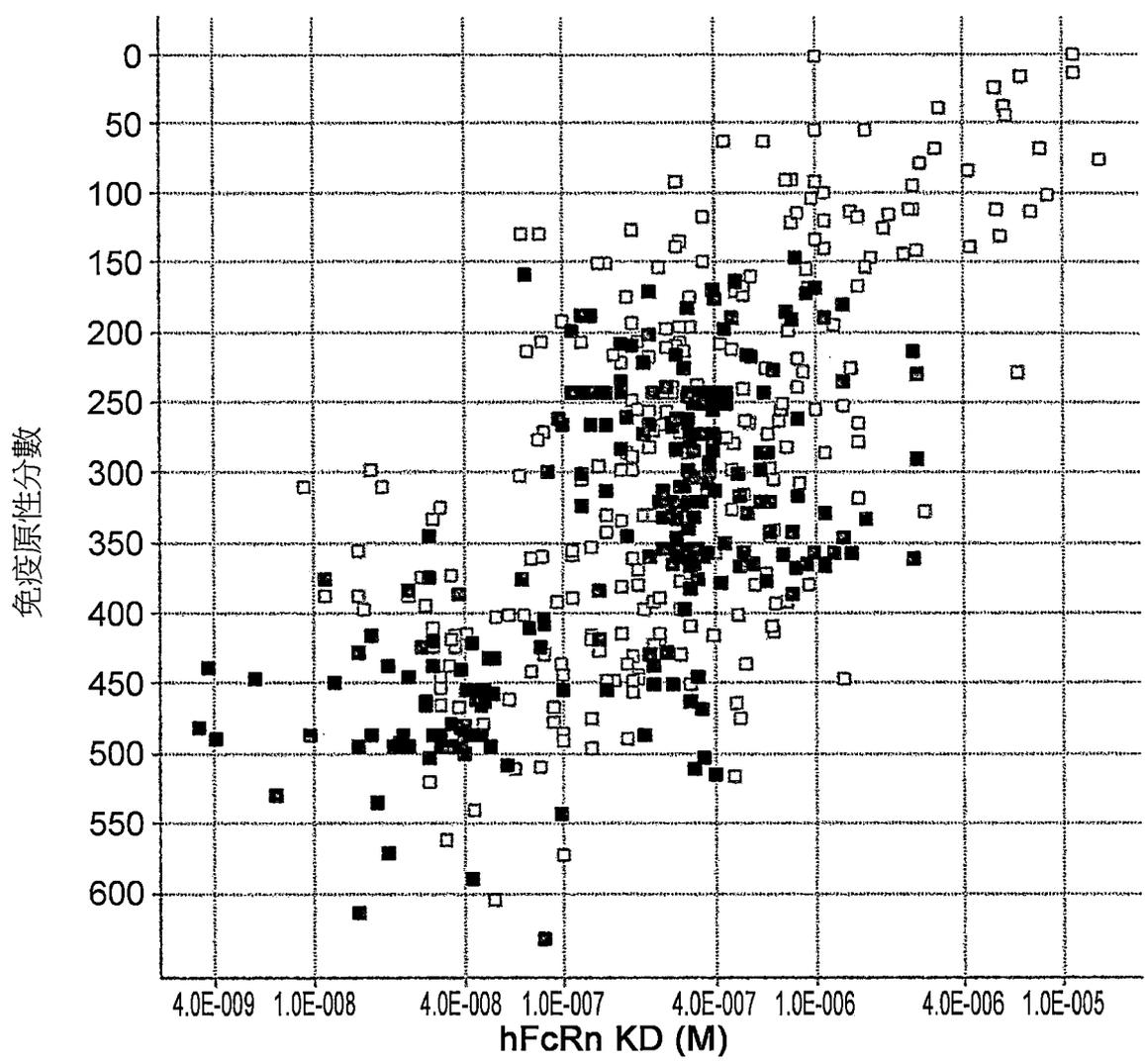


圖 4

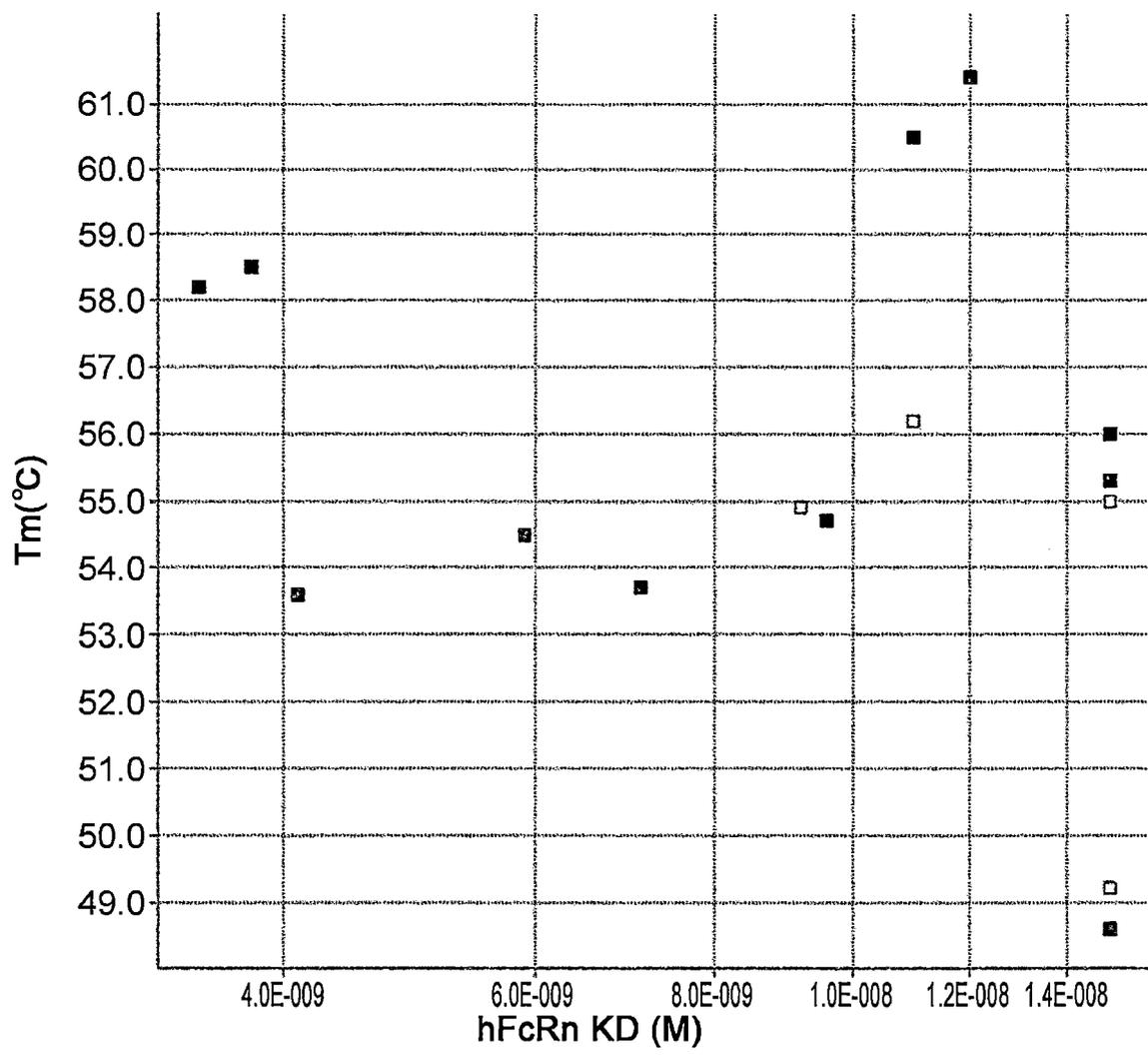


圖 5

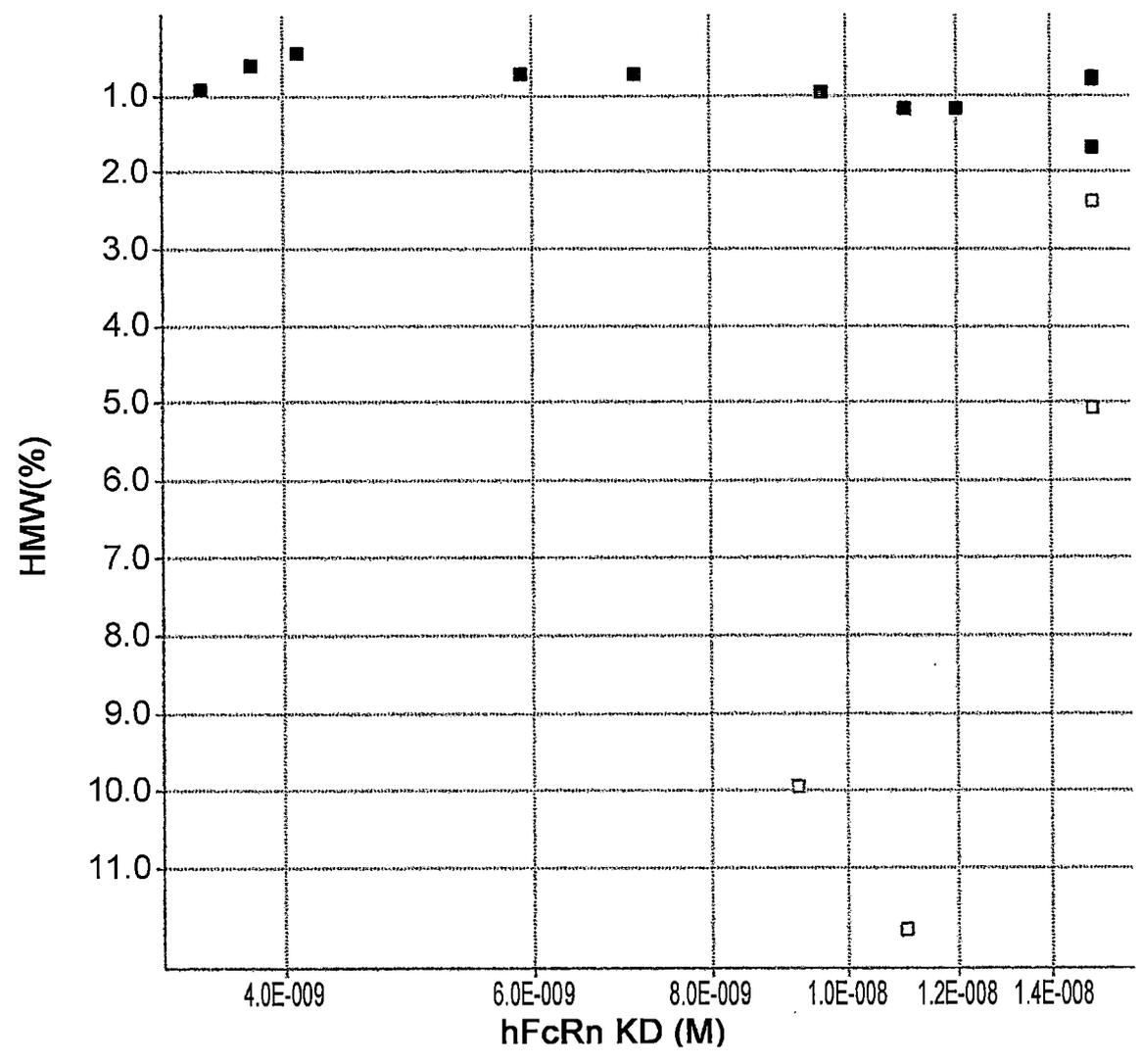


圖 6

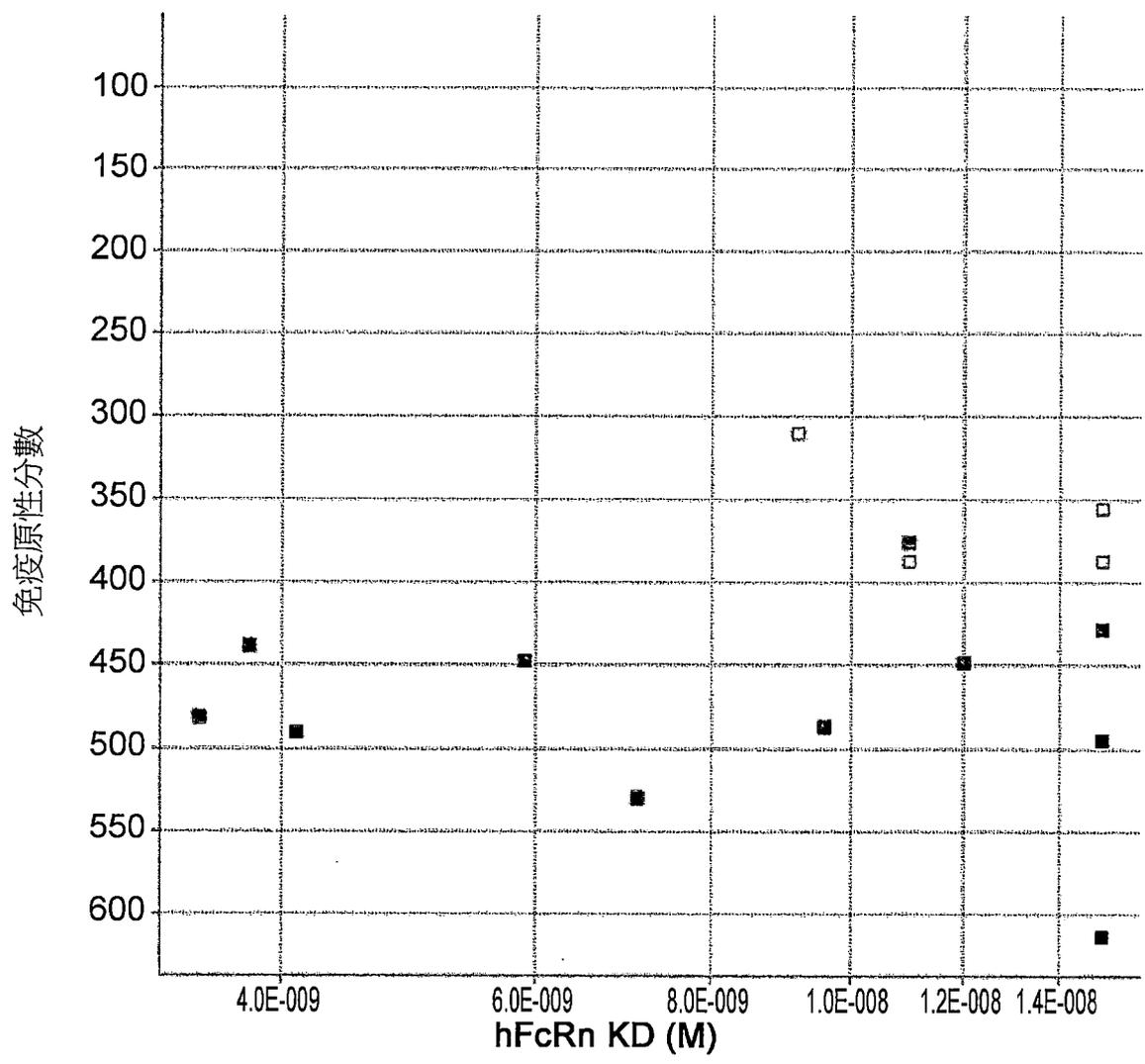


圖 7

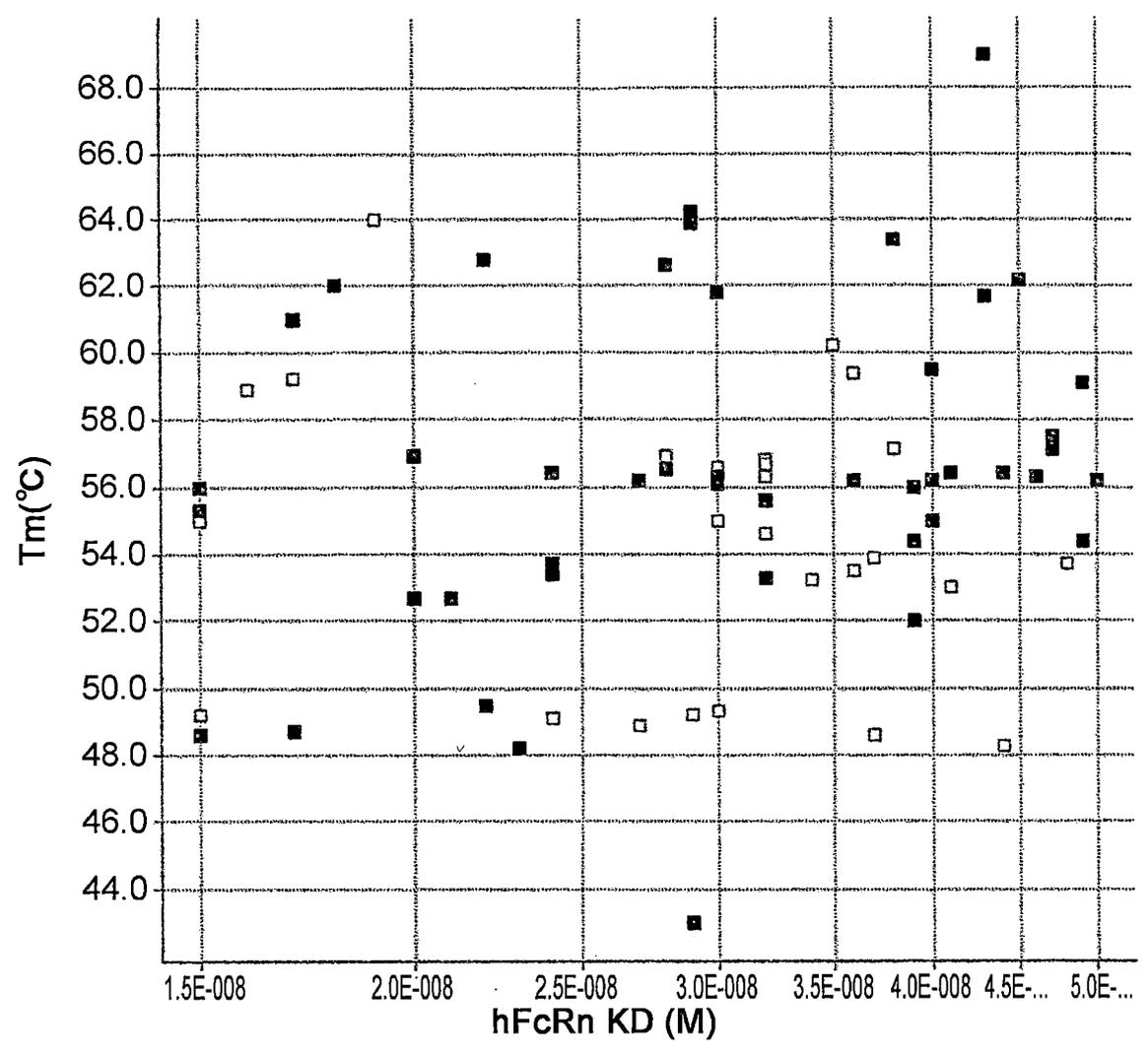


圖 8

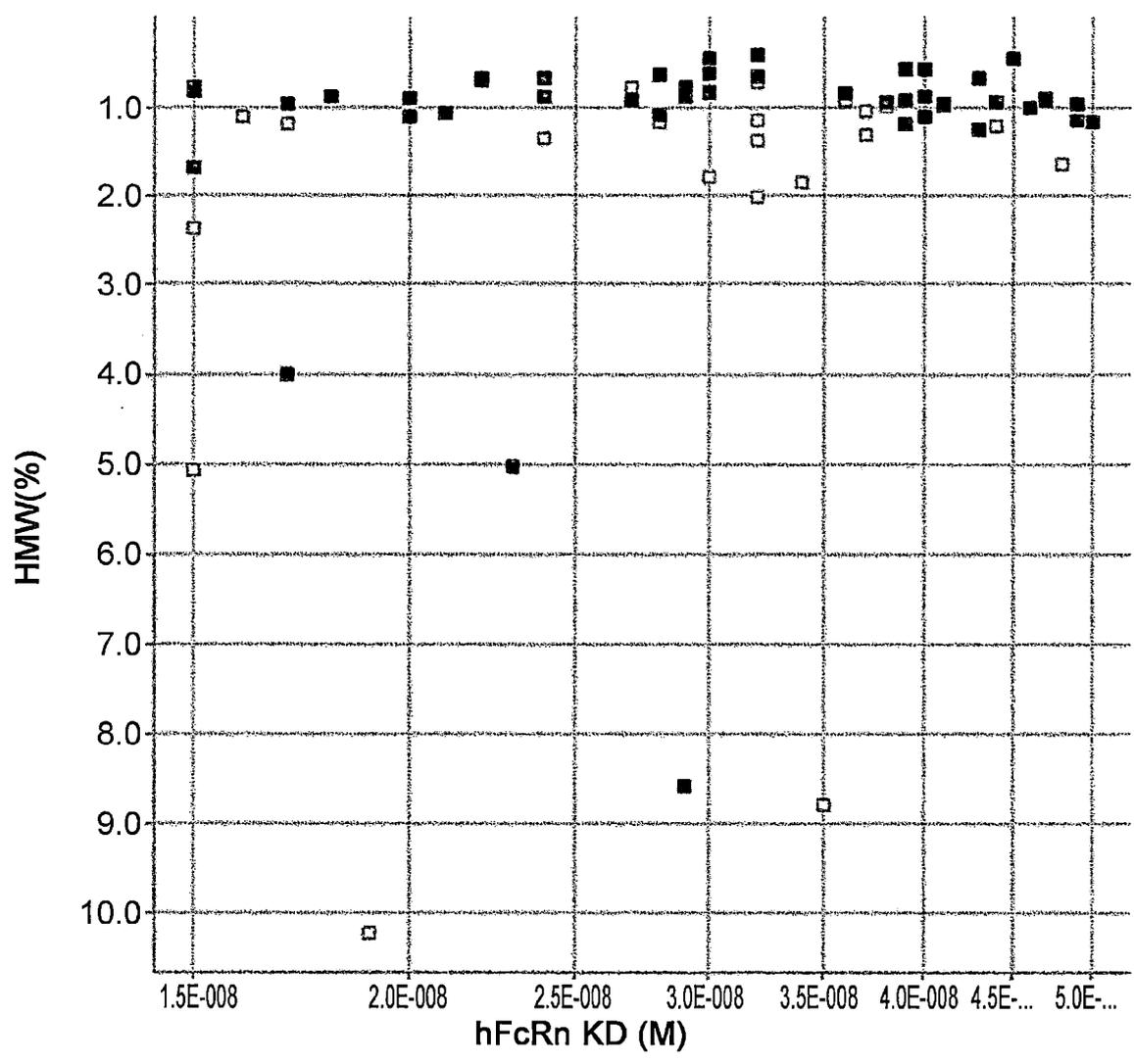


圖 9

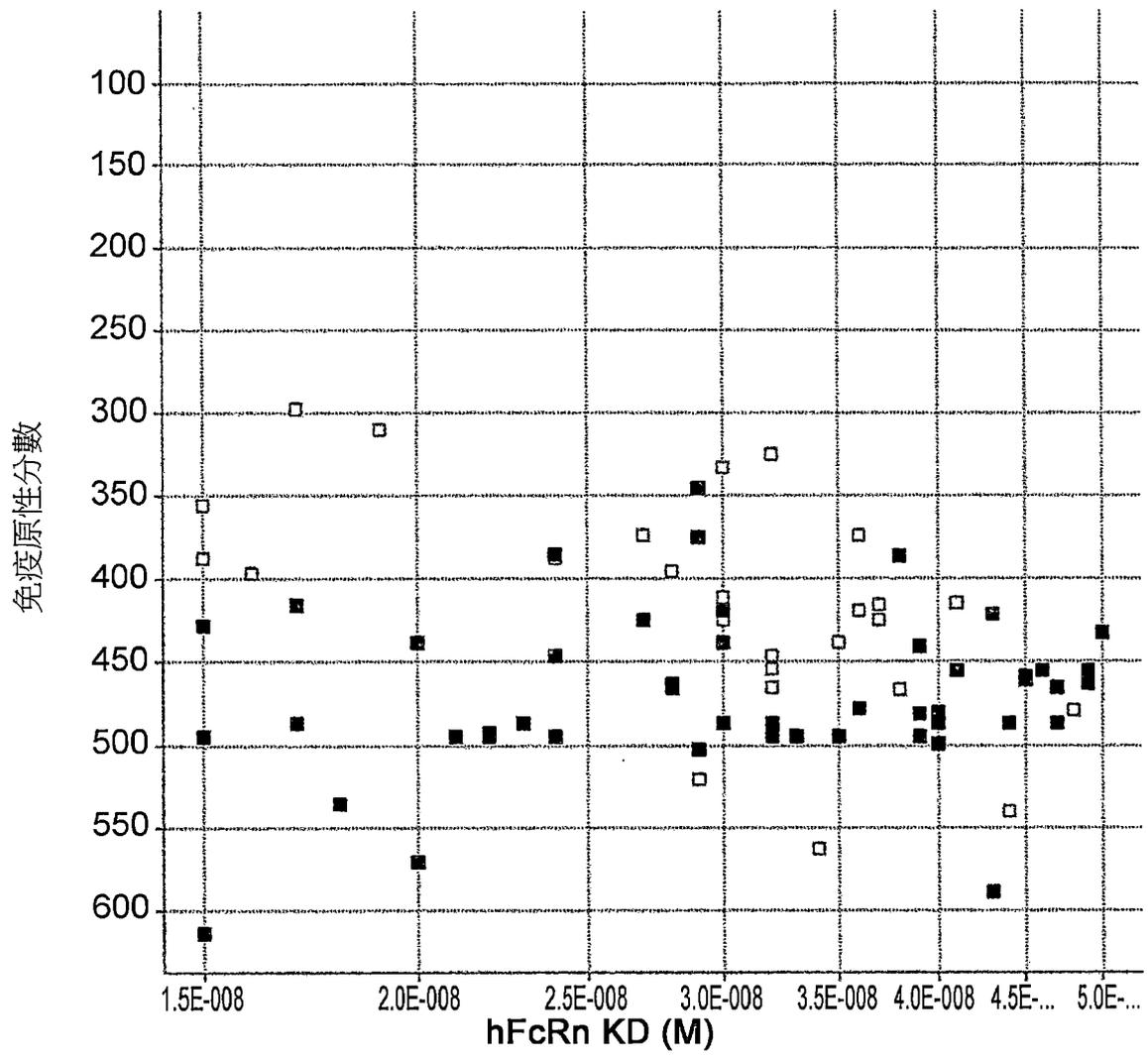


圖 10

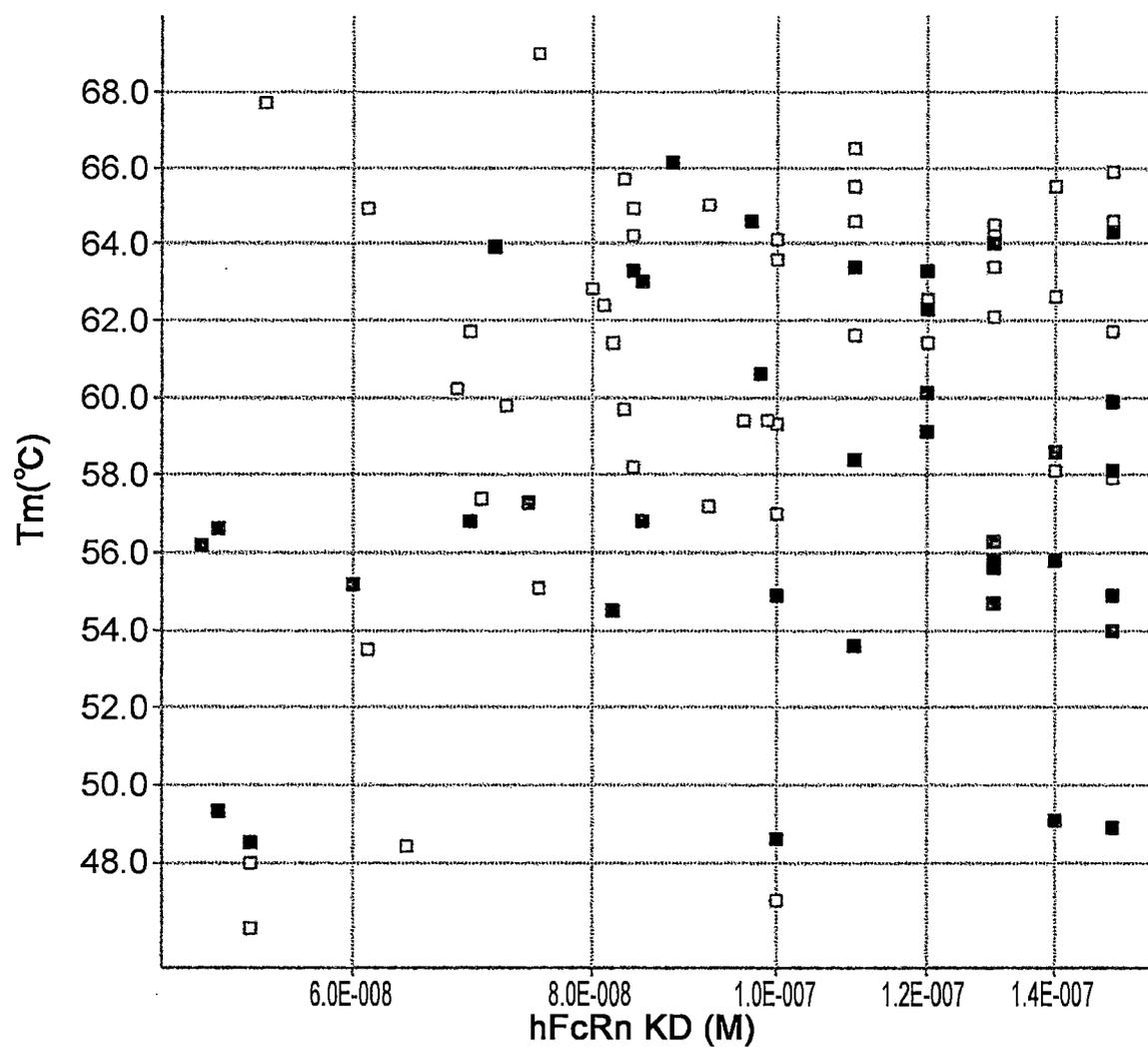


圖 11





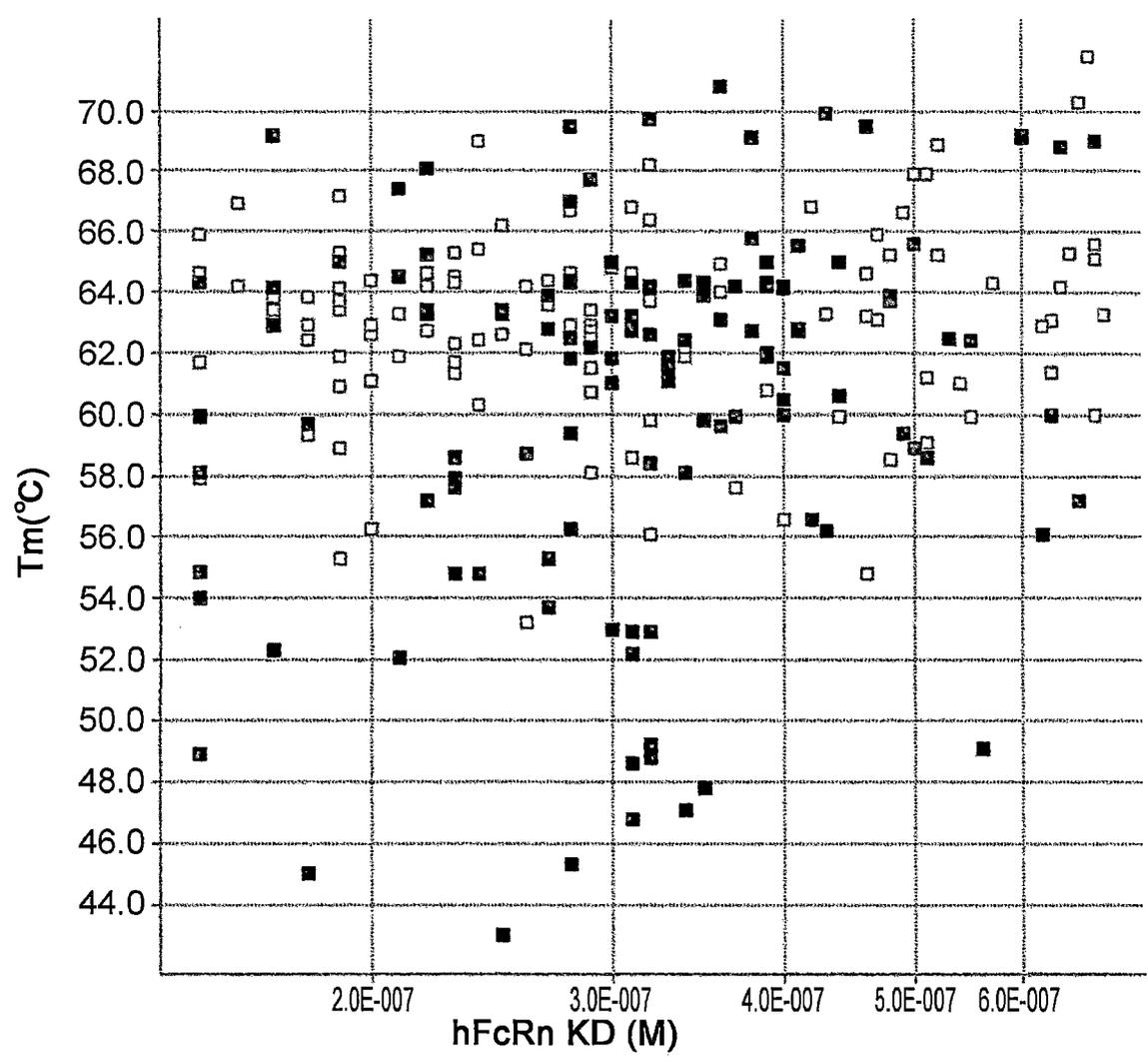


圖 14

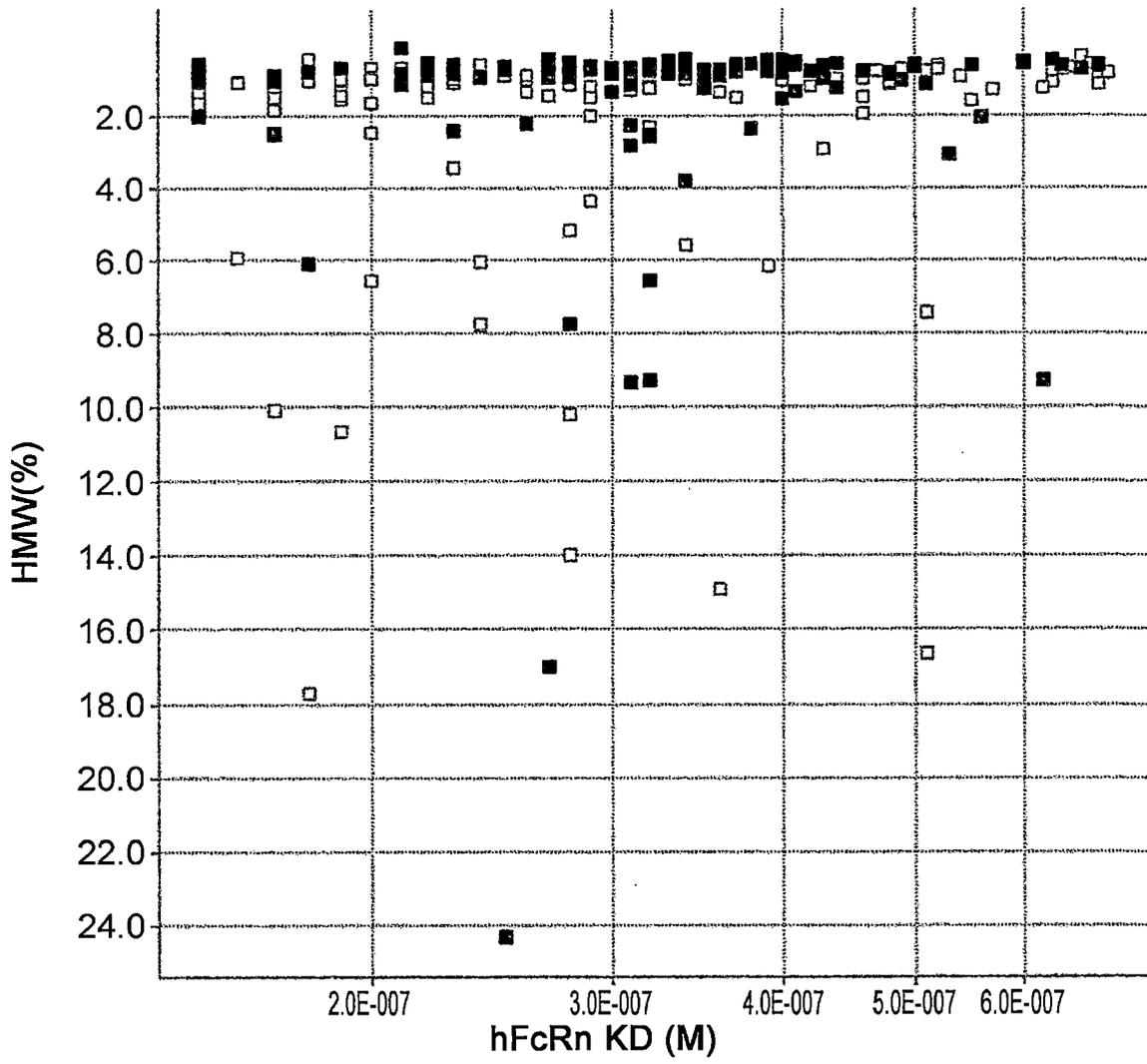


圖 15

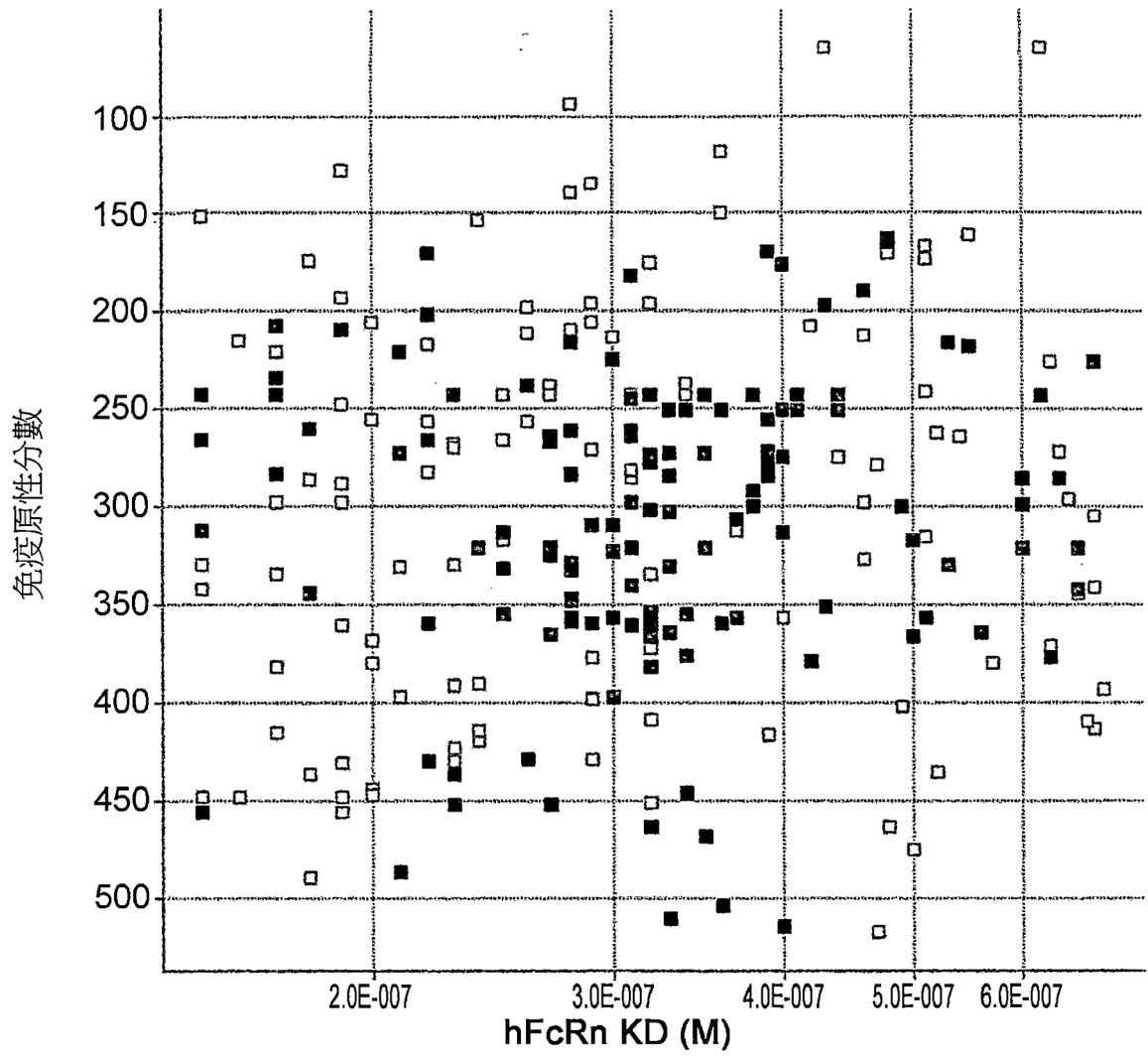


圖 16

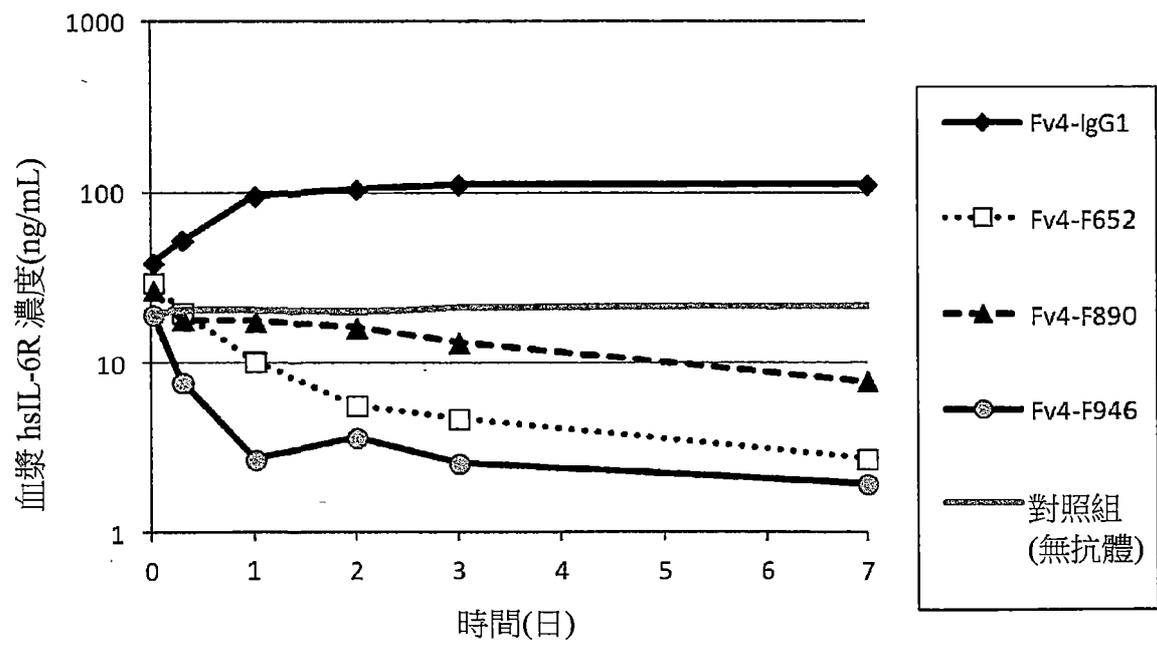


圖 17

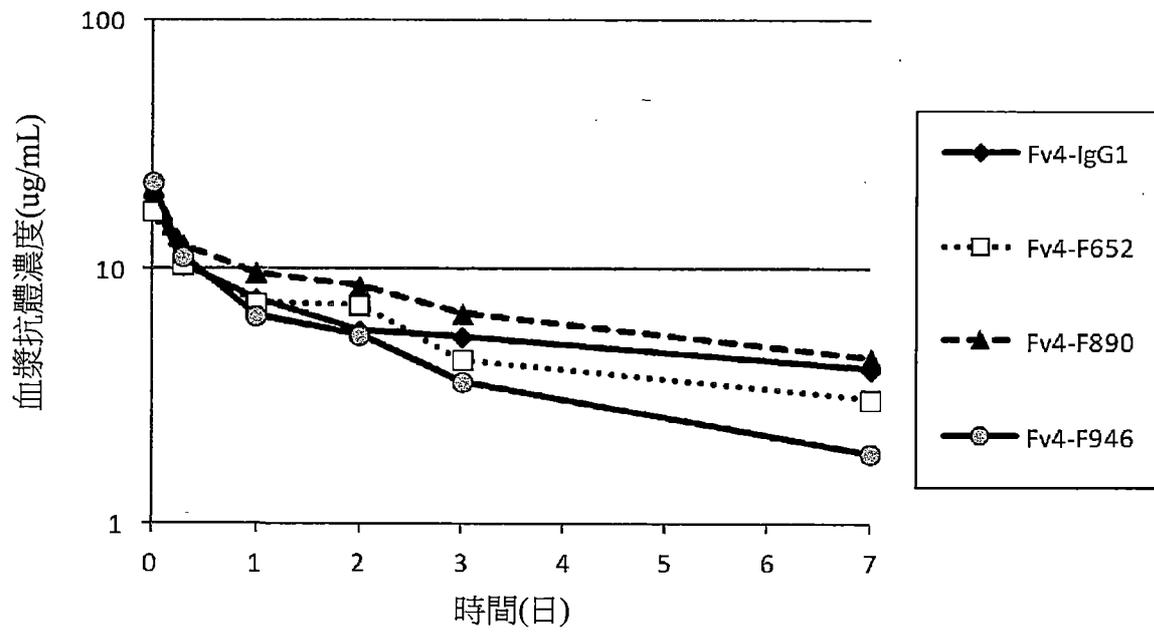


圖 18

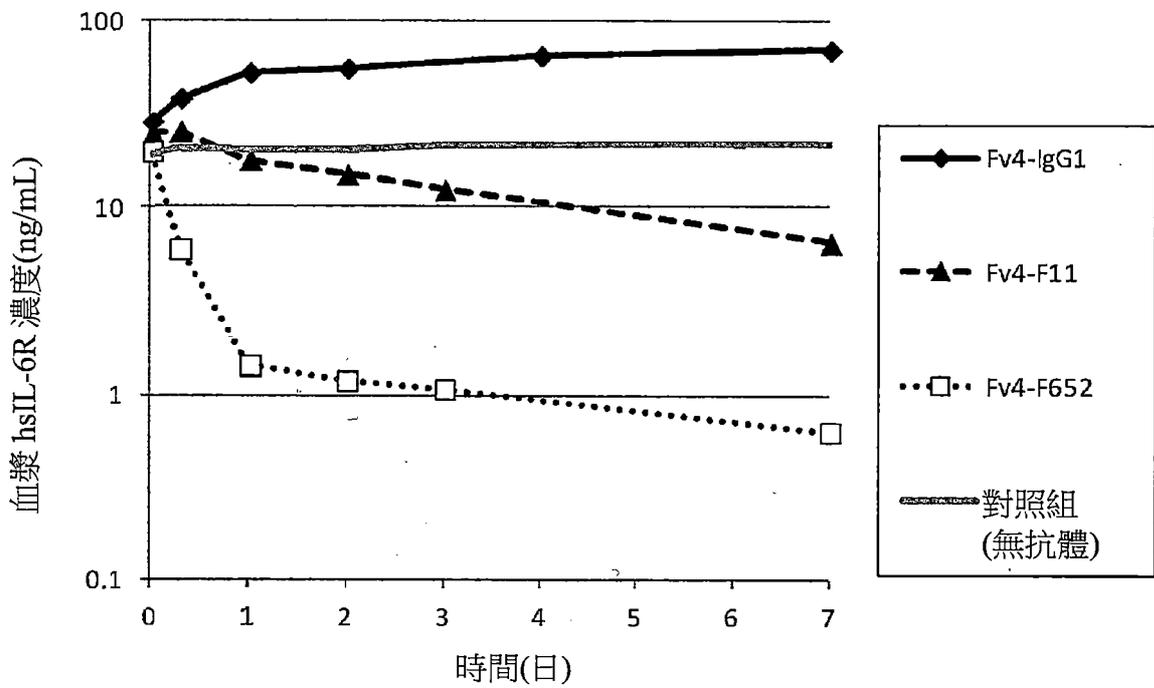


圖 19

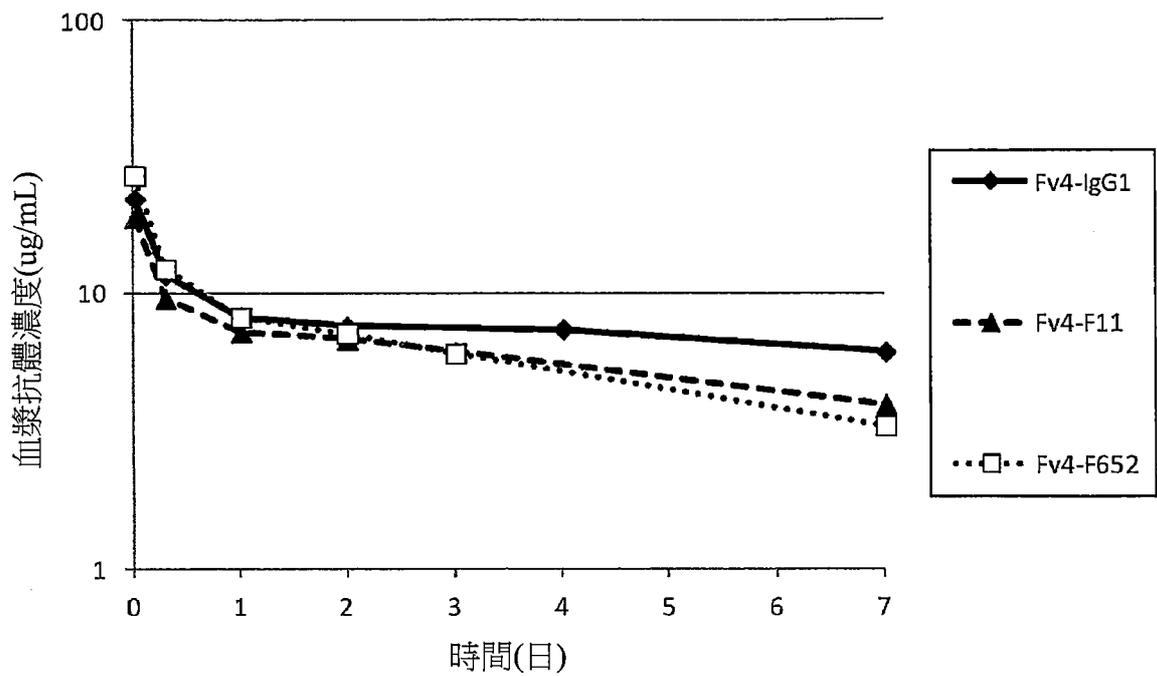


圖 20

hIgG1

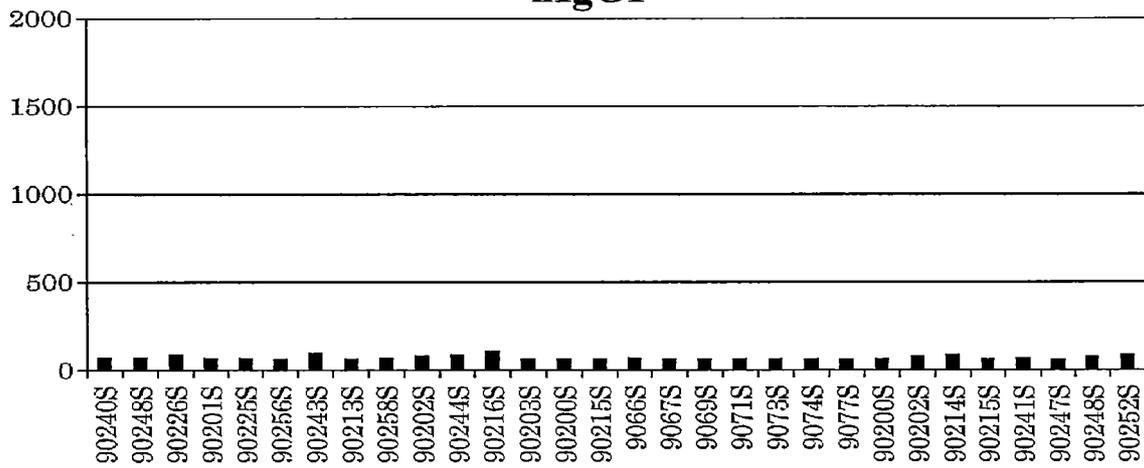


圖 21-1

YTE

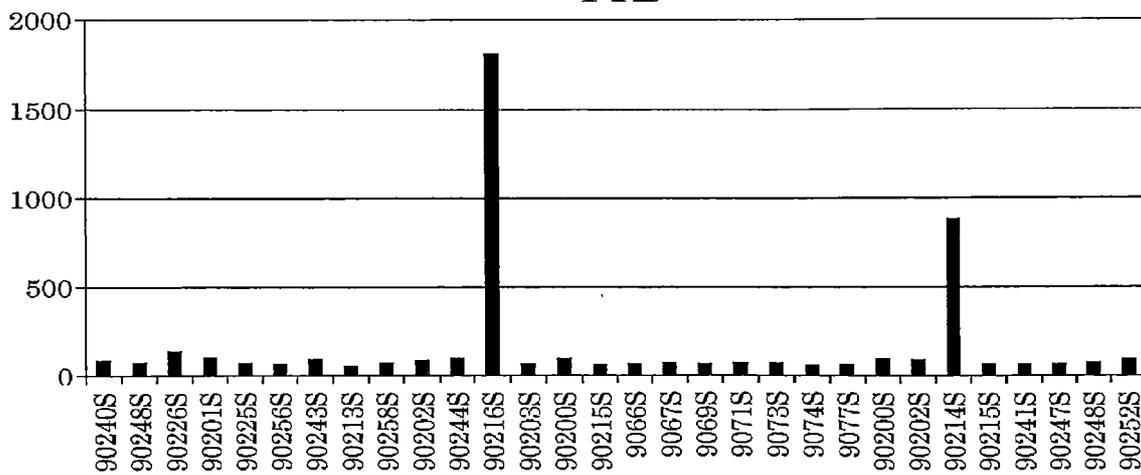


圖 21-2

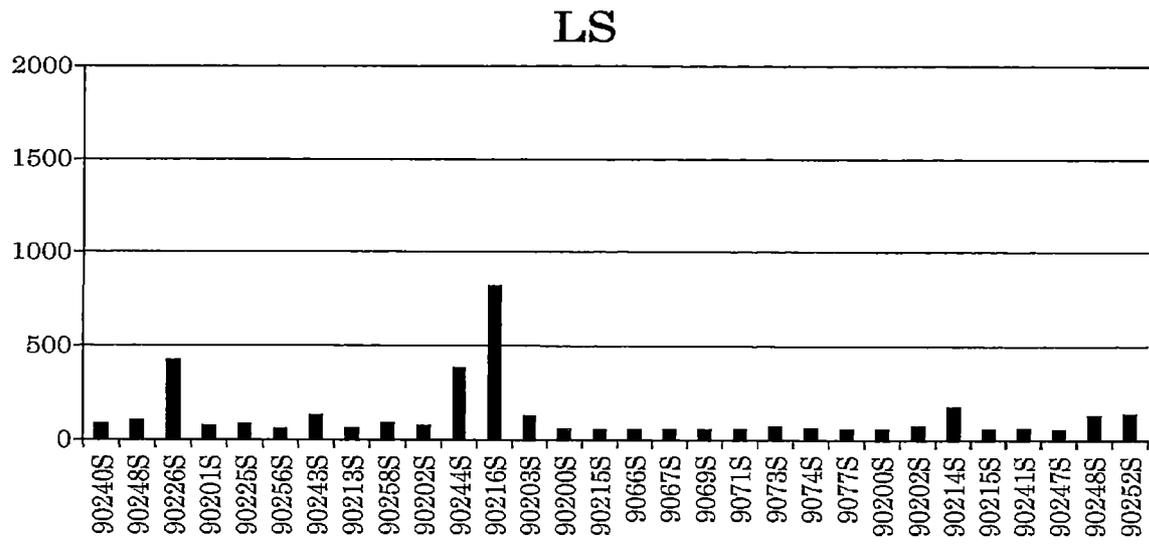


圖 21-3

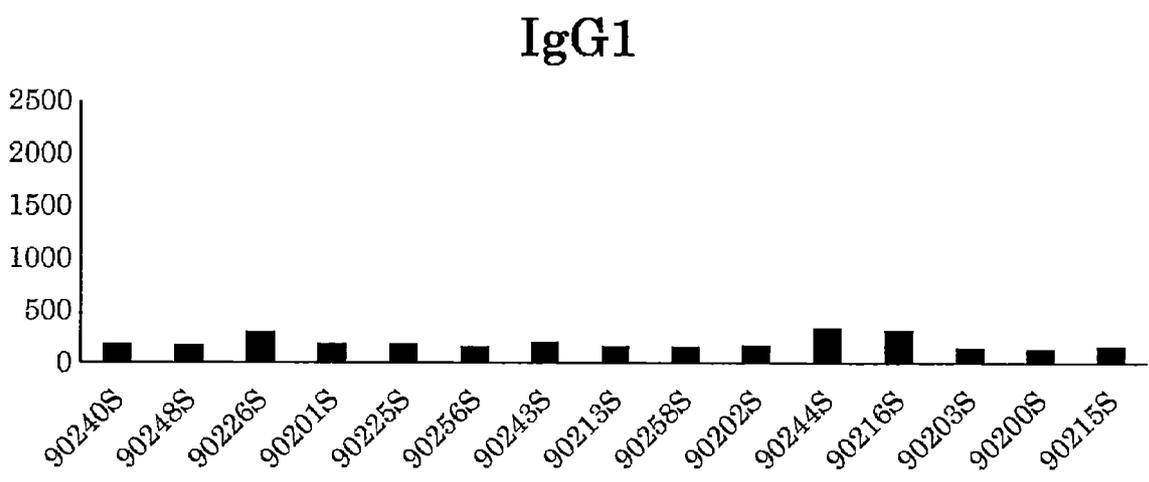


圖 22-1

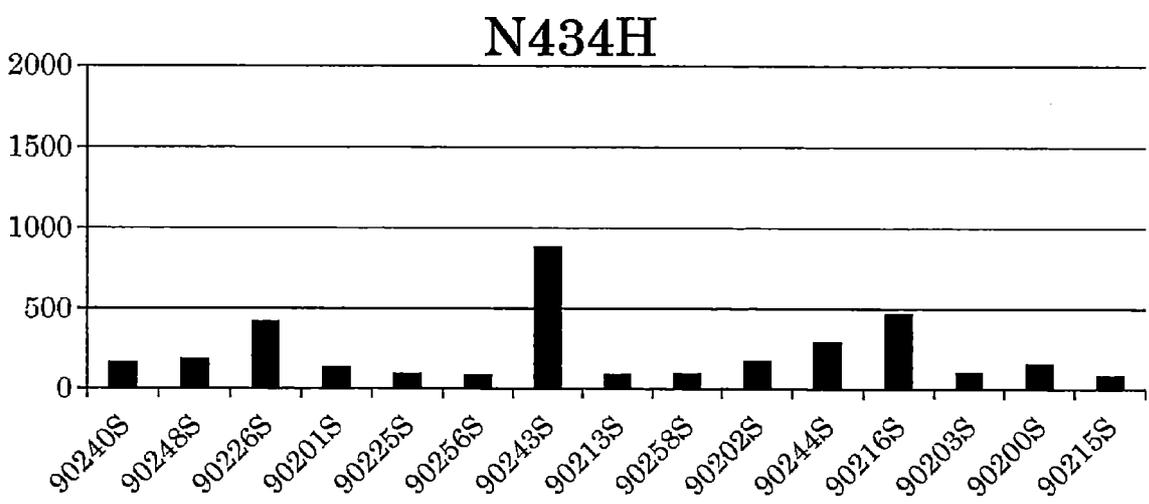


圖 22-2

### F11

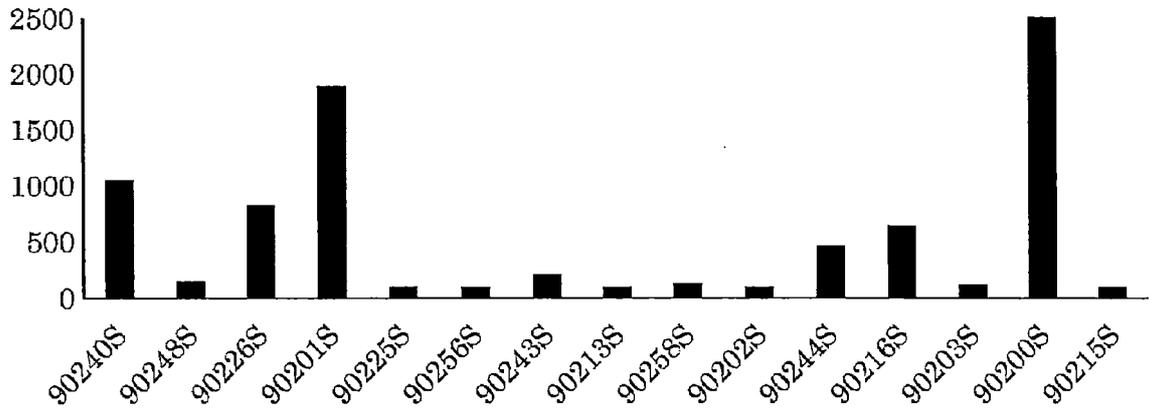


圖 22-3

### F68

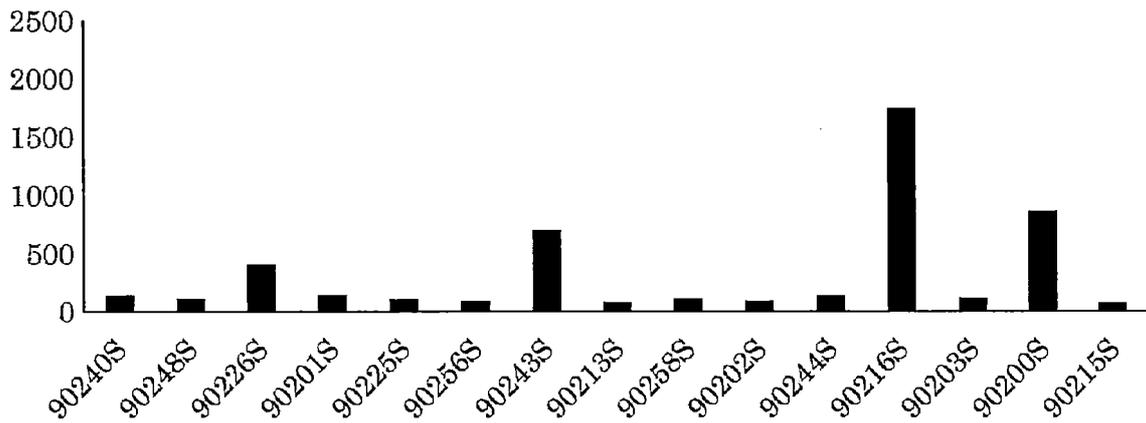


圖 22-4

### F890

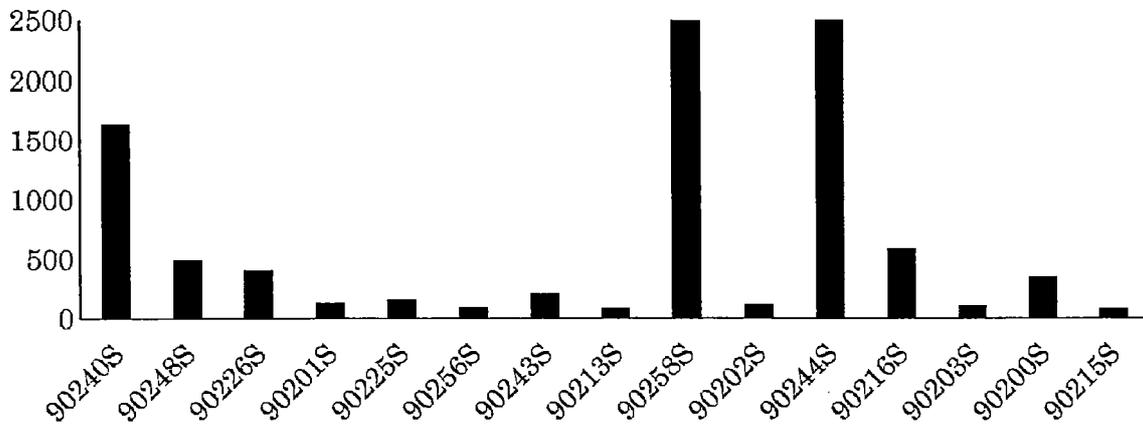


圖 22-5

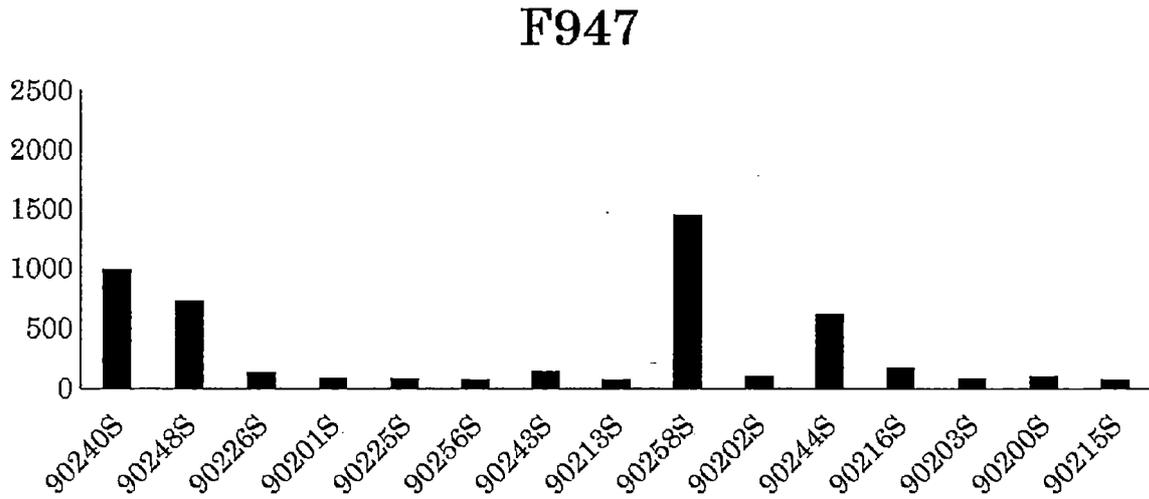


圖 22-6

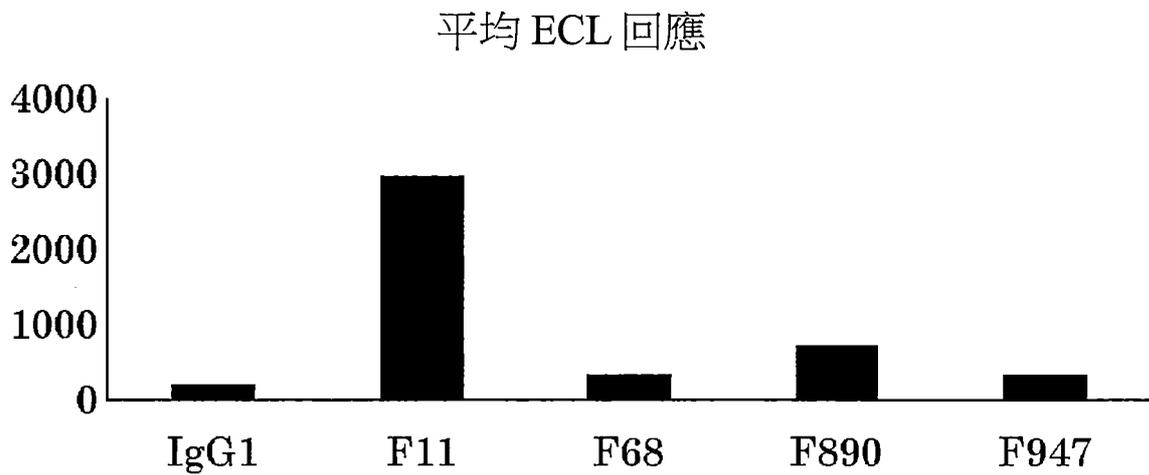


圖 23-1

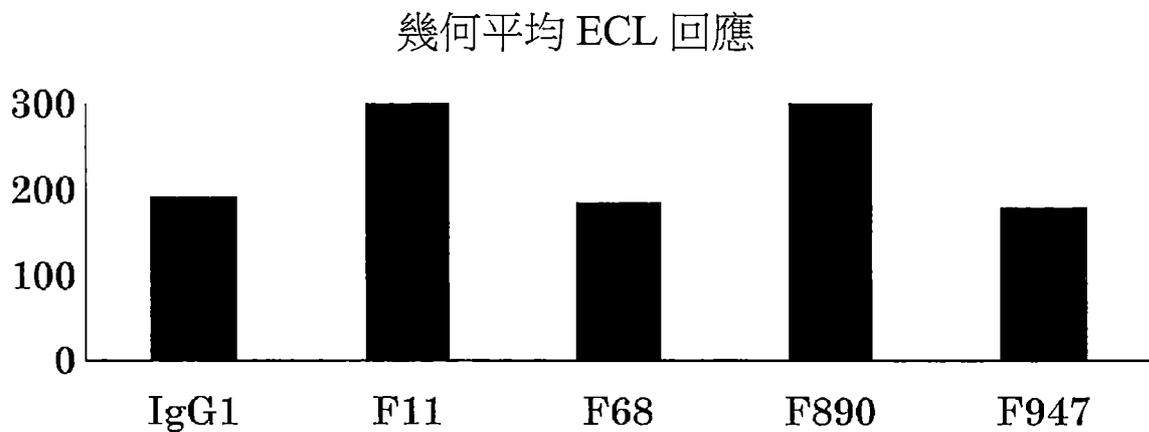


圖 23-2

