



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201936638 A

(43)公開日：中華民國 108 (2019) 年 09 月 16 日

(21)申請案號：107142295

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 06 月 29 日

(51)Int. Cl. : *C07K16/28 (2006.01)*
A61P35/00 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

(30)優先權：2014/07/01 美國
2015/04/17 美國

62/019,762
62/148,920

(71)申請人：美商輝瑞股份有限公司 (美國) PFIZER INC. (US)
美國

(72)發明人：梅 查德 MAY, CHAD MICHAEL (US)；路特 亞當 ROOT, ADAM REID (US)；
布萊迪 威廉 BRADY, WILLIAM A. (US)；奇斯特柯發 廖德米拉
TCHISTIAKOVA, LIOUDMILA GENNADIEVNA (US)；摩賽克 莉迪亞
MOSYAK, LIDIA (US)；布魯姆 賴德 BLOOM, LAIRD (US)；摩爾 保羅
MOORE, PAUL A. (GB)；強森 萊斯利 JOHNSON, LESLIE S. (US)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：10 項 圖式數：35 共 323 頁

(54)名稱

雙特異性異質二聚體雙功能抗體及彼等之用途

(57)摘要

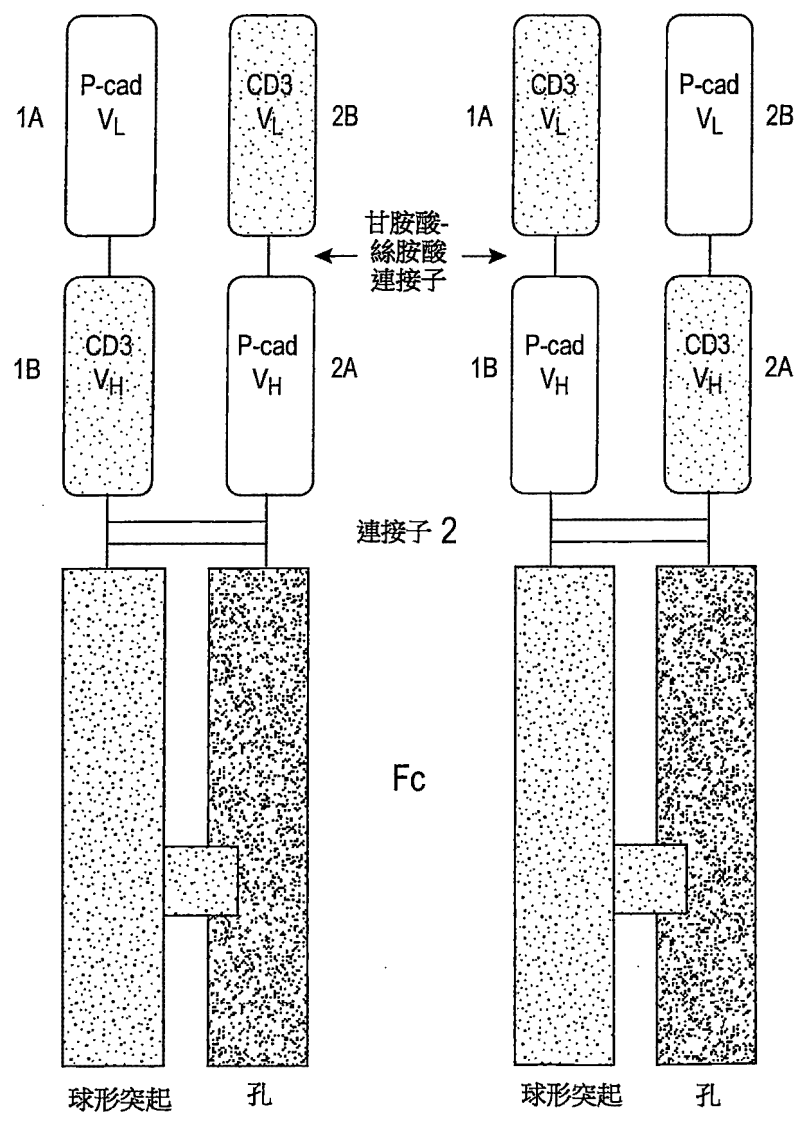
雙特異性異質二聚體雙功能抗體(diabody)分子及彼等於治療癌症之用途。該雙特異性異質二聚體雙功能抗體分子包含二個相聯結以形成二個表位結合位點的多肽鏈，該二個表位結合位點識別 P-鈣黏蛋白(cadherin)腫瘤細胞相關抗原及 CD3 T 細胞抗原。

Bispecific heterodimeric diabody molecules and uses thereof in the treatment of cancer. The bispecific heterodimeric diabody molecules comprise two polypeptide chains that associate to form two epitope binding sites recognizing the P-cadherin tumor cell associated antigen and the CD3 T cell antigen.

指定代表圖：

第 1A 圖

P-鈣黏蛋白 /CD3 LP-DART



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)

雙特異性異質二聚體雙功能抗體及彼等之用途

BISPECIFIC HETERODIMERIC DIABODIES AND USES THEREOF

[相關申請案]

本申請案主張 2014 年 7 月 1 日提交之美國臨時申請案第 62/019,762 號及 2015 年 4 月 17 日提交之美國臨時申請案第 62/148,920 號的利益，其全文以引用方式納入本文。

[序列表]

本申請案係經由 EFS-Web 以電子方式提交且包含以電子方式遞呈之 .txt 格式的序列表。該 txt 檔案含有 2015 年 6 月 12 日創建之標題為 “PC72054A_Sequence_Listing.txt” 的序列表且其大小為 248 KB。包含在此 .txt 檔案中之序列表為本專利此說明書之一部分，其全文以引用方式納入本文。

【技術領域】

本發明關於雙特異性異質二聚體雙功能抗體(diabody)及彼等於治療癌症之用途。

【先前技術】

現已研發各種策略來產生能夠招募 T 細胞以介導腫瘤細胞滅殺之雙特異性分子。然而，由於製造效率低且穩定性質差，大部分製造該等分子的努力受到限制。為了解決這些問題，現已研發基於共價連接、雙特異性異質二聚體雙功能抗體結構之由 Fv 衍生的策略，亦稱為雙親和性重新靶向(DART®)蛋白質(美國專利公開號第 2007/0004909、2009/0060910 和 2010/0174053 號)。

對於克服與產生雙特異性抗體相關之挑戰並提供高度特異性且有效的作用劑的雙特異性異質二聚體雙功能抗體仍然是有需要的，該高度特異性且有效的作用劑能與表現靶的抗原之腫瘤細胞結合並招募和透過活化 CD3 來活化 T 細胞，導致用於癌症之創新而有效的治療。

【發明內容】

本發明提供雙特異性異質二聚體雙功能抗體，其中該雙特異性異質二聚體雙功能抗體能夠特異結合至 P-鈣黏蛋白(cadherin)之表位及結合至 CD3 之表位。

本發明提供雙特異性異質二聚體雙功能抗體，其中該雙特異性異質二聚體雙功能抗體能夠特異性結合至 P-鈣黏蛋白之表位和結合至 CD3 之表位，其中該雙特異性異質二聚體雙功能抗體包含第一多肽鏈和第二條多肽鏈，其中：a.該第一多肽鏈包含(從 N 端至 C 端之方向)：i.結構域 1，其包含子結構域 1A 和子結構域 1B，和 ii.第一異質

二聚體-提升結構域；及 b.該第二多肽鏈包含(從 N 端至 C 端之方向)：i.結構域 2，其包含子結構域 2A 和子結構域 2B，和 ii.第二異質二聚體-提升結構域；且其中子結構域 1A 和子結構域 2A 形成 P-鈣黏蛋白 VL/VH 結合結構域，此 P-鈣黏蛋白 VL/VH 結合結構域包含抗 P-鈣黏蛋白抗體之可變重鏈(VH)結構域(P-CAD VH) 和抗 P-鈣黏蛋白抗體之可變輕鏈(VL)結構域(P-CAD VL)，且子結構域 1B 和子結構域 2B 形成 CD3 VL/VH 結合結構域，此 CD3 VL/VH 結合結構域包含抗 CD3 抗體之 VL 結構域(CD3 VL)，和抗 CD3 抗體之 VH 結合結構域(CD3 VH)；或者其中子結構域 1A 和子結構域 2A 形成 CD3 VL/VH 結合結構域，此 CD3 VL/VH 結合結構域包含 CD3 VL 和 CD3 VH 且子結構域 1B 和子結構域 2B 形成 P-鈣黏蛋白 VL/VH 結合結構域，此 P-鈣黏蛋白 VL/VH 結合結構域包含 P-CAD VH 和 P-CAD VL。

於本發明之另一態樣中，該子結構域 1A 包含 P-CAD VL 或 CD3 VL，若該子結構域 1A 包含 CD3 VL，則該子結構域 1B 包含 P-CAD VH，或者若該子結構域 1A 包含 P-CAD VL，則該子結構域 1B 包含 CD3 VH；且其中根據所選擇之用於子結構域 1A 的 VL 結構域，該子結構域 2B 包含 P-CAD VL 或 CD3 VL，若該子結構域 2B 包含 CD3 VL，則該子結構域 2A 包含 P-CAD VH，或者若該子結構域 2B 包含 P-CAD VL，則該子結構域 2A 包含 CD3 VH。