中值 ECL 回應

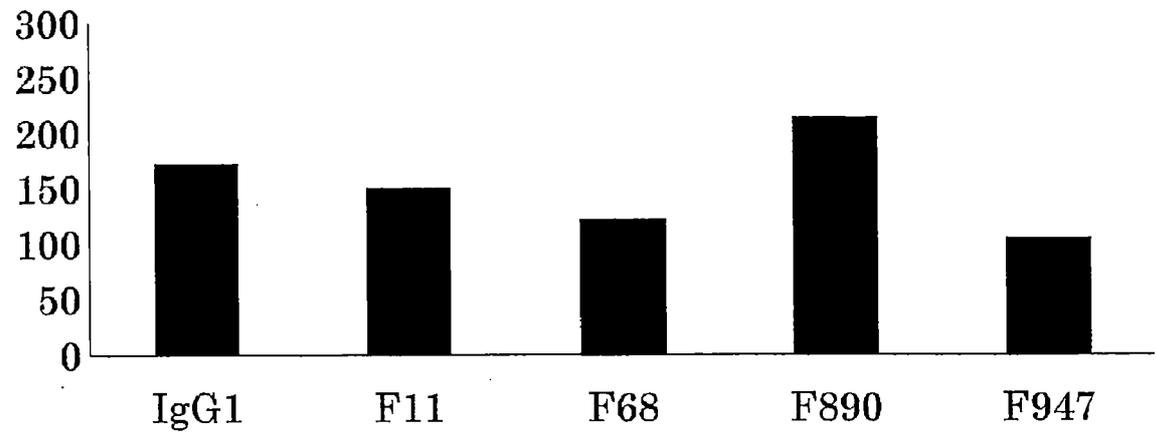


圖 23-3

IgG1

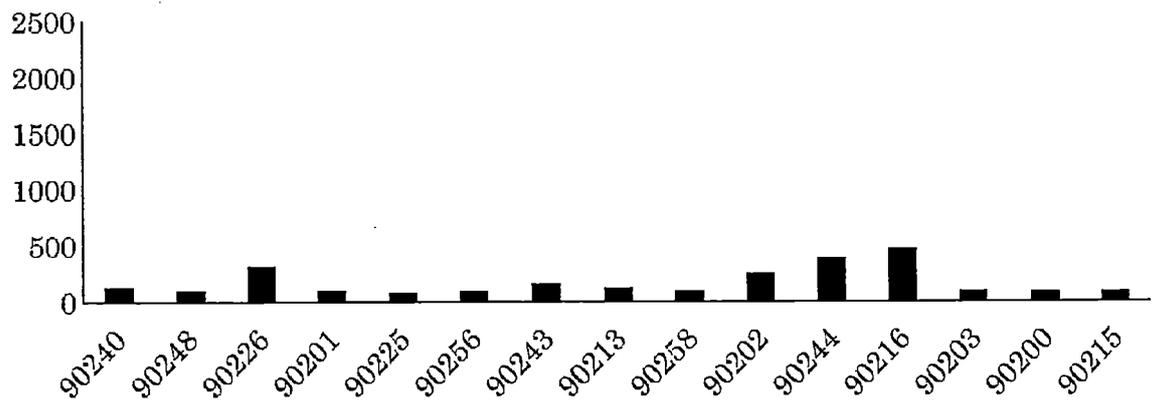


圖 24-1

F890

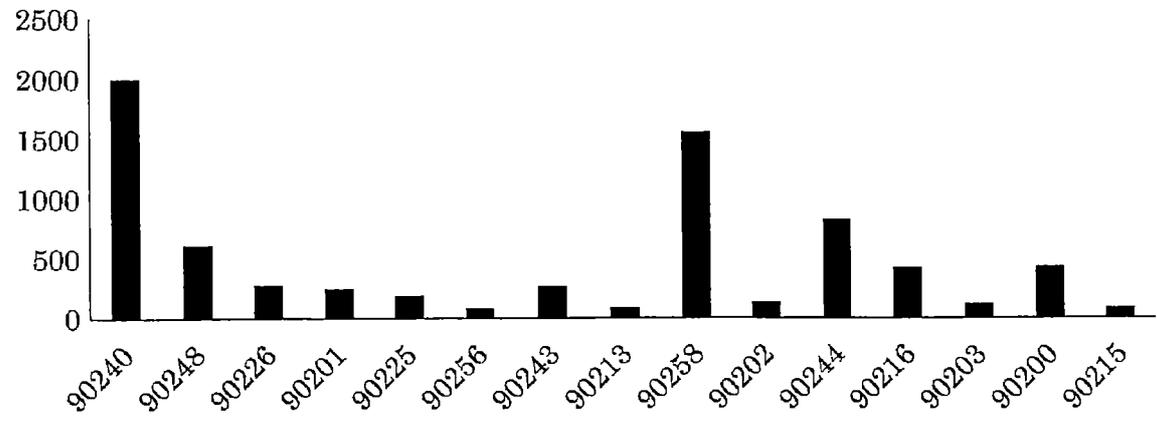


圖 24-2

### F1058

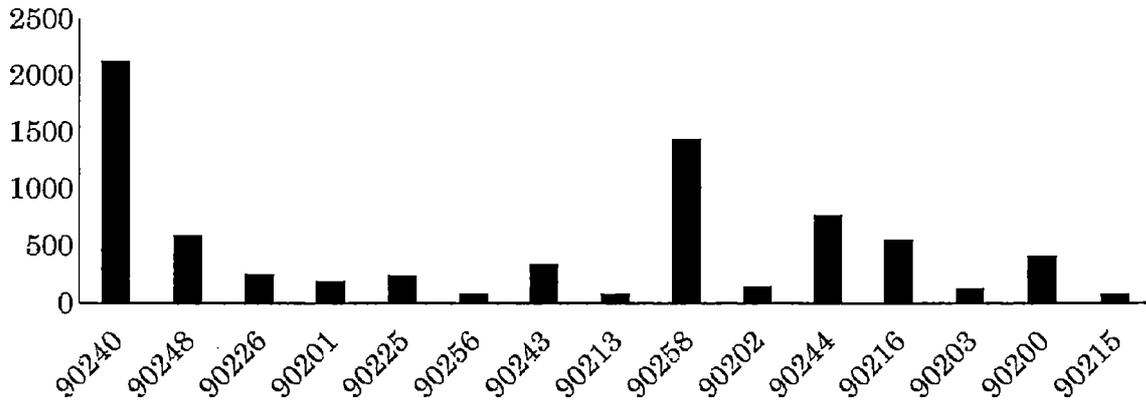


圖 24-3

### F1059

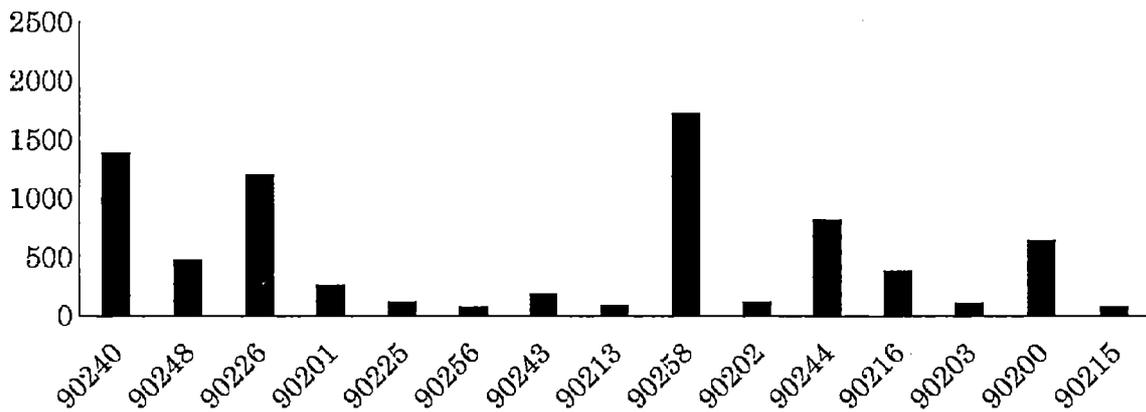


圖 24-4

### F1060

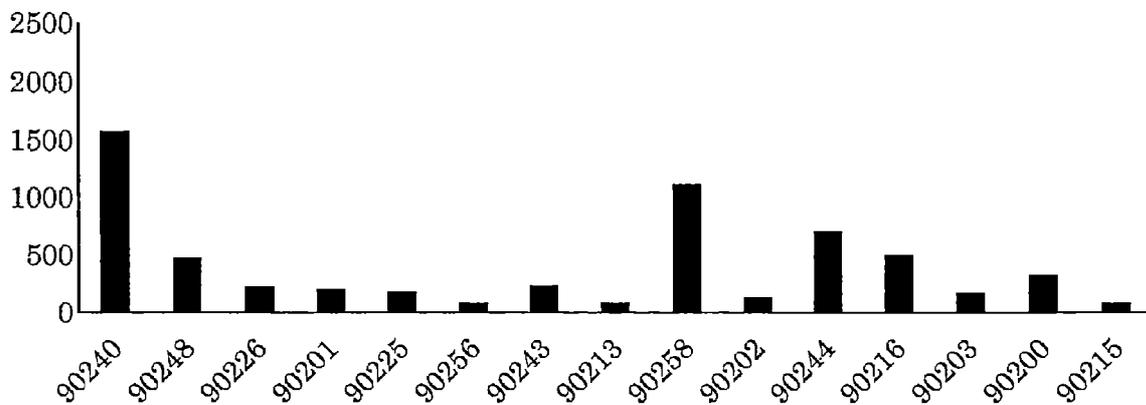


圖 24-5

### F1061

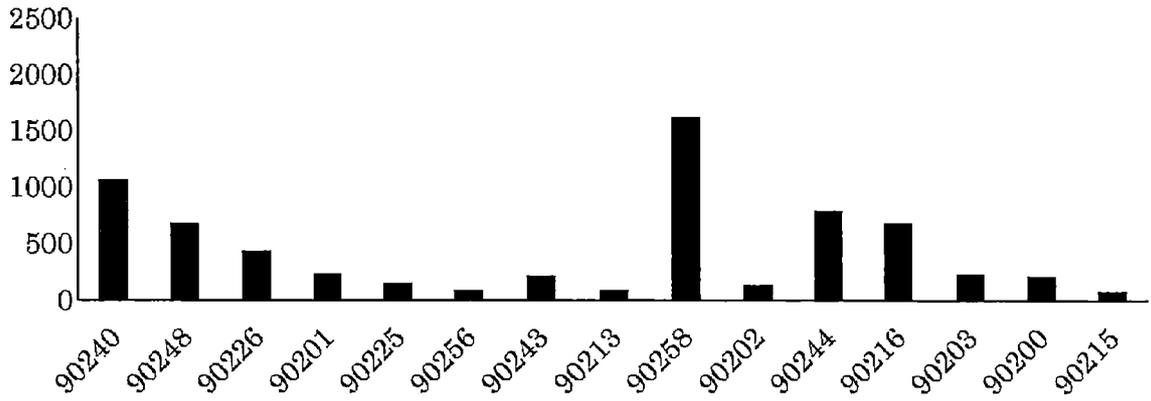


圖 24-6

### F1062

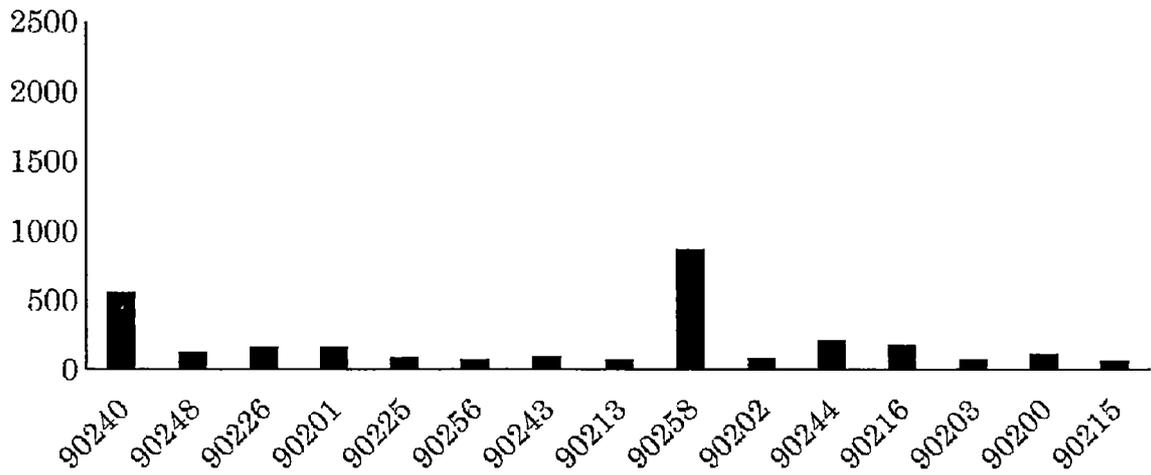


圖 24-7

### F1063

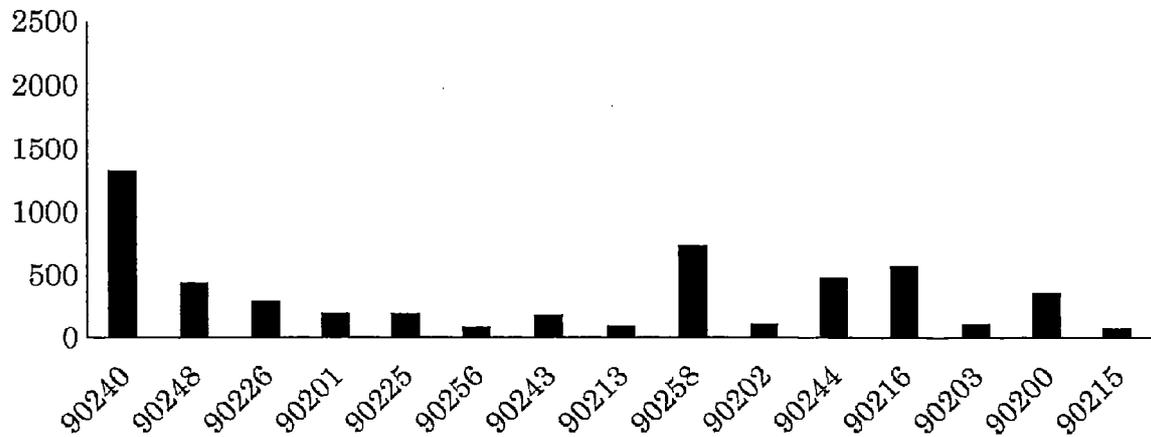


圖 24-8

### F1064

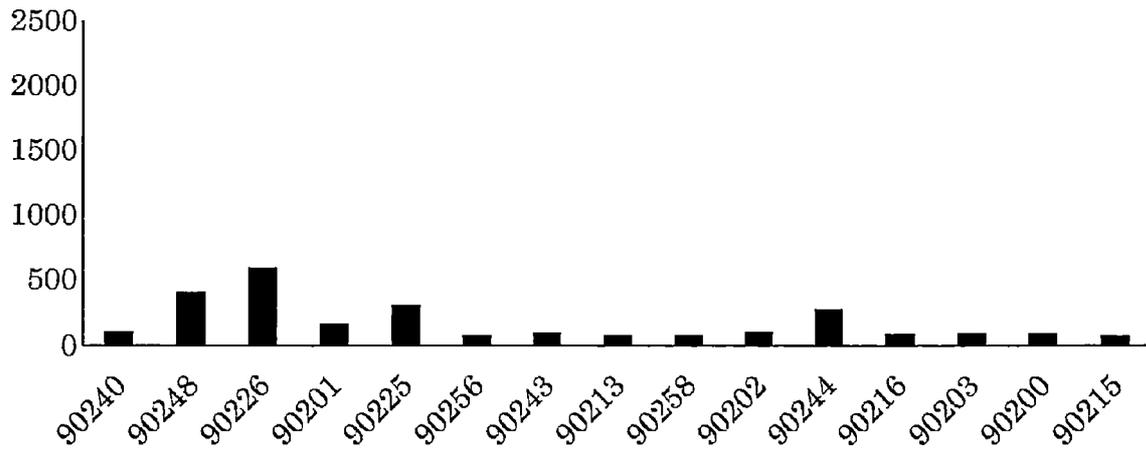


圖 24-9

### F1065

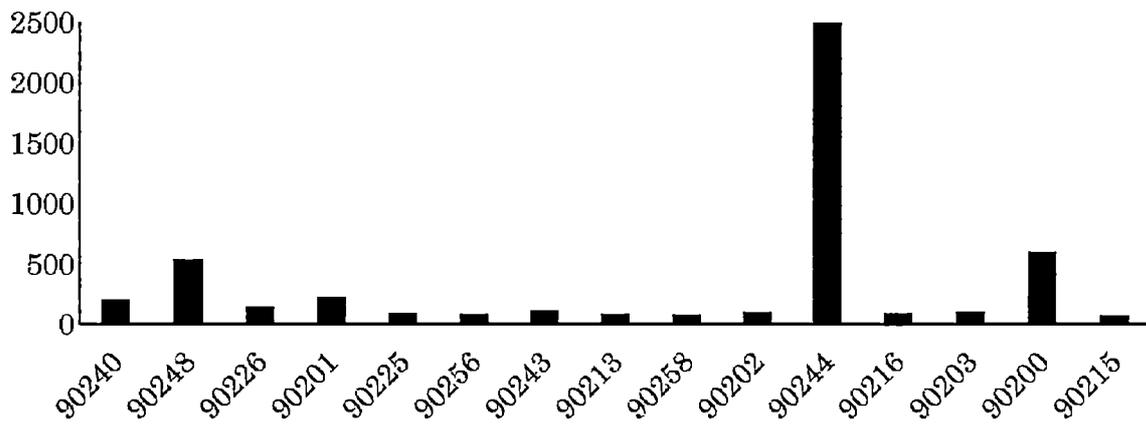


圖 24-10

### F1066

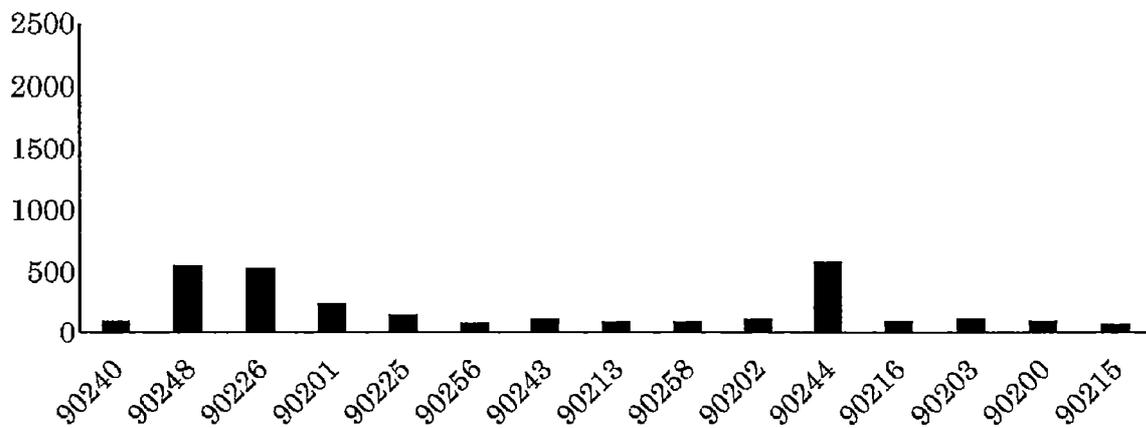


圖 24-11

### F1067

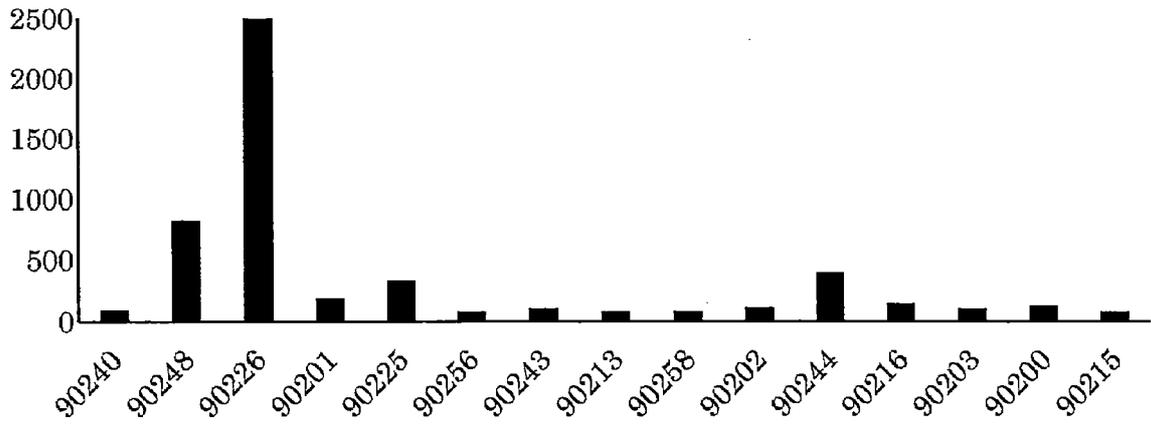


圖 24-12

### F1068

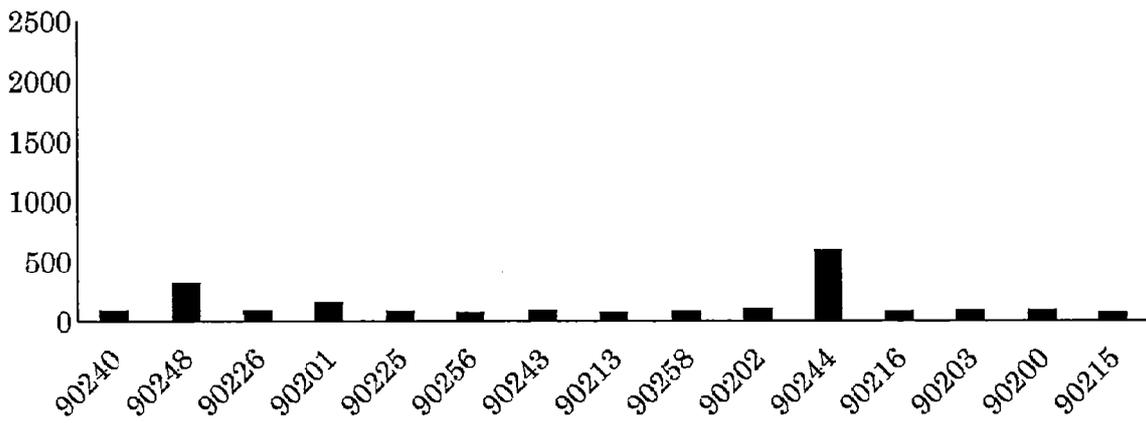


圖 24-13

### F1069

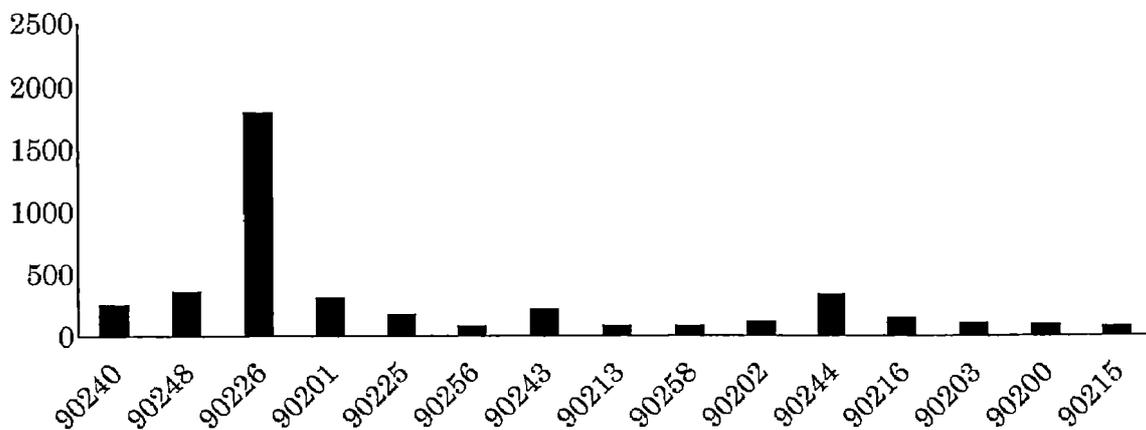


圖 24-14

### F1070

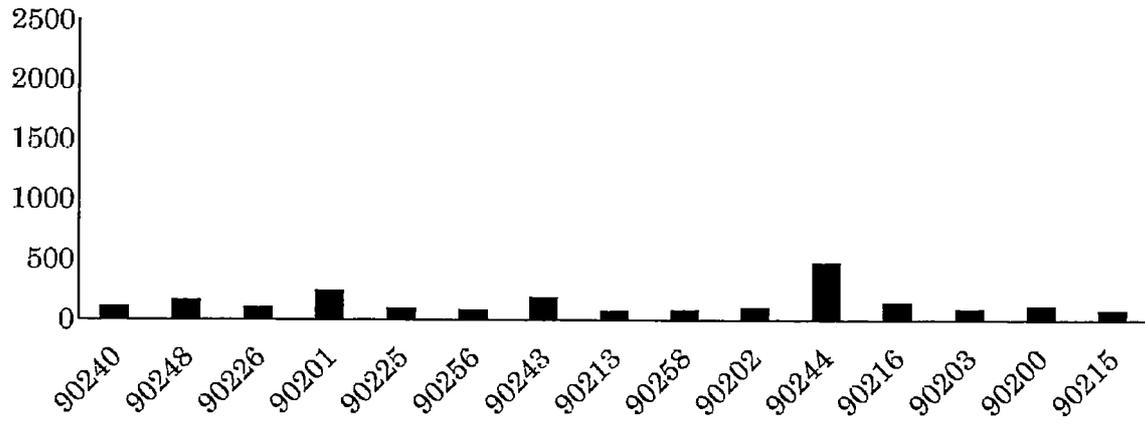


圖 24-15

### F1071

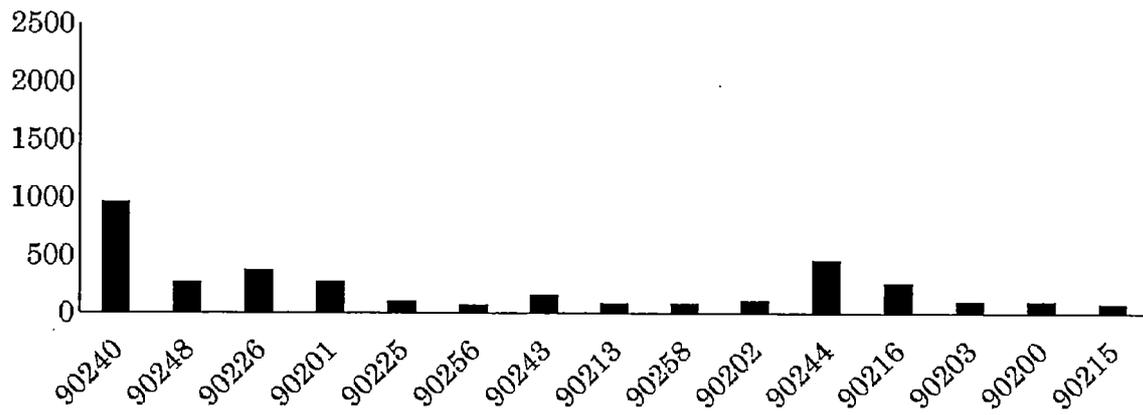


圖 24-16

### F1072

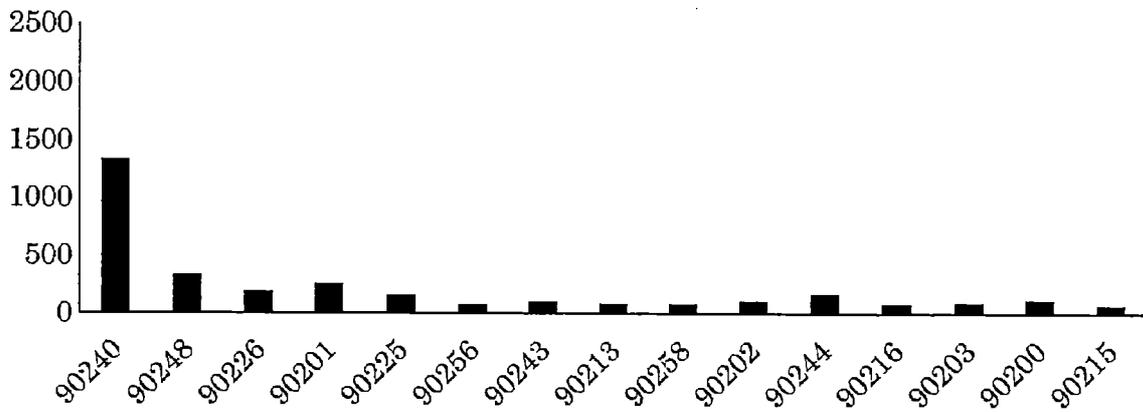


圖 24-17

### F1073

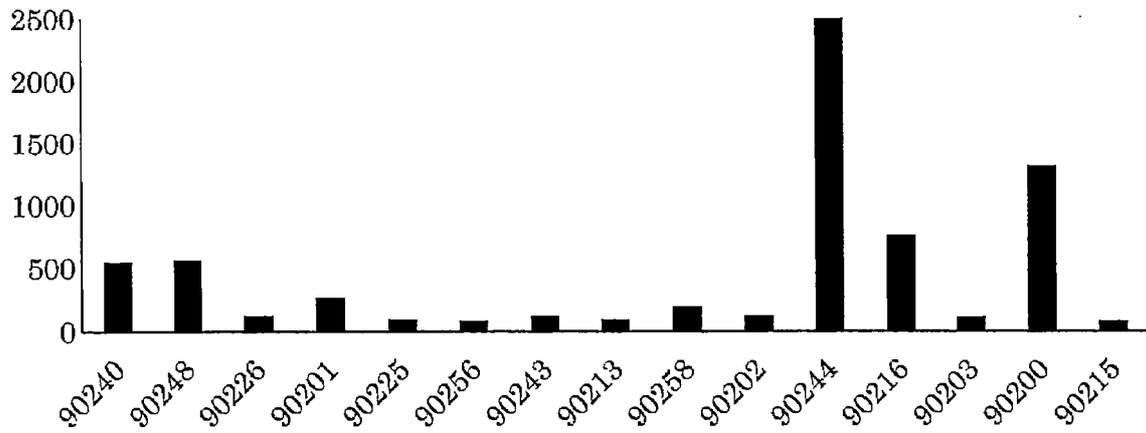


圖 24-18

### 15 個各別 RA 患者的平均 ECL 回應

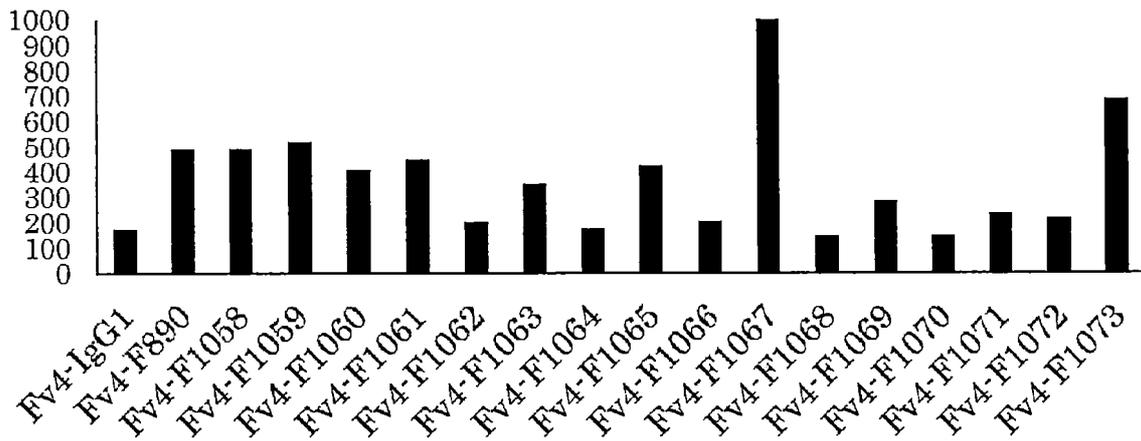


圖 25-1

### 15 個各別 RA 患者的幾何平均 ECL 回應

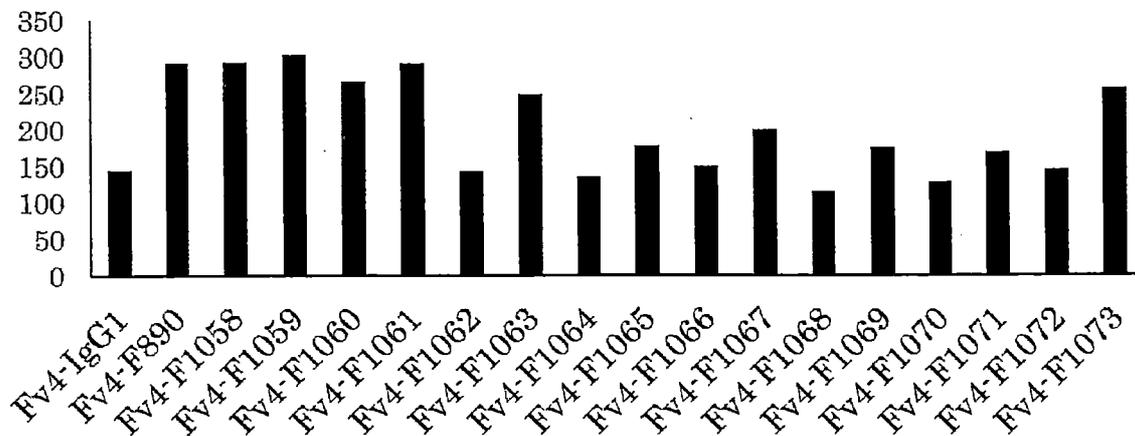


圖 25-2