於本發明之一特殊態樣中，該子結構域 1A 包含 P-

CAD VL 而該子結構域 1B 包含 CD3 VH，且該子結構域 2B 包含 CD3 VL 而該子結構域 2A 包含 P-CAD VH；且其中該子結構域 1A 之 P-CAD VL 和該子結構域 2A 之 P-CAD VH 形成能夠特異結合至 P-鈣黏蛋白之表位的 VL/VH 結合結構域，而子結構域 1B 之 CD3 VH 和子結構域 2B 之 CD3 VL 形成能夠特異結合至 CD3 之表位的 VL/VH 結合結構域。

於一特殊態樣中，子結構域 1A 包含 CD3 VL 而子結構域 1B 包含 P-CAD VH，且該子結構域 2B 包含 P-CAD VL 而該子結構域 2A 包含 CD3 VH；其中該子結構域 1A 之 CD3 VL 和子結構域 2A 之 CD3 VH 形成能夠特異結合至 CD3 之表位的 VL/VH 結合結構域，而該子結構域 1B 之 P-CAD VH 和子結構域 2B 之 P-CAD VL 形成能夠特異結合至 P-鈣黏蛋白之表位的 VL/VH 結合結構域。

於另一態樣中，該子結構域 1A 包含抗 P-鈣黏蛋白抗體之 VH 結合結構域(P-CAD VH)或抗 CD3 抗體之 VH 結合結構域(CD3 VH)，而若該子結構域 1A 包含 CD3 VH，則該子結構域 1B 包含抗 P-鈣黏蛋白抗體之 VL 結合結構域(P-CAD VL)，或者若該子結構域 1A 包含 P-CAD VH，則該子結構域 1B 包含抗 CD3 抗體(CD3 VL)；且其中根據所選擇之用於子結構域 1A 的 VH 結構域，該子結構域 2B 包含 P-CAD VH 或 CD3 VH，若該子結構域 2B 包含 CD3 VH，則該子結構域 2A 包含 P-CAD VL，而若該子結構域 2B 包含 P-CAD VH，則該子結構域 2A 包含 CD3 VL。

於一特殊之態樣中，該子結構域 1A 包含 P-CAD VH 而子結構域 1B 包含 CD3 VL，且該子結構域 2B 包含 CD3 VH，而子結構域 2A 包含 P-CAD VL；其中該子結構域 1A 之 P-CAD VH 和子結構域 2A 之 P-CAD VL 形成能夠特異結合至 P-鈣黏蛋白之表位的 VL/VH 結合結構域，且該子結構域 1B 之 CD3 VL 和子結構域 2B 之 CD3 VH 形成能夠特異結合至 CD3 之表位的 VL/VH 結合結構域。

於一特殊之態樣中，該子結構域 1A 包含 CD3 VH 而子結構域 1B 包含 P-CAD VL，且該子結構域 2B 包含 P-CAD VH，而子結構域 2A 包含 CD3 VL；其中該子結構域 1A 之 CD3 VH 和子結構域 2A 之 CD3 VL 形成能夠特異結合至 CD3 之表位的 VL/VH 結合結構域，且該子結構域 1B 之 P-CAD VL 和子結構域 2B 之 P-CAD VH 形成能夠特異結合至 P-鈣黏蛋白之表位的 VL/VH 結合結構域。

本發明進一步提供雙特異性異質二聚體雙功能抗體，其中該第一異質二聚體提升結構域和第二異質二聚體提升結構域包含含有 CH2 和 CH3 結構域之 IgG Fc 區，其中與野生型 IgG Fc 區相比較，該 CH2 結構域及/或 CH3 結構域之胺基酸序列包含至少一個胺基酸修飾以形成球形突起(knob)或孔(hole)。於一態樣中，該第一異質二聚體提升結構域和第二異質二聚體提升結構域二者不同時為球形突起或不同時為孔；及/或其中該第一異質二聚體提升結構域和第二異質二聚體提升結構域形成 IgG 免疫球蛋白 Fc 區。於另一態樣中，該形成球形突起之 IgG Fc 區包含

SEQ ID NO：63 之序列，而形成孔之 IgG Fc 區包含 SEQ ID NO：64 之序列。

本發明進一步提供雙特異性異質二聚體雙功能抗體，其中該第一異質二聚體提升結構域和第二異質二聚體提升結構域包含 E-卷(coil)區(此 E-卷區包含麩胺酸和帶負電荷之 α -螺旋卷)或 K 卷區(此 K 卷區包含賴胺酸和帶正電荷之螺旋卷)；且其中該第一異質二聚體提升結構域和第二異質二聚體提升結構域二者不同時為 E-卷區或不同時為 K-卷區。於一態樣中，該 E-卷區包含 SEQ ID NO：61 之序列，及/或該 K-卷區包含 SEQ ID NO：62 之序列。

本發明進一步提供雙特異性異質二聚體雙功能抗體，其中該子結構域 1A 和子結構域 1B 可藉由甘胺酸-絲胺酸連接子(連接子 1)連接且不相聯結以形成 VL/VH 表位結合結構域，而該子結構域 2B 和子結構域 2A 可藉由甘胺酸-絲胺酸連接子(連接子 1)連接且不相聯結以形成 VL/VH 表位結合結構域。於本發明之一態樣中，該甘胺酸-絲胺酸連接子(連接子 1)包含 SEQ ID NO：68 或 SEQ ID NO：69 之序列。

本發明進一步提供雙特異性異質二聚體雙功能抗體，其中該第一異質二聚體提升結構域包含在子結構域 1B 上之半胱胺酸連接子(連接子 2)及/或該第二異質二聚體提升結構域包含在子結構域 2A 上之半胱胺酸連接子(連接子 2)。於一態樣中，該第一異質二聚體提升結構域及/或該第二異質二聚體提升結構域之連接子 2 進一步包含至少一個

甘胺酸殘基。於另一態樣中，該第一異質二聚體提升結構域及/或該第二異質二聚體提升結構域之連接子 2 包含 GFNRGEC(SEQ ID NO : 70)、GVEPKSC(SEQ ID NO : 71)、GGCGGG(SEQ ID NO : 72)、GCPPCP(SEQ ID NO : 73)、GGTGGCPPCP(SEQ ID NO : 74)、

GEPKSSDKTHTCPPCP(SEQ ID NO : 75)或

GGTGGGEPKSSDKTHTCPPCP(SEQ ID NO : 76)之序列。

於另一態樣中，該第一異質二聚體提升結構域之連接子 2 包含 GCPPCP(SEQ ID NO : 73)、GGTGGCPPCP(SEQ ID NO : 74)、GEPKSSDKTHTCPPCP(SEQ ID NO : 75)或 GGTGGGEPKSSDKTHTCPPCP(SEQ ID NO : 76)之序列，且該第二異質二聚體提升結構域之連接子 2 包含 GCPPCP(SEQ ID NO : 73)、GGTGGCPPCP(SEQ ID NO : 74)、GEPKSSDKTHTCPPCP(SEQ ID NO : 75)或

GGTGGGEPKSSDKTHTCPPCP(SEQ ID NO : 76)之序列。

於另一態樣中，該第一異質二聚體提升結構域之連接子 2 包含 GGCGGG(SEQ ID NO : 72)之序列，而該第二異質二聚體提升結構域之連接子 2 包含 GGCGGG(SEQ ID NO : 72)之序列。於另一態樣中，該第一異質二聚體提升結構域之連接子 2 包含 GFNRGEC(SEQ ID NO : 70)之序列，而該第二異質二聚體提升結構域之連接子 2 包含 GVEPKSC(SEQ ID NO : 71)之序列，或者該第一異質二聚體提升結構域之連接子 2 包含 GVEPKSC(SEQ ID NO : 71)之序列，而該第二異質二聚體提升結構域之連接子 2 包含

GFNRGEC(SEQ ID NO：70)之序列。

本發明提供雙特異性異質二聚體雙功能抗體，其中該雙特異性異質二聚體雙功能抗體特異結合至人 P-鈣黏蛋白之胞外結構域 3 (ECD3)。本發明進一步提供雙特異性異質二聚體雙功能抗體，其中該雙特異性異質二聚體雙功能抗體特異結合至在 P-鈣黏蛋白上之表位，但不結合至在 E-鈣黏蛋白或 VE-鈣黏蛋白上之表位。本發明亦提供雙特異性異質二聚體雙功能抗體，其中該雙特異性異質二聚體雙功能抗體特異結合至在人 P-鈣黏蛋白上之表位，但不結合至在小鼠 P-鈣黏蛋白上之表位。

本發明提供雙特異性異質二聚體雙功能抗體，其中該雙特異性異質二聚體雙功能抗體顯示出延長之血清和腫瘤半衰期。藥代動力學分析可藉由各種分析，諸如 ELISA 進行。本發明進一步提供雙特異性異質二聚體雙功能抗體，其中該雙特異性異質二聚體雙功能抗體在 P-鈣黏蛋白表現水準增加時或受體密度水準增加時顯示出較低之 EC50。該 EC50 可藉由各種玻管內和活體內細胞毒性分析測定。

本發明提供雙特異性異質二聚體雙功能抗體，其包含含有 SEQ ID NO：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21 或 23 之序列的 P-CAD VL 之 P-CAD VL CDR1、P-CAD VL CDR2 及 P-CAD VL CDR3；含有 SEQ ID NO：45 或 46 之序列的 CD3 VH 之 CD3 VH CDR1、CD3 VH CDR2 和 CD3 VH CDR3；含有 SEQ ID NO：47 之序列的 CD3

VL 之 CD3 VL CDR1、CD3 VL CDR2 和 CD3 VL CDR3；及/或含有 SEQ ID NO：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22 或 24 之序列的 P-CAD VH 之 P-CAD VH CDR1、P-CAD VH CDR2 及 P-CAD VH CDR3。

本發明提供雙特異性異質二聚體雙功能抗體，其包含下列群組：含有 SEQ ID NO：35 或 36 之序列的 P-CAD VL CDR1、含有 SEQ ID NO：37 或 38 之序列的 P-CAD VL CDR2 及含有 SEQ ID NO：39、40、41、42、43 或 44 之序列的 P-CAD VL CDR3；含有 SEQ ID NO：48 之序列的 CD3 VH CDR1、含有 SEQ ID NO：49 或 50 之序列的 CD3 VH CDR2 及含有 SEQ ID NO：51 之序列的 CD3 VH CDR3；含有 SEQ ID NO：55 之序列的 CD3 VL CDR1、含有 SEQ ID NO：56 之序列的 CD3 VL CDR2 及含有 SEQ ID NO：57 之序列的 CD3 VL CDR3；及/或含有 SEQ ID NO：25 或 33 之序列的 P-CAD VH CDR1、含有 SEQ ID NO：26 或 34 之序列的 P-CAD VH CDR2 及含有 SEQ ID NO：27、28、29、30、31 或 32 之序列的 P-CAD VH CDR3。

於本發明之一態樣中，該 P-CAD VL CDR1 包含 SEQ ID NO：35 之序列，該 P-CAD VL CDR2 包含 SEQ ID NO：37 之序列，該 P-CAD VL CDR3 包含 SEQ ID NO：41 之序列，該 P-CAD VH CDR1 包含 SEQ ID NO：25 之序列，該 P-CAD VH CDR2 包含 SEQ ID NO：26 之序列，且該 P-CAD VH CDR3 包含 SEQ ID NO：28 之序列。於另

一態樣中，該 P-CAD VL CDR1 包含 SEQ ID NO：35 之序列；該 P-CAD VL CDR2 包含 SEQ ID NO：37 之序列；且該 P-CAD VL CDR3 包含 SEQ ID NO：42 之序列，該 P-CAD VH CDR1 包含 SEQ ID NO：25 之序列，該 P-CAD VH CDR2 包含 SEQ ID NO：26 之序列，且該 P-CAD VH CDR3 包含 SEQ ID NO：29 之序列。於另一態樣中，該 P-CAD VL CDR1 包含 SEQ ID NO：35 之序列；該 P-CAD VL CDR2 包含 SEQ ID NO：37 之序列，該 P-CAD VL CDR3 包含 SEQ ID NO：43 之序列，該 P-CAD VH CDR1 包含 SEQ ID NO：25 之序列，該 P-CAD VH CDR2 包含 SEQ ID NO：26 之序列，且該 P-CAD VH CDR3 包含 SEQ ID NO：30 之序列。於另一態樣中，該 P-CAD VL CDR1 包含 SEQ ID NO：35 之序列；該 P-CAD VL CDR2 包含 SEQ ID NO：37 之序列，該 P-CAD VL CDR3 包含 SEQ ID NO：39 之序列，該 P-CAD VH CDR1 包含 SEQ ID NO：25 之序列，該 P-CAD VH CDR2 包含 SEQ ID NO：26 之序列，且該 P-CAD VH CDR3 包含 SEQ ID NO：31 之序列。

本發明進一步提供雙特異性異質二聚體雙功能抗體，其包含：P-CAD VL，其包含 SEQ ID NO：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21 或 23 之序列；CD3 VH，其包含 SEQ ID NO：45 或 46 之序列；CD3 VL，其包含 SEQ ID NO：47 之序列；及 P-CAD VH，其包含 SEQ ID NO：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22 或 24

之序列。於一態樣中，該 P-CAD VL 包含 SEQ ID NO：5 之序列且該 P-CAD VH 包含 SEQ ID NO：6 之序列。於另一態樣中，該 P-CAD VL 包含 SEQ ID NO：7 之序列且該 P-CAD VH 包含 SEQ ID NO：8 之序列。於另一態樣中，該 P-CAD VL 包含 SEQ ID NO：9 之序列且該 P-CAD VH 包含 SEQ ID NO：10 之序列。於另一態樣中，該 P-CAD VL 包含 SEQ ID NO：15 之序列且該 P-CAD VH 包含 SEQ ID NO：16 之序列。

本發明進一步提供能夠特異結合至 P-鈣黏蛋白之表位和結合至 CD3 之表位的雙特異性異質二聚體雙功能抗體，此雙特異性異質二聚體雙功能抗體包含第一多肽鏈和第二多肽鏈，其中該第一多肽鏈包含 SEQ ID NO：90 之序列且該第二條多肽鏈包含 SEQ ID NO：91 之序列。本發明進一步提供能夠特異結合至 P-鈣黏蛋白之表位及結合至 CD3 之表位的雙特異性異質二聚體雙功能抗體，此雙特異性異質二聚體雙功能抗體包含第一多肽鏈及第二多肽鏈，其中該第一多肽鏈包含 SEQ ID NO：92 之序列且該第二條多肽鏈包含 SEQ ID NO：93 之序列。

本發明進一步提供能夠特異結合至 P-鈣黏蛋白之表位及結合至 CD3 之表位的雙特異性異質二聚體雙功能抗體，其包含第一多肽鏈及第二多肽鏈，其中該第一多肽鏈包含 SEQ ID NO：88 之序列且該第二條多肽鏈包含 SEQ ID NO：89 之序列。

本發明進一步提供雙特異性異質二聚體雙功能抗體，

其中該第一多肽鏈和第二多肽鏈可藉由至少一個二硫鍵彼此共價鍵結。

本發明進一步提供能夠特異結合至 P-鈣黏蛋白之表位及結合至 CD3 之表位的雙特異性異質二聚體雙功能抗體，其包含第一多肽鏈及第二多肽鏈，其中該第一多肽鏈及第二條多肽鏈包含如第 30A、30B、31A、31B、32A 或 32B 圖中所列之序列。於本發明之另一態樣中，該雙特異性異質二聚體雙功能抗體包含如表 5 中所列之第一多肽鏈、第二多肽鏈和第三多肽鏈。

本發明提供雙特異性異質二聚體雙功能抗體，其中該雙特異性異質二聚體雙功能抗體可與可檢測之標記共軛結合，該可檢測之標記包含，但不限於螢光團(fluorophore)或放射性核素(radionuclide)。

本發明提供結合至 P-鈣黏蛋白且競爭結合至本文所揭示之雙特異性異質二聚體雙功能抗體的雙特異性異質二聚體雙功能抗體。

本發明進一步提供醫藥組成物，其包含治療有效量之本文所揭示之雙特異性異質二聚體雙功能抗體和醫藥上可接受之載體。

本發明進一步提供用於治療有需要治療 P-鈣黏蛋白相關病症的患者中之 P-鈣黏蛋白相關病症的方法，其包含投予該患者本文所揭示之雙特異性異質二聚體雙功能抗體或包含本文所揭示之雙特異性異質二聚體雙功能抗體的醫藥組成物。本發明進一步提供用於治療有需要治療 P-鈣黏蛋

白相關病症的患者中之 P-鈣黏蛋白相關病症的方法，其包含投予該患者本文所揭示之雙特異性異質二聚體雙功能抗體或包含本文所揭示之雙特異性異質二聚體雙功能抗體的醫藥組成物，其中係活化或誘導細胞溶解性 T 細胞反應。

本發明進一步提供用於療法中之本文所揭示之雙特異性異質二聚體雙功能抗體。本發明進一步提供本文所揭示之雙特異性異質二聚體雙功能抗體於製造用於療法中之藥物的用途。於另一態樣中，該療法為 P-鈣黏蛋白相關病症的治療。本發明進一步提供用於療法中之本文所揭示之雙特異性異質二聚體雙功能抗體，其中該療法係活化或誘導細胞溶解性 T 細胞反應。

於一態樣中，該 P-鈣黏蛋白相關病症為癌症。於另一態樣中，該癌症為表現 P-鈣黏蛋白或 P-鈣黏蛋白陽性之癌症。該癌症包括，但不限於乳癌、結腸直腸癌、卵巢癌、胃癌、甲狀腺癌、前列腺癌、子宮頸癌、胰腺癌、肺癌、膀胱癌、肝癌、子宮內膜癌、頭頸癌、睪丸癌及膠質母細胞癌。

本發明進一步提供以重組方式製造本文所揭示之雙特異性異質二聚體雙功能抗體的經分離之宿主細胞、包含編碼本文所揭示之雙特異性異質二聚體雙功能抗體的核苷酸序列的經分離之多核苷酸及包含該多核苷酸之載體。