15 個各別 RA 患者的中值平均 ECL 回應

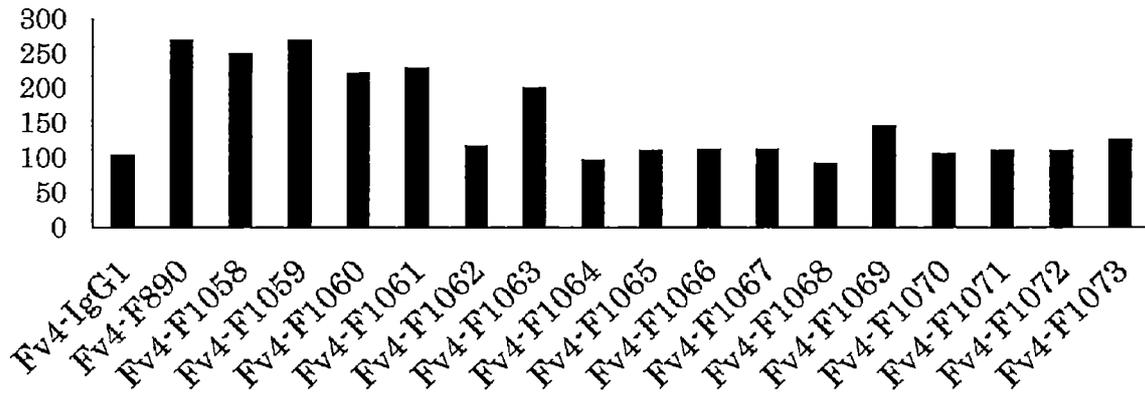


圖 25-3

### F1104

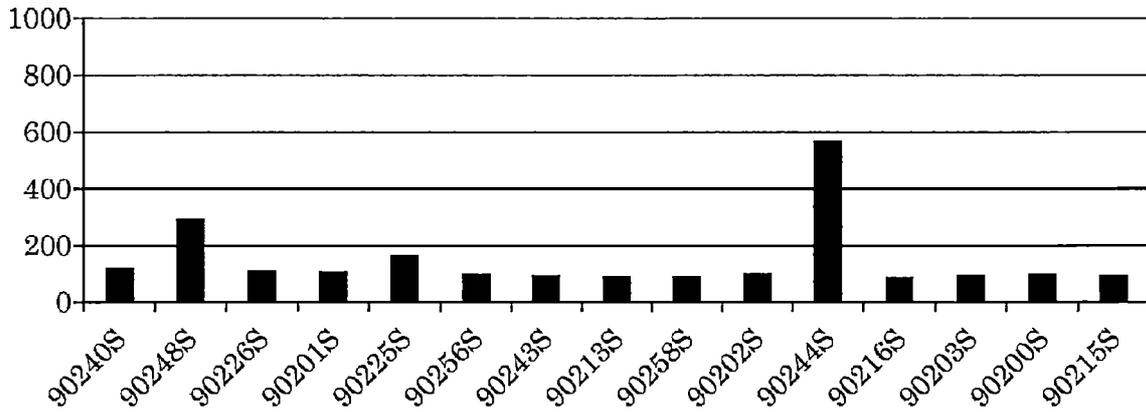


圖 26-1

### F1105

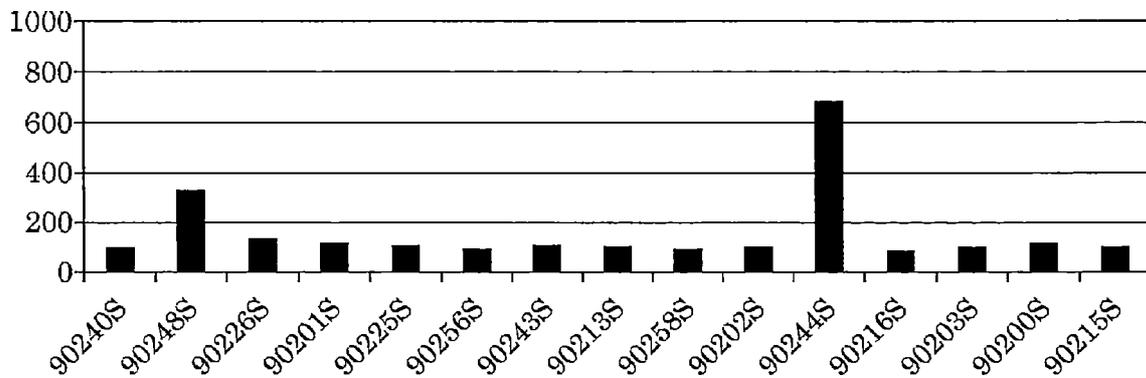


圖 26-2

### F1106

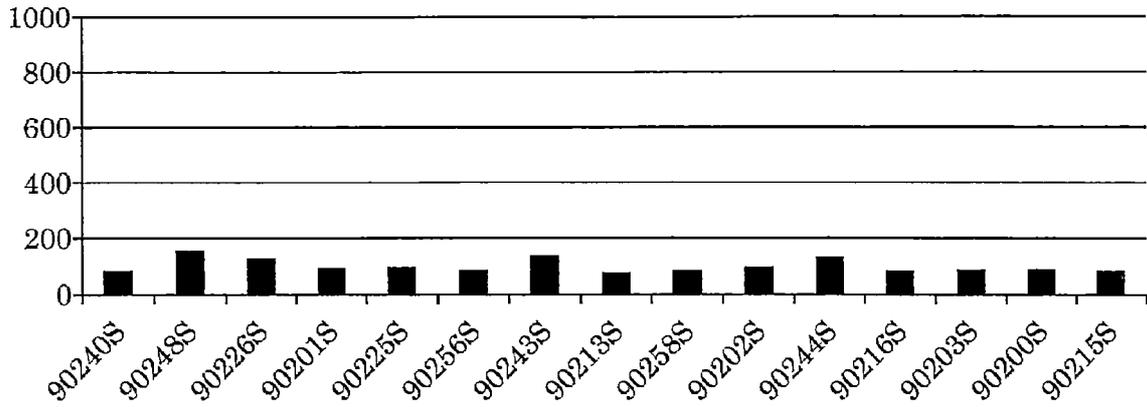


圖 26-3

### F1107

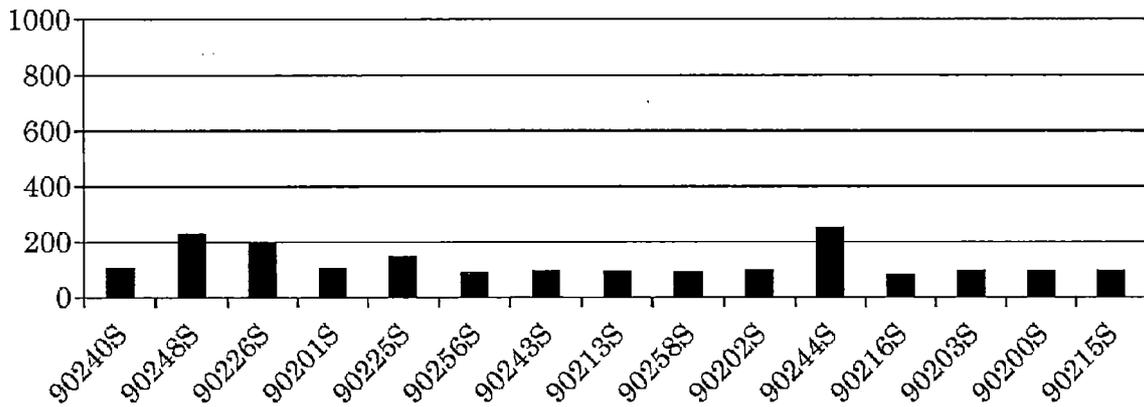


圖 27-1

### F1108

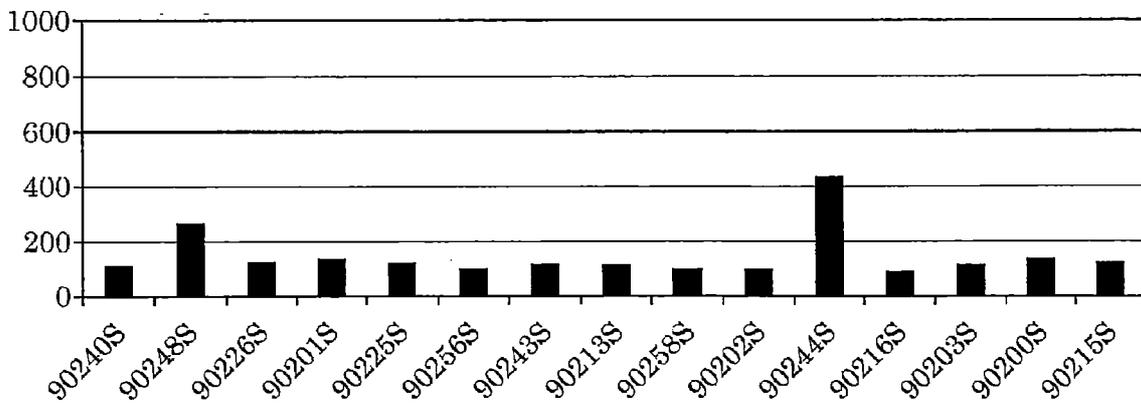


圖 27-2

### F1109

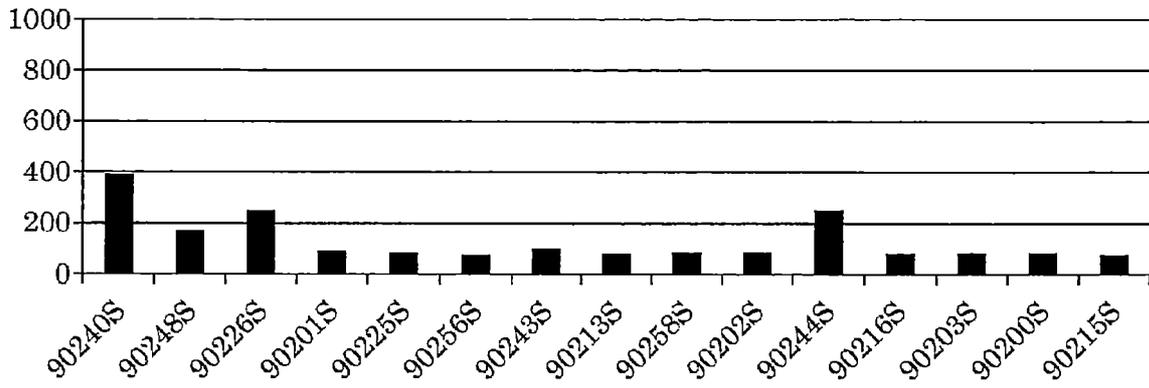


圖 27-3

### F1110

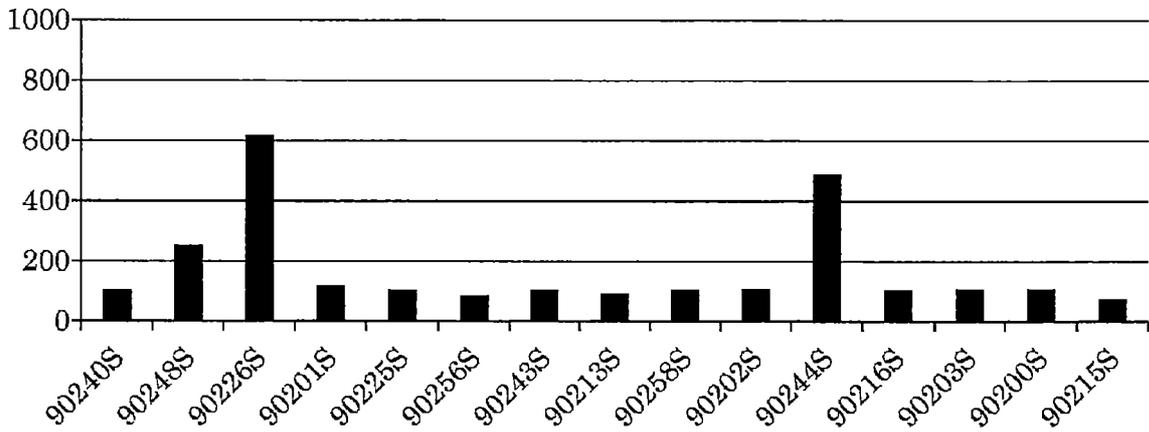


圖 27-4

### F1111

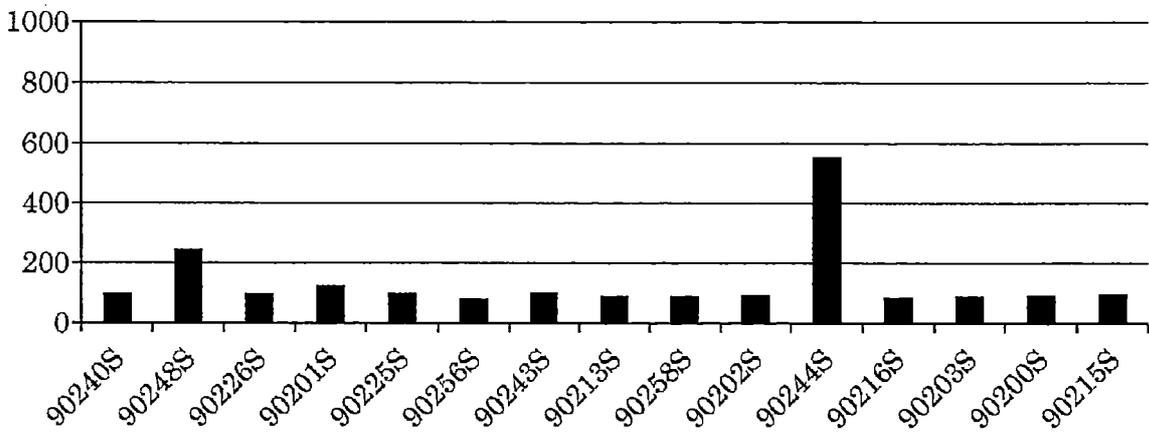


圖 27-5

### F1112

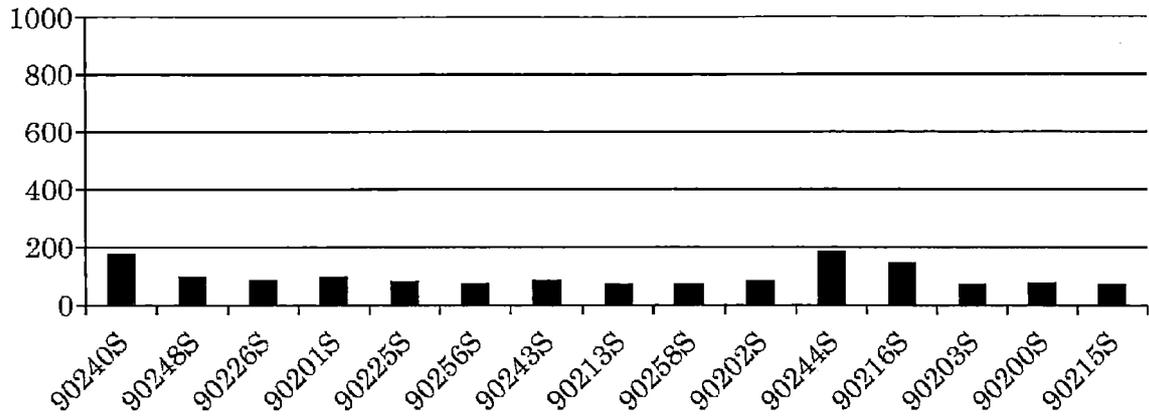


圖 27-6

### F1113

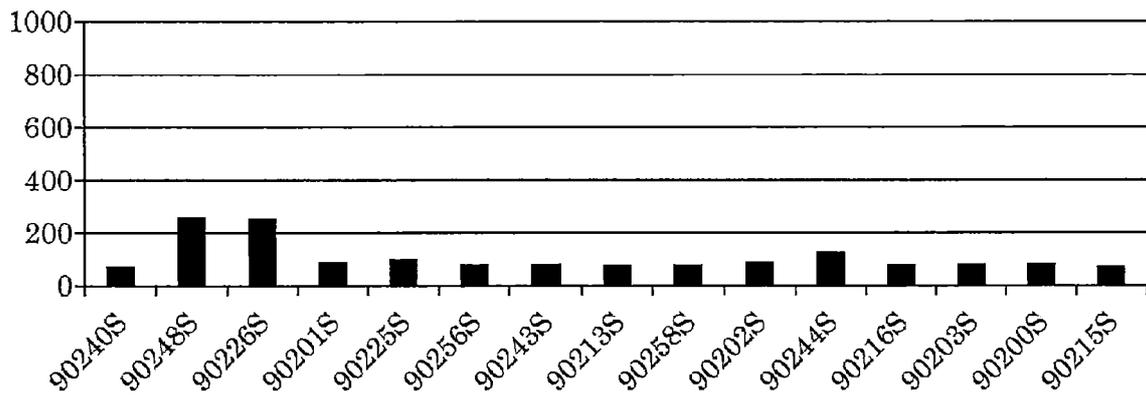


圖 27-7

### F1114

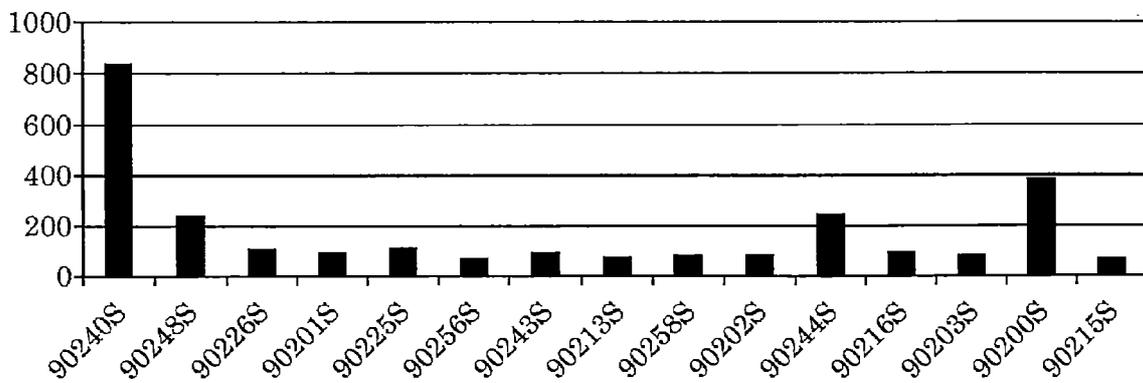


圖 27-8

### F1230

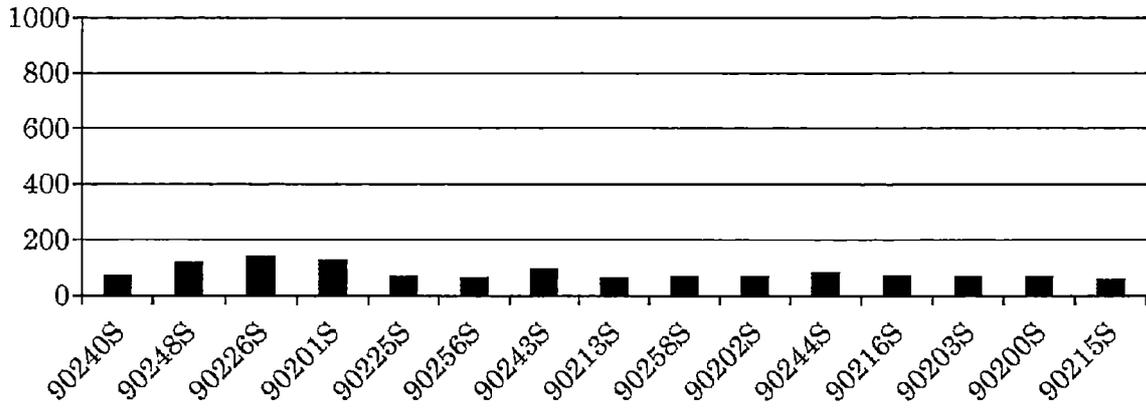


圖 28-1

### F1231

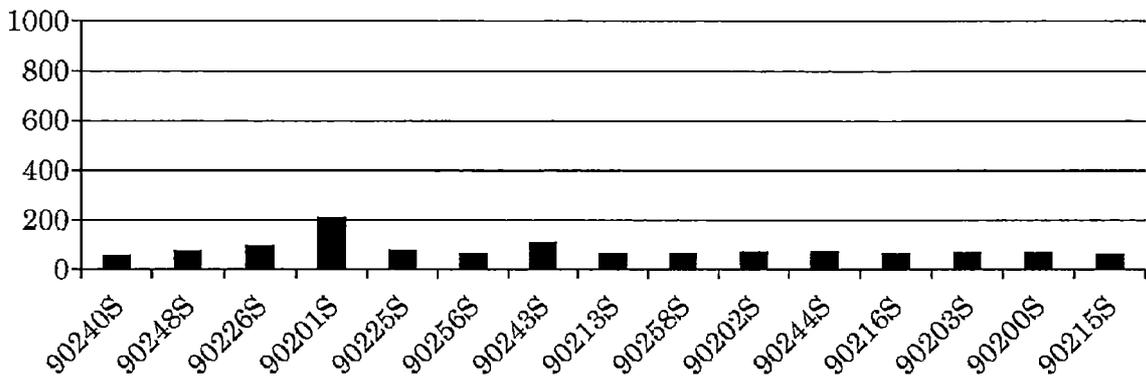


圖 28-2

### F1232

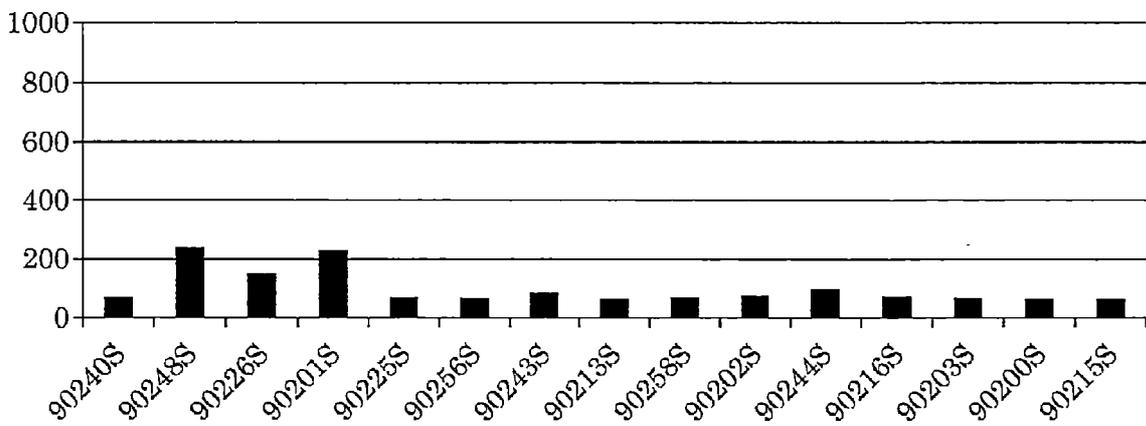


圖 28-3

### F947

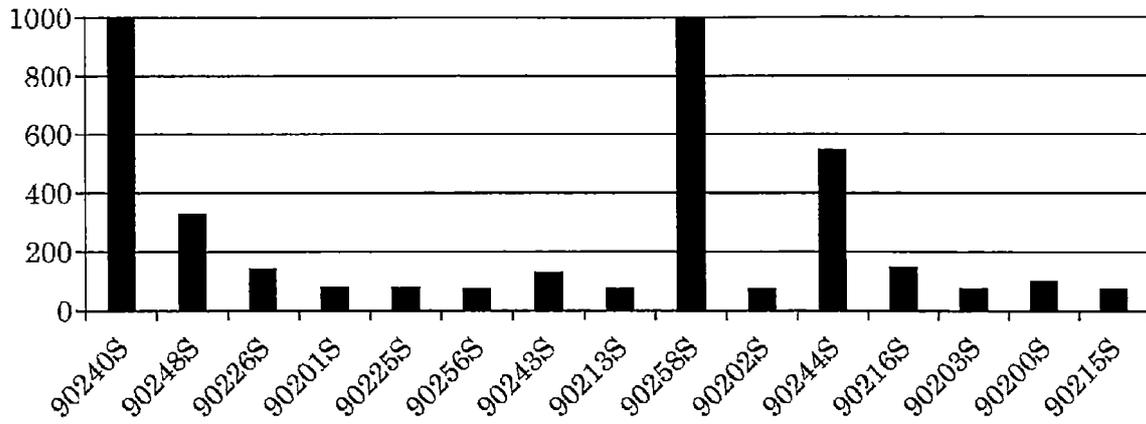


圖 29-1

### F1119

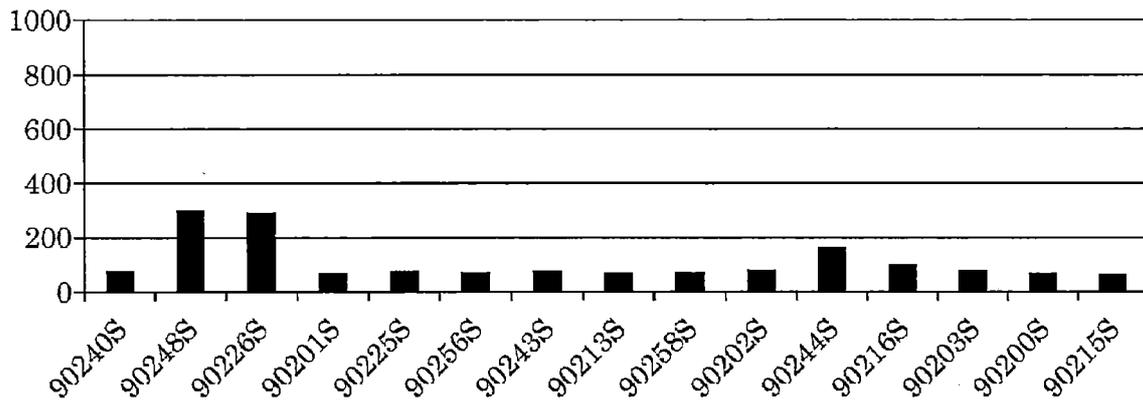


圖 29-2

### F1120

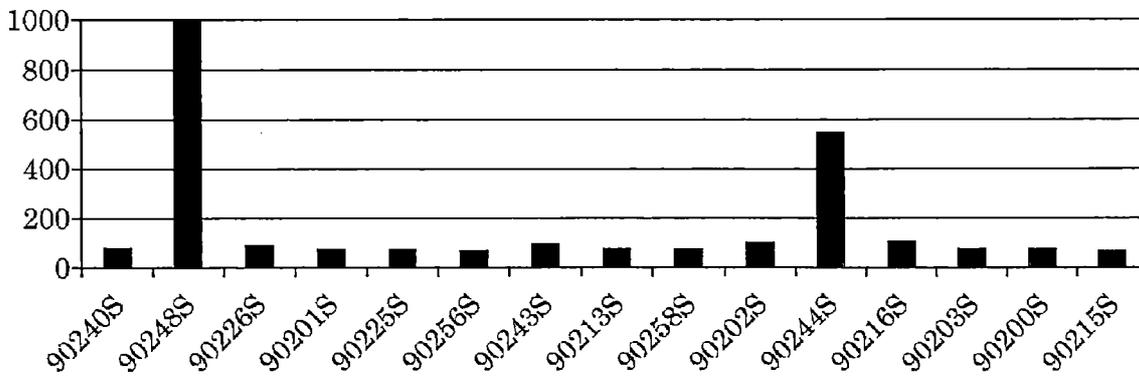


圖 29-3

### F1121

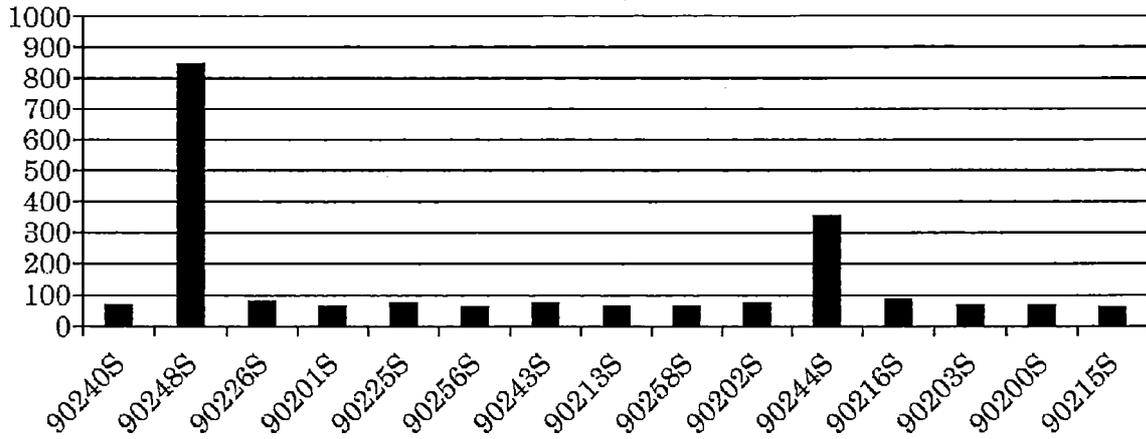


圖 29-4

### F1122

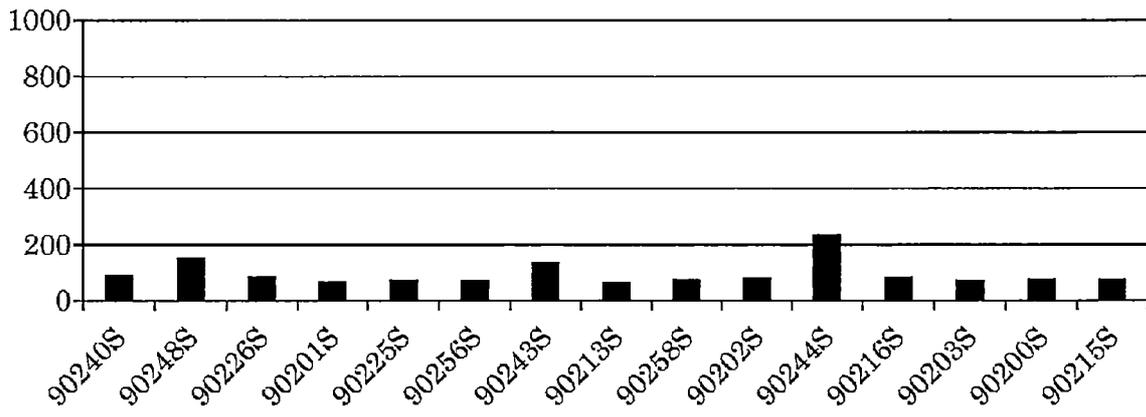


圖 29-5

### F1123

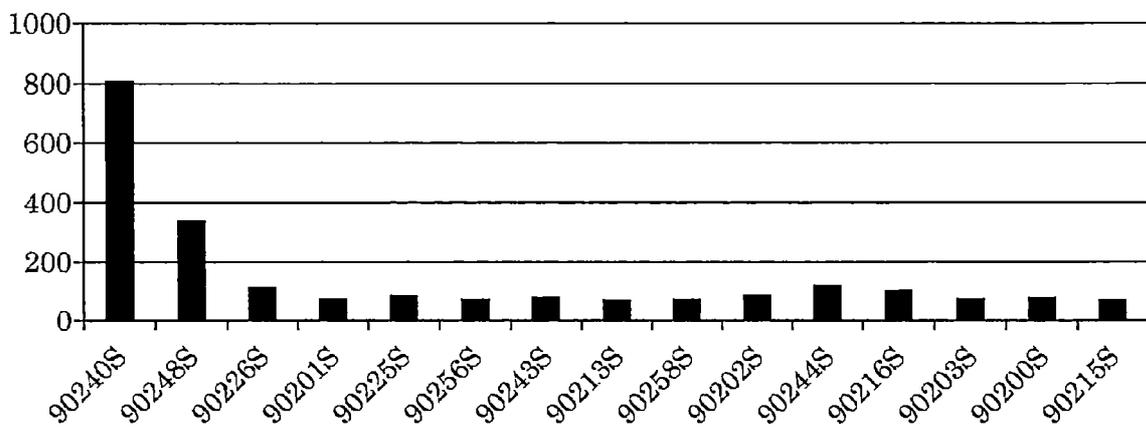


圖 29-6

### F1124

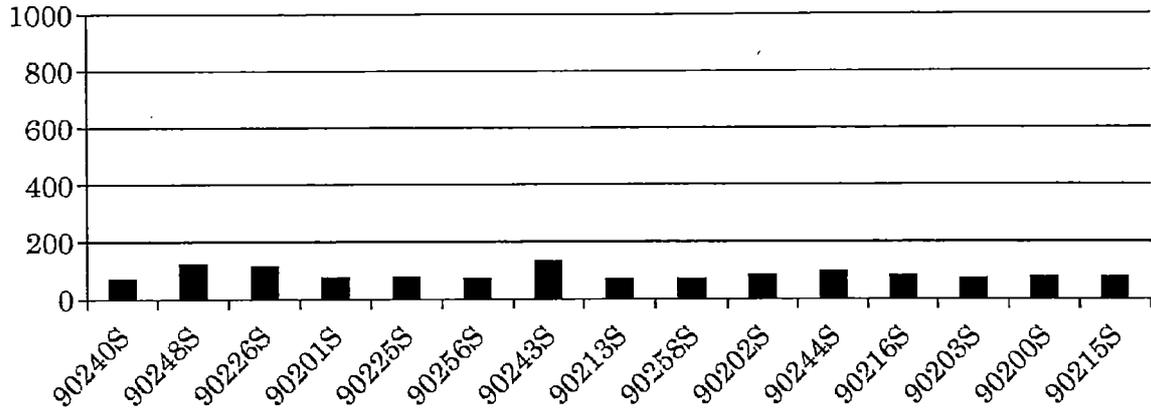


圖 29-7

### F939

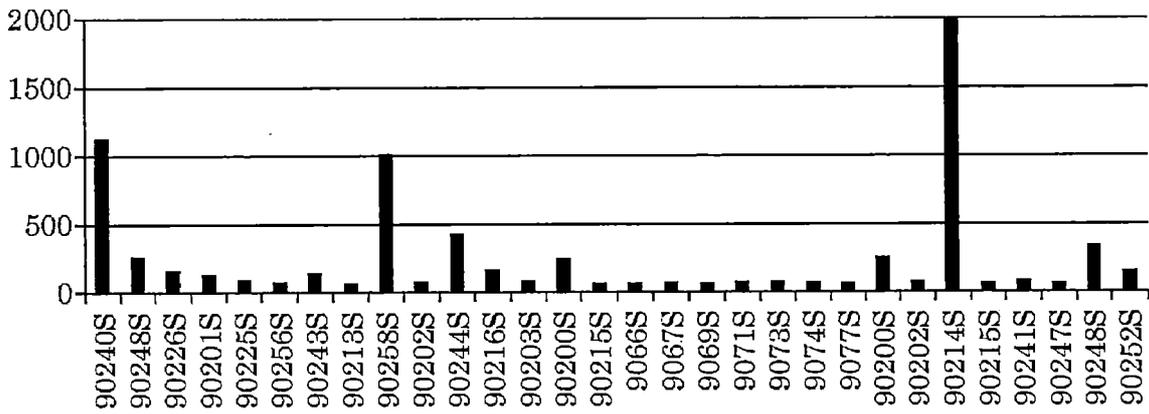


圖 30-1

### F1291

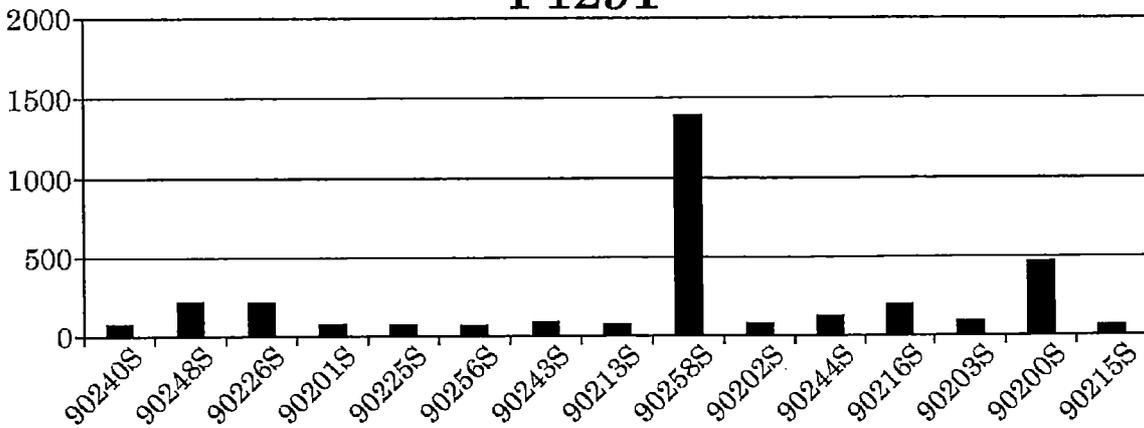


圖 30-2

### F1268

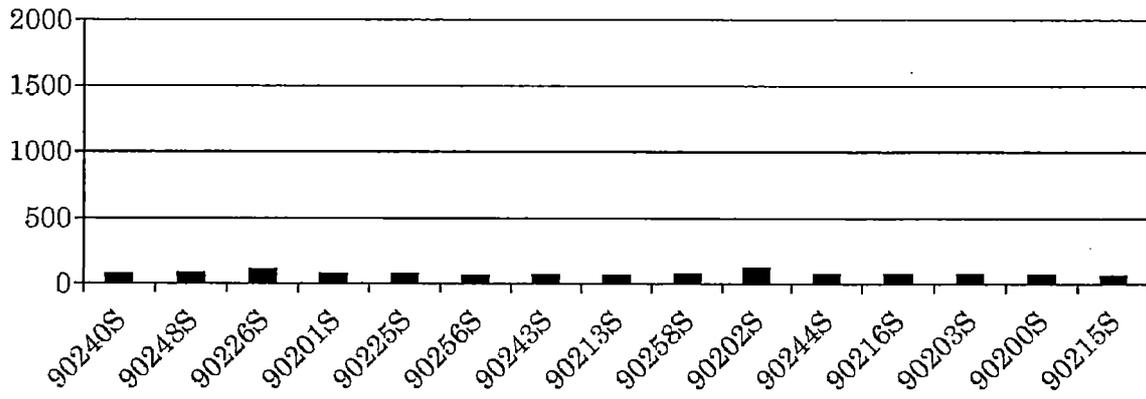


圖 30-3

### F1269

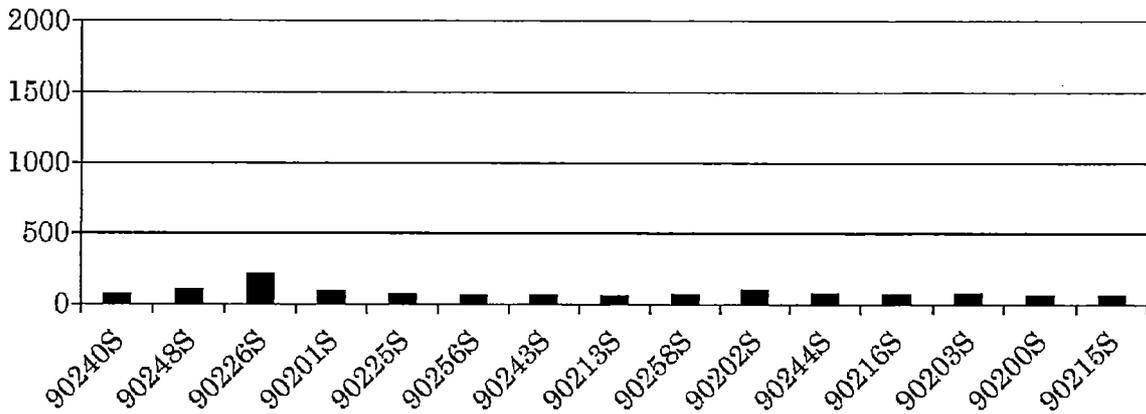


圖 30-4

### F1243

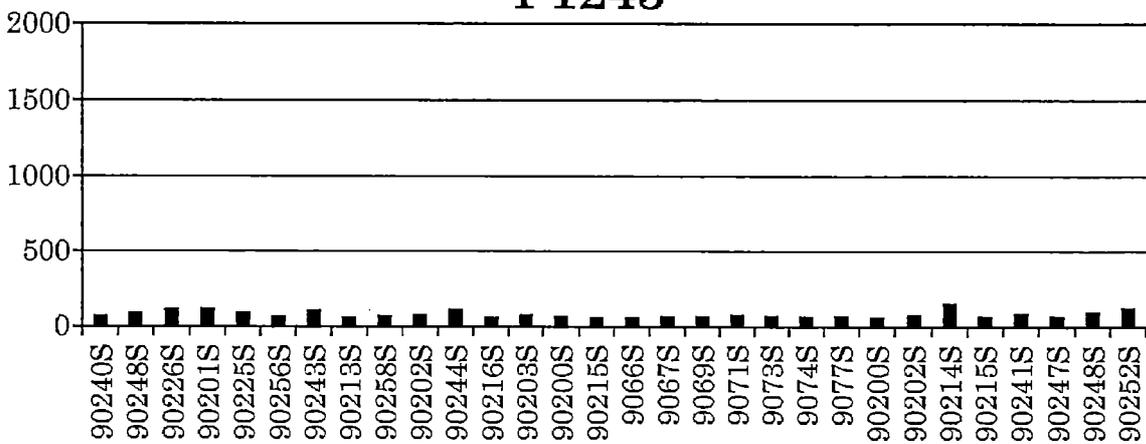


圖 30-5

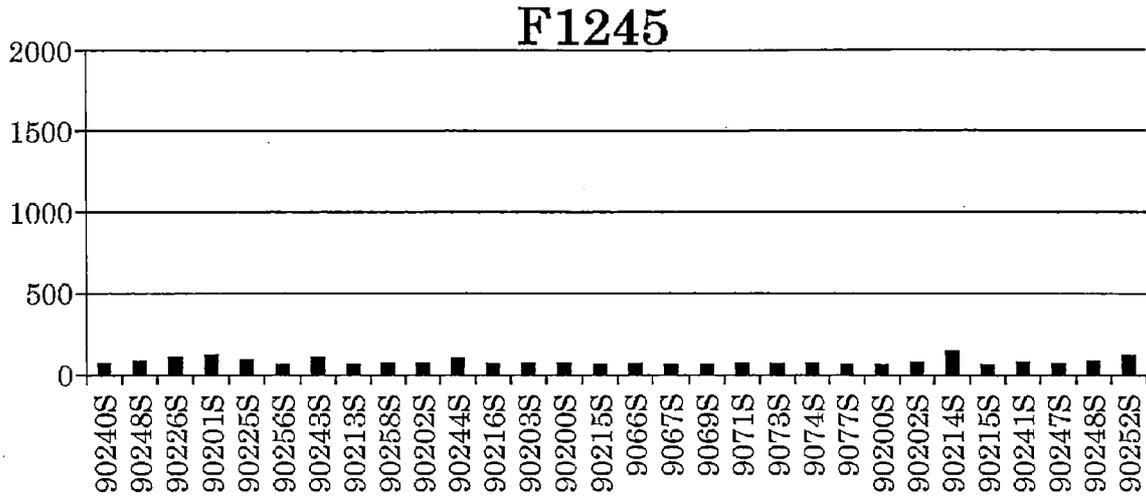


圖 30-6

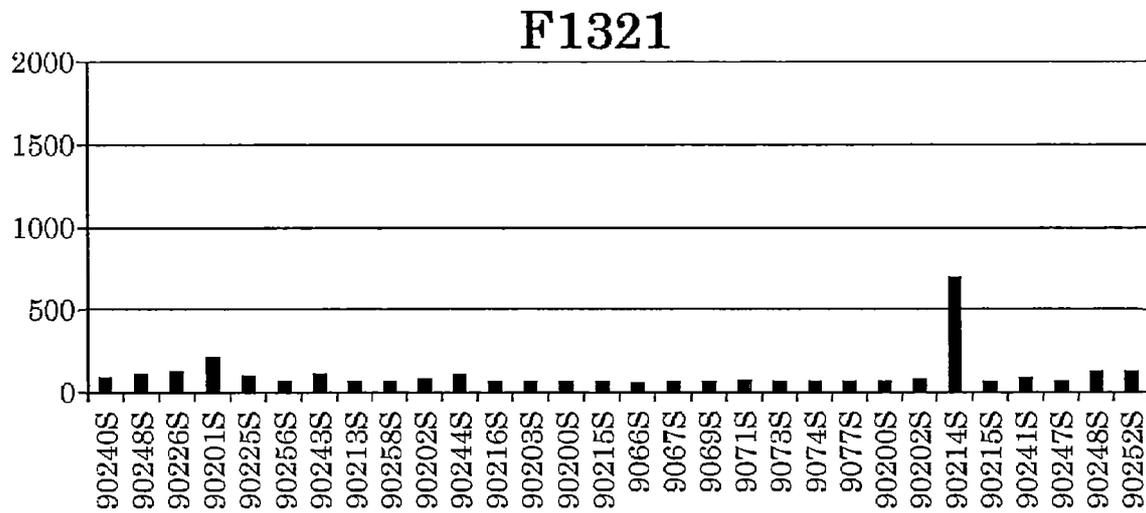


圖 30-7

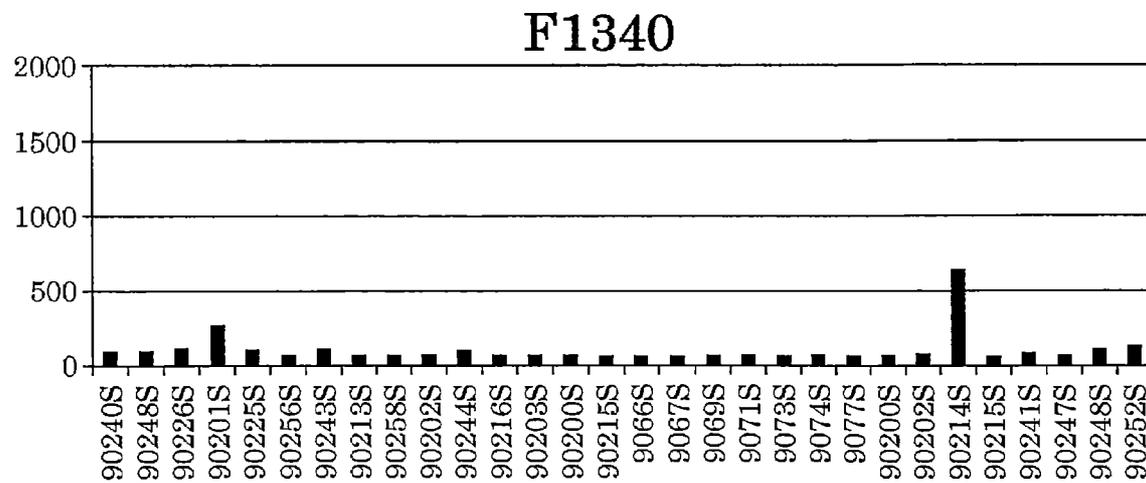


圖 30-8

### F1323

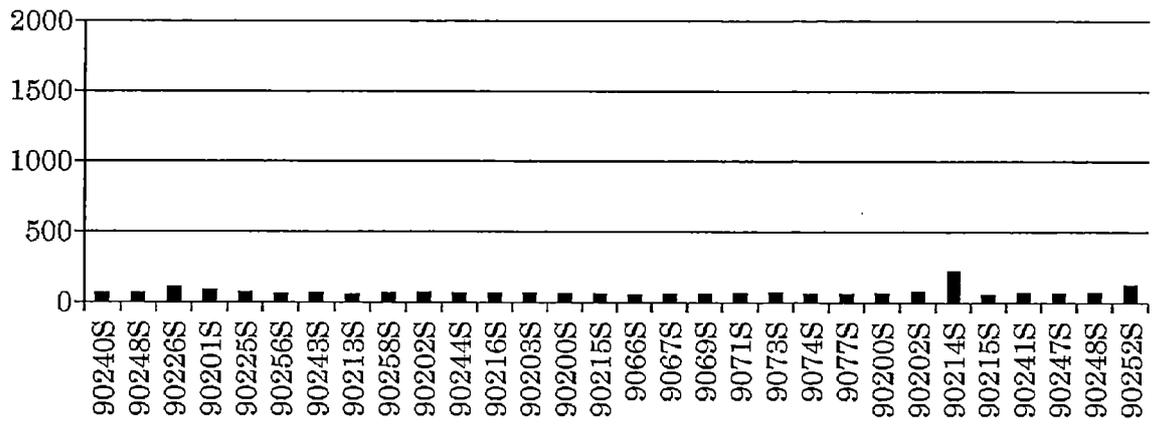


圖 30-9

### F890

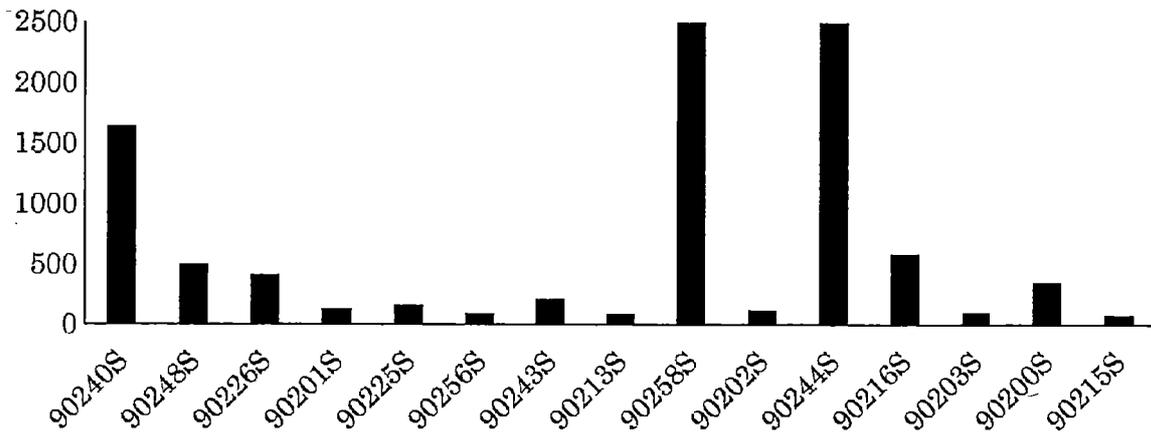


圖 31-1

### F1115

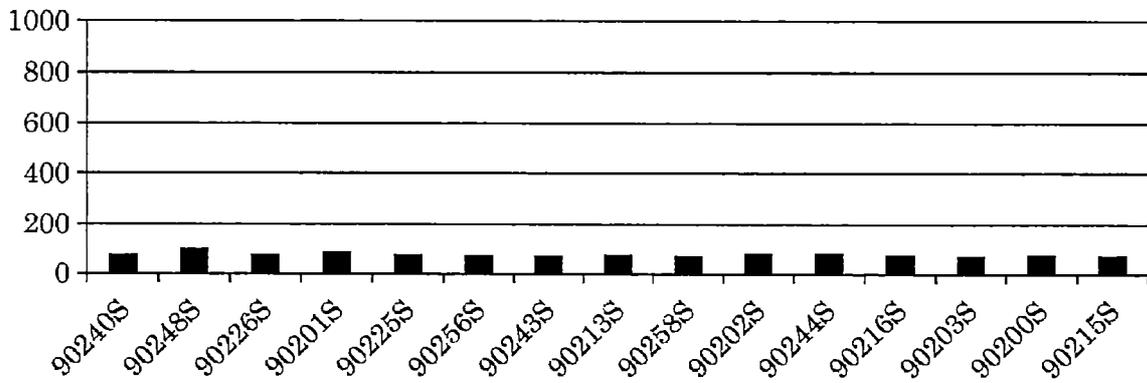


圖 31-2

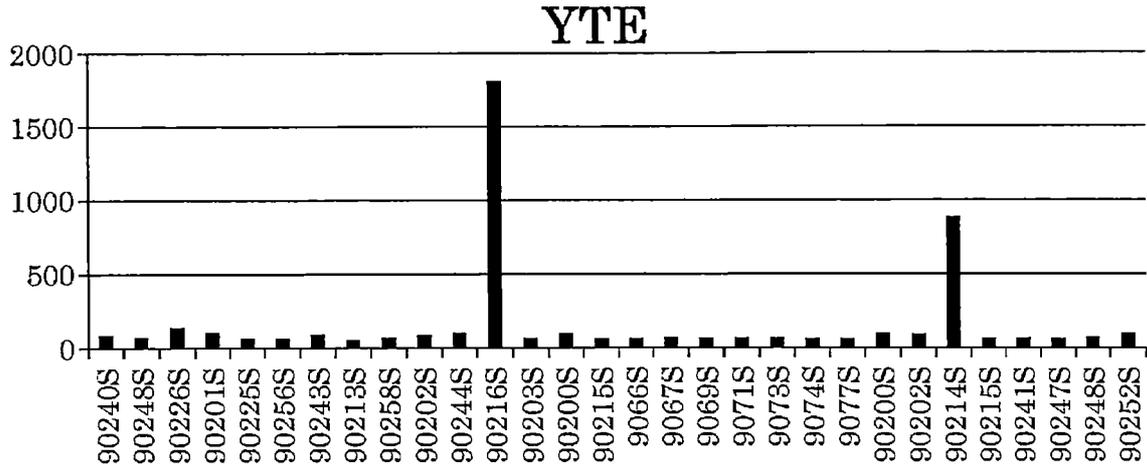


圖 32-1

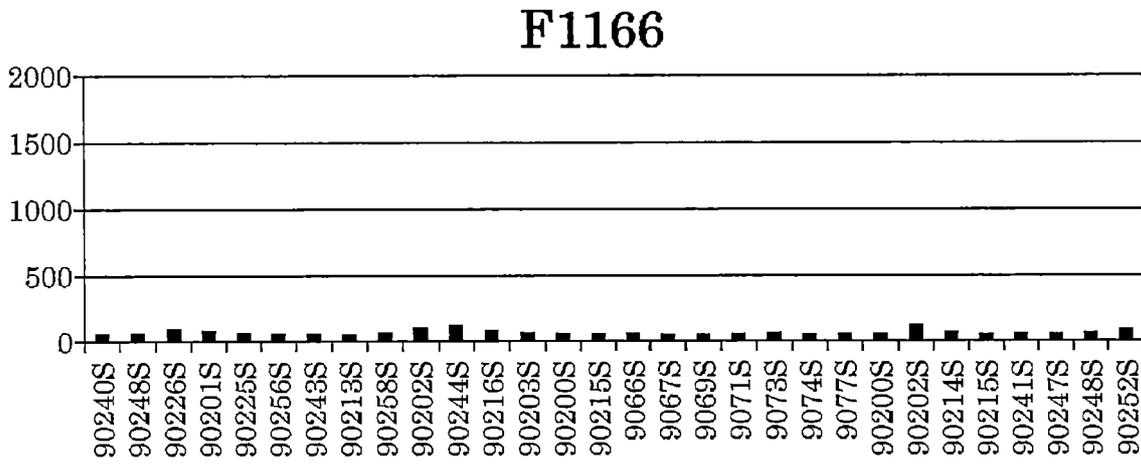


圖 32-2

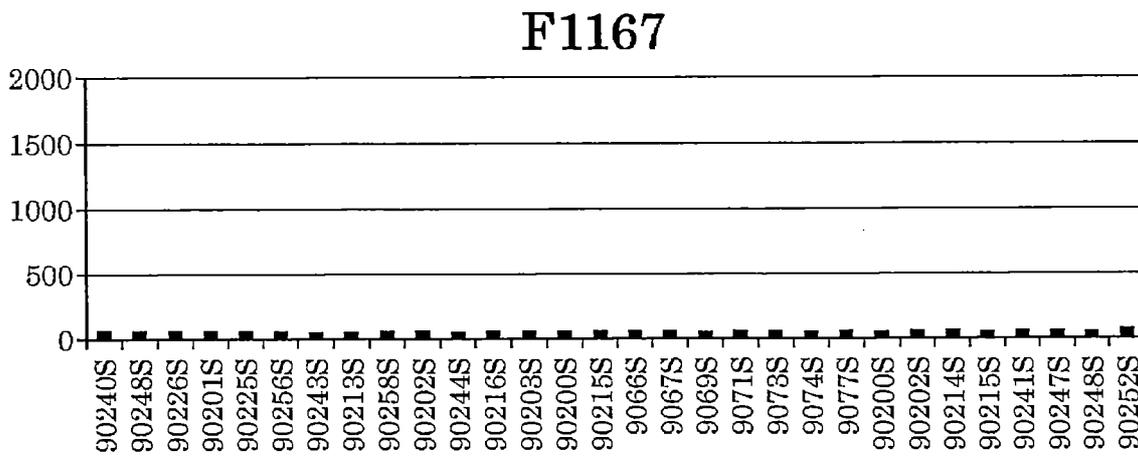


圖 32-3

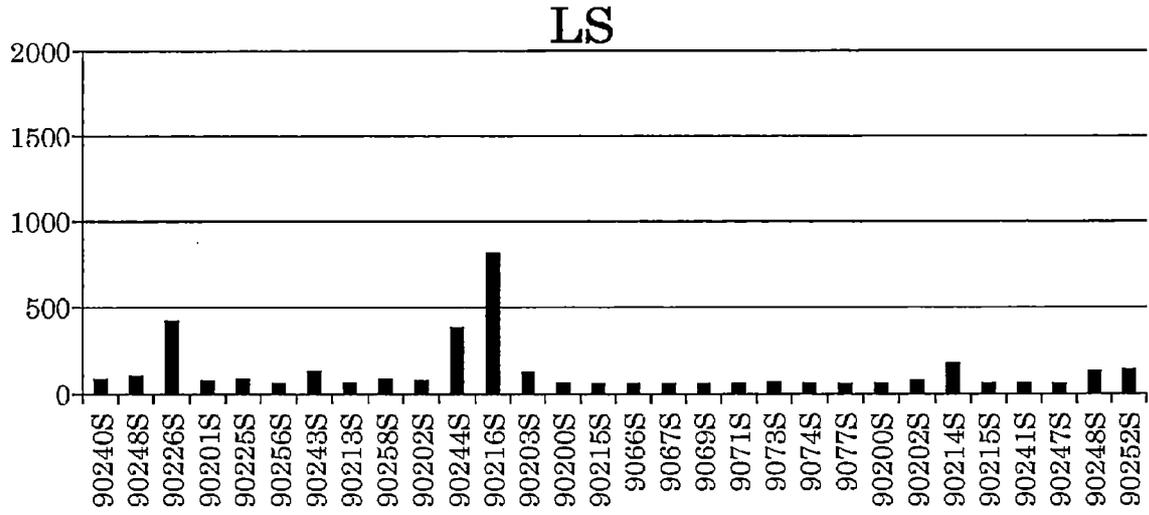


圖 32-4

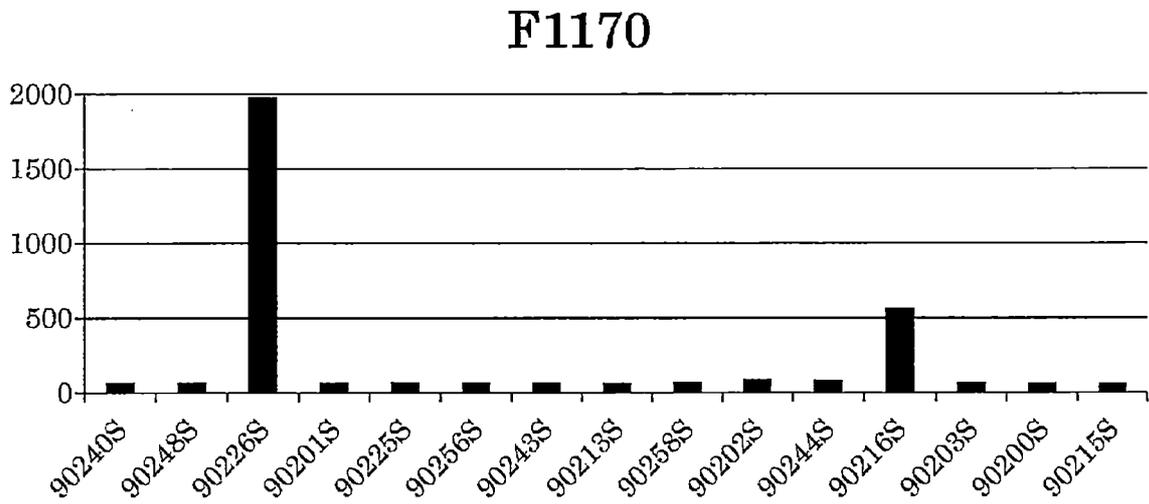


圖 32-5

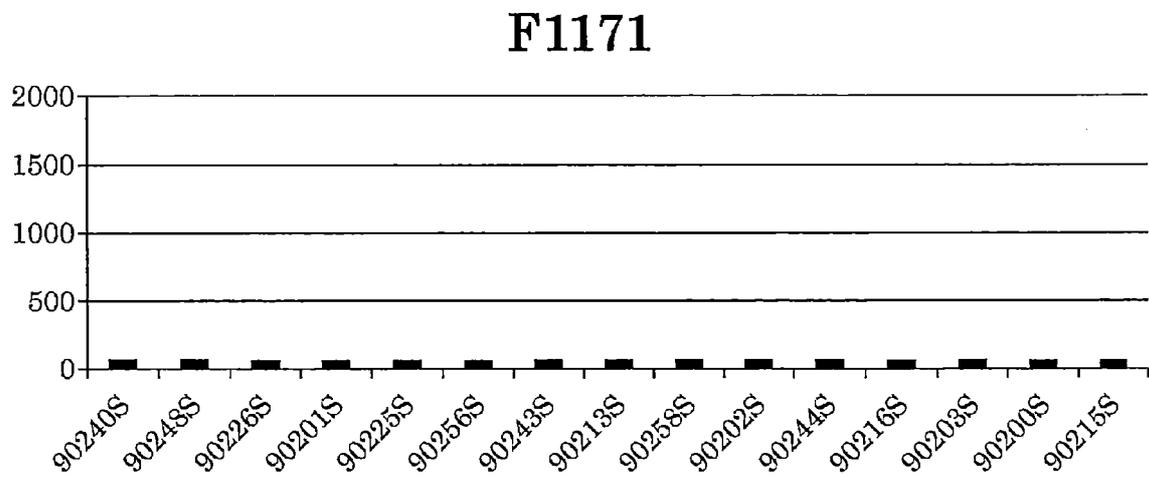


圖 32-6

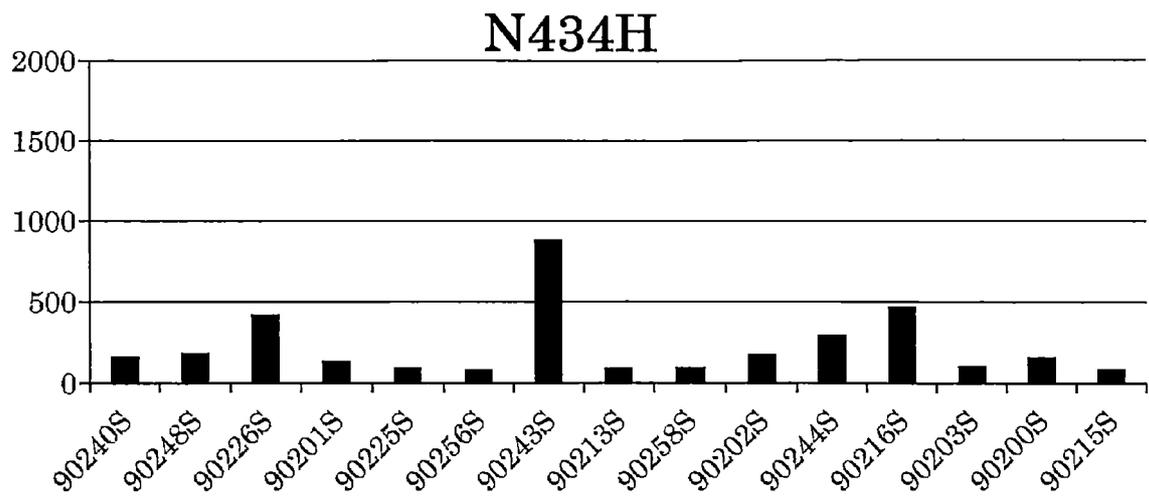


圖 32-7

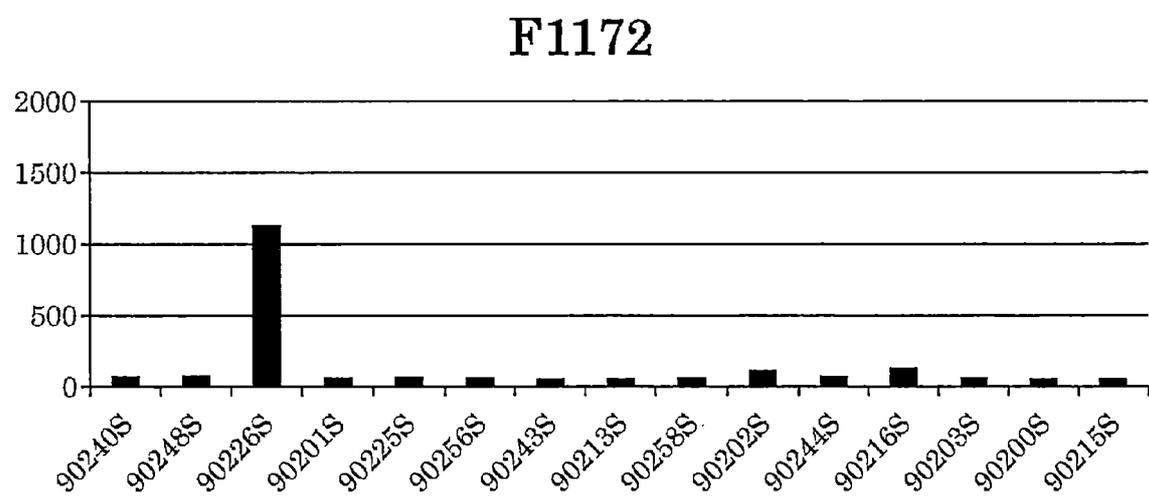


圖 32-8

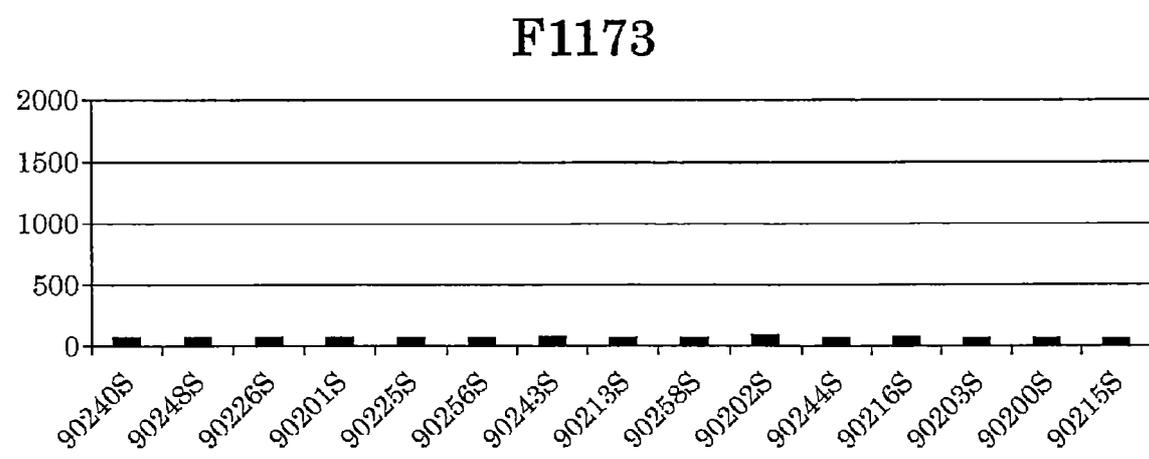


圖 32-9

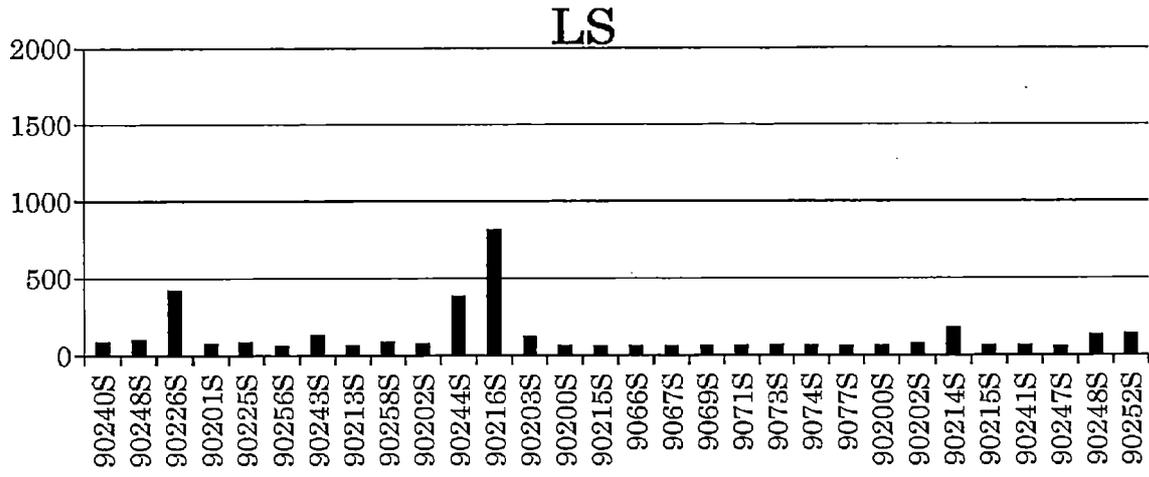


圖 33-1

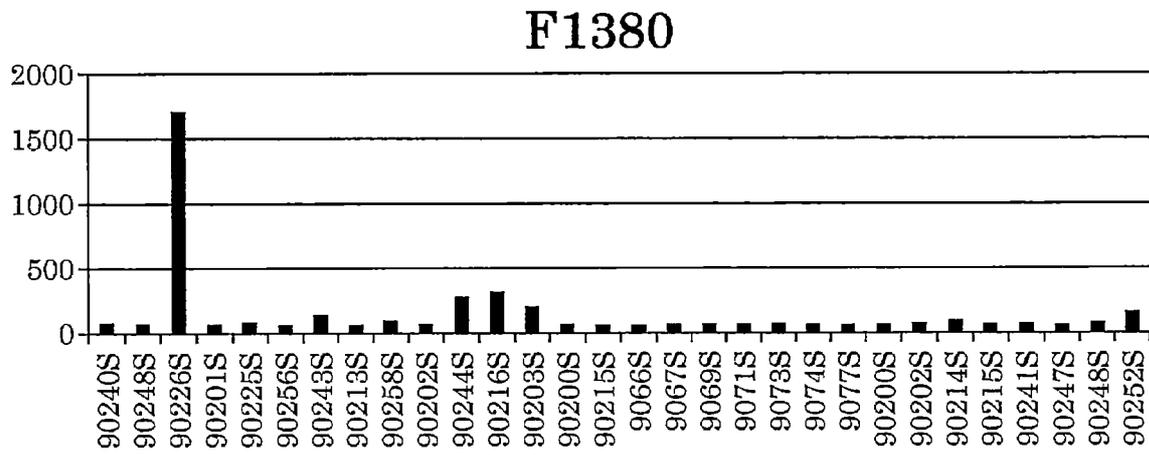


圖 33-2

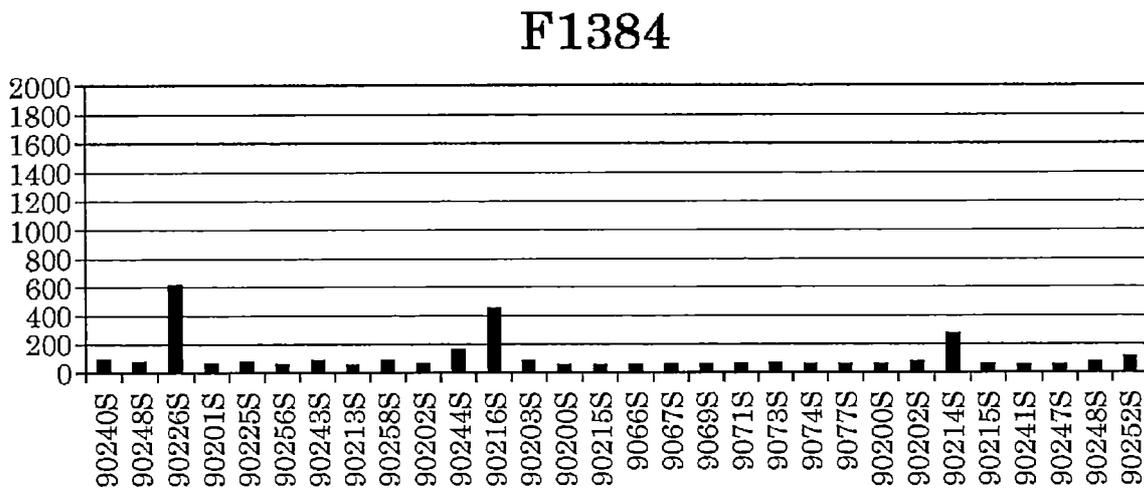
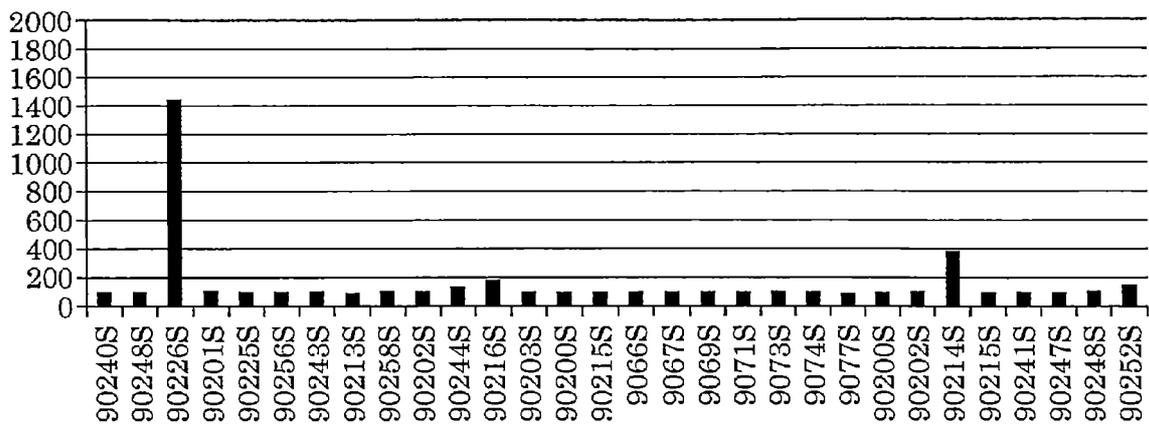