本發明進一步提供製造本文所揭示之雙特異性異質二聚體雙功能抗體的方法，其包含在能導致製造雙特異性異質二聚體雙功能抗體的條件下培養本文所揭示之宿主細

胞，並從該培養上清液純化該雙特異性異質二聚體雙功能抗體。

本發明進一步提供本文所揭示之雙特異性異質二聚體雙功能抗體，其中晶體結構組裝成緊密之球形結構，此結構係藉由介於一對半胱胺酸殘基之間的二硫鍵聯穩定化，該對半胱胺酸殘基由位在子結構域 1B 之位置 239 處的半胱胺酸殘基(Cys²³⁹)及位在子結構域 2A 之位置 246 處的半胱胺酸殘基(Cys²⁴⁶)所組成；且，其中該晶體衍射用於測定原子坐標之 X 射線，以提供較約 2.0 埃更佳之解析率。

本發明進一步提供能夠特異結合至 P-鈣黏蛋白之表位和結合至 CD3 之表位的雙特異性異質二聚體雙功能抗體，其包含第一多肽鏈和第二條多肽鏈，其中該第一多肽鏈包含(從 N 端至 C 端之方向)：結構域 1，其包含子結構域 1A (其包含含有 SEQ ID NO：47 之序列的抗 CD3 抗體之 VL 結合結構域(CD3 VL))和子結構域 1B (其包含含有 SEQ ID NO：6 之序列的抗 P-鈣黏蛋白抗體之 VH 結合結構域(P-CAD VH))，其中該子結構域 1A 和子結構域 1B 可藉由甘胺酸-絲胺酸連接子(連接子 1)共價連接且不相聯結以形成 VL/VH 表位結合結構域；該第二多肽鏈包含(從 N 端至 C 端之方向)：結構域 2，其包含子結構域 2B(其包含含有 SEQ ID NO：5 之序列的 P-CAD VL)和子結構域 2A (其包含含有 SEQ ID NO：45 之序列的 CD3 VH)，其中該子結構域 2B 和子結構域 2A 可藉由甘胺酸-絲胺酸連接子(連接子 1)共價連接且不相聯結以形成 VL/VH 表位結合結

構域；其中晶體結構組裝成緊密之球形結構，此結構係藉由介於一對半胱胺酸殘基之間的二硫鍵聯穩定化，該對半胱胺酸殘基包含位在子結構域 1B 之位置 239 處的半胱胺酸殘基(Cys²³⁹)及一位在子結構域 2A 之位置 246 處的半胱胺酸殘基(Cys²⁴⁶)；且，其中該晶體衍射用於測定原子坐標之 X 射線，以提供較約 2.0 埃更佳之解析率。

於另一態樣中，本文所描述之雙特異性異質二聚體雙功能抗體含有二個彼此分隔約 40 埃之抗原結合位點且該結合位點可位於該雙特異性異質二聚體雙功能抗體的正交相對側。

本發明進一步提供根據本文所揭示之晶體結構來鑑定用於形成在雙特異性異質二聚體雙功能抗體內之二硫鍵聯的半胱胺酸殘基之額外位置的方法，其中係分析該晶體結構中之一對可供用於以一對可形成二硫鍵聯之半胱胺酸殘基取代的胺基酸殘基位置。於本發明之一特殊態樣中，該用於以一對可形成二硫鍵聯之半胱胺酸殘基取代的一對胺基酸殘基之位置可選自由下列所組成之群組：胺基酸位置 Gln¹²¹(VH1B)Gly¹⁶⁰(VL1A)、Val¹²⁹(VH1B)Gly²⁴⁴(VL1A)、Val¹²³(VH1 B)Gly¹⁶⁰(VL1A)、Gly¹²⁶(VH1B)Ser²⁴²(VL1A)及 Ala¹²⁷(VH1B)Ser²⁴²(VL1A)。該二硫鍵聯可減少溶劑可及性並降低連接子之長度。

本發明進一步提供遺傳工程處理雙特異性異二聚體雙功能抗體變體之方法以試圖形成更穩定之域間聯結，其中該遺傳工程係透過在域間界面(根據本文所揭示之晶體結

構)中的胺基酸定點誘變進行，其中該胺基酸定點誘變填滿大的內部空隙/孔。於本發明之一特殊態樣中，該定點誘變可經由以具有大體積芳族側鏈之胺基酸替換小胺基酸來增加胺基酸側鏈體積。於本發明之另一態樣中，該小胺基酸可選自由下列所組成之群組：在位置 Ala⁴⁴(VL1A)、Val²¹³(VH2A)、Leu²³⁸(VH2A)或 Met²³¹(VL2B)處之胺基酸。於本發明之另一態樣中，該具有大體積芳族側鏈之胺基酸可選自由下列所組成之群組：苯丙胺酸、酪胺酸或色胺酸。

本發明進一步提供結合至 P-鈣黏蛋白之抗體，其包含含有 SEQ ID NO：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21 或 23 之序列的輕鏈可變區(VL)之 CDR1、CDR2 和 CDR3 及/或含有 SEQ ID NO：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22 或 24 之序列的重鏈可變區(VH)之 CDR1、CDR2 和 CDR3。

於本發明之另一態樣中，本文所揭示之抗體包含含有 SEQ ID NO：35 或 36 之序列的 VL CDR1、含有 SEQ ID NO：37 或 38 之序列的 VL CDR2、含有 SEQ ID NO：39、40、41、42、43 或 44 之序列的 VL CDR3、含有 SEQ ID NO：25 或 33 之序列的 VH CDR1、含有 SEQ ID NO：26 或 34 之序列的 VH CDR2 及含有 SEQ ID NO：27、28、29、30、31 或 32 之序列的 VH CDR3。

於本發明之另一態樣中，本文所揭示之抗體包含含有 SEQ ID NO：35 或 36 之序列的 VL CDR1、含有 SEQ ID

NO：37 或 38 之序列的 VL CDR2、含有 SEQ ID NO：39、40、41、42、43 或 44 之序列的 VL CDR3、含有 SEQ ID NO：25 之序列的 VH CDR1、含有 SEQ ID NO：26 之序列的 VH CDR2 及含有 SEQ ID NO：27、28、29、30、31 或 32 之序列的 VH CDR3。

於本發明之另一態樣中，本文所揭示之抗體包含含有 SEQ ID NO：35 之序列的 VL CDR1、含有 SEQ ID NO：37 之序列的 VL CDR2、含有 SEQ ID NO：42 之序列的 VL CDR3、含有 SEQ ID NO：25 之序列的 VH CDR1、含有 SEQ ID NO：26 之序列的 VH CDR2 及含有 SEQ ID NO：29 之序列的 VH CDR3。

本發明進一步提供結合至 P-鈣黏蛋白之抗體，其包含含有 SEQ ID NO：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21 或 23 之序列的輕鏈可變區及/或含有 SEQ ID NO：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22 或 24 之序列的重鏈可變區。於本發明之另一態樣中，本文所揭示之抗體包含含有 SEQ ID NO：5 之序列的輕鏈可變區及/或含有 SEQ ID NO：6 之序列的重鏈可變區。於本發明之另一態樣中，本文所揭示之抗體包含含有 SEQ ID NO：7 之序列的輕鏈可變區及/或含有 SEQ ID NO：8 之序列的重鏈可變區。於本發明之另一態樣中，本文所揭示之抗體包含含有 SEQ ID NO：9 之序列的輕鏈可變區及/或含有 SEQ ID NO：10 之序列的重鏈可變區。於本發明之另一態樣中，本文所揭示之抗體包含含有 SEQ ID NO：15 之序列的輕

鏈可變區及/或含有 SEQ ID NO：16 之序列的重鏈可變區。

本發明進一步提供結合至 P-鈣黏蛋白並與本文所揭示之抗體競爭結合至 P-鈣黏蛋白之抗體。

本發明進一步提供醫藥組成物，其包含治療上有效量之本文所揭示的抗體及醫藥上可接受之載體。

本發明進一步提供用於治療有需要治療 P-鈣黏蛋白相關病症的患者中之 P-鈣黏蛋白相關病症的方法，其包含投予該患者本文所揭示之抗體或包含本文所揭示之抗體的醫藥組成物。本發明進一步提供用於療法中之本文所揭示的抗體。本發明進一步提供本文所揭示之抗體於製造用於療法中之藥物的用途。

於一態樣中，該 P-鈣黏蛋白相關病症為癌症。於另一態樣中，該癌症為表現 P-鈣黏蛋白或 P-鈣黏蛋白陽性之癌症。該癌症包括，但不限於乳癌、結腸直腸癌、卵巢癌、胃癌、甲狀腺癌、前列腺癌、子宮頸癌、胰腺癌、肺癌、膀胱癌、肝癌、子宮內膜癌、頭頸癌、睪丸癌及膠質母細胞癌。

本發明進一步提供編碼本文所揭示之抗體的核酸。於本發明之另一態樣中，該核酸可包含選自由下列所組成之群組的序列：SEQ ID NO：98、100、102、104、106、108、110、112、114 和 116。於本發明之進一步態樣中，該核酸可包含選自由下列所組成之群組的序列：SEQ ID NO：97、99、101、103、105、107、109、111、113 和