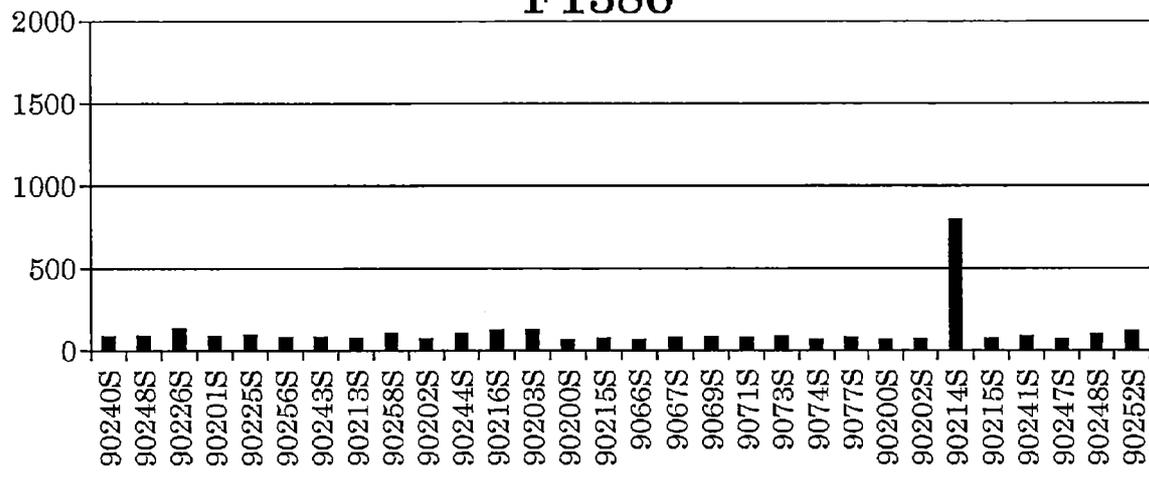
圖 33-3

### F1385



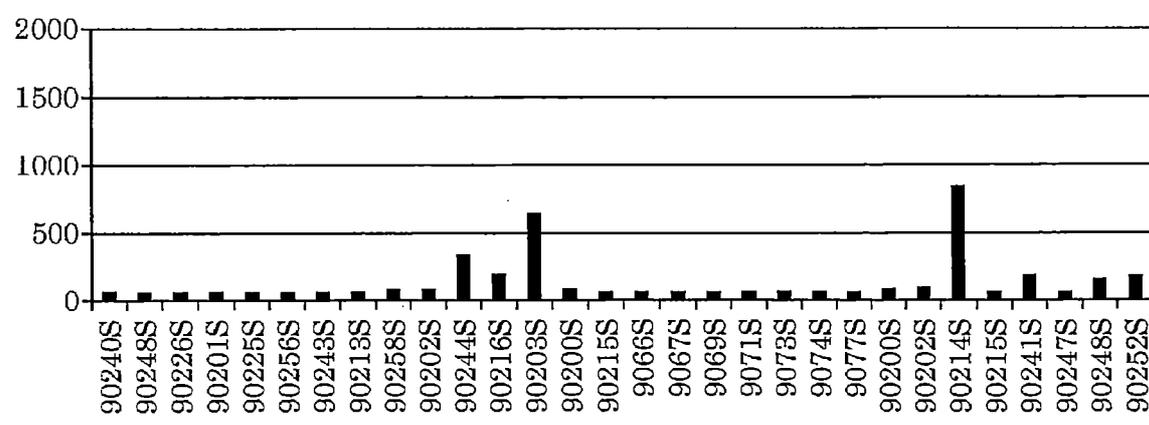
### 33-4

### F1386



### 33-5

### F1388



### 33-6

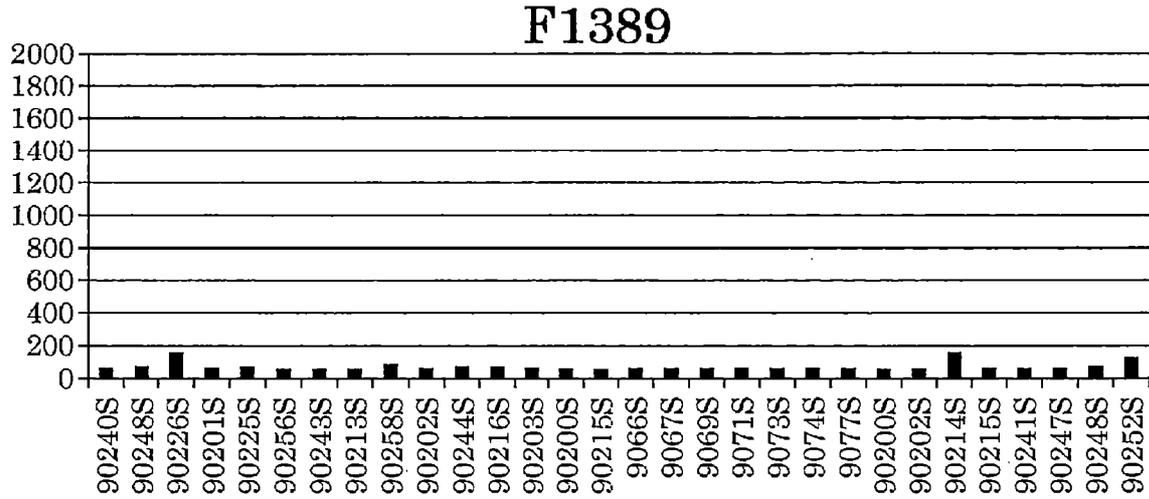


圖 33-7

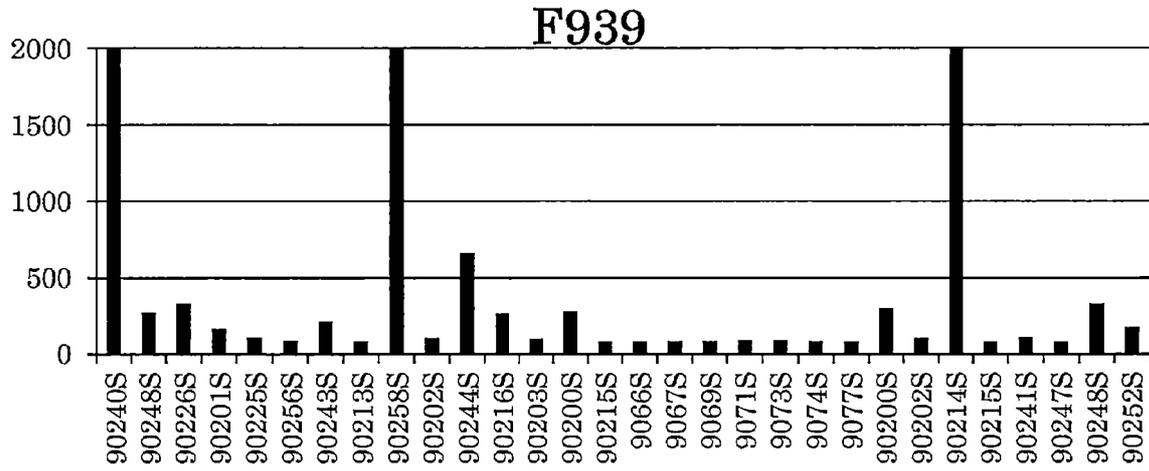


圖 34

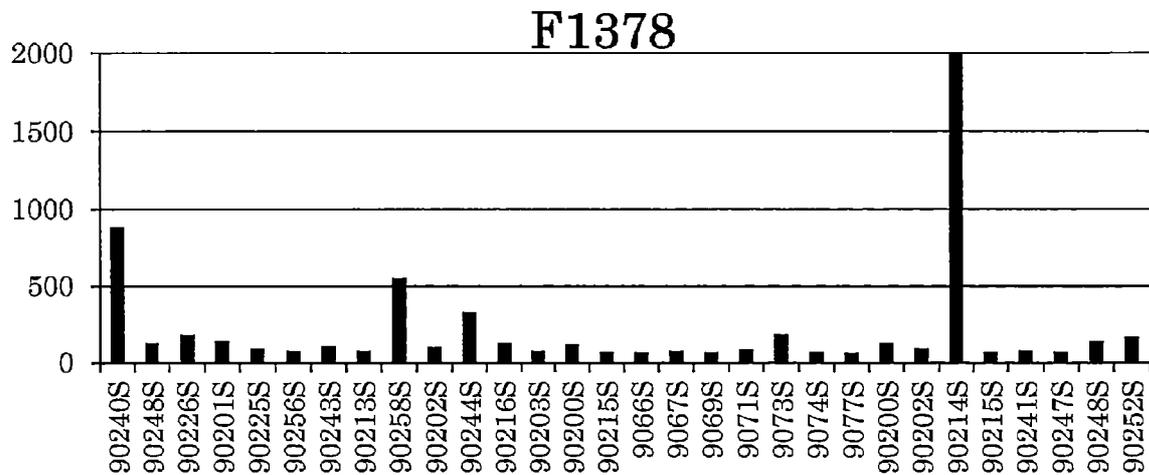


圖 35

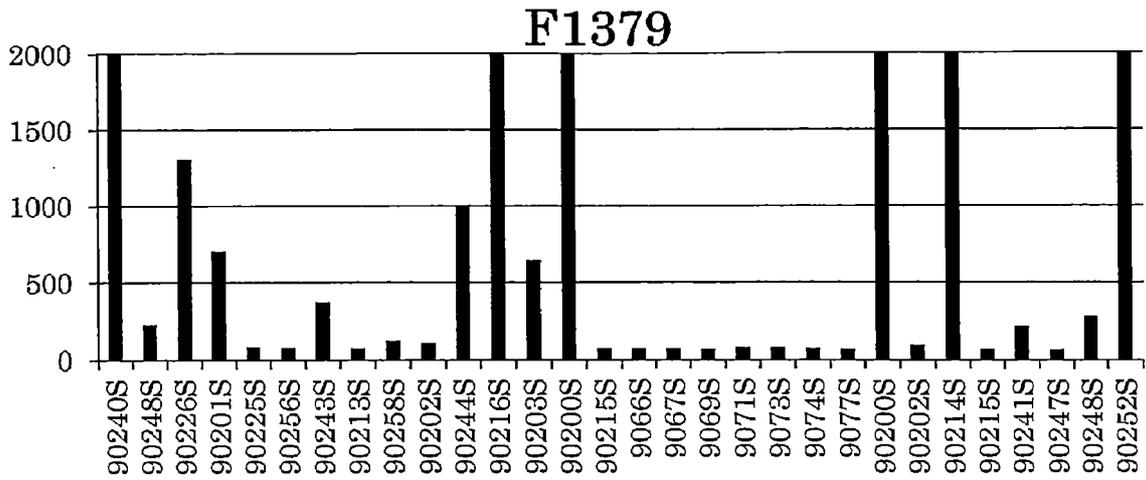


圖 36

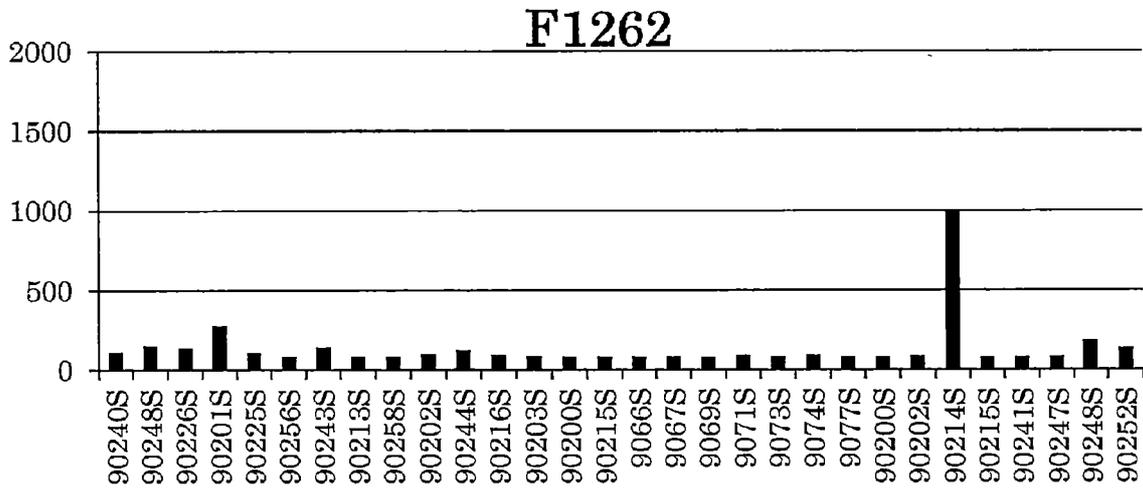


圖 37

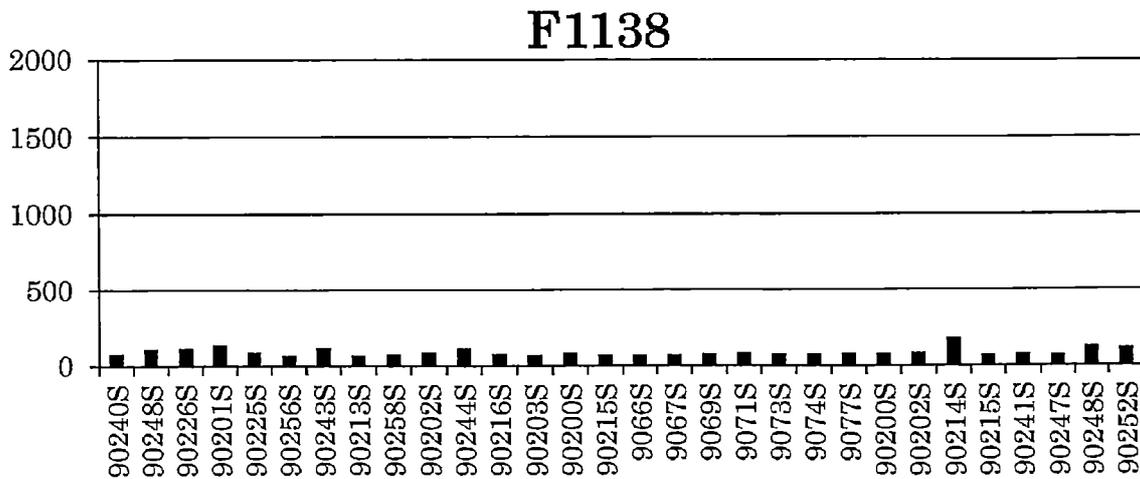


圖 38

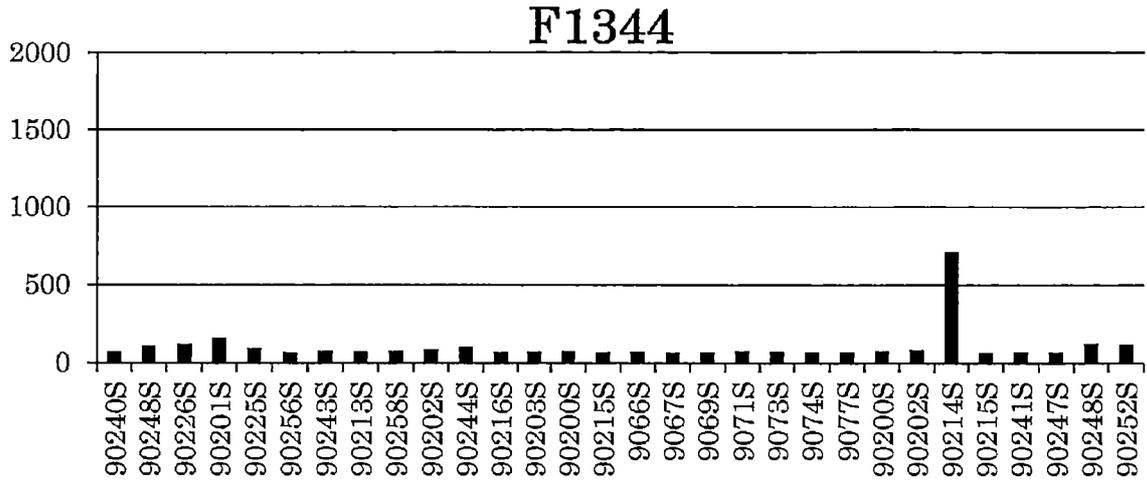


圖 39

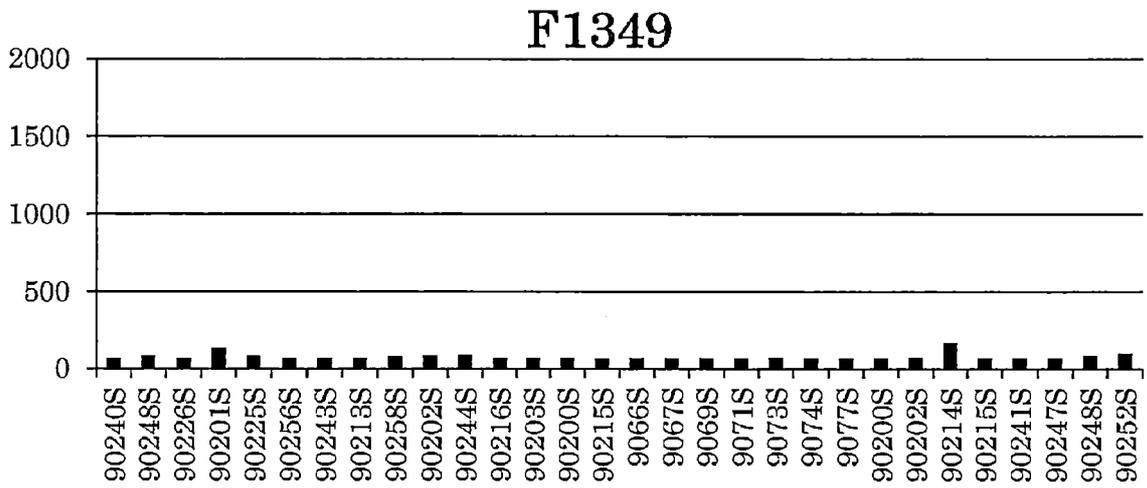


圖 40

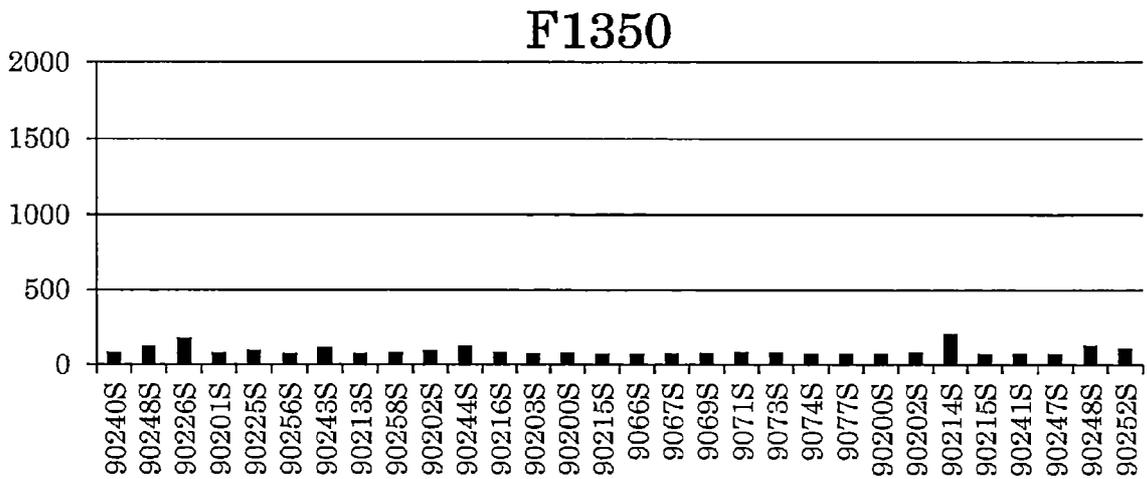


圖 41

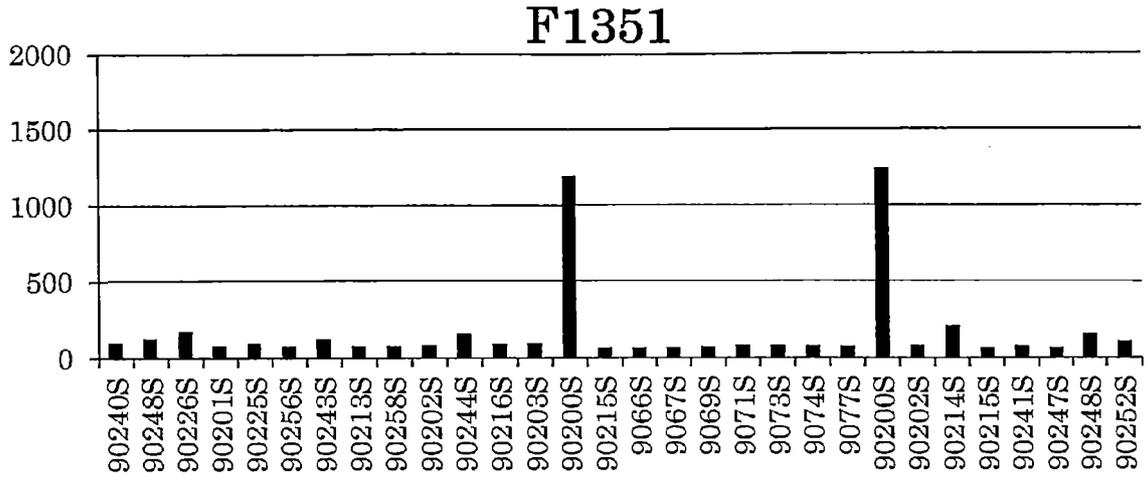


圖 42

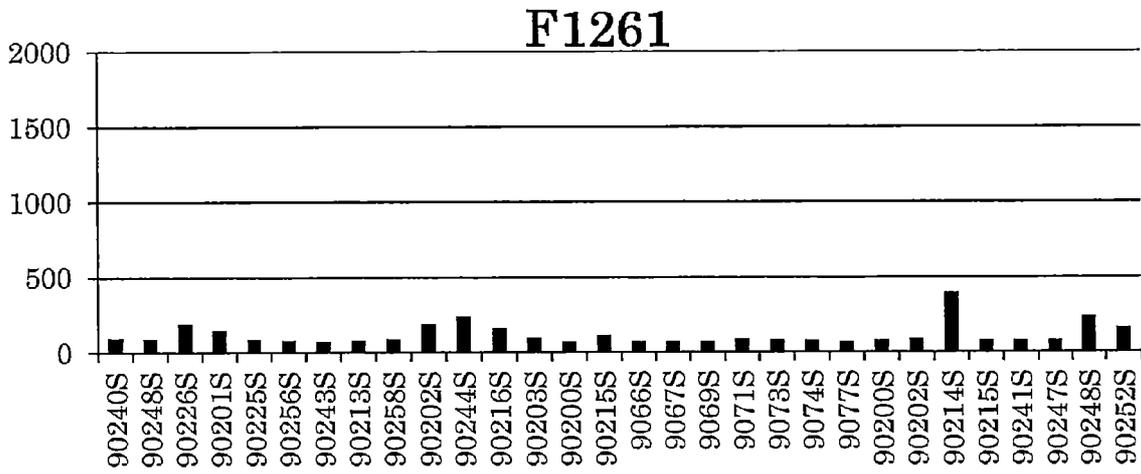


圖 43

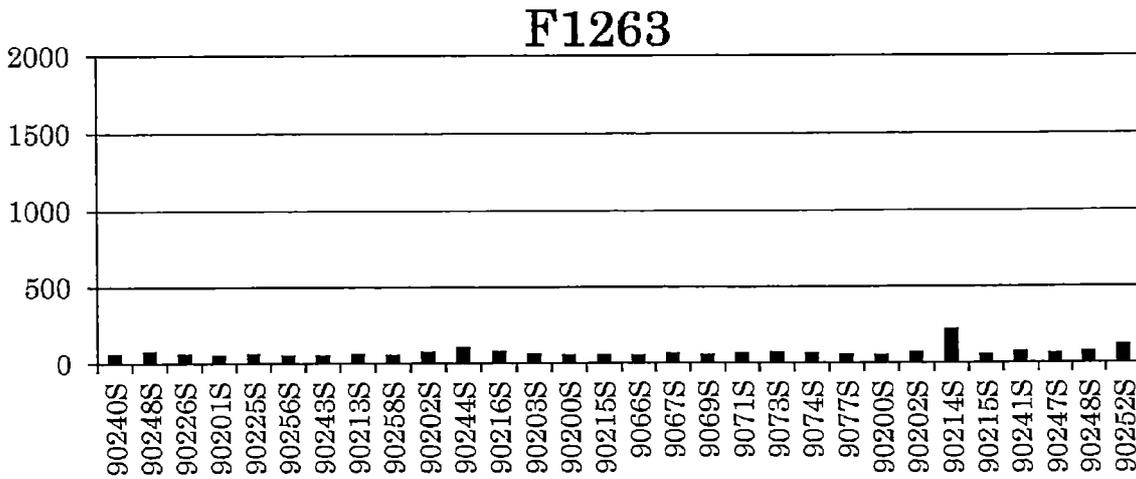


圖 44

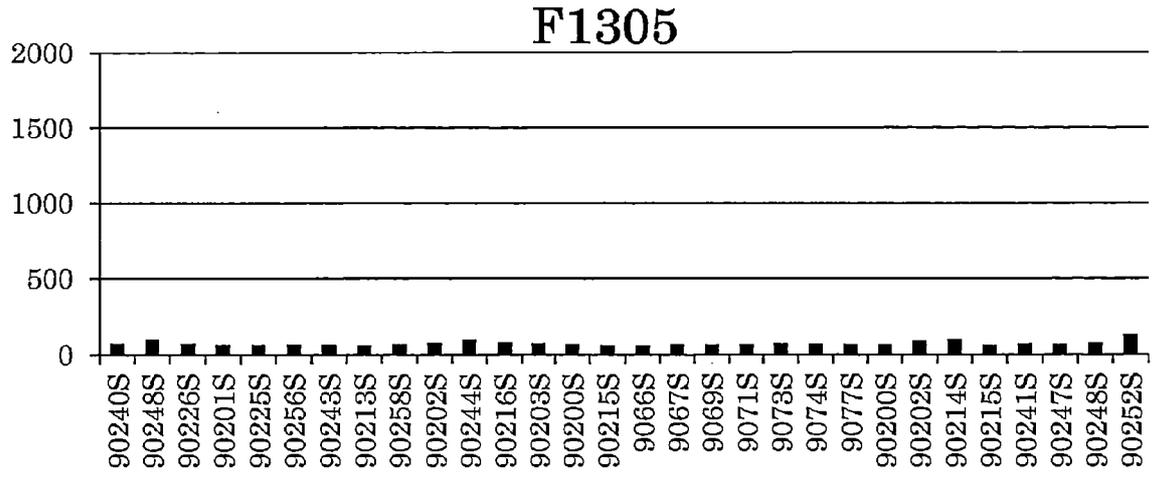


圖 45

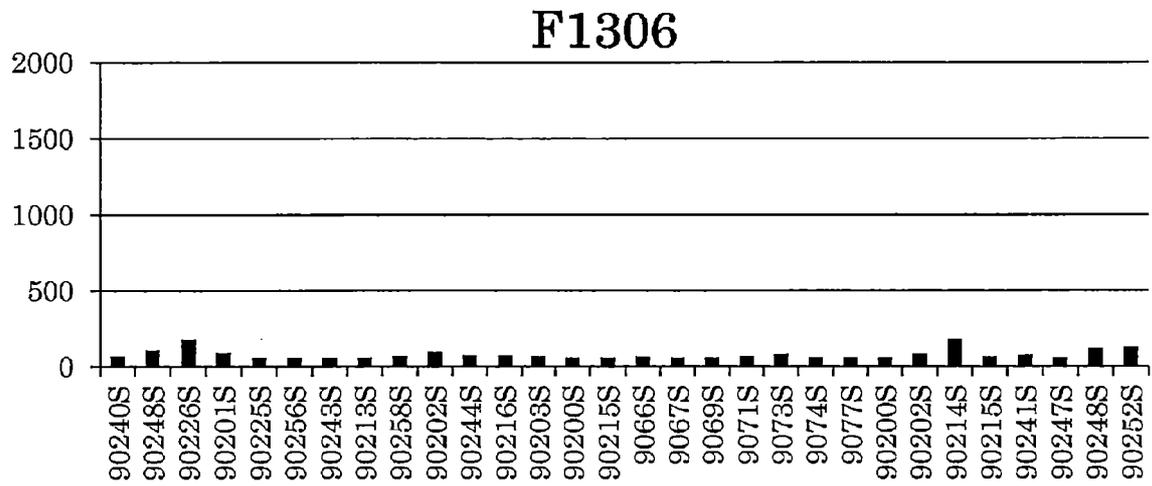


圖 46

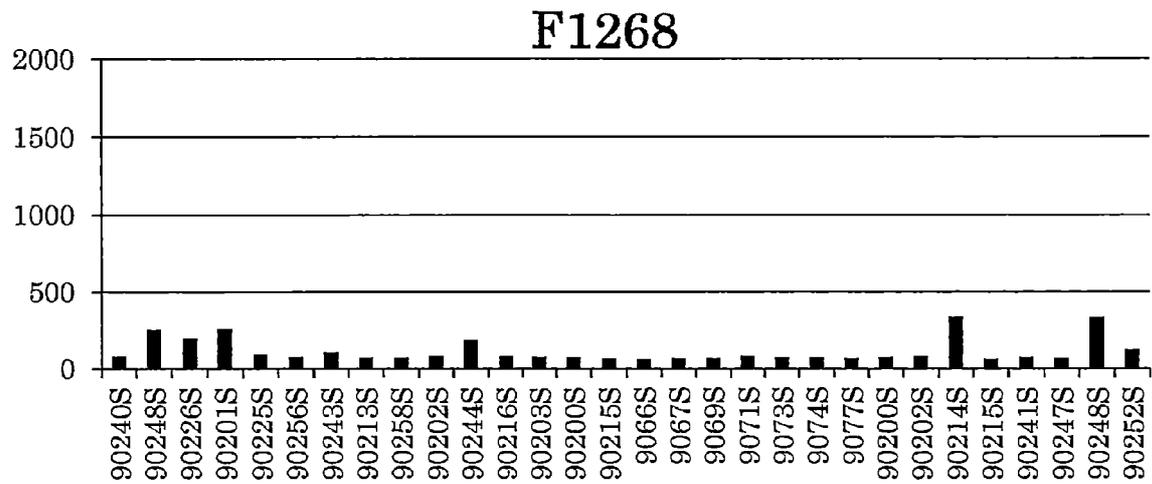


圖 47

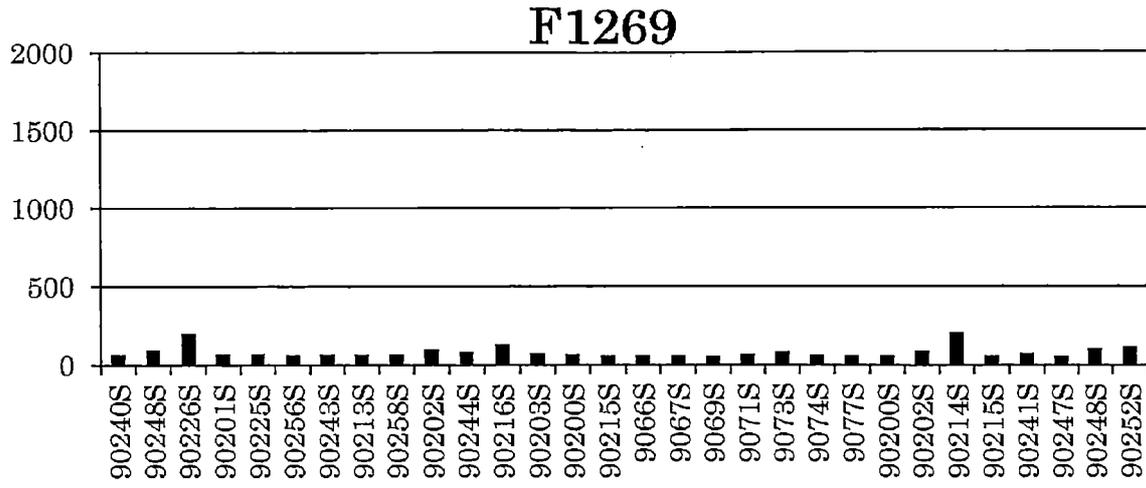


圖 48

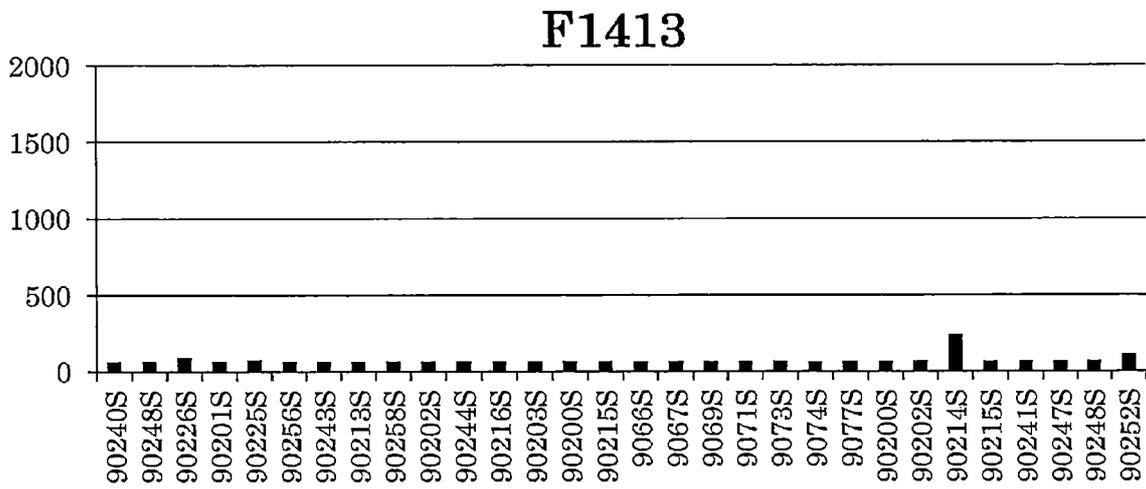


圖 49

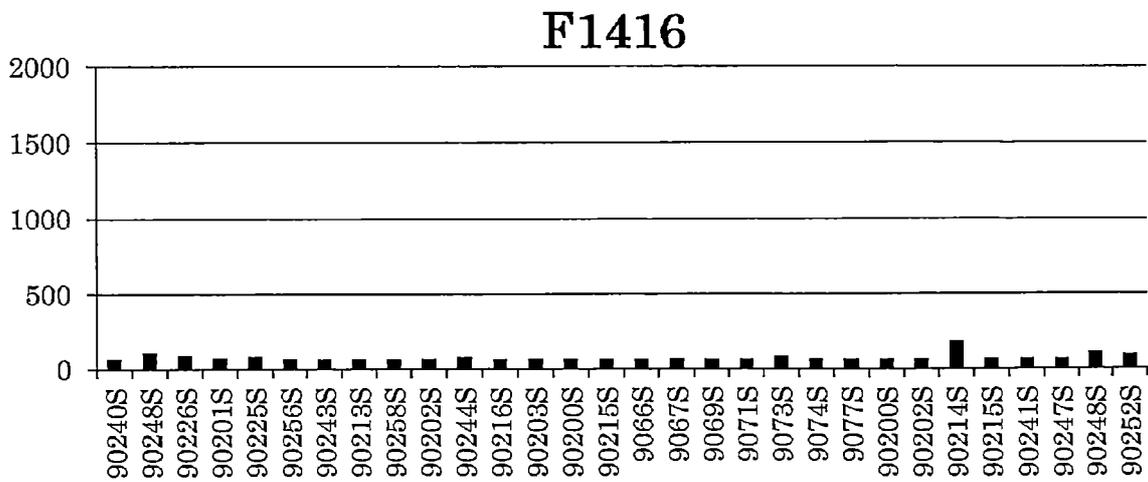


圖 50

### F1419

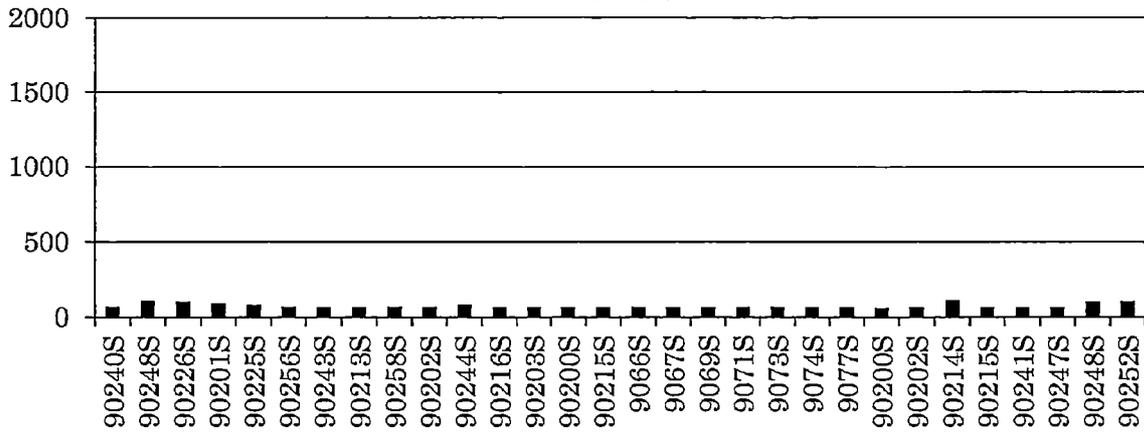


圖 51

### F1420

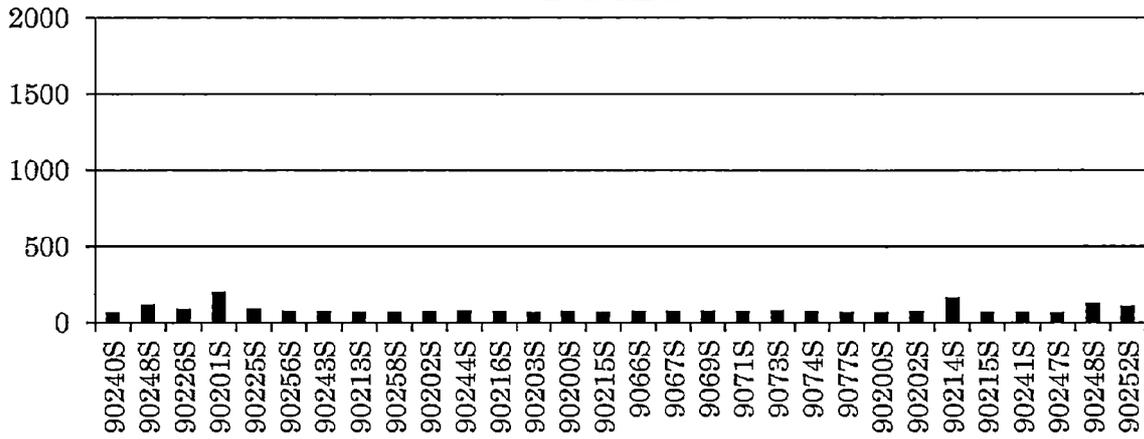


圖 52

### F1370

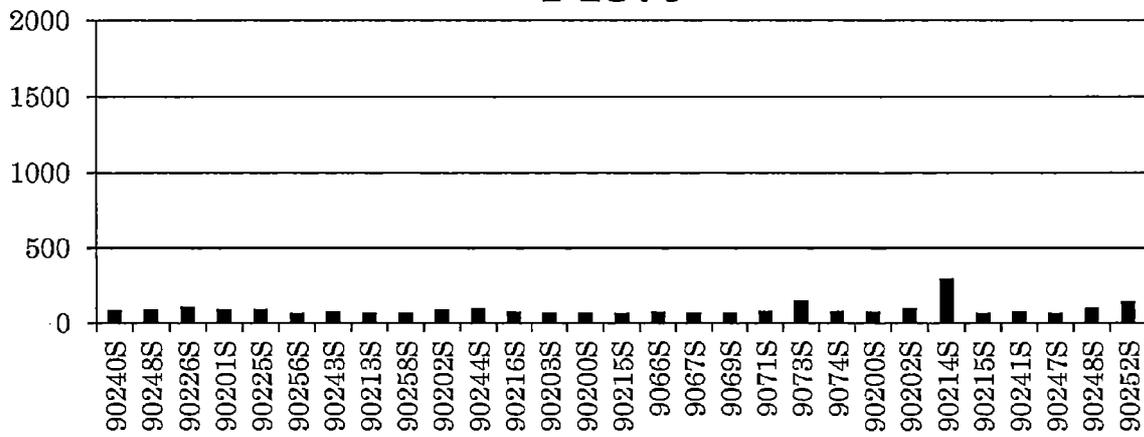


圖 53

### F1371

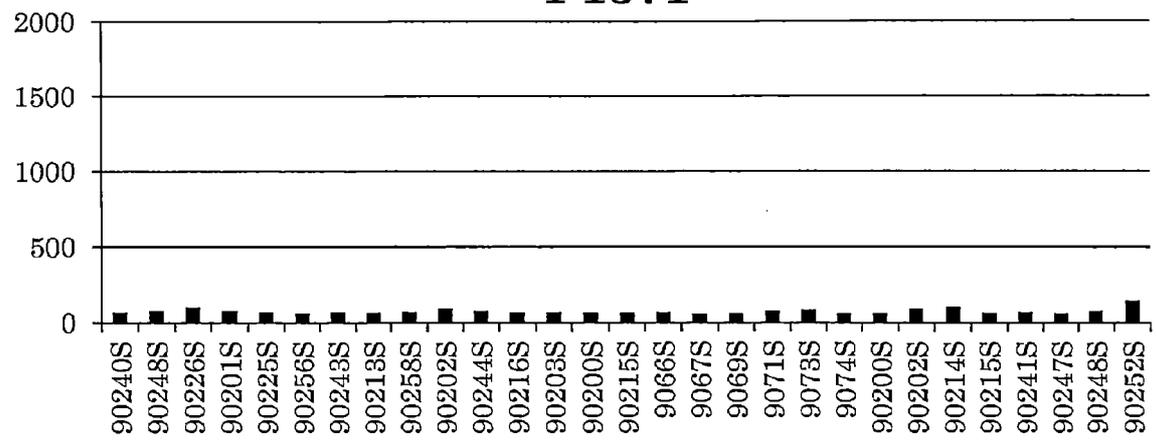


圖 54

### F1599

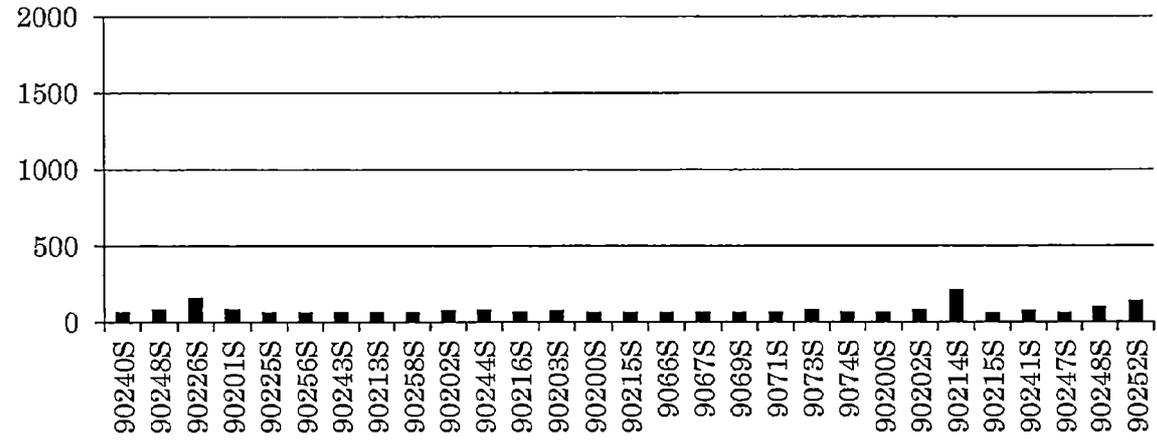


圖 55

### F1600

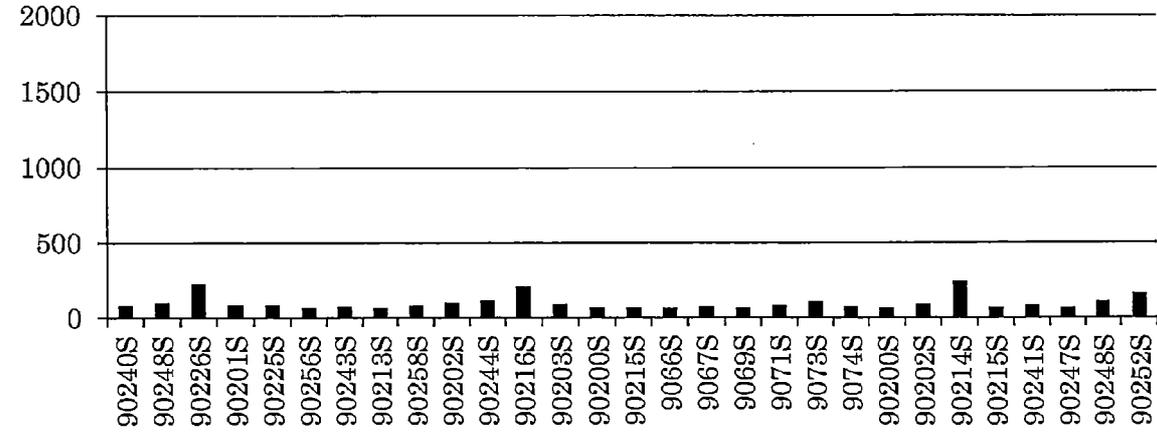