115。本發明進一步提供包含本文所揭示之核酸的載體及包含本文所揭示之載體的宿主細胞。

本發明進一步提供本文所揭示之雙特異性異質二聚體雙功能抗體或抗體，其中該 P-CAD VL 包含：P-CAD VL CDR1 序列，此 P-CAD VL CDR1 序列包含 $X_{L1.1}-X_{L1.2}-X_{L1.3}-X_{L1.4}-X_{L1.5}-X_{L1.6}-X_{L1.7}-X_{L1.8}-X_{L1.9}-X_{L1.10}-X_{L1.11}-X_{L1.12}-X_{L1.13}$ ，其中 $X_{L1.1}$ 至 $X_{L1.13}$ 各自獨立為根據表 57、表 58 或表 59 之第 3 行的胺基酸殘基；P-CAD VL CDR2 序列，此 P-CAD VL CDR2 序列包含 $X_{L2.1}-X_{L2.2}-X_{L2.3}-X_{L2.4}-X_{L2.5}-X_{L2.6}-X_{L2.7}$ ，其中 $X_{L2.1}$ 至 $X_{L2.7}$ 各自獨立為根據表 60、表 61 或表 62 之第 3 行的胺基酸殘基；及 P-CAD VL CDR3 序列，此 P-CAD VL CDR3 序列包含 $X_{L3.1}-X_{L3.2}-X_{L3.3}-X_{L3.4}-X_{L3.5}-X_{L3.6}-X_{L3.7}-X_{L3.8}-X_{L3.9}-X_{L3.10}-X_{L3.11}$ ，其中 $X_{L3.1}$ 至 $X_{L3.11}$ 各自獨立為根據表 63、表 64 或表 65 之第 3 行的胺基酸殘基；該 P-CAD VH 包含：P-CAD VH CDR1 序列，此 P-CAD VH CDR1 序列包含 $X_{H1.1}-X_{H1.2}-X_{H1.3}-X_{H1.4}-X_{H1.5}-X_{H1.6}-X_{H1.7}-X_{H1.8}-X_{H1.9}-X_{H1.10}$ 或 $X_{H1.5}-X_{H1.6}-X_{H1.7}-X_{H1.8}-X_{H1.9}-X_{H1.10}$ ，其中 $X_{H1.1}$ 至 $X_{H1.10}$ 各自獨立為根據表 48、表 49 或表 50 之第 3 行的胺基酸殘基；P-CAD VH CDR2 序列，此 P-CAD VH CDR2 序列包含 $X_{H2.1}-X_{H2.2}-X_{H2.3}-X_{H2.4}-X_{H2.5}-X_{H2.6}-X_{H2.7}-X_{H2.8}-X_{H2.9}-X_{H2.10}-X_{H2.11}-X_{H2.12}-X_{H2.13}-X_{H2.14}-X_{H2.15}-X_{H2.16}-X_{H2.17}$ 或 $X_{H2.1}-X_{H2.2}-X_{H2.3}-X_{H2.4}-X_{H2.5}-X_{H2.6}-X_{H2.7}-X_{H2.8}-X_{H2.9}-X_{H2.10}$ ，其中 $X_{H2.1}$ 至 $X_{H2.17}$ 各自獨立為根據表 51、表 52

或表 53 之第 3 行的胺基酸殘基；P-CAD VH CDR3 序列，此 P-CAD VH CDR3 序列包含 $X_{H3.1}-X_{H3.2}-X_{H2.3}-X_{H3.4}-X_{H3.5}-X_{H3.6}-X_{H3.7}-X_{H3.8}-X_{H3.9}$ ，其中 $X_{H3.1}$ 至 $X_{H3.9}$ 各自獨立為根據表 54、表 55 或表 56 之第 3 行的胺基酸殘基。

於一態樣中， $X_{L1.1}$ 至 $X_{L1.13}$ 各自獨立為根據表 57 之第 3 行的胺基酸殘基。於另一態樣中， $X_{L1.1}$ 至 $X_{L1.13}$ 各自獨立為根據表 58 之第 3 行的胺基酸殘基。於另一態樣中， $X_{L1.1}$ 至 $X_{L1.13}$ 各自獨立為根據表 59 之第 3 行的胺基酸殘基。於另一態樣中， $X_{L2.1}$ 至 $X_{L2.7}$ 各自獨立為根據表 60 之第 3 行的胺基酸殘基。於另一態樣中， $X_{L2.1}$ 至 $X_{L2.7}$ 各自獨立為根據表 61 之第 3 行的胺基酸殘基。於另一態樣中， $X_{L2.1}$ 至 $X_{L2.7}$ 各自獨立為根據表 62 之第 3 行的胺基酸殘基。於另一態樣中， $X_{L3.1}$ 至 $X_{L3.11}$ 各自獨立為根據表 63 之第 3 行的胺基酸殘基。於另一態樣中， $X_{L3.1}$ 至 $X_{L3.11}$ 各自獨立為根據表 64 之第 3 行的胺基酸殘基。於另一態樣中， $X_{L3.1}$ 至 $X_{L3.11}$ 各自獨立為根據表 65 之第 3 行的胺基酸殘基。

於另一態樣中， $X_{H1.1}$ 至 $X_{H1.10}$ 各自獨立為根據表 48 之第 3 行的胺基酸殘基。於另一態樣中， $X_{H1.1}$ 至 $X_{H1.10}$ 各自獨立為根據表 49 之第 3 行的胺基酸殘基。於另一態樣中， $X_{H1.1}$ 至 $X_{H1.10}$ 各自獨立為根據表 50 之第 3 行的胺基酸殘基。於另一態樣中， $X_{H2.1}$ 至 $X_{H2.17}$ 各自獨立為根據表 51 之第 3 行的胺基酸殘基。於另一態樣中， $X_{H2.1}$ 至 $X_{H2.17}$ 各自獨立為根據表 52 之第 3 行的胺基酸殘基。於另

一態樣中， $X_{H2.1}$ 至 $X_{H2.17}$ 各自獨立為根據表 53 之第 3 行的胺基酸殘基。於另一態樣中， $X_{H3.1}$ 至 $X_{H3.9}$ 各自獨立為根據表 54 之第 3 行的胺基酸殘基。於另一態樣中， $X_{H3.1}$ 至 $X_{H3.9}$ 各自獨立為根據表 55 之第 3 行的胺基酸殘基。於另一態樣中， $X_{H3.1}$ 至 $X_{H3.9}$ 各自獨立為根據表 56 之第 3 行的胺基酸殘基。

本發明進一步提供本文所揭示之雙特異性異質二聚體雙功能抗體或抗體，其中該 P-CAD VL 包含：P-CAD VL CDR1 序列，此 P-CAD VL CDR1 序列包含 $X_{L1.1}$ - $X_{L1.2}$ - $X_{L1.3}$ - $X_{L1.4}$ - $X_{L1.5}$ - $X_{L1.6}$ - $X_{L1.7}$ - $X_{L1.8}$ - $X_{L1.9}$ - $X_{L1.10}$ - $X_{L1.11}$ - $X_{L1.12}$ - $X_{L1.13}$ ，其中 $X_{L1.1}$ 至 $X_{L1.13}$ 各自獨立為根據表 69 之第 3 行或第 4 行的胺基酸殘基；P-CAD VL CDR2 序列，此 P-CAD VL CDR2 序列包含 $X_{L2.1}$ - $X_{L2.2}$ - $X_{L2.3}$ - $X_{L2.4}$ - $X_{L2.5}$ - $X_{L2.6}$ - $X_{L2.7}$ ，其中 $X_{L2.1}$ 至 $X_{L2.7}$ 各自獨立為根據表 70 之第 3 行或第 4 行的胺基酸殘基；及 P-CAD VL CDR3 序列，此 P-CAD VL CDR3 序列包含 $X_{L3.1}$ - $X_{L3.2}$ - $X_{L3.3}$ - $X_{L3.4}$ - $X_{L3.5}$ - $X_{L3.6}$ - $X_{L3.7}$ - $X_{L3.8}$ - $X_{L3.9}$ - $X_{L3.10}$ - $X_{L3.11}$ ，其中 $X_{L3.1}$ 至 $X_{L3.11}$ 各自獨立為根據表 71 之第 3 行或第 4 行的胺基酸殘基；該 P-CAD VH 包含：P-CAD VH CDR1 序列，此 P-CAD VH CDR1 序列包含 $X_{H1.1}$ - $X_{H1.2}$ - $X_{H1.3}$ - $X_{H1.4}$ - $X_{H1.5}$ - $X_{H1.6}$ - $X_{H1.7}$ - $X_{H1.8}$ - $X_{H1.9}$ - $X_{H1.10}$ 或 $X_{H1.5}$ - $X_{H1.6}$ - $X_{H1.7}$ - $X_{H1.8}$ - $X_{H1.9}$ - $X_{H1.10}$ ，其中 $X_{H1.1}$ 至 $X_{H1.10}$ 各自獨立為根據表 66 之第 3 行或第 4 行的胺基酸殘基；P-CAD VH CDR2 序列，此 P-CAD VH CDR2 序列包含 $X_{H2.1}$ - $X_{H2.2}$ - $X_{H2.3}$ - $X_{H2.4}$ -

$X_{H2.5}-X_{H2.6}-X_{H2.7}-X_{H2.8}-X_{H2.9}-X_{H2.10}-X_{H2.11}-X_{H2.12}-X_{H2.13}-$
 $X_{H2.14}-X_{H2.15}-X_{H2.16}-X_{H2.17}$ 或 $X_{H2.1}-X_{H2.2}-X_{H2.3}-X_{H2.4}-X_{H2.5}-$
 $X_{H2.6}-X_{H2.7}-X_{H2.8}-X_{H2.9}-X_{H2.10}$ ，其中 $X_{H2.1}$ 至 $X_{H2.17}$ 各自獨立為根據表 67 之第 3 行或第 4 行的胺基酸殘基；及 P-CAD VH CDR3 序列，此 P-CAD VH CDR3 序列包含 $X_{H3.1}-$
 $X_{H3.2}-X_{H3.3}-X_{H3.4}-X_{H3.5}-X_{H3.6}-X_{H3.7}-X_{H3.8}-X_{H3.9}$ ，其中 $X_{H3.1}$
 至 $X_{H3.9}$ 各自獨立為根據表 68 之第 3 行或第 4 行的胺基酸殘基。

於一態樣中， $X_{L1.1}$ 至 $X_{L1.13}$ 各自獨立為根據表 69 之第 3 行的胺基酸殘基。於另一態樣中， $X_{L1.1}$ 至 $X_{L1.13}$ 各自獨立為根據表 69 之第 4 行的胺基酸殘基。於另一態樣中， $X_{L2.1}$ 至 $X_{L2.7}$ 各自獨立為根據表 70 之第 3 行的胺基酸殘基。於另一態樣中， $X_{L2.1}$ 至 $X_{L2.7}$ 各自獨立為根據表 70 之第 4 行的胺基酸殘基。於另一態樣中， $X_{L3.1}$ 至 $X_{L3.11}$ 各自獨立為根據表 71 之第 3 行的胺基酸殘基。於另一態樣中， $X_{L3.1}$ 至 $X_{L3.11}$ 各自獨立為根據表 71 之第 4 行的胺基酸殘基。於另一態樣中， $X_{H1.1}$ 至 $X_{H1.10}$ 各自獨立為根據表 66 之第 3 行的胺基酸殘基。於另一態樣中， $X_{H1.1}$ 至 $X_{H1.10}$ 各自獨立為根據表 66 之第 4 行的胺基酸殘基。於另一態樣中， $X_{H2.1}$ 至 $X_{H2.17}$ 各自獨立為根據表 67 之第 3 行的胺基酸殘基。於另一態樣中， $X_{H2.1}$ 至 $X_{H2.17}$ 各自獨立為根據表 67 之第 4 行的胺基酸殘基。於另一態樣中， $X_{H3.1}$ 至 $X_{H3.9}$ 各自獨立為根據表 68 之第 3 行的胺基酸殘基。於另一態樣中， $X_{H3.1}$ 至 $X_{H3.9}$ 各自獨立為根據表 68 之第 4

行的胺基酸殘基。

此外，本發明提供 $X_{H1.8}$ 為 G， $X_{H2.5}$ 為 Y， $X_{H3.1}$ 為 I， $X_{H3.7}$ 為 F， $X_{L3.3}$ 為 W， $X_{L2.6}$ 為 N， $X_{H2.16}$ 為 Q， $X_{H3.5}$ 為 N， $X_{H3.9}$ 為 I， $X_{L1.8}$ 為 G， $X_{L2.2}$ 為 N， $X_{L2.3}$ 為 N， $X_{L3.2}$ 為 T 及/或 $X_{L3.4}$ 為 D。本發明亦提供本文所描述之態樣的任何組合。

【圖式簡單說明】

第 1A 和 1B 圖提供四個 LP-DART P-鈣黏蛋白/CD3 雙特異性異質二聚體雙功能抗體之替換代表的示意圖，其具有包含經優化之 Fc 區的第一異質二聚體提升結構域和第二異質二聚體提升結構域以經由“在孔中之球形突起”聯結來聯結。

第 2 圖提供 VF-DART 雙特異性異質二聚體雙功能抗體之示意圖，該 VF-DART 雙特異性異質二聚體雙功能抗體同時對準並活化 T 細胞(經由 CD3 抗原)和腫瘤細胞(經由 P-鈣黏蛋白抗原)，其具有第一多肽鏈(1)，其中第一異質二聚體提升結構域包含 C 端肽，此 C 端肽與第二多肽鏈(2)之第二異質二聚體提升結構域的 C 端肽形成用於穩定之二硫鍵。

第 3 圖提供具有第一多肽鏈(1)和第二多肽鏈(2)之組裝的 VF-DART 雙特異性異質二聚體雙功能抗體之示意圖，其中第一異質二聚體提升結構域(諸如 SEQ ID NO：70 或 SEQ ID NO：71，詳細描述於下文中)和第二異質二

聚體提升結構域(諸如 SEQ ID NO: 71 或 SEQ ID NO: 70, 取決於該第一異質二聚體提升結構域之選擇)包含一半胱胺酸殘基。

第 4 圖提供經組裝之 EK-DART 雙特異性異質二聚體雙功能抗體之示意圖, 該 EK-DART 雙特異性異質二聚體雙功能抗體具有第一多肽鏈(1) (其中第一異質二聚體提升結構域包含形成帶負電荷之 α -螺旋卷(E-卷)的麩胺酸富集區)和第二多肽鏈(2)(其中第二異質二聚體提升結構域包含形成帶正電荷之螺旋卷(K-卷)的賴胺酸富集區)。

第 5 圖提供經組裝之 LP-DART 雙特異性異質二聚體雙功能抗體之示意圖, 該 LP-DART 雙特異性異質二聚體雙功能抗體具有包含經優化之 Fc 區的第一異質二聚體提升結構域和第二異質二聚體提升結構域以經由“在孔中之球形突起”聯結來聯結。

第 6 圖提供稱為 MP3-DART 之具有 Fc 結構域的替換之雙特異性異質二聚體雙功能抗體的結構。該雙特異性異質二聚體雙功能抗體係連接至 Fc 結構域之 N 端側, 因此被稱為“N-端 MP3-DART”。該 N-端 MP3-DART 包含示意圖表示之第一、第二和第三多肽鏈。N-端 MP3-DART 之最終結構表示在圖中。

第 7 圖提供稱為 MP3-DART 之具有 Fc 結構域的替換之雙特異性異質二聚體雙功能抗體的結構。該雙特異性異質二聚體雙功能抗體係連接至 Fc 結構域之 C 端側, 因此被稱為“C-端 MP3-DART”。該 C-端 MP3 DART 包含示意

圖表示之第一、第二和第三多肽鏈。C-端 MP3-DART 之最終結構表示在圖中。

第 8 圖提供線性回歸分析，其比較細胞毒性 T 淋巴細胞(CTL)之活性對相關之細胞表面 P-鈣黏蛋白表現。

第 9 圖顯示在小鼠 HCT116 結腸直腸癌模型中，177 EK-DART 在活體內降低腫瘤體積之能力。

第 10 圖顯示在小鼠 HCT116 結腸直腸癌模型中，153 EK-DART 在活體內降低腫瘤體積之能力。

第 11 圖顯示在小鼠 HCT116 結腸直腸癌模型中，154 EK-DART 在活體內降低腫瘤體積之能力。

第 12 圖顯示在小鼠 HCT116 結腸直腸癌模型中，35 EK-DART 在活體內降低腫瘤體積之能力。

第 13 圖顯示在小鼠 HCT116 結腸直腸癌模型中，153 LP-DART 在活體內降低腫瘤體積之能力。

第 14 圖顯示在小鼠 HCT116 結腸直腸癌模型中，153 LP-DART 在活體內降低腫瘤體積之能力。

第 15 圖顯示在小鼠 Du145 前列腺癌模型中，153 LP-DART 在活體內降低腫瘤體積之能力。

第 16 圖顯示在小鼠 H1650 肺癌模型中，153 LP-DART 在活體內降低腫瘤體積之能力。

第 17A-17D 圖顯示在已建立之腫瘤+植入之人 T 細胞模型中，153 LP-DART 在活體內降低腫瘤體積之能力，第 17E 圖顯示該腫瘤體積之單向 ANOVA 分析。

第 18A 和 18B 圖顯示在已建立之腫瘤人 T 細胞繼承

性轉移模型中，153 LP-DART 在活體內降低腫瘤體積之能力。

第 19 圖顯示在 P-鈣黏蛋白陽性患者來源之結腸直腸腫瘤異種移植物中，153 LP-DART 在活體內降低腫瘤體積之能力。

第 20 圖顯示在腫瘤浸潤淋巴細胞(TIL)之 153 LP-DART 介導劑量依賴性增加。

第 21A-21D 圖提供用於評估經螢光團標記之 153 LP-DART 和 T 細胞的性質之玻管內分析。

第 22A-22D 圖提供在 HCT116 異種移植模型中之 153 LP-DART 的生物分佈和靶向，其係採用縱向 FMT 成像。

第 23A-23C 圖顯示來自 FMT 成像、研究之藥物動力學數據(ELISA)。

第 24A 圖顯示出經螢光團標記之 T 細胞活性和未經標記之 T 細胞活性的評估，而第 24B 圖顯示出在 HCT116 腫瘤模型中經螢光團標記之 T 細胞的細胞進踪動力學，其係使用 FMT 成像(活體內)。

第 25 圖提供經設計之用於晶體學的 DART 構建體之示意圖，其具有共價連接至 P-CAD VH 結構域之命名為“6XHIS”的 C-端 His 標籤和共價連接至 CD3 VH 結構域之命名為“FLAG”的 C-端 FLAG。