圖 56

### F1566

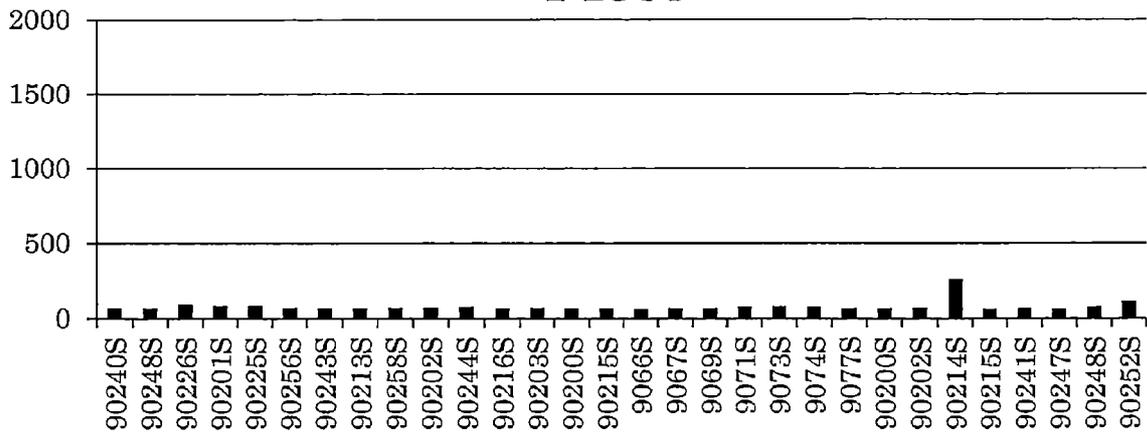


圖 57

### F1448

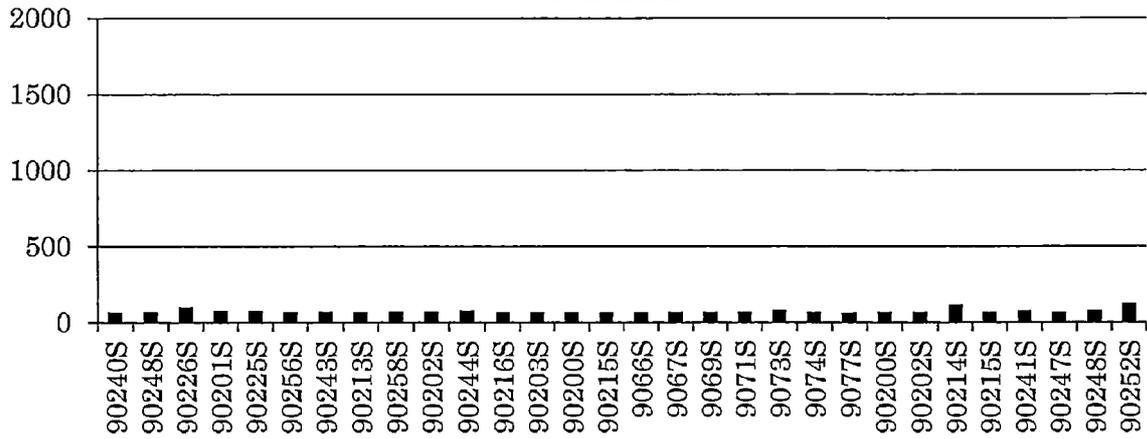


圖 58

### F1601

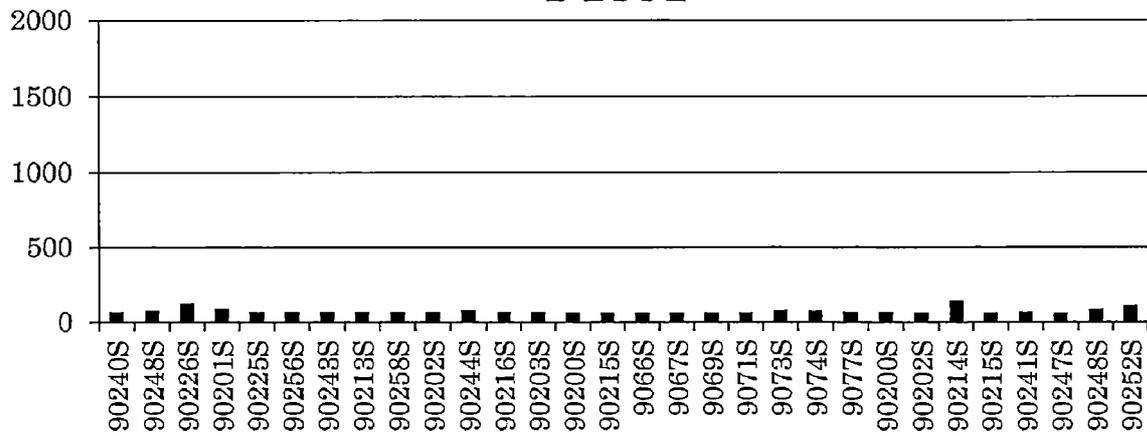


圖 59

### F1602

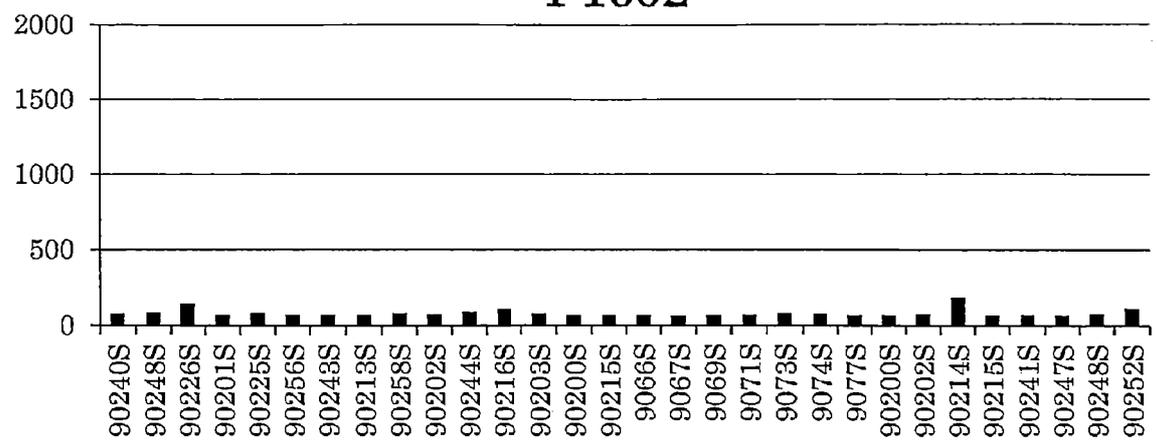


圖 60

### F1603

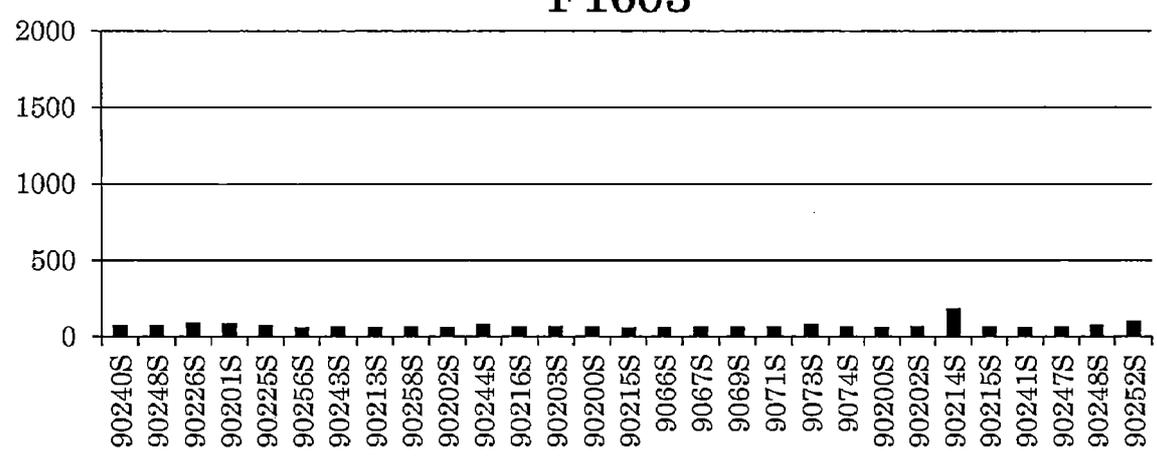


圖 61

### F1531

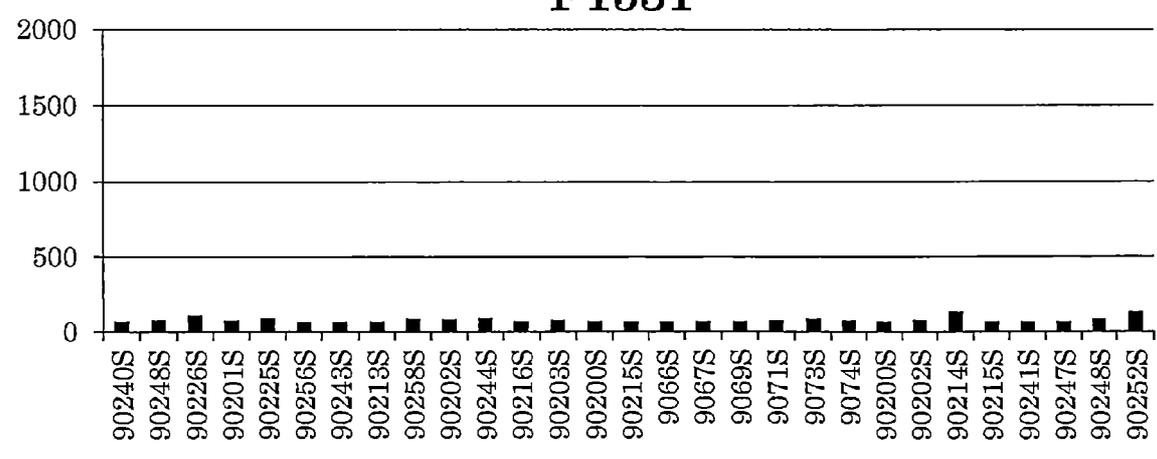


圖 62

### F1604

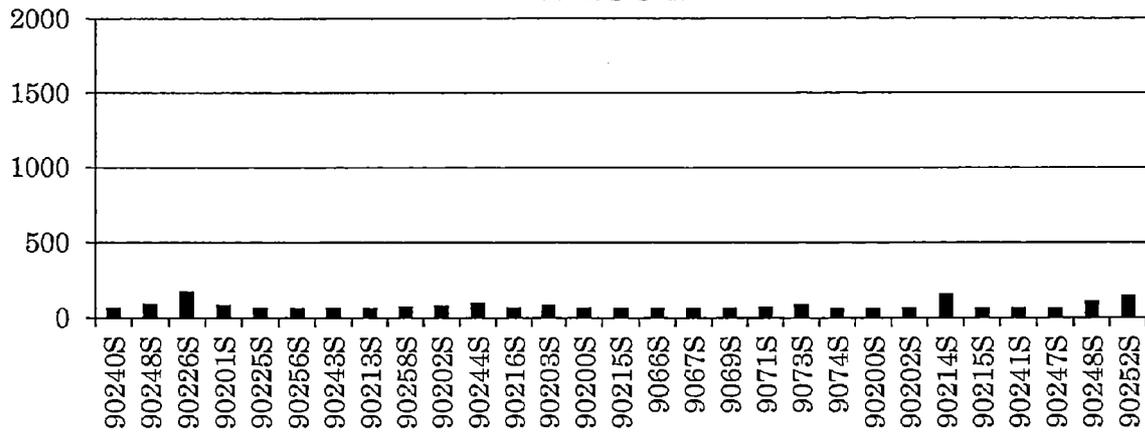


圖 63

### F1605

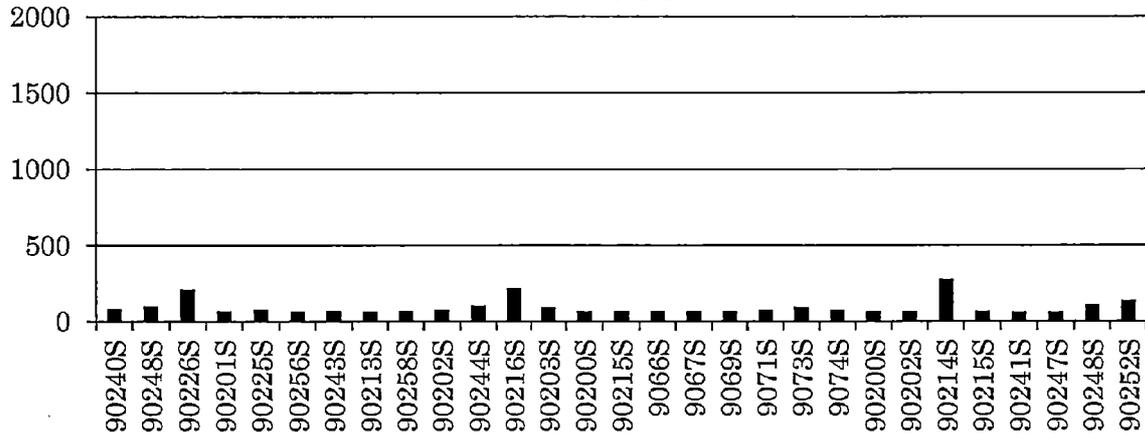


圖 64

### F1586

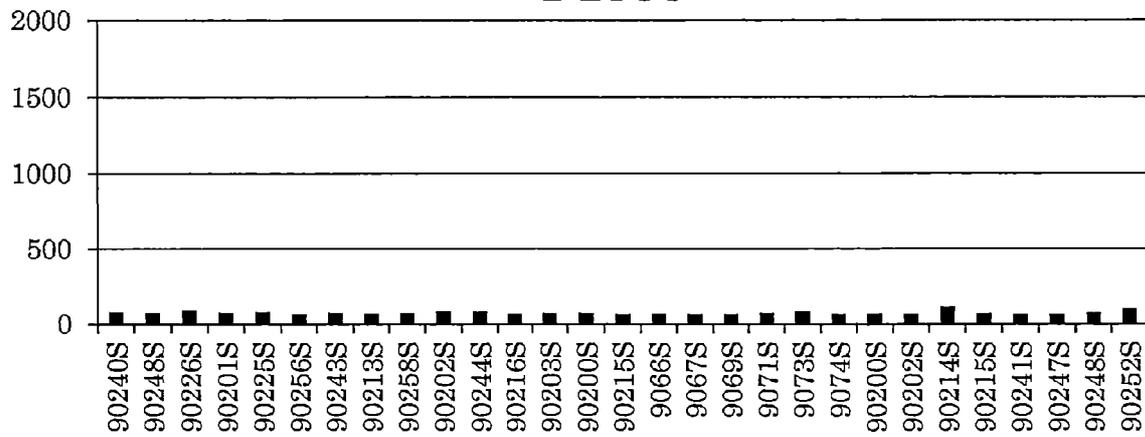


圖 65

### F1592

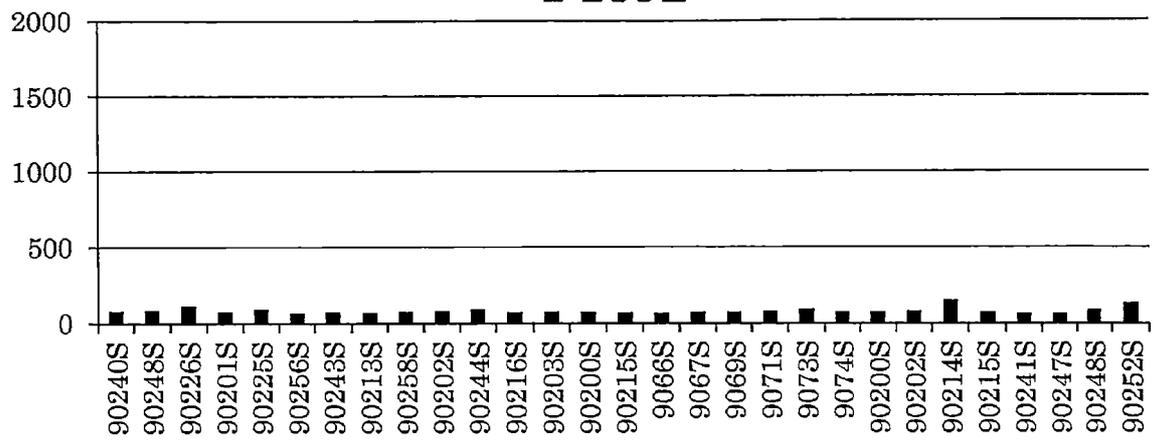


圖 66

### F1610

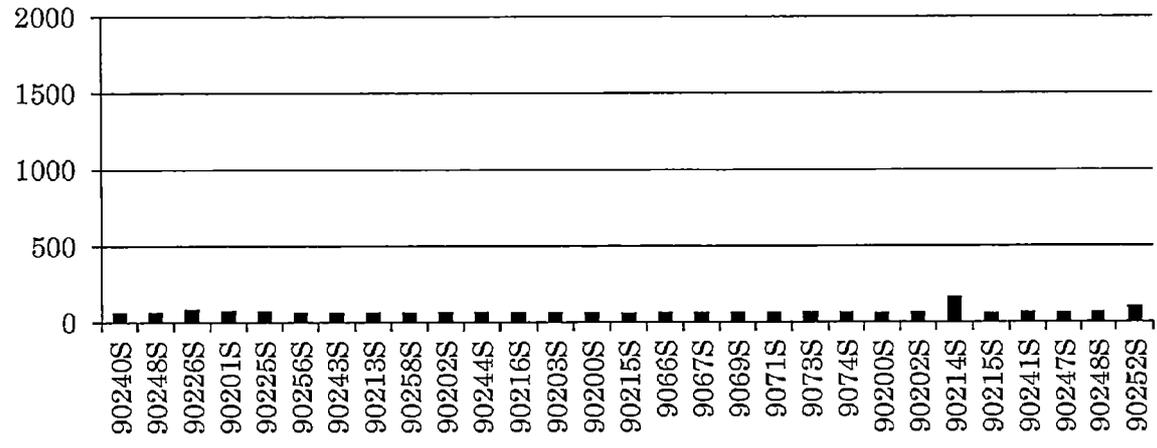


圖 67

### F1611

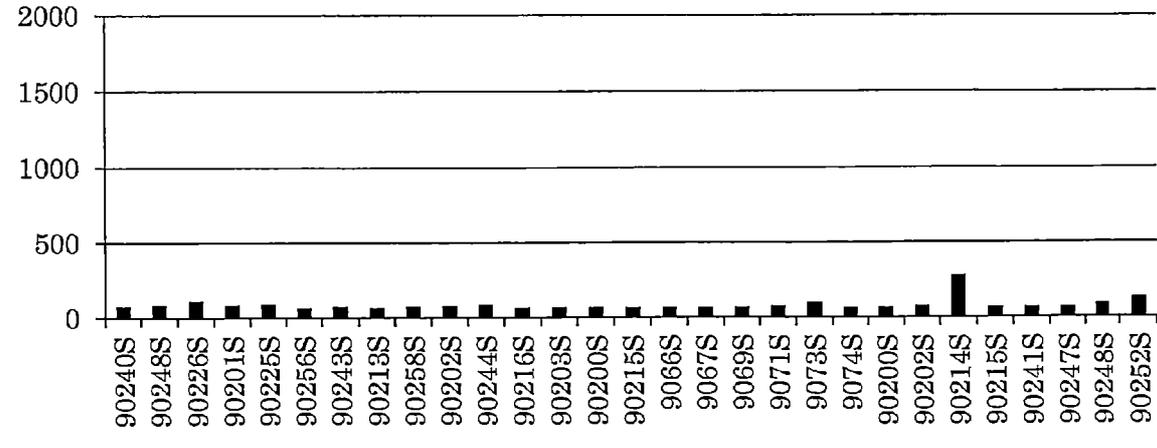


圖 68

### F1612

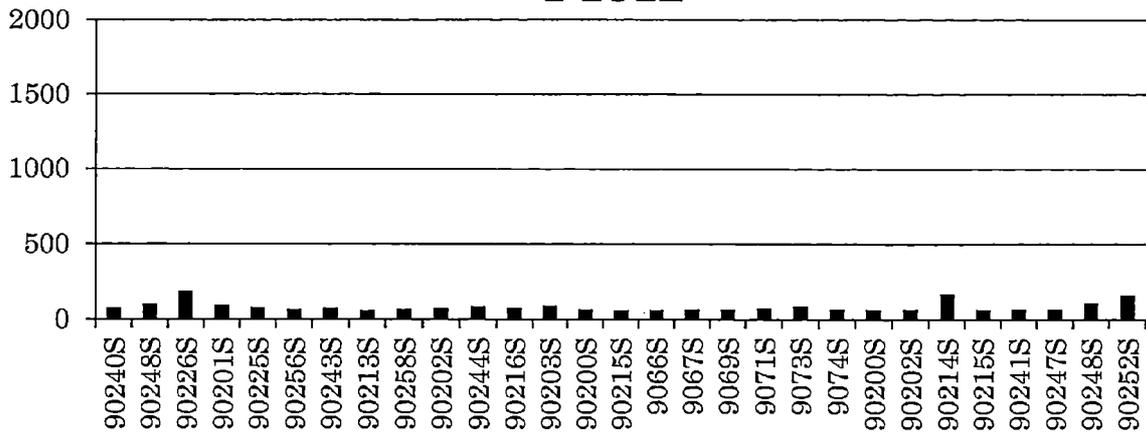


圖 69

### F1613

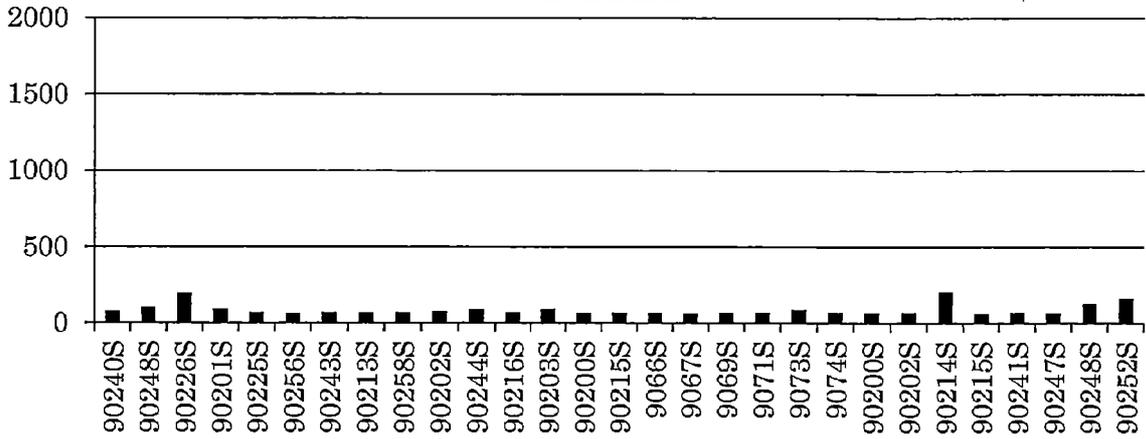


圖 70

### F1614

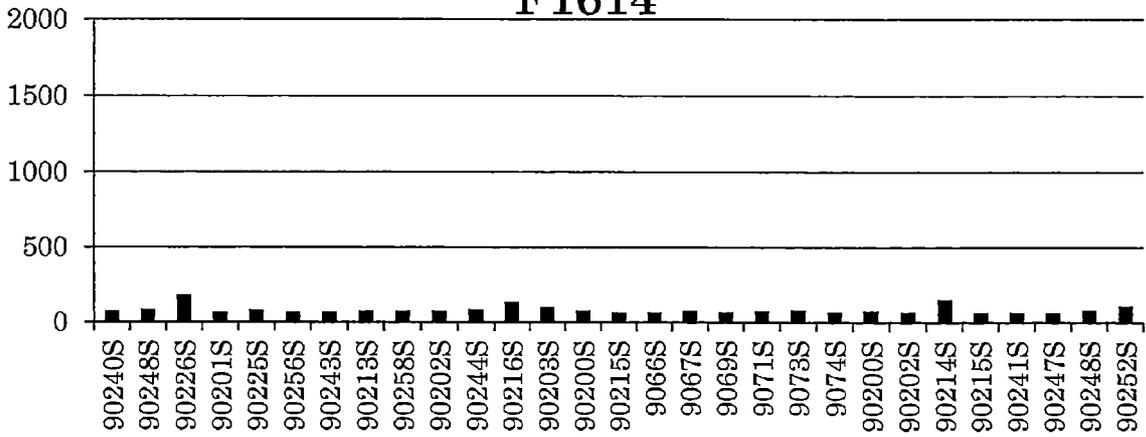


圖 71

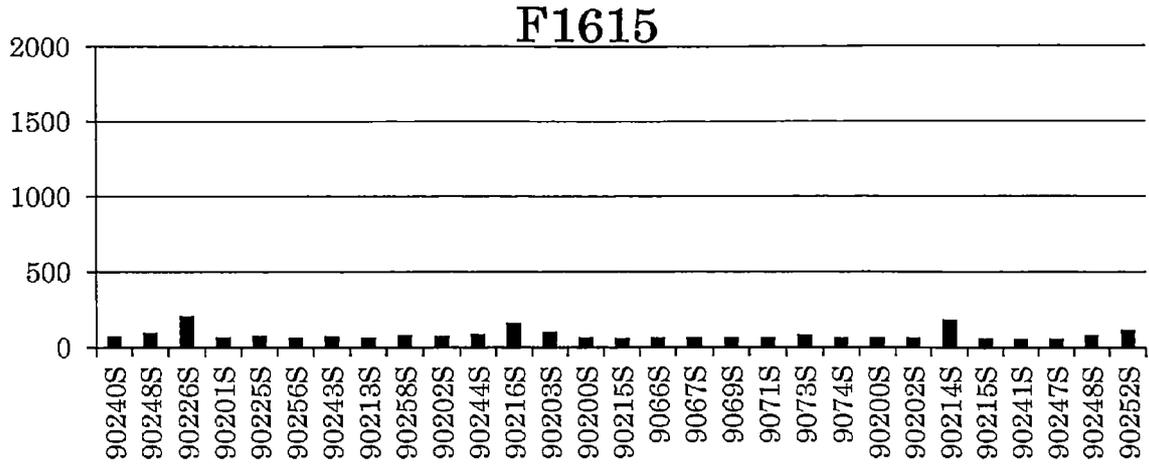


圖 72

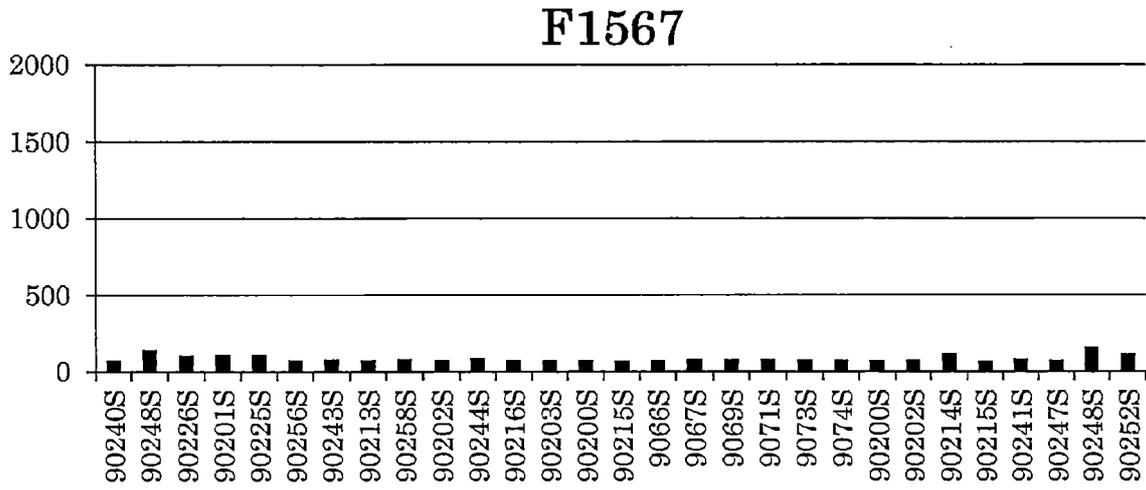


圖 73

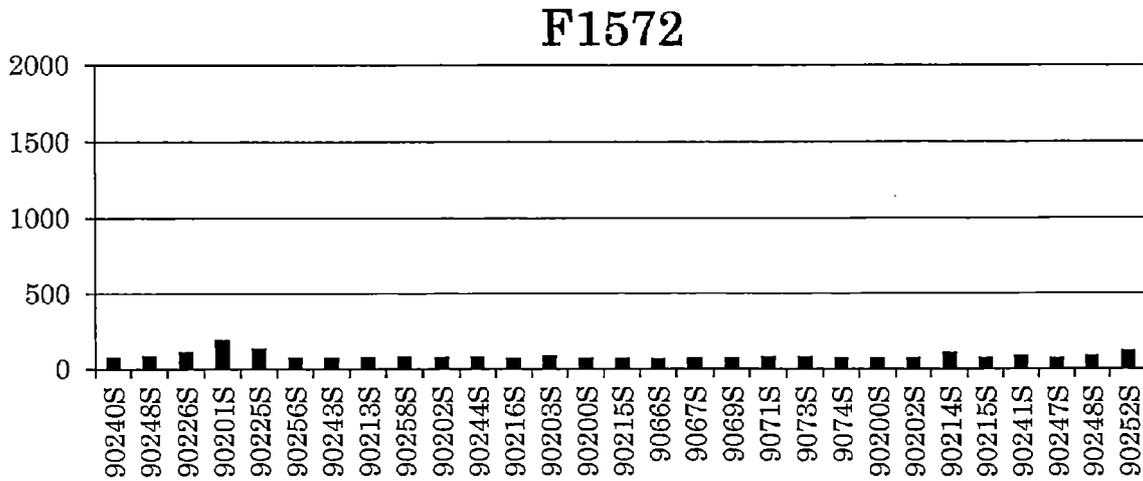


圖 74

### F1576

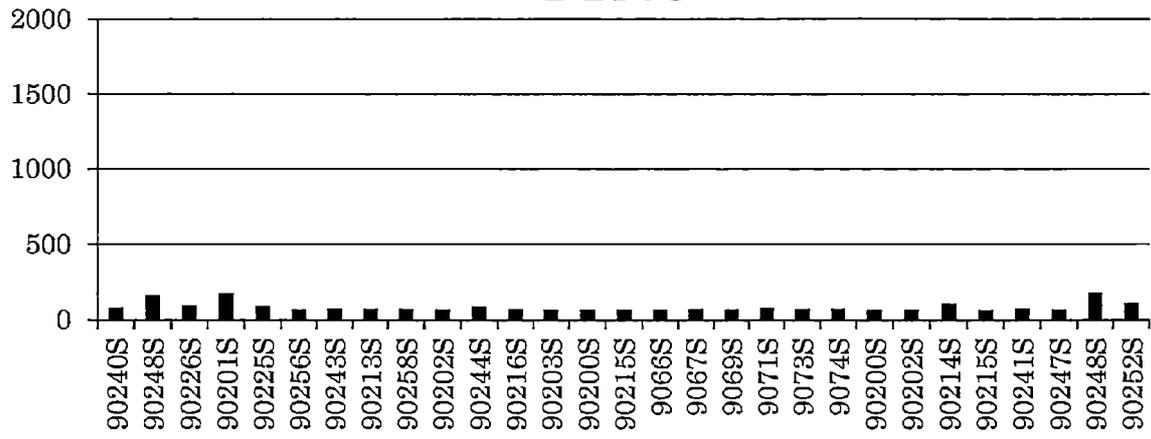


圖 75

### F1578

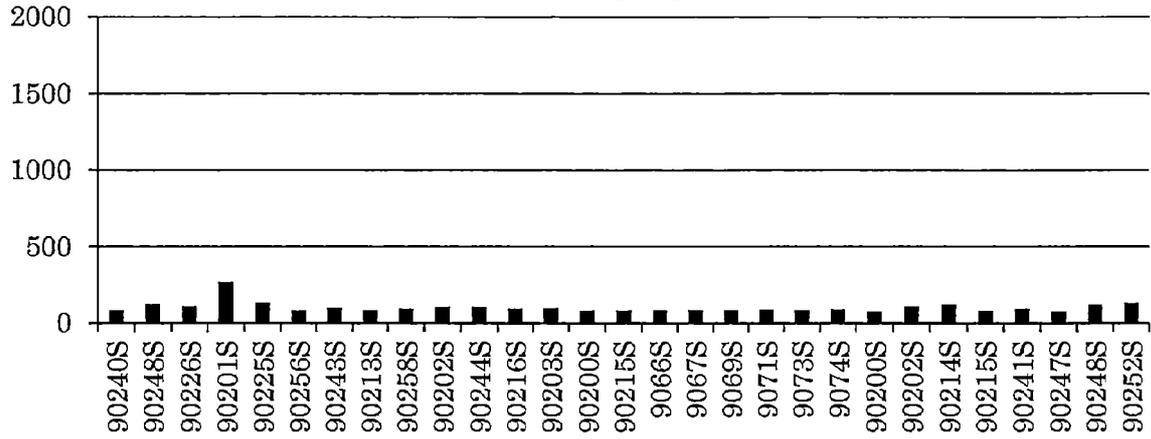


圖 76

### F1579

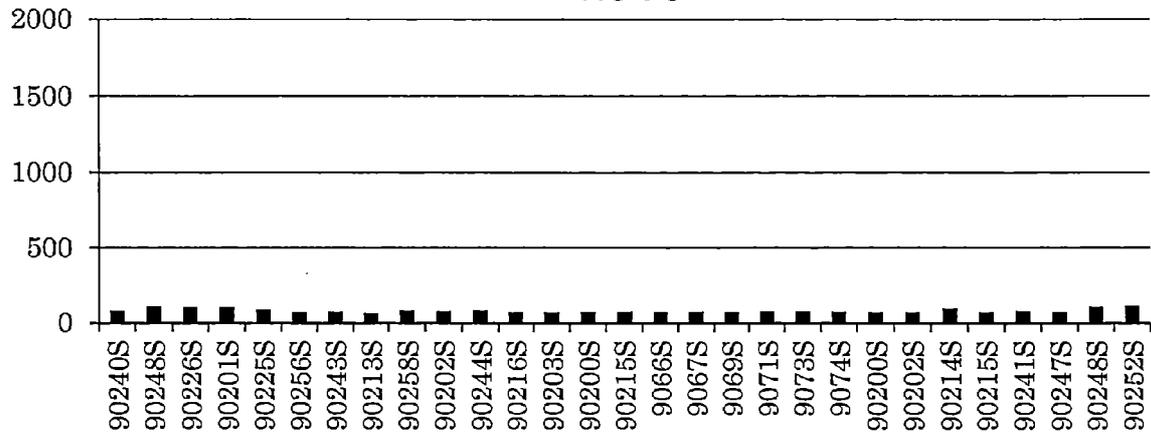


圖 77

### F1641

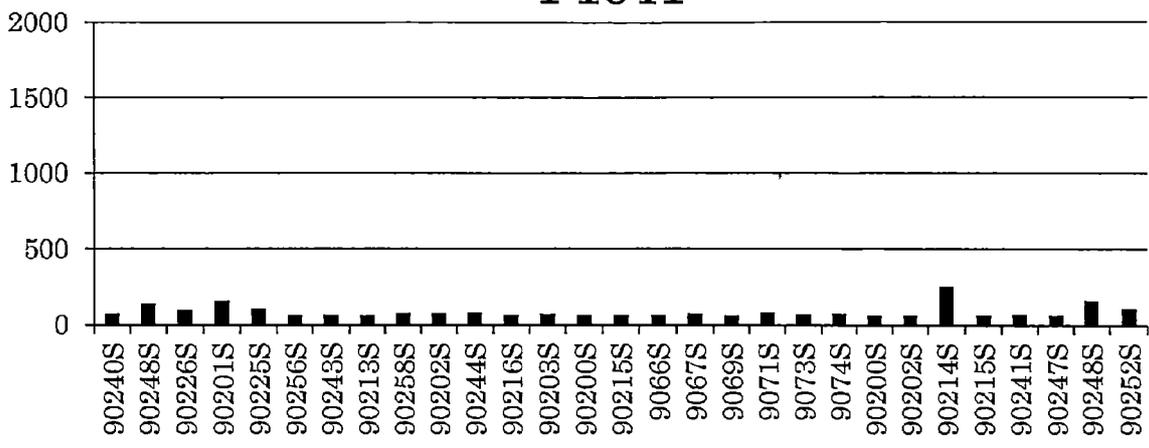


圖 78

### F1642

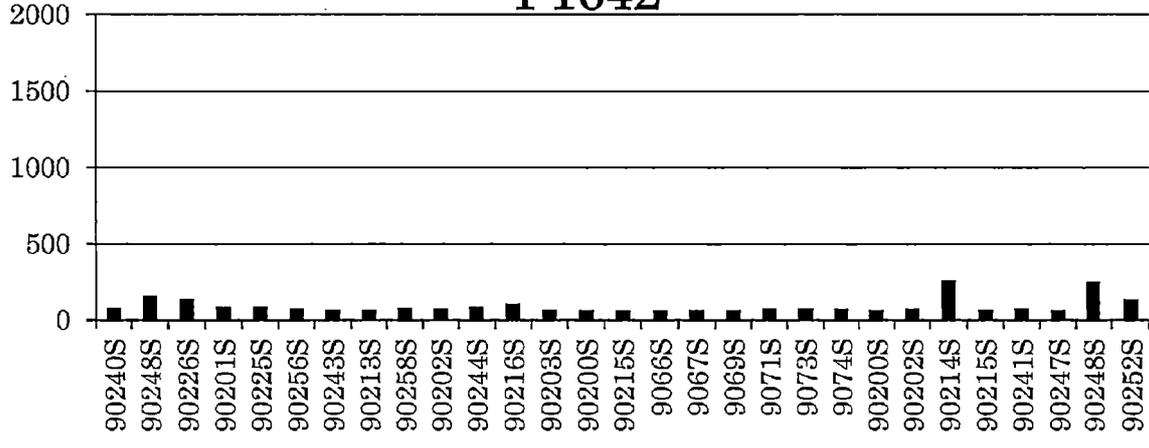


圖 79