第 26 圖提供晶體 35 DART 蛋白之晶體結構的圖示。

第 27 圖提供晶體 35 DART 蛋白的圖示，其顯示用於抗 CD3 CDR 區和抗 P-CAD CDR 區之抗原結合位點。

第 28 圖提供晶體 35 DART 蛋白變體之示意圖，該晶體 35 DART 蛋白變體透過在含有大的內部空隙/孔的域間界面中之定點誘變而具有更穩定之域間聯結，該大的內部空隙/孔中可填充具有各種胺基酸之增加的側鏈體積。

第 29 圖提供晶體 35 DART 蛋白之晶體結構的圖示，該晶體 35 DART 蛋白具有各種不同之二硫鍵位置(Cys-Cys 位點)以降低該二硫鍵之溶劑可及性並降低連接子之長度。

第 30A 和 30B 圖提供本發明之 VF-DART 雙特異性異質二聚體雙功能抗體之第一和第二多肽鏈的胺基酸序列。

第 31A 和 31B 圖提供本發明之 EK-DART 雙特異性異質二聚體雙功能抗體之第一和第二多肽鏈的胺基酸序列。

第 32A 和 32B 圖提供本發明之 LP-DART 雙特異性異質二聚體雙功能抗體之第一和第二多肽鏈的胺基酸序列。

第 33 圖提供本發明之 DART 雙特異性異質二聚體雙功能抗體之第一和第二多肽鏈的胺基酸序列。

第 34 圖提供用於 P-鈣黏蛋白 153 LP-DART 之表位繪測的 P-鈣黏蛋白-胞外結構域(ECD)-Fc 融合蛋白構建體。

第 35 圖提供完整長度之 P-鈣黏蛋白表位序列(UniProt P22223, CADH3, 人鈣黏蛋白-3)。

[詳細說明]

本發明描述新穎之雙特異性異質二聚體雙功能抗體，其包含特異結合 P-鈣黏蛋白之抗原結合結構域及特異結合

CD3 之抗原結合結構域以招募和活化細胞溶解性 T 細胞。該雙特異性異質二聚體雙功能抗體可進一步包含 Fc 結構域。此外，本文中證明該雙特異性異質二聚體雙功能抗體成功地引導和活化 T 細胞對表現 P-鈣黏蛋白之腫瘤細胞的細胞毒性。另外，本發明之雙特異性異質二聚體雙功能抗體具有增強之藥物動力學性質以延長活體內半衰期且係經設計成在表現 P-鈣黏蛋白之腫瘤的存在下經由該 CD3 複合物來吸引和活化多株 T 細胞群。

本發明描述針對源自人噬菌體展示庫之 P-鈣黏蛋白的完整人單鏈抗體結合結構域之分離和表徵。本發明進一步提供這些 P-鈣黏蛋白結合結構域共價連接至抗 CD3 抗體之抗原結合結構域(為先前描述之 DART 格式) (Moore et al., Blood, 117(17): 4542-4551, 2011)以創建能夠同時結合至 P-鈣黏蛋白和 CD3 之雙特異性異質二聚體雙功能抗體。此外，於本發明之一態樣中，該抗 P-鈣黏蛋白/抗 CD3 DART 蛋白，亦稱為雙特異性異質二聚體雙功能抗體，成功地指導並活化 T 細胞對表現 P-鈣黏蛋白之細胞的細胞毒性。

除非另外定義，本文所使用之所有技藝術語、符號和其他科學術語或用辭意圖具有本發明相關技藝之技術人士熟習所通常理解的含義。於一些情況中，本文中定義具有通常理解之含義的術語係為了清楚及/或快速參考，而本文中包含該類定義不應被必然解釋為代表與本技藝中所通常理解者有顯著差異。除非另有說明，實行本發明時係使

用在本技藝之技術範圍內的習知分子生物學(包括重組技術)、微生物學、細胞生物學、生物化學、核酸化學及免疫學技術。該等技術在文獻中有充分解釋，諸如 *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan et al., eds., 1999，包括到 2001 年之補充資料)；*Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel et al., eds., 1987，包括到 2001 年之補充資料)；*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*，第三版(Sambrook and Russel, 2001)。

P-鈣黏蛋白(鈣黏蛋白 3，CDH3)屬於跨膜糖蛋白之經典鈣黏蛋白超家族，其調節發育期間之鈣依賴性細胞-細胞黏著和組織穩態(Gumbiner et al., *J. Cell Biol.*, 148: 399-403, (2000))。該鈣黏蛋白胞內結構域直接與連接至肌動蛋白(actin)細胞骨骼網絡之細胞質連環蛋白(catenin)交互作用，提供穩定之細胞交互作用的分子基礎。該鈣黏蛋白/連環蛋白複合物，以及由此結構控制之傳信通路代表重大的調控機制，透過其對細胞生長、分化、移動和存活的影响來指導細胞命運決定(Cavallaro et al, 2011)。經典鈣黏蛋白包括 E-鈣黏蛋白(CDH1)、N-鈣黏蛋白(CDH2)和 P-鈣黏蛋白(CDH3)。正常組織中之 P-鈣黏蛋白的表現水準低且主要侷限於肌上皮細胞及複層上皮(stratified epithelium)的基底層。現已有報導，P-鈣黏蛋白之表現在各種不同腫瘤中增加，包括乳癌、胃癌、子宮內膜癌、胰腺癌和結直腸癌且為生存率低之末期疾病患者中的良好預測指標(Hardy et al, 2002；Imai et al, 2008；Parades et al,

2005；Stefansson et al, 2004；Taniuchi et al, 2005)。基因表現略圖分析及免疫組織化學分析進一步表明肺癌(包括，但不限於非小細胞肺癌和小細胞肺癌)、卵巢癌、頭頸癌、甲狀腺癌和膀胱癌。

CD3(分化 3 之簇)為包含四個不同鏈 ϵ 、 δ 、 γ 和 ζ 而形成 $\epsilon\delta$ 、 $\epsilon\gamma$ 和 $\zeta\zeta$ 二聚體的 T 細胞共受體蛋白質複合物。

這些二聚體與稱為 T 細胞受體(TCR)之分子聯結，並在 T 淋巴細胞中產生活化信號。該 TCR 和 CD3 分子一起包含該 TCR 複合物。眾所周知，抗 CD3 抗體透過活化內源性淋巴因子之製造來引起細胞毒性 T 細胞產生且能夠選擇性地殺死腫瘤靶的(Yun et al., Cancer Research, 49: 4770-4774 (1989))。

更具體地說，T 細胞表現能夠誘導抗原特異性免疫反應之 TCR 複合物(Smith-Garvin et al, 2009)。抗原為由腫瘤細胞和經病毒感染之細胞所表現的肽，其能夠刺激免疫反應。細胞內表現之抗原結合至第 I 型主要組織相容性(第 I 型 MHC)分子並被運送至表面而與 T 細胞在此接觸。若 TCR 對與抗原複合之第 I 型 MHC 的結合親和力足夠，則將開始形成免疫突觸。透過免疫突觸來傳信之作用係透過該形成 $\epsilon\delta$ 、 $\epsilon\gamma$ 和 $\zeta\zeta$ 二聚體的 CD3 共同受體來介導。這些二聚體與 TCR 聯結並在 T 淋巴細胞中產生活化信號。此傳信級聯指導 T 細胞介導滅殺表現該抗原之細胞。細胞毒性係由從 T 細胞至靶細胞的粒酶 B(granzyme)和穿孔素(perforin)釋出並轉移所介導。

不受理論所束縛，咸信，本發明之雙特異性異質二聚體雙功能抗體可允許 T 細胞免去 TCR 和該與抗原複合之第 I 型 MHC 交互作用的必要性，取而代之的是透過指導表現在 T 細胞上之 CD3(諸如 CD3 ϵ)和表現在腫瘤上之 P-鈣黏蛋白共接合來重新指導 T 細胞針對靶的細胞。

本文所使用之“效應子功能”係指支持由雙特異性異質二聚體雙功能抗體之抗 CD3 結合結構域與細胞毒性 T 細胞交互作用所導致之生化事件的能力。

如本文所使用之術語“抗體”係指單株抗體、多特異性抗體、人抗體、人化抗體、合成抗體、嵌合型抗體、多株抗體、駱駝化抗體、單鏈 Fvs(scFv)、單鏈抗體、Fab 片段、F(ab')片段、二硫鍵鍵聯之雙特異性 Fvs(sdFv)、內抗體和抗獨特型(抗 Id)抗體(包括，例如針對本發明抗體之抗 Id 和抗-抗 Id 抗體)及上述任一項之表位結合片段或結合結構域。尤其是，抗體包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子之免疫活性片段，即，含有抗原結合位點之分子。免疫球蛋白分子可為任何類型(例如 IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 和 IgY)、類別(例如 IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁ 和 IgA₂)或子類別。

如本文所使用之術語“雙特異性異質二聚體雙功能抗體”係指具有二或多個多肽鏈或蛋白質之複合物，該二或多個多肽鏈或蛋白質各自包含至少一個抗體 VL 和一個抗體 VH 結構域或其片段，其中二個抗體結合結構域同時包含在單一多肽鏈內且其中各多肽鏈中之 VL 和 VH 結構域

係來自不同抗體。

如本文所使用之術語“免疫特異結合”、“免疫特異識別”，“特異結合”、“特異識別”及類似術語係指特異結合至抗原(例如表位或免疫複合物)且不特異結合至另一分子之分子，例如結合結構域。特異結合至抗原之分子可以較低之親和力結合至其他肽或多肽，此可藉由本技藝已知之分析，例如免疫分析，BIACORE®或其他分析來測定。較佳地，特異結合抗原之分子不與其他蛋白質交叉反應。

如本文所使用之術語“重鏈”、“輕鏈”、“可變區”或“可變結構域”、“框架區”、“恆定結構域”，等具有彼等在免疫學技藝中的普通含義且係指在天然存在之免疫球蛋白中的結構域和重組結合蛋白之對應結構域(例如人化抗體、單鏈抗體、嵌合型抗體，等)。該天然存在之免疫球蛋白的基本結構單位為具有二個輕鏈和二個重鏈的四聚體，通常以約 150,000Da 之糖蛋白形式表現。每一條鏈之胺基端(N 端)部分均包含具有約 100 至 110 或更多個胺基酸之可變區，此可變區主要負責識別抗原。每一條鏈之羧基端(C 端)部分界定恆定區。每一條輕鏈係由輕鏈可變結構域(VL)和輕鏈恆定結構域(CL)所組成。每一條重鏈係由重鏈可變區(VH)和重鏈恆定區(具有 CH1、鉸鏈、CH2 和 CH3 結構域)所組成。該 IgG 分子之可變區包含高可變區，稱為互補決定區(CDR)，其含有與抗原接觸之殘基和非 CDR 區段，稱為框架區(FR)，其通常維持結構並決定 CDR 環之定位(雖然某些框架殘基亦可接觸抗原)。各 VH

和 VL 包含三個 CDR 和四個 FR，從胺基端到羧基端係依下列結構排列：n-FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4-c。免疫球蛋白分子可為任何類型(例如 IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 和 IgY)和類別(例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2)或子類別。

該“鉸鏈區”或“鉸鏈結構域”通常被定義為從人 IgG1 之 Glu216 至 Pro230 的伸展區。其他 IgG 同種異型之鉸鏈區可經由將形成重鏈間 S--S 鍵之第一個和最後一個半胱胺酸殘基放在相同位置來與 IgG1 序列比對。

如本文所使用之術語“Fc 區”、“Fc 結構域”或類似術語係用於定義 IgG 重鏈之 C 端區。IgG 之 Fc 區包含二個恆定結構域，CH2 和 CH3。人 IgG Fc 區之 CH2 結構域通常從胺基酸 231 延伸至胺基酸 341 (根據 Kabat 編號系統)。人 IgG Fc 區之 CH3 結構域通常從胺基酸 342 延伸至 447(根據 Kabat 編號系統)。人 IgG Fc 區之 CH2 結構域(亦稱為“C γ 2”結構域)之獨特處在於其並非緊密搭配另一個結構域。而是，二個 N-連接之分支碳水化合物鏈穿插在完整之天然 IgG 的二個 CH2 結構域之間。

當提及結合蛋白、結合結構域或抗體(如本文所廣泛定義者)時，各結構域之胺基酸分配係根據 Kabat、Chothia、Kabat 和 Chothia 二者之累積、AbM、接觸及/或構形定義或任何本技藝中所周知之 CDR 測定方法的定義。抗體 CDR 可被視為最初由 Kabat 等人定義之高可變區。參見，例如 Kabat et al., 1992, Sequences of Proteins

of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, NIH, Washington D.C.。該 CDR 之位置亦可被視為結構性環結構，其最初係由 Chothia 和其他人描述。參見，例如 Chothia et al., 1989, Nature 342 : 877-883。其他識別 CDR 的方法包括“AbM 定義”(此為 Kabat 和 Chothia 之間的折衷方法且係使用牛津分子 AbM 抗體建模軟體 (Oxford Molecular's AbM antibody modeling software)(Accelrys，加州聖地牙哥)推衍)，或包括基於所觀察到之抗原接觸的 CDR 之“接觸定義”，此方法列於如 MacCallum et al., 1996, J. Mol.Biol., 262:732-745 中。於另一方法中，本文中稱為 CDR 之“構象定義”，該 CDR 之位置可被視為對抗原結合具有焓貢獻之殘基。參見，例如 Makabe et al., 2008, Journal of Biological Chemistry, 283 : 1156-1166。還有其他 CDR 邊界定義可能不嚴格遵循上述方法的其中一者，但仍可能與至少一部分之 Kabat CDR 重疊，雖然其可能鑑於預測或實驗發現特定之殘基或殘基團或甚至是整個 CDR 不會顯著影響抗原結合而被縮短或延長。如本文所使用者，CDR 可指藉由本技藝中已知之任何方法(包括方法的組合)定義的 CDR。本文所使用之方法可利用根據這些方法中之任一方法所定義的 CDR。在任何包含一個以上之 CDR 的指定態樣，該 CDR 可根據 Kabat、Chothia、延伸者、AbM、接觸及/或構形定義中之任一者定義。

人化抗體係指含有源自非人免疫球蛋白之最小序列的非人(例如鼠)抗體形式，該非人(例如鼠)抗體形式為嵌合

型免疫球蛋白、免疫球蛋白鏈或其片段(諸如 Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂ 或其他抗原結合子序列或抗體之結合結構域)。較佳地，人化抗體為其中該來自接受者之互補決定區(CDR)(受體抗體)的殘基被來自具有所需之特異性、親和力和能力的非人物種(諸如小鼠、大鼠或兔)之 CDR(供體抗體)的殘基替換之人免疫球蛋白。

術語“單株抗體”係指源自單一選殖株(包括任何真核、原核或噬菌體選殖株)之抗體，而非製造該單株抗體之方法。本發明之雙特異性異質二聚體雙功能抗體之結合結構域來源的單株抗體可使用本技藝中已知之多種技術製備，包括使用雜交瘤、重組株和噬菌體顯示技術或彼等之組合。例如，單株抗體可使用雜交瘤技術，包括那些本技藝中所已知者來製造。

抗體亦可使用本技藝中已知之各種噬菌體展示法產生。在噬菌體展示法中係將功能性抗體結構域展示在攜帶編碼該抗體之多核苷酸序列的噬菌體顆粒之表面上。於一特定態樣中，可利用該等噬菌體來展示抗原結合結構域，諸如從組庫或組合抗體庫(例如人或鼠)表現之 Fab 和 Fv 或二硫鍵穩定化之 Fv。可與所欲抗原結合之抗原結合結構域之噬菌體可使用抗原選擇或鑑定，例如使用經標記之抗原或使用結合至或被截留在固體表面或小珠上的抗原。這些方法中所使用之噬菌體通常為絲狀噬菌體，包括 fd 和 M13。抗原結合結構域係以與噬菌體基因 III 或基因 VIII 蛋白之重組融合蛋白形式表現。可用來製造本發明之免疫

球蛋白或其片段的噬菌體展示法之實例包括那些揭示於 Brinkmann et al. (1995)“Phage Display Of Disulfide-Stabilized Fv Fragments”, J. Immunol. Methods, 182:41-50 中者。

該多種 IgG 同種異型的功能特性及彼等之結構域為本技藝所周知。IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 之胺基酸序列為本技藝所已知者。從特定之 IgG 同種異型選擇及/或組合二或多個結構域以用於本發明之方法中可根據任何已知之親代同種異型之參數，包括對 FcγR 之親和力來進行。例如，使用來自表現出對 FcγR II B 有限之結合力或不結合 FcγR II B 之 IgG 同種異型(例如 IgG2 或 IgG4)的區或結構域可發現特定用途，其中期望將雙特異性異質二聚體雙功能抗體進行工程處理以將對活化受體之結合最大化並將對抑制性受體之結合最小化。類似地，使用已知會優先結合 C1q 或 FcγR III A 之來自 IgG 同種異型(例如 IgG3)的 Fc 區或結構域可與本技藝中已知之 Fc 胺基酸修飾組合以用來增強由抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)及/或補體依賴性細胞毒性(CDC)、增進遺傳工程處理雙特異性異質二聚體雙功能抗體分子，從而將效應子功能活性，例如：補體活化或 ADCC 最大化。以類似方式，可在 IgG 同種異型之 Fc 區或結構域中製造突變以將 Fc 區之效應子功能最小化或消除。

術語“表位”係指分子中能被抗體識別且與該抗體之一或多個抗原結合區結合的部分。表位通常包含化學活性表

面分組之分子，諸如胺基酸或糖側鏈，且具有特定之三維結構特徵和特定之電荷特徵。本文所使用之術語“抗原性表位”的定義為抗體可特異結合至其之多肽部分，此可藉由本技藝中所熟知之任何方法，例如習知之免疫分析測定。“非線性表位”或“構形表位”包含在抗原蛋白(其為與特異於該表位之抗體結合者)內之不連續多肽(或胺基酸)。一旦在抗原上測定出期望之表位，就可能產生針對該表位之抗體，例如使用本文所描述之技術。在發現過程中，抗體之產生和表徵可以闡明關於期望之表位的信息。然後，從此信息有可能進行競爭性篩選結合至相同表位的抗體。達成此任務的一種方法為進行競爭和交叉競爭