### F1643

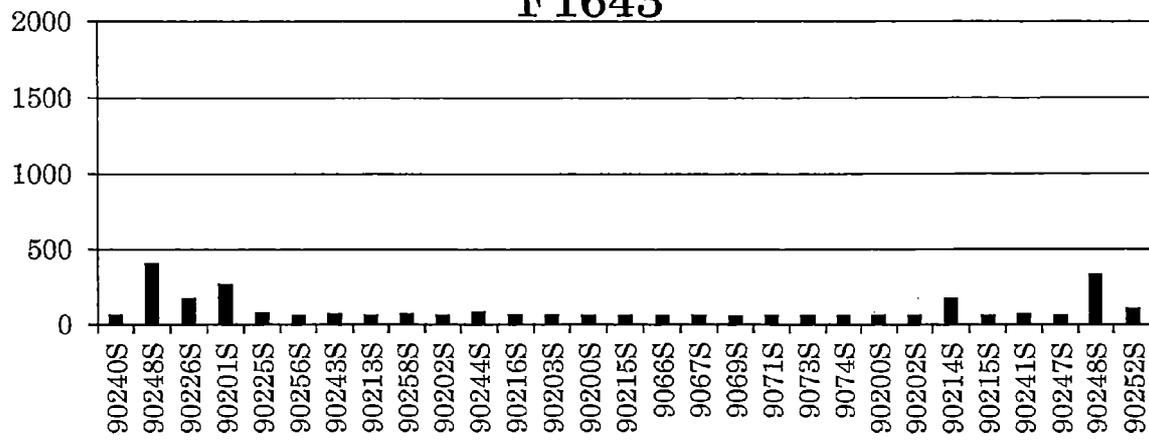


圖 80

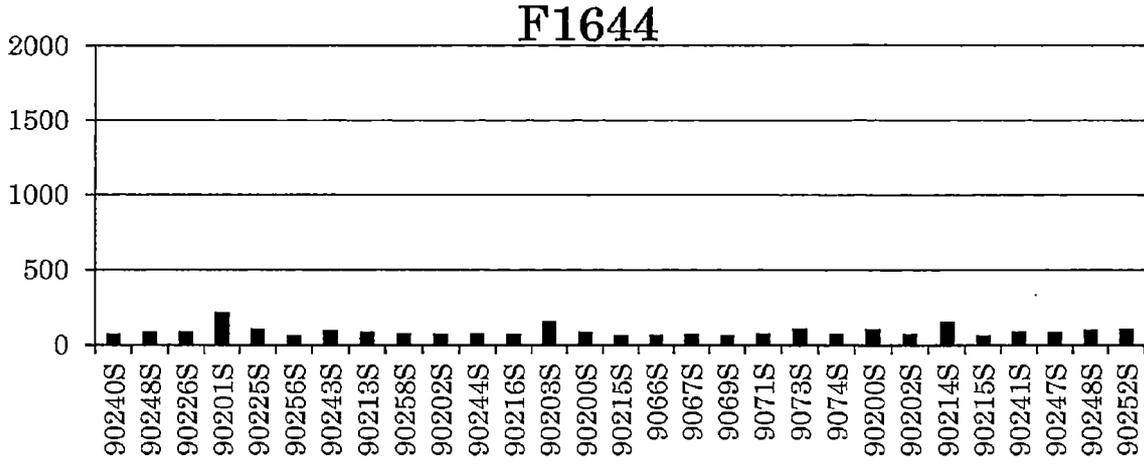


圖 81

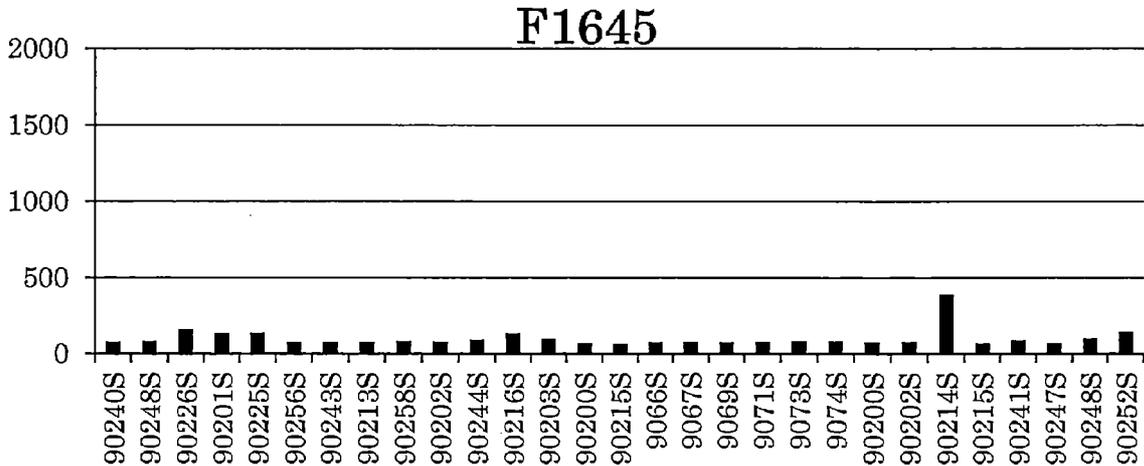


圖 82

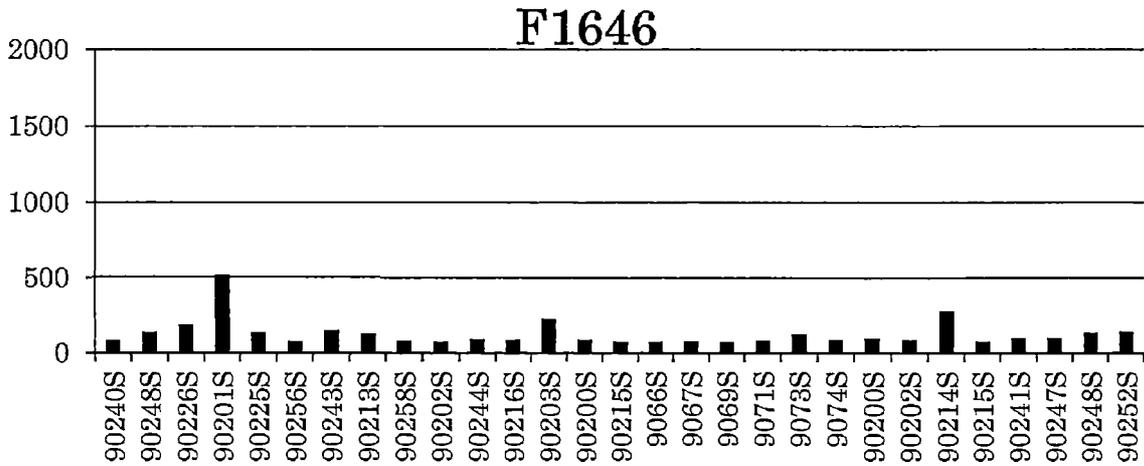


圖 83

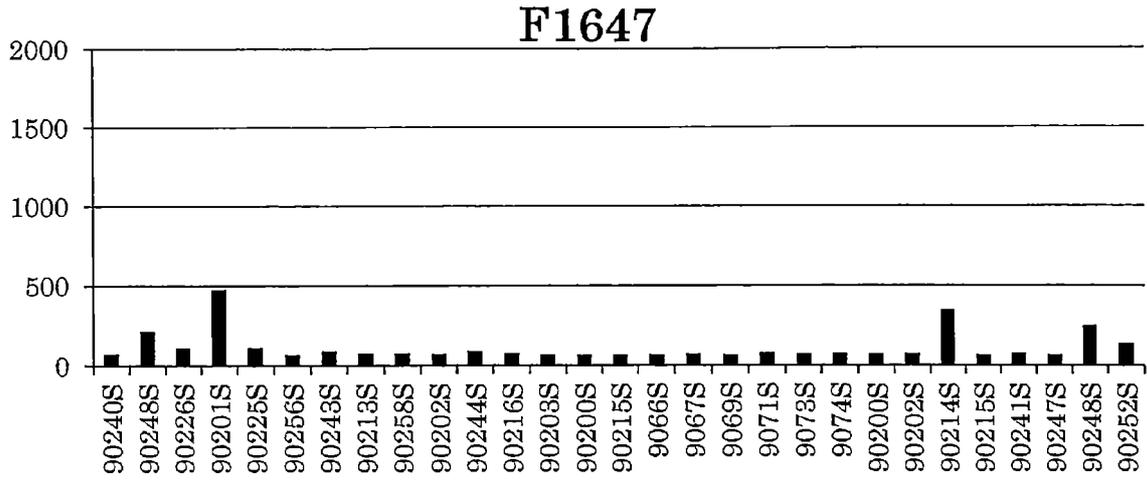


圖 84

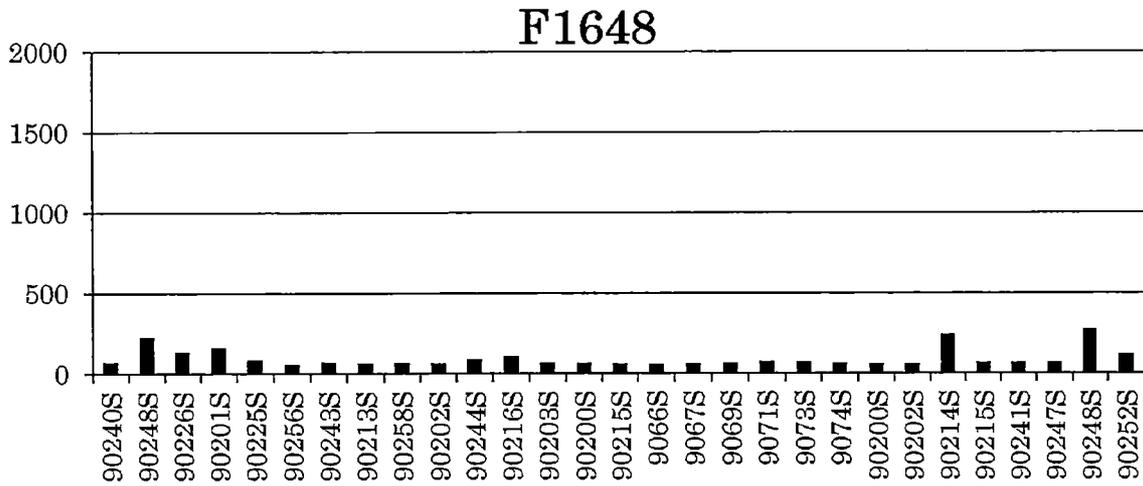


圖 85

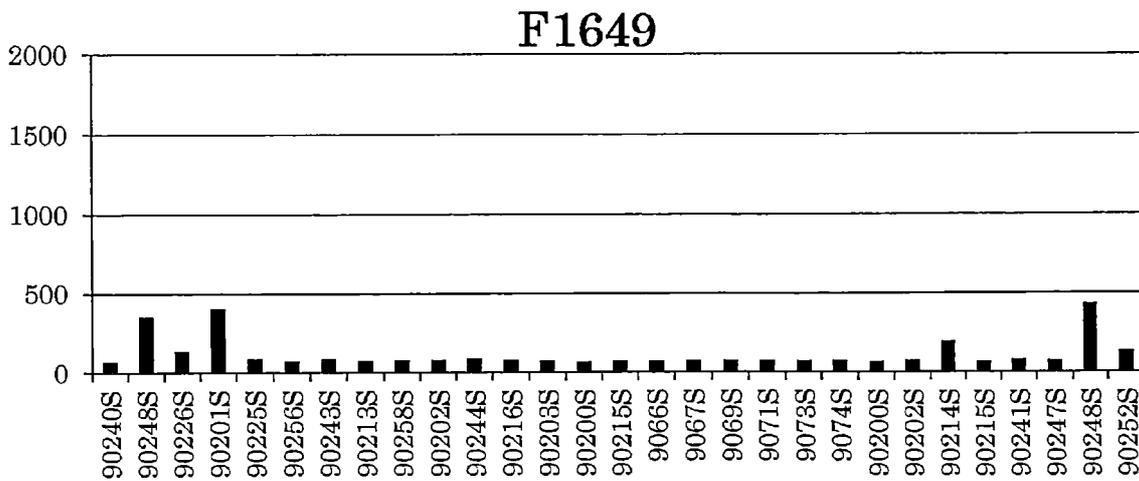


圖 86

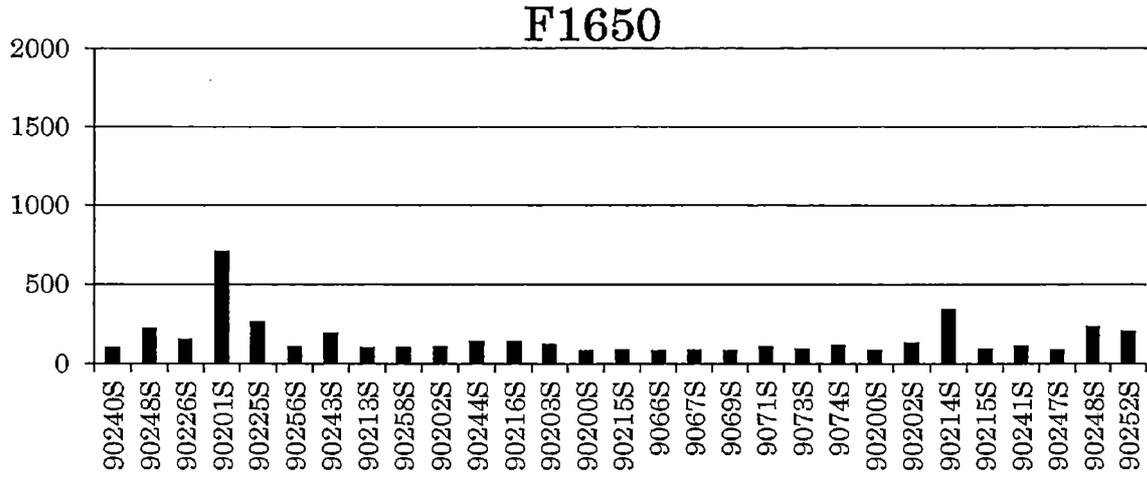


圖 87

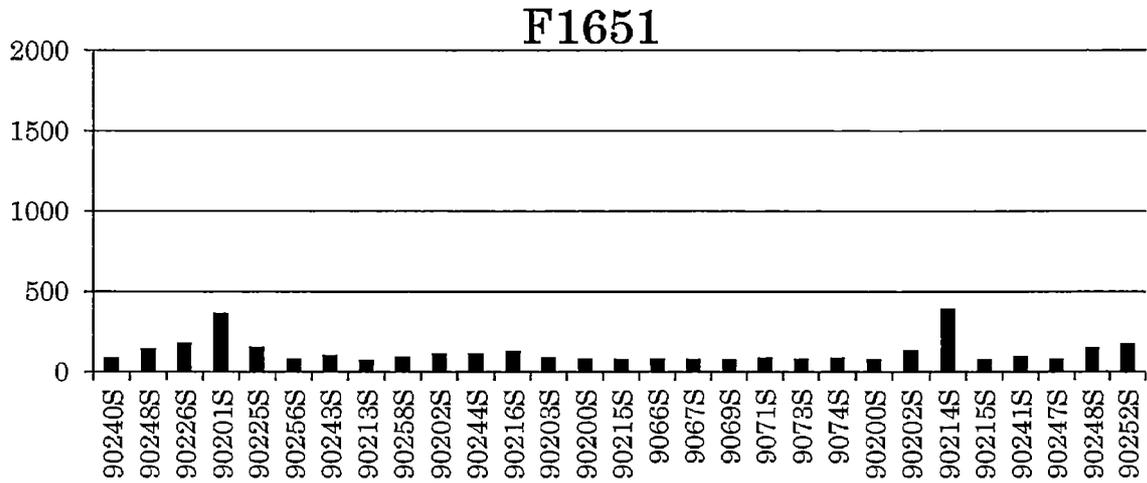


圖 88

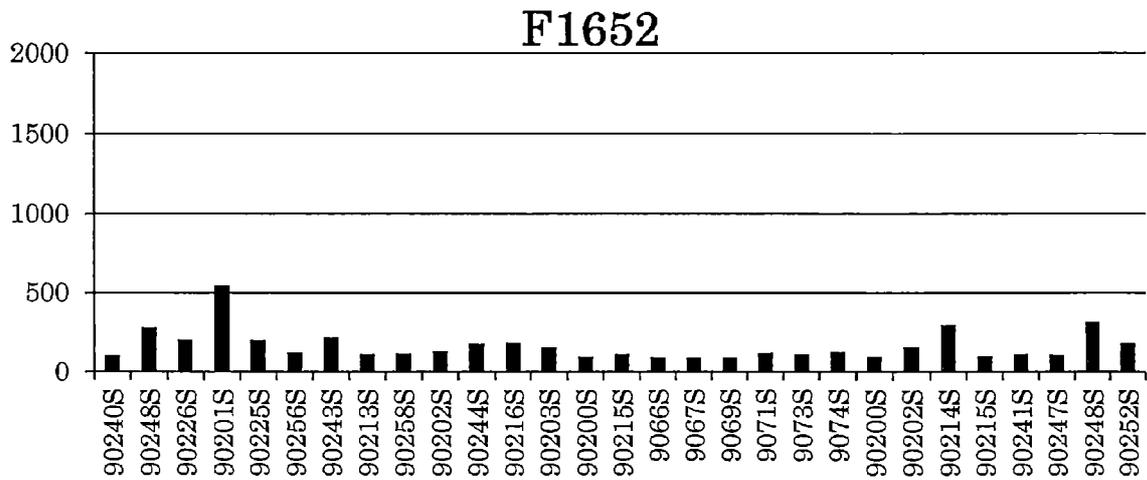


圖 89

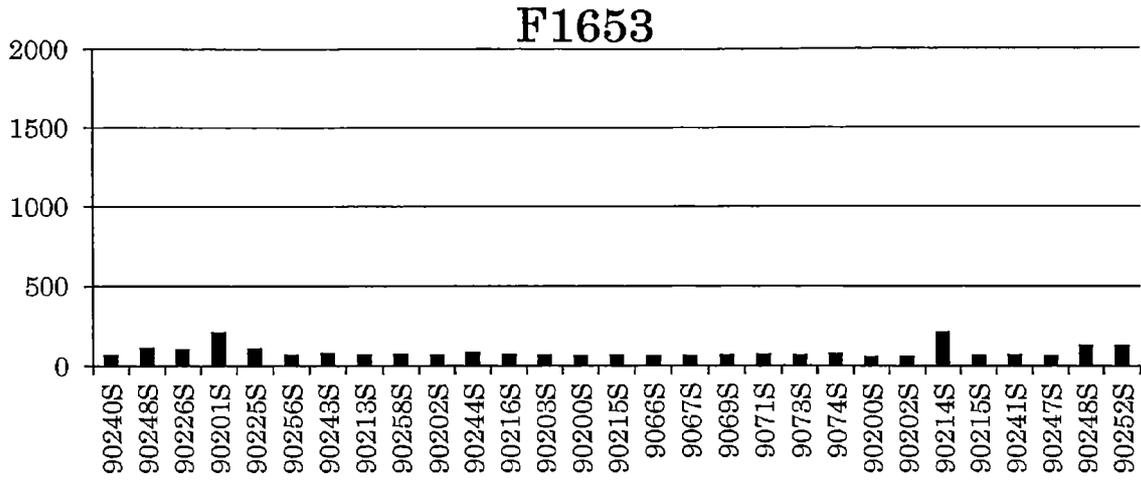


圖 90

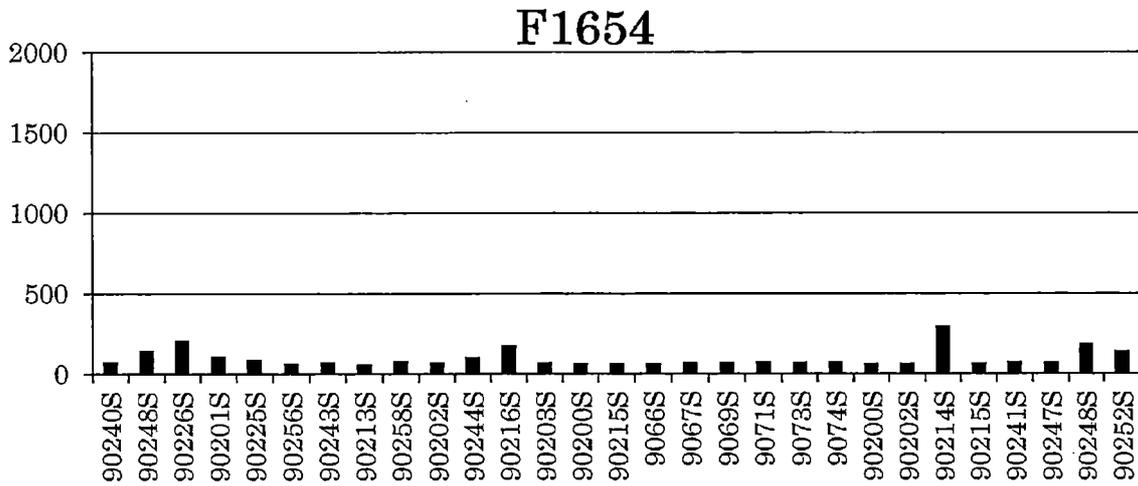


圖 91

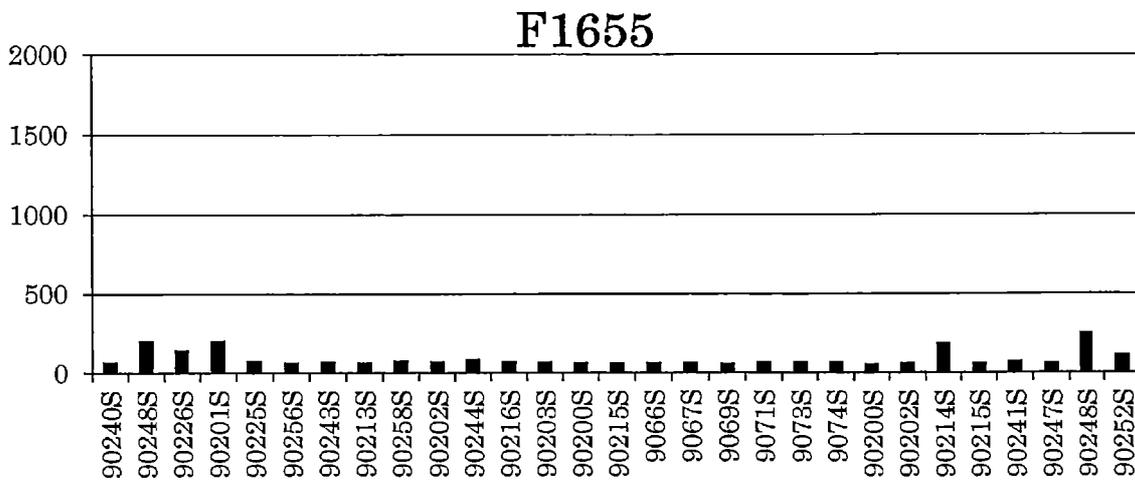


圖 92

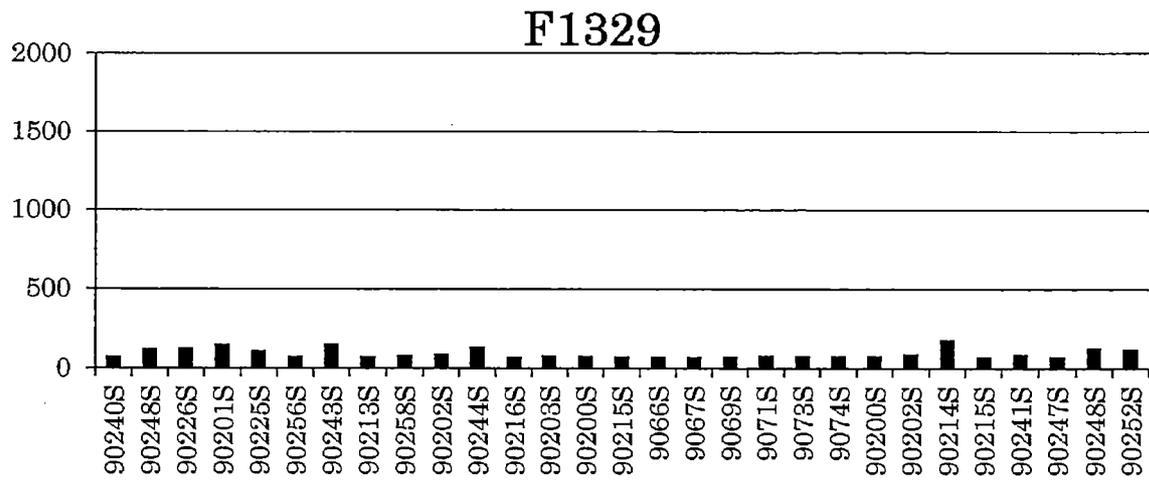


圖 93

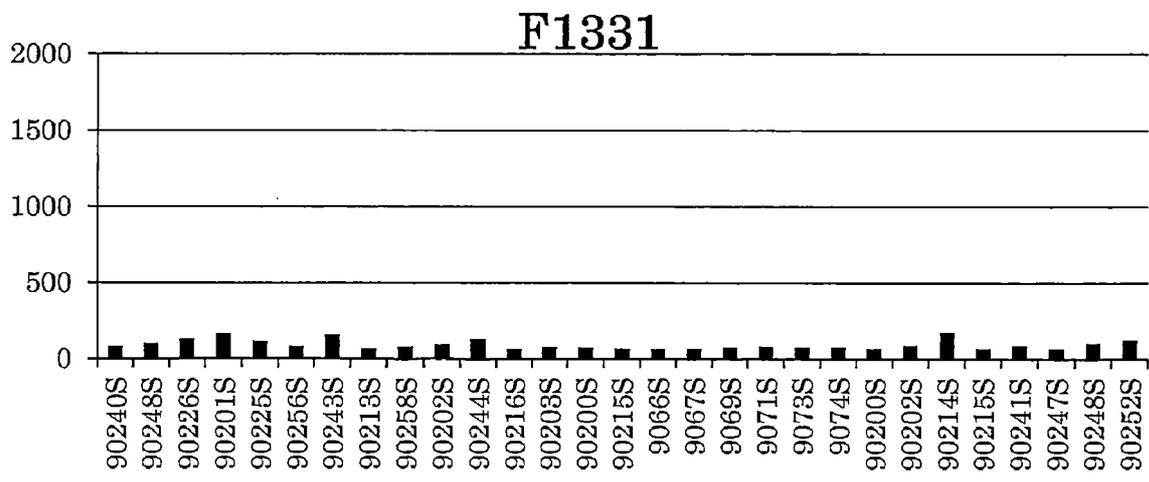


圖 94

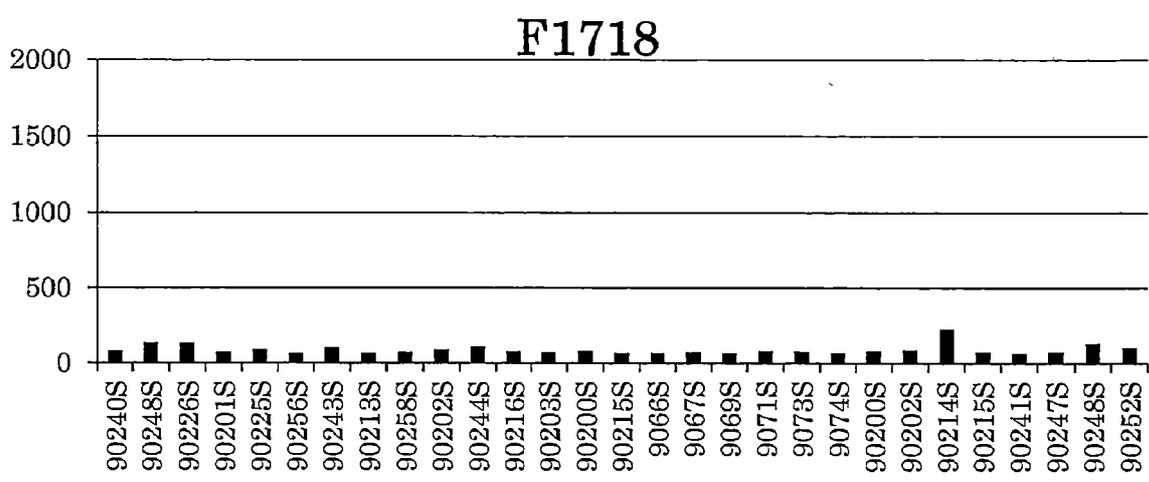


圖 95

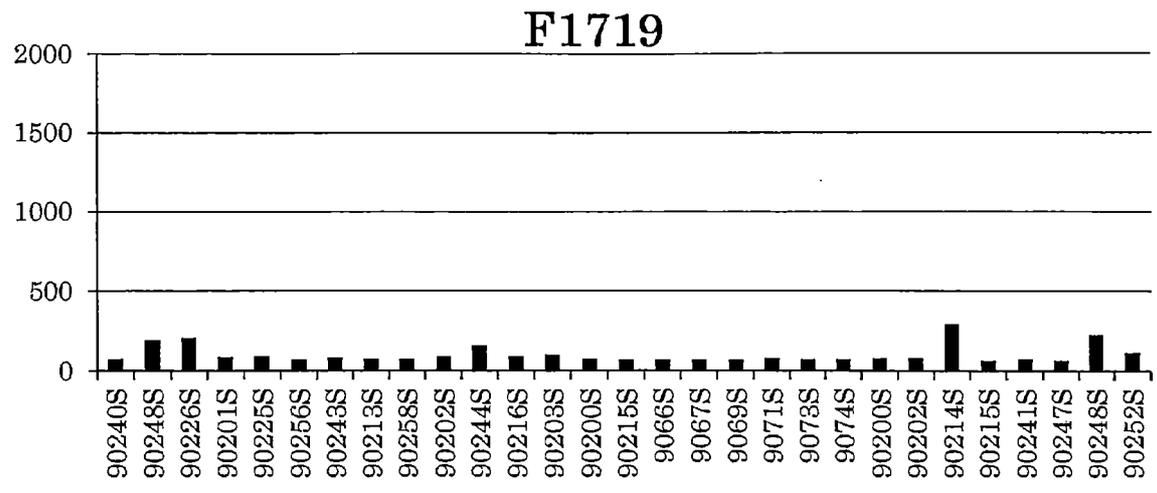


圖 96

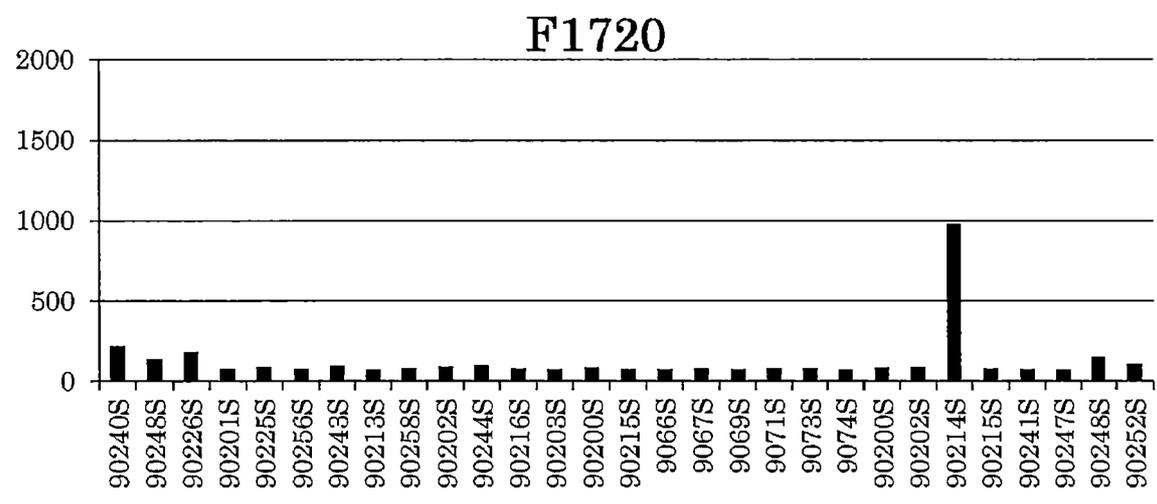


圖 97

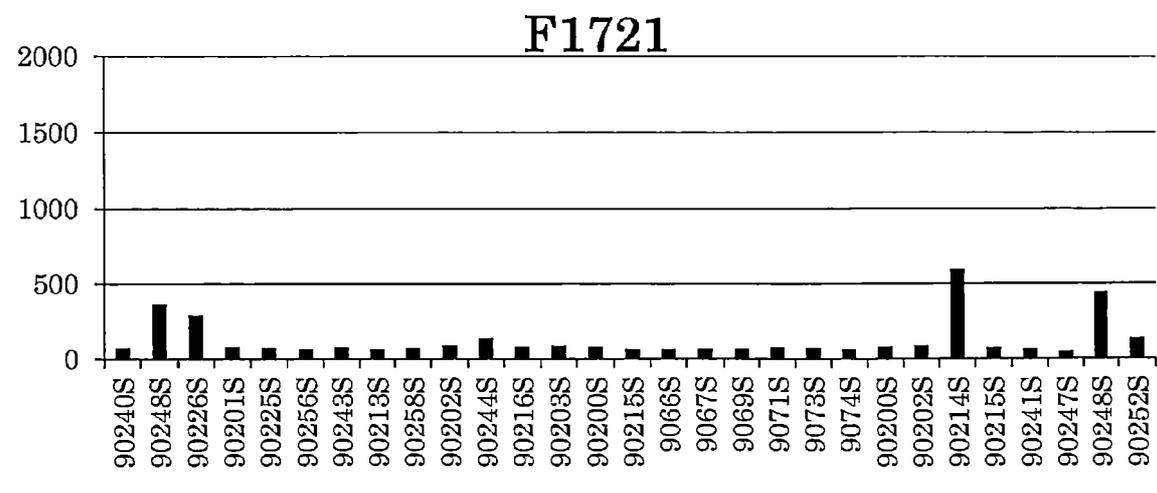


圖 98

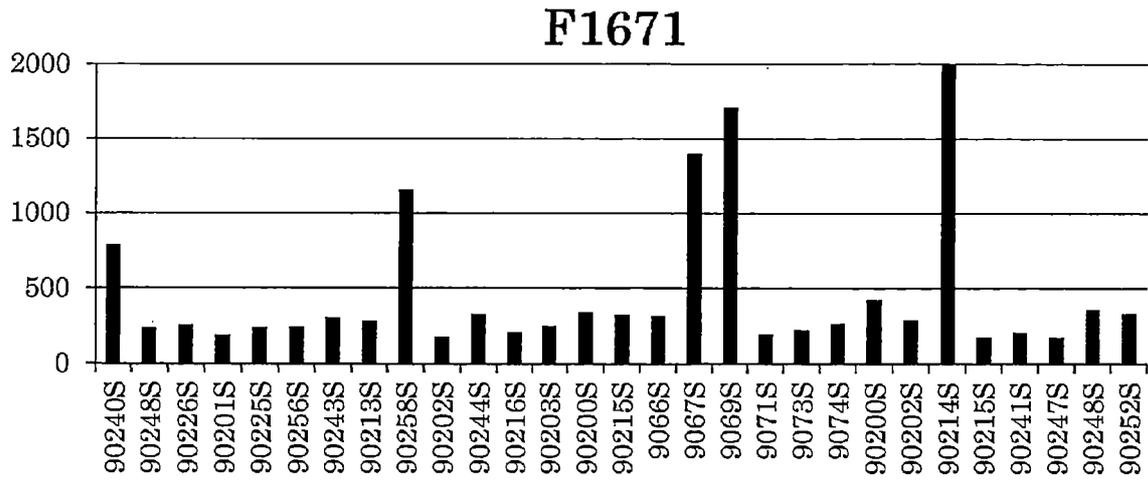


圖 99

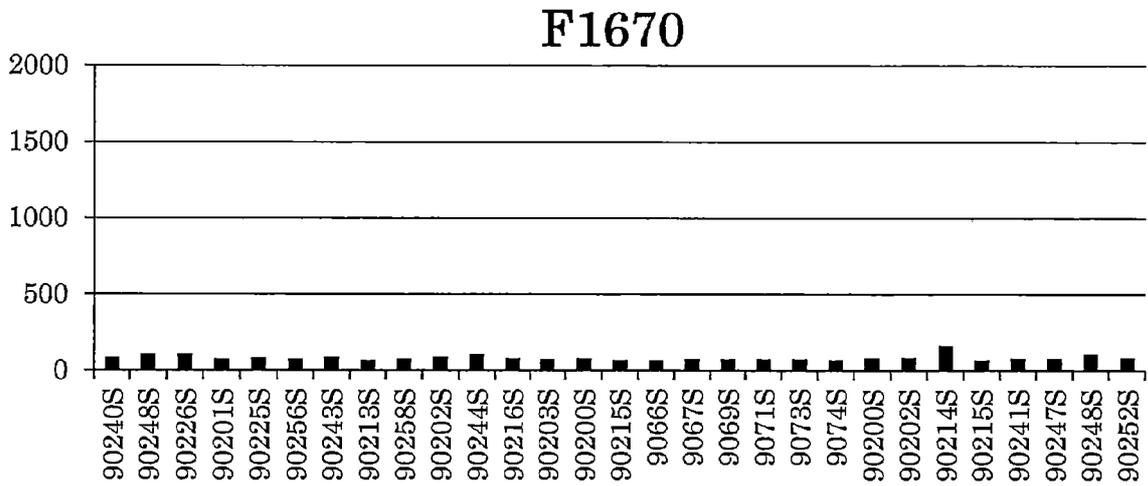


圖 100

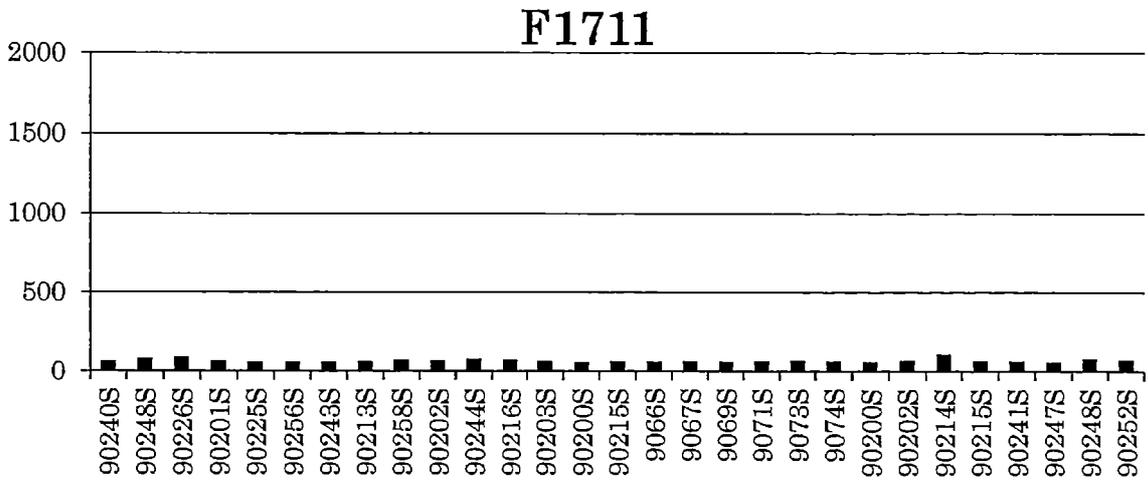


圖 101

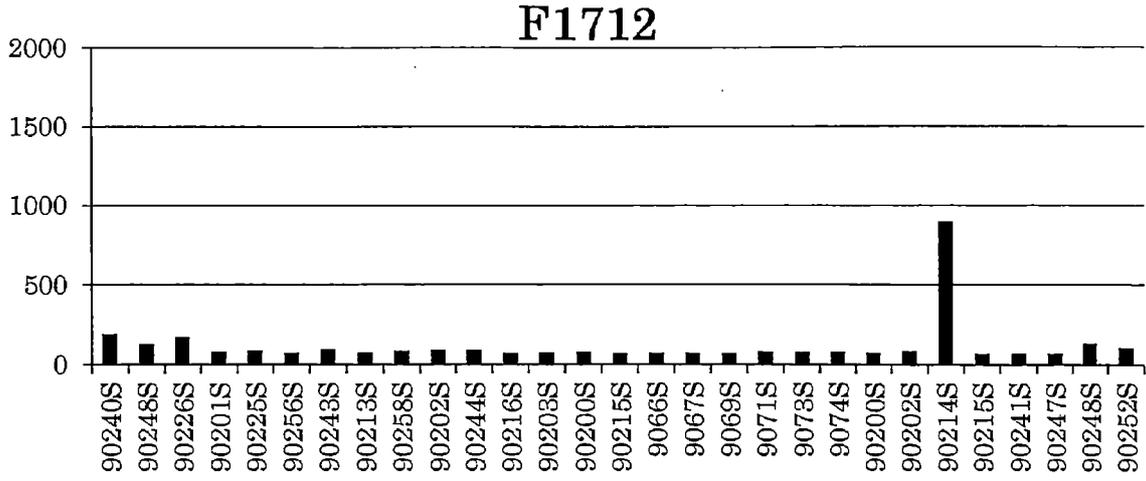


圖 102

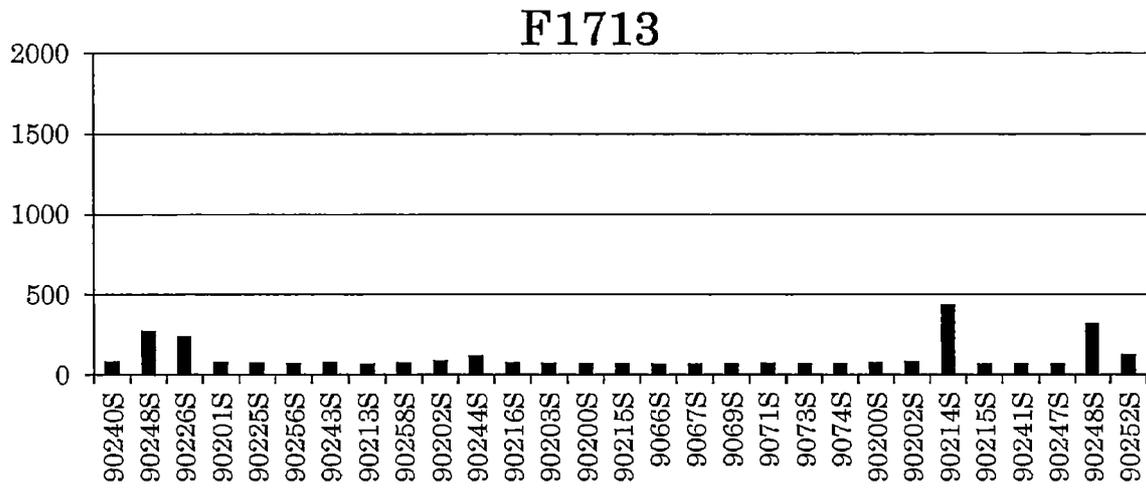


圖 103

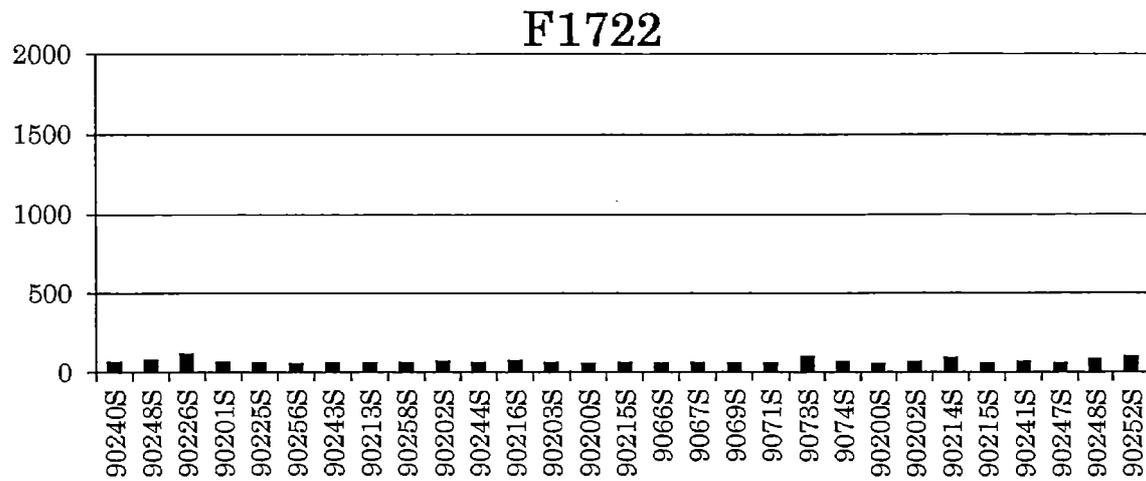


圖 104

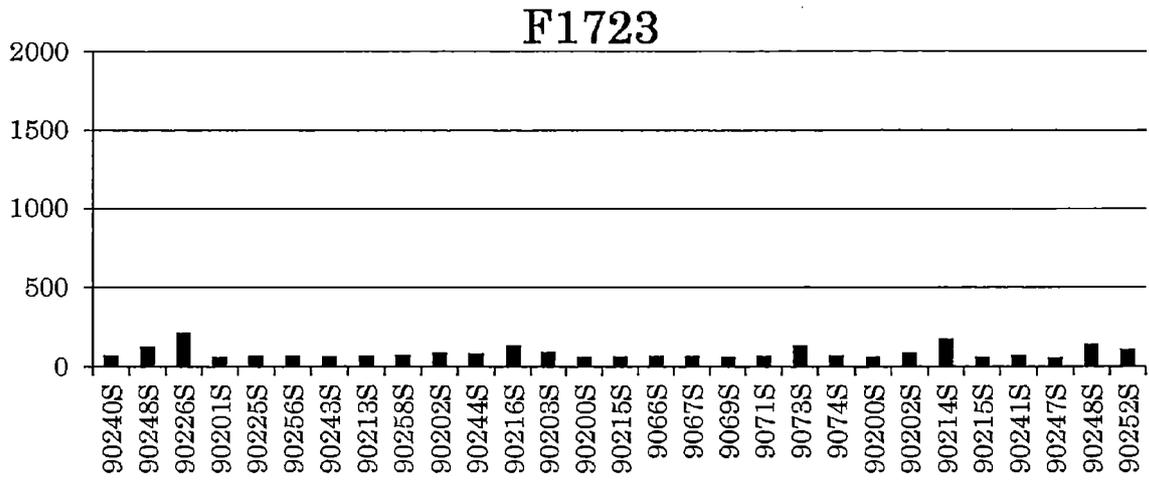


圖 105

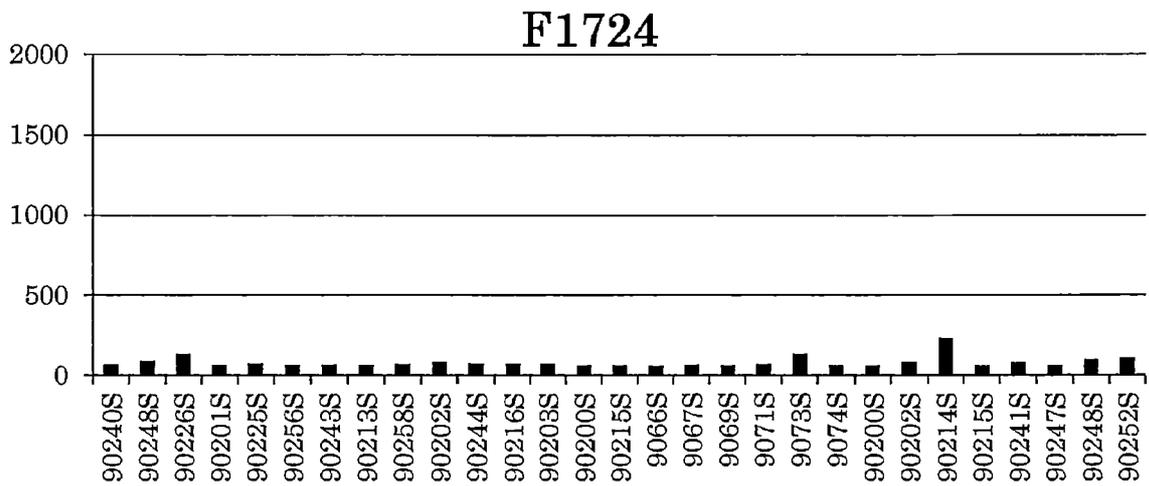


圖 106



圖 107

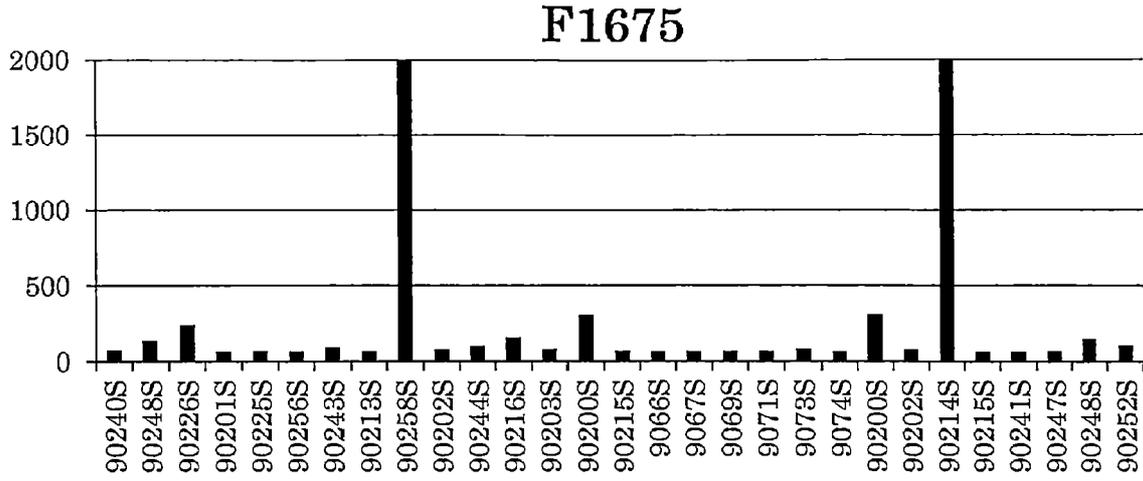


圖 108

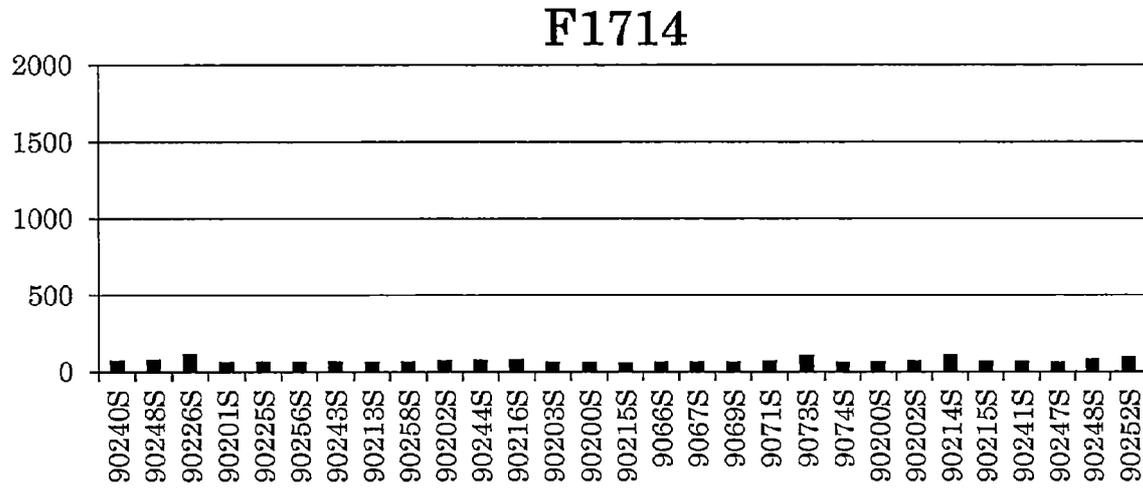


圖 109

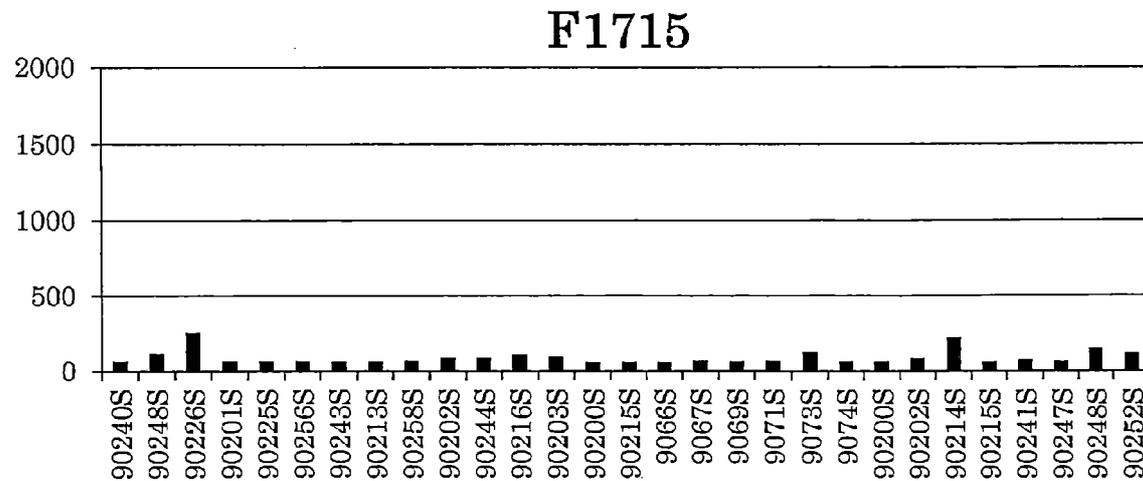


圖 110

### F1716

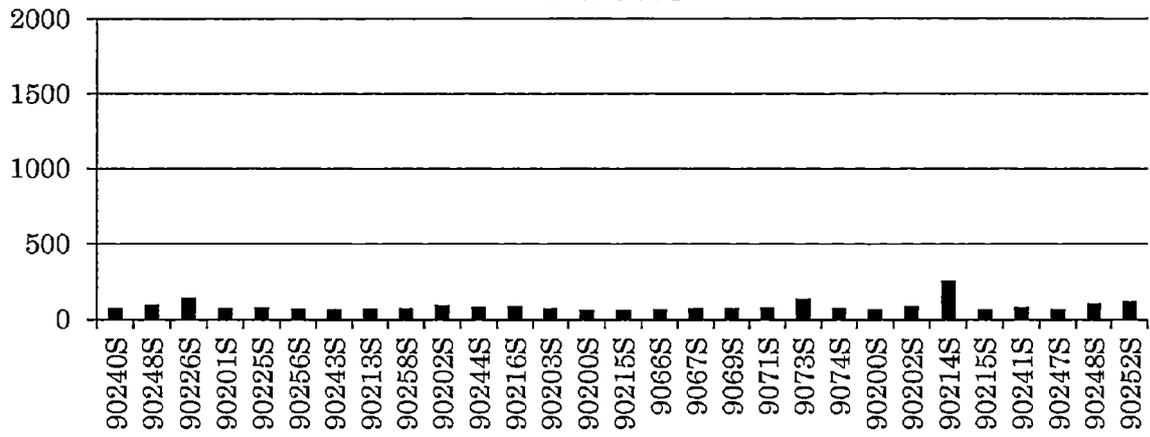


圖 111

### F1717

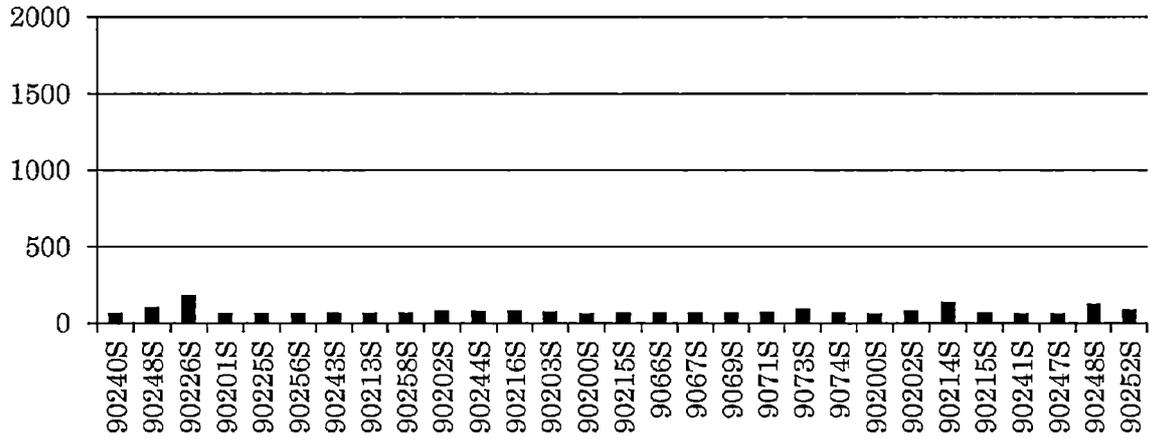


圖 112

### F1683

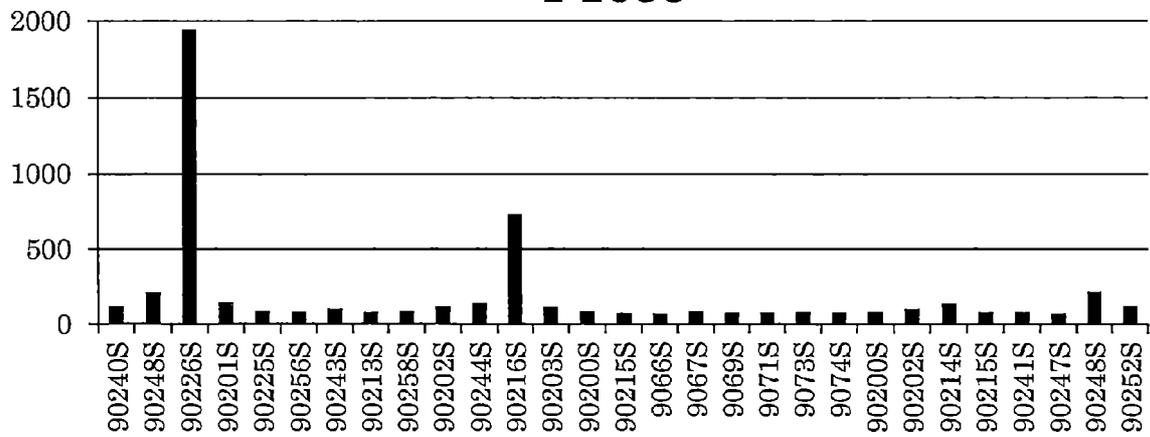


圖 113

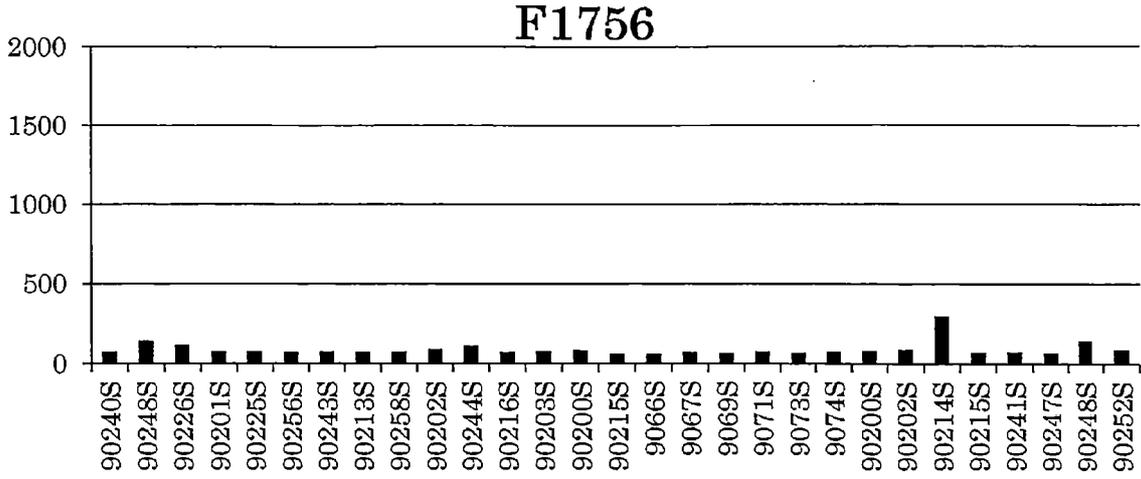


圖 114

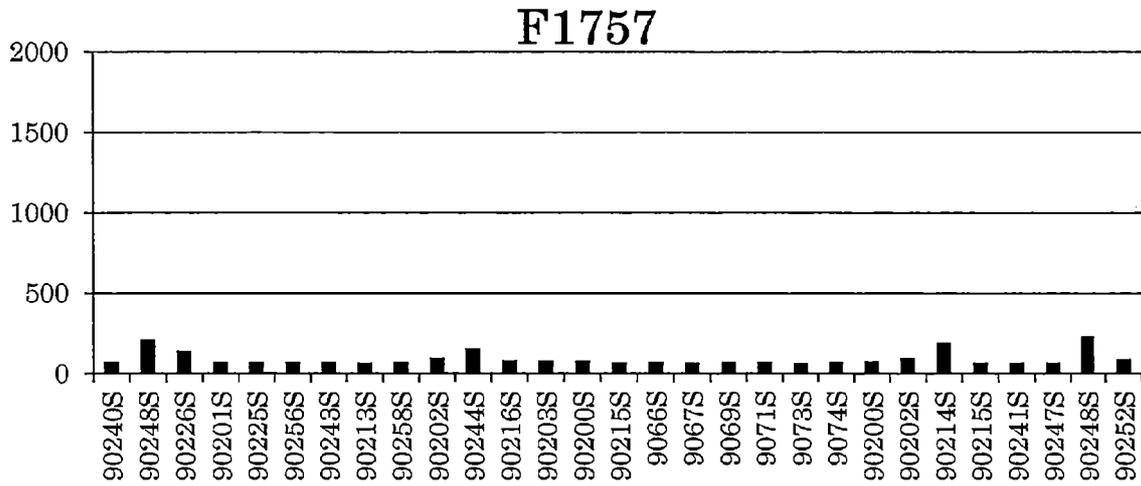


圖 115

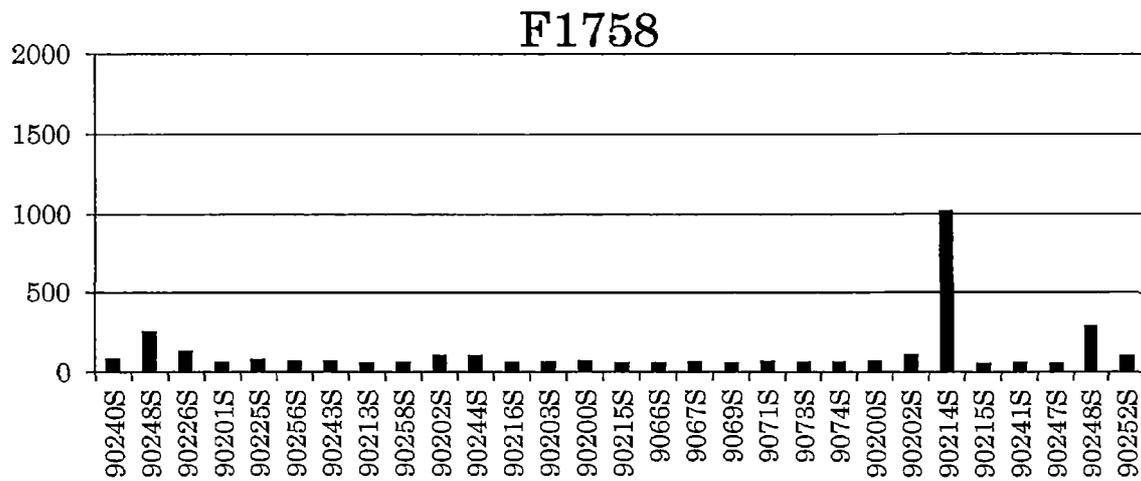


圖 116

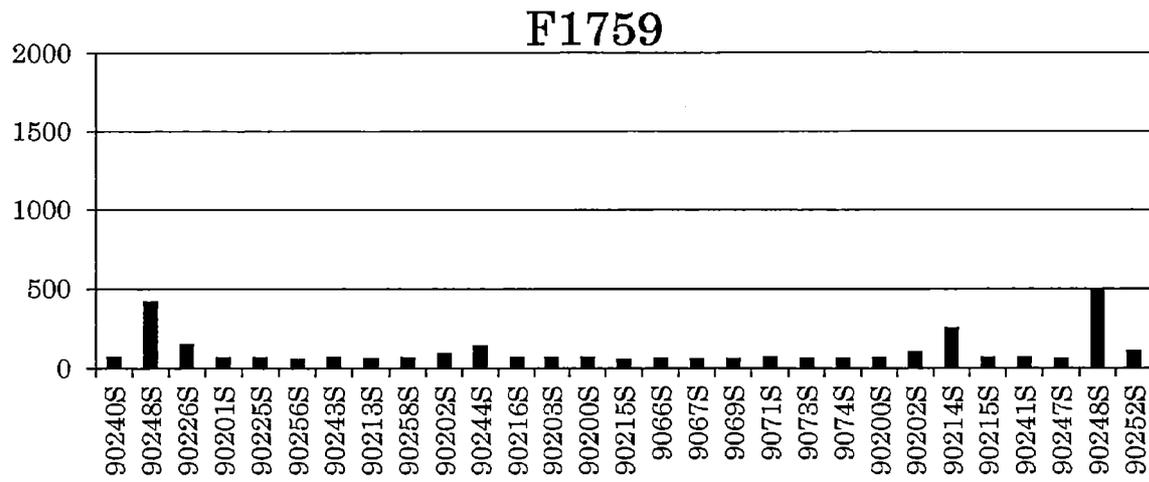


圖 117

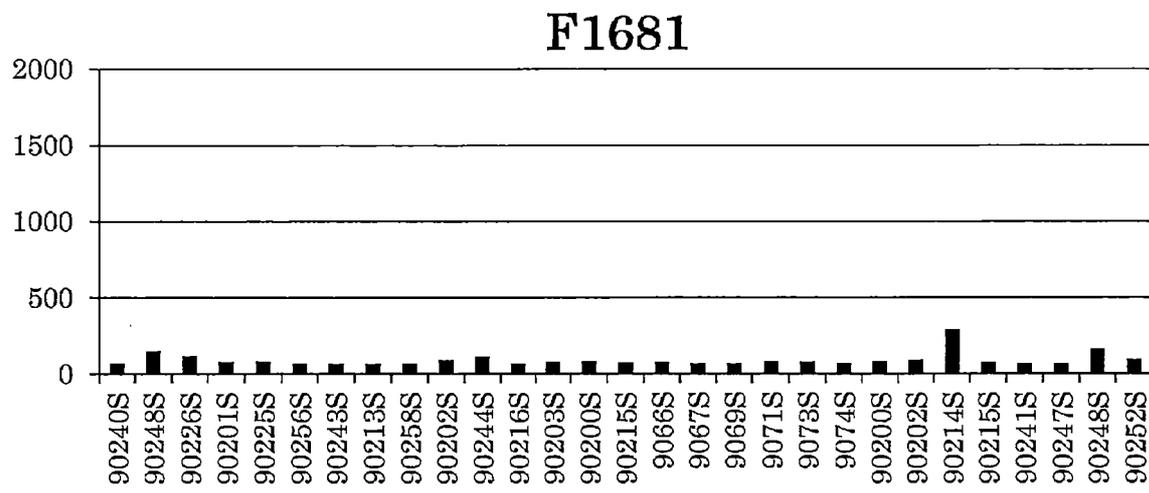


圖 118

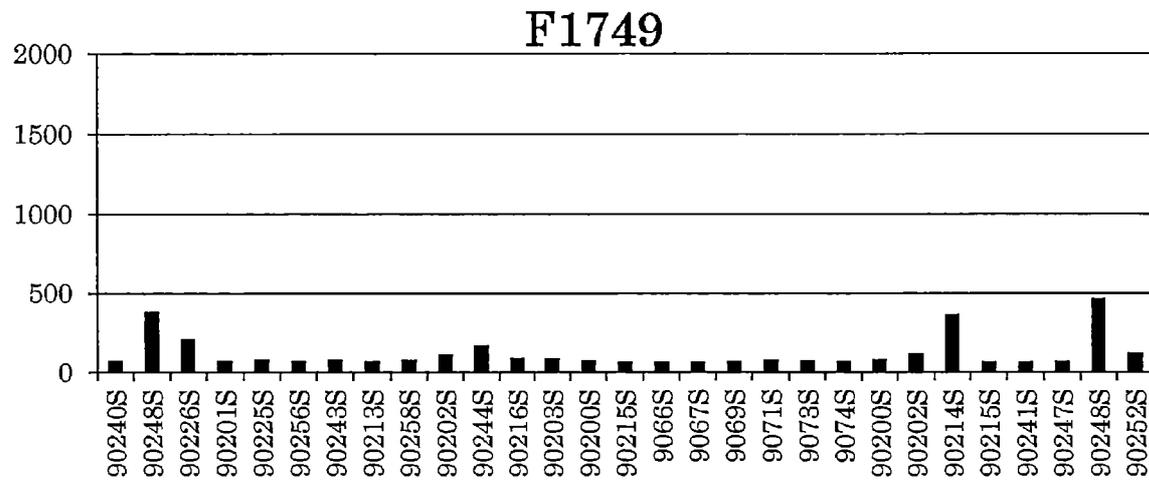


圖 119

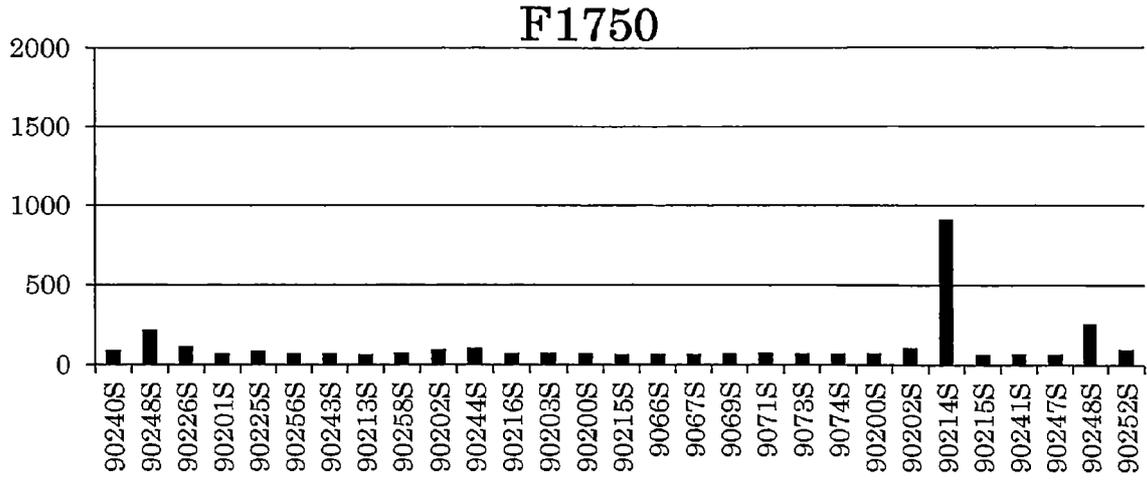


圖 120

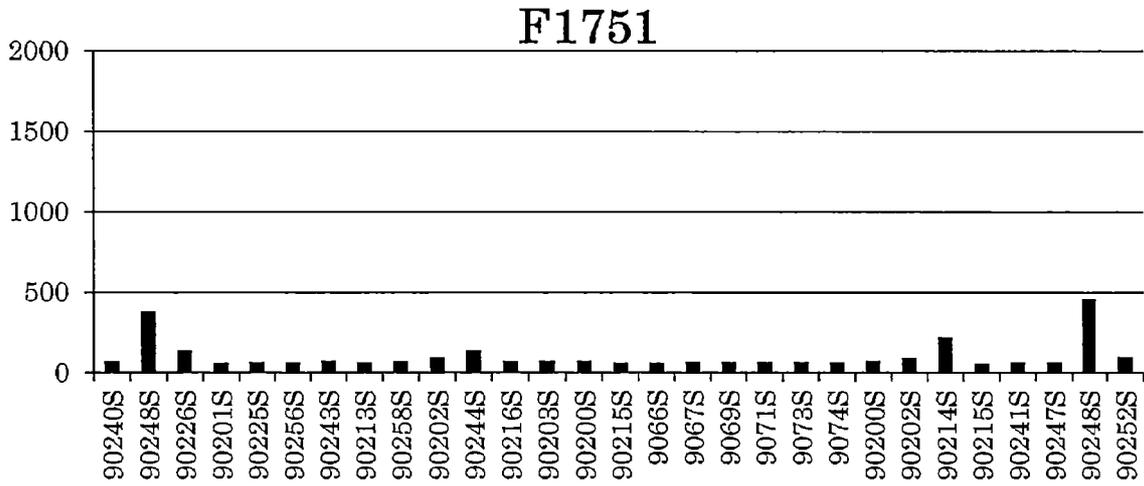


圖 121

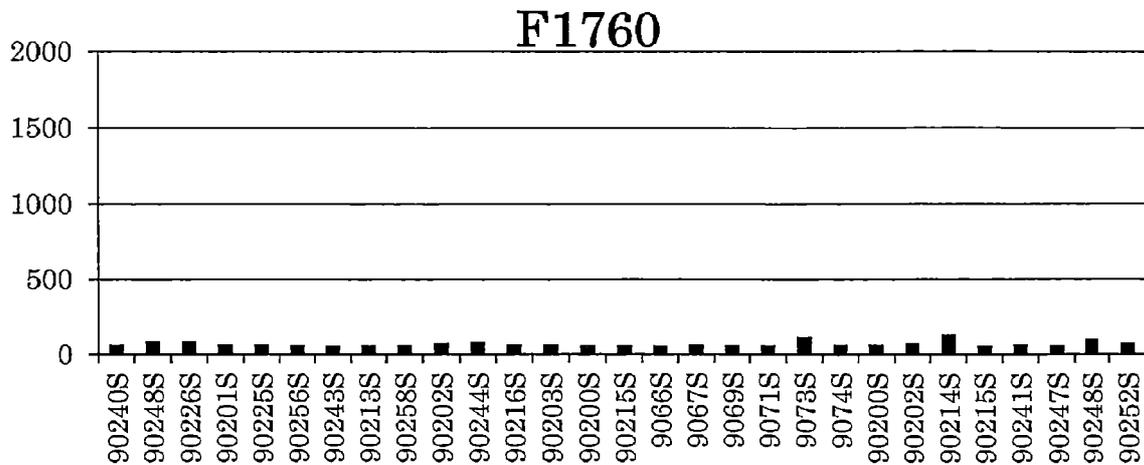


圖 122

F1761

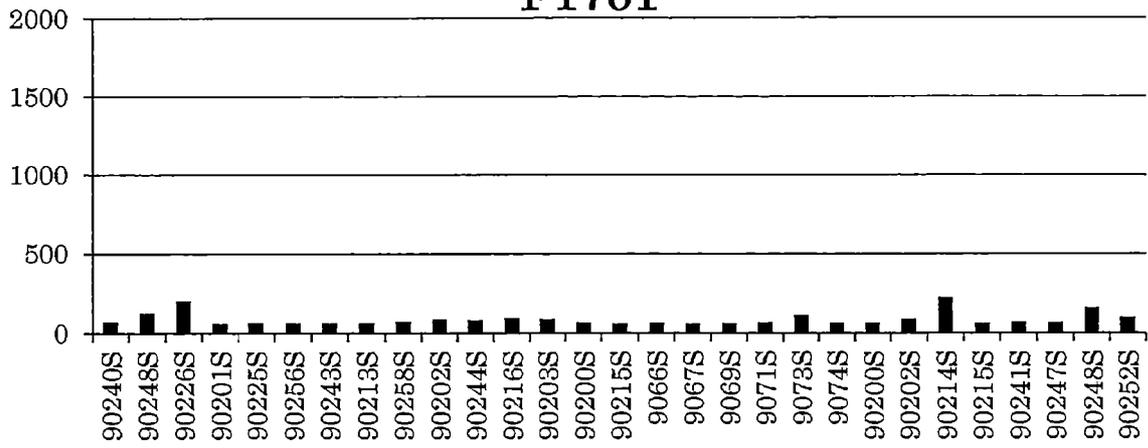


圖 123

F1762

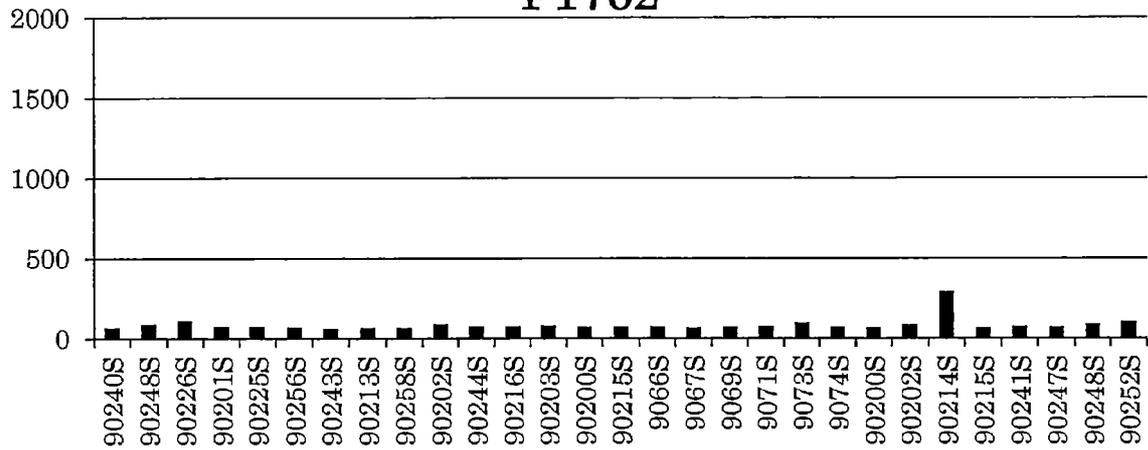


圖 124

F1763

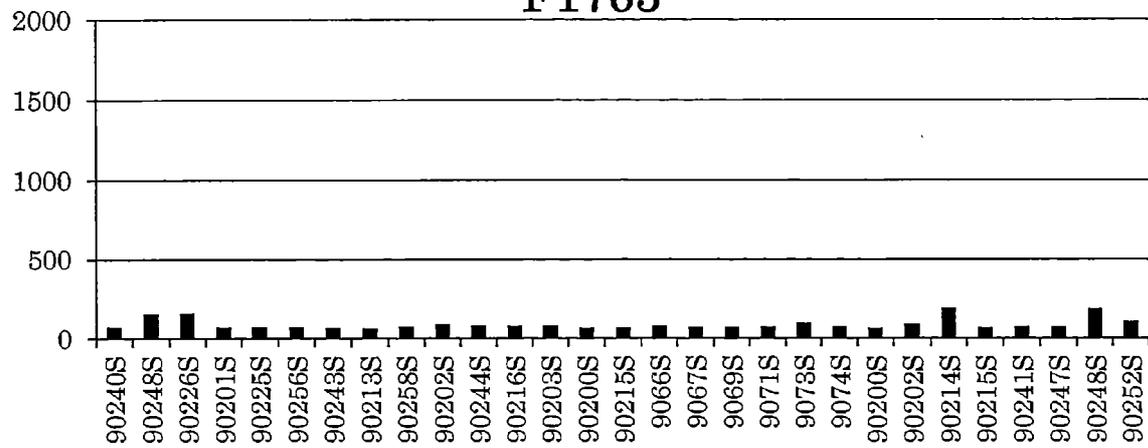


圖 125

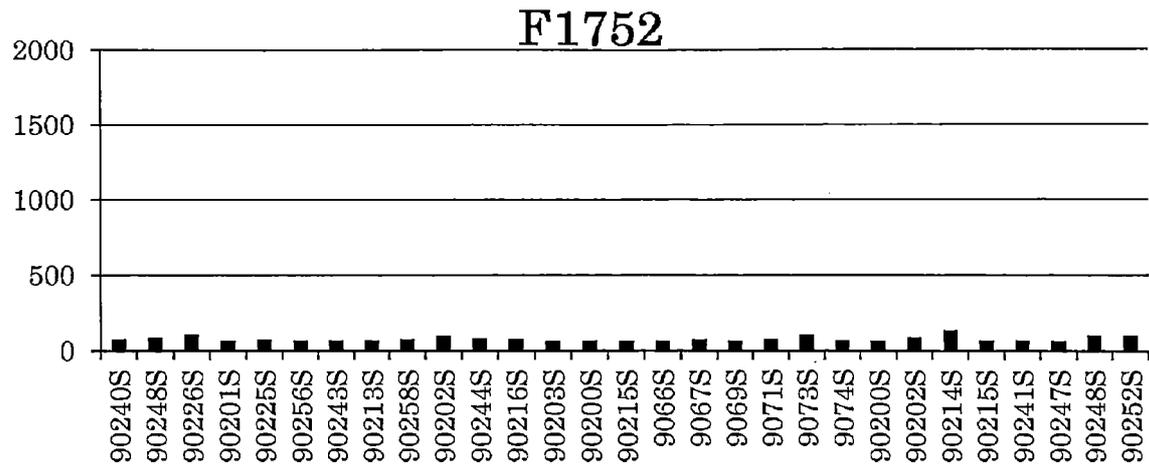


圖 126

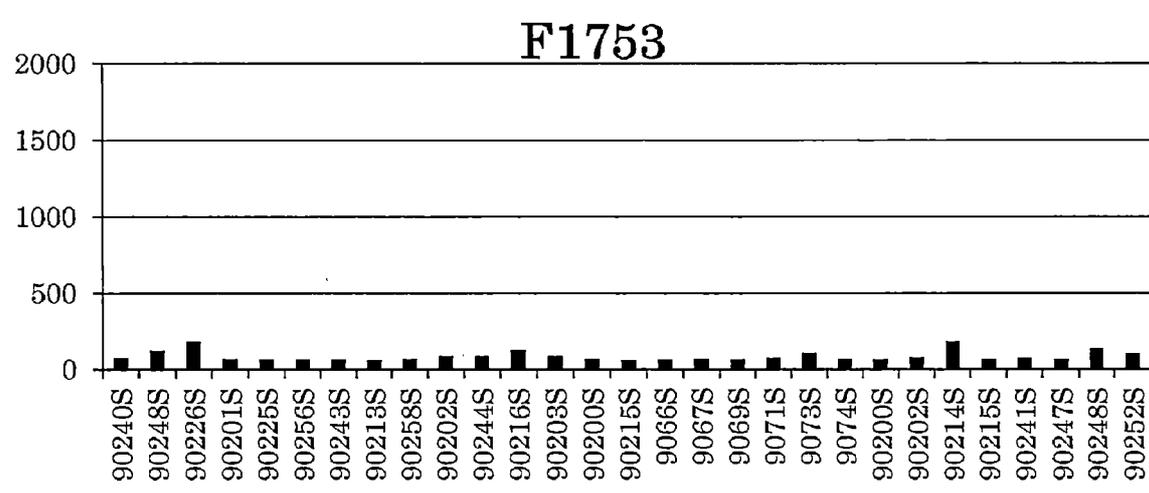


圖 127

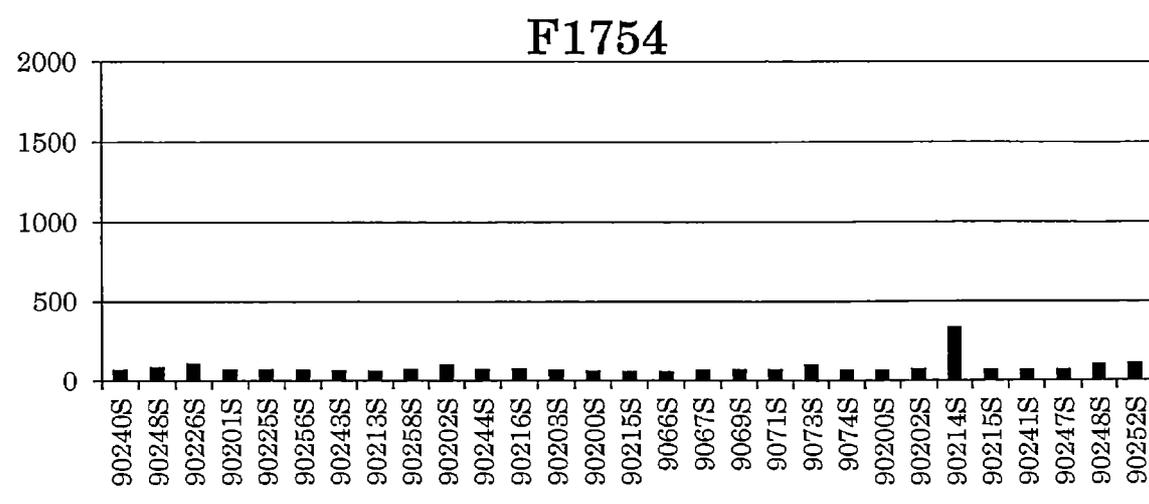


圖 128

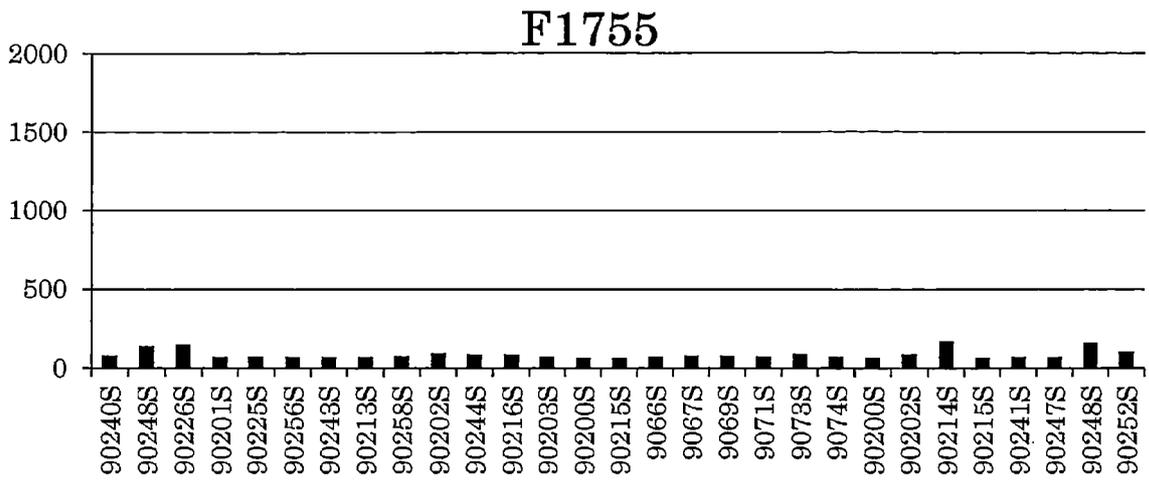


圖 129

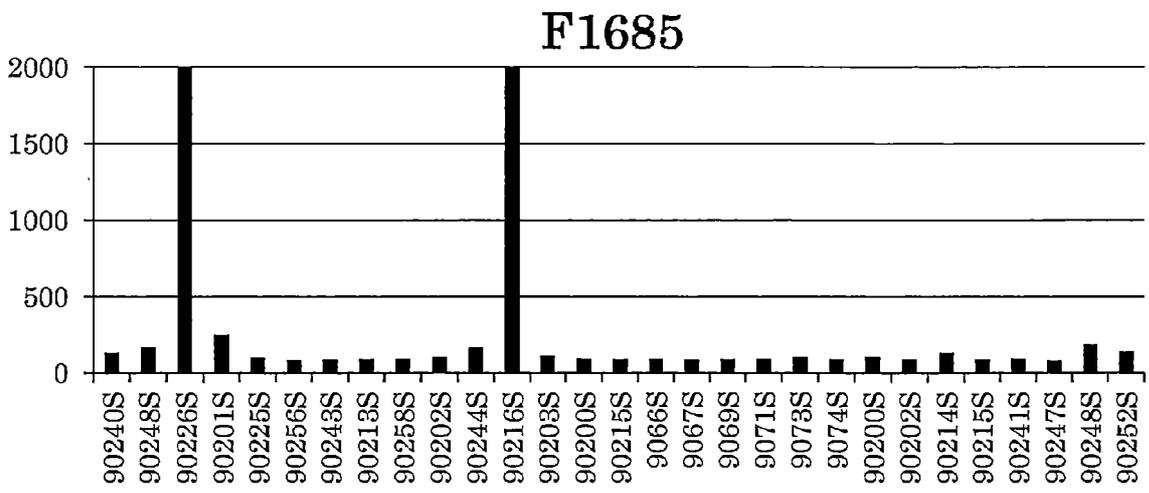


圖 130

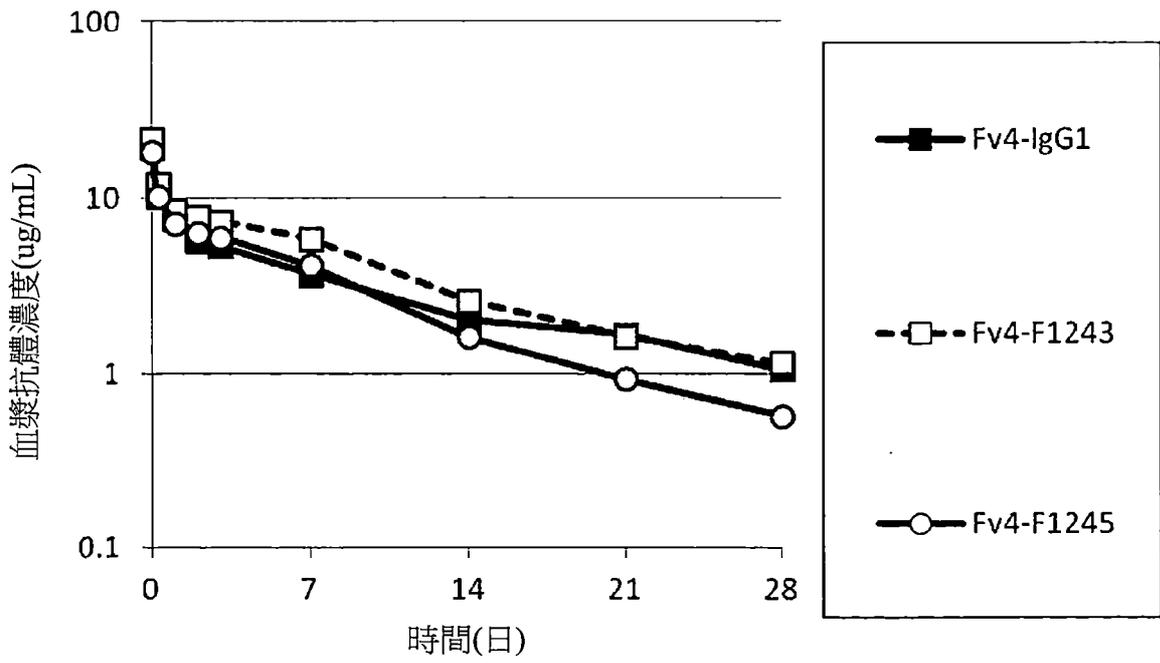


圖 131

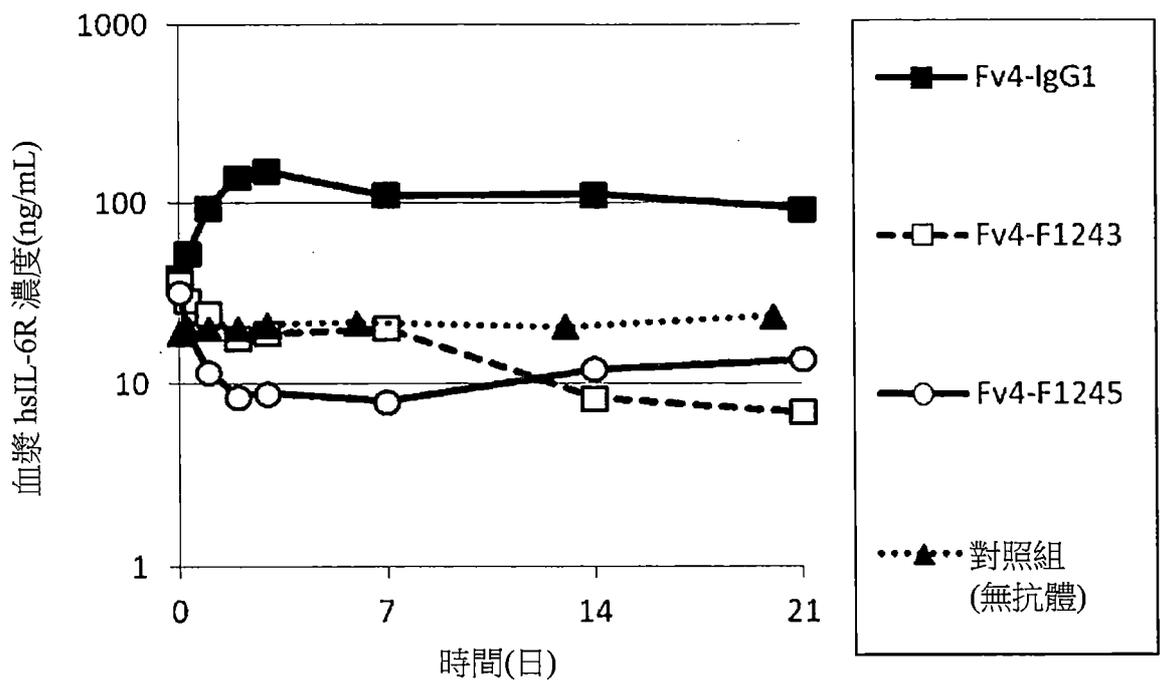


圖 132

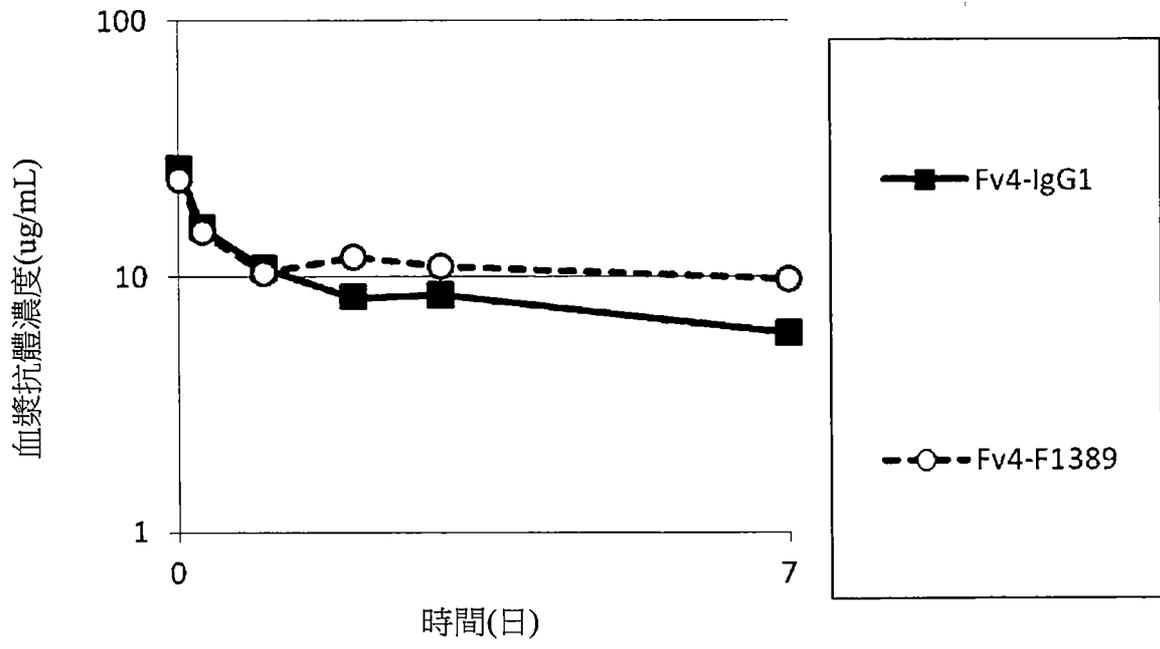


圖 133





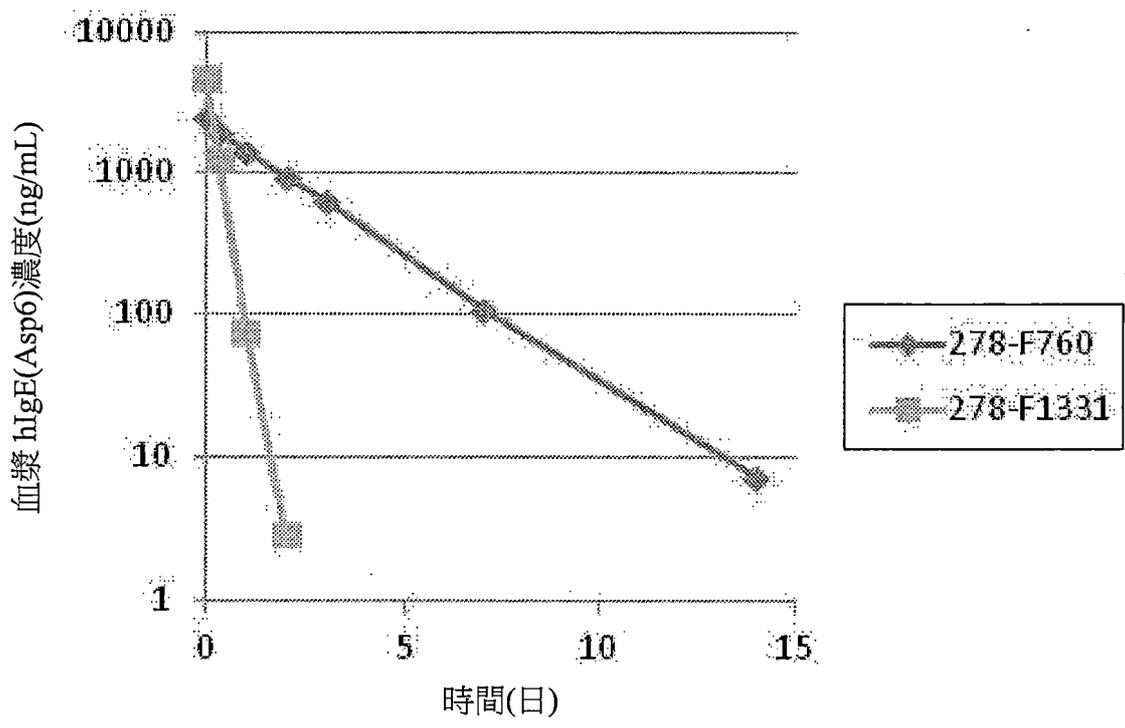


圖 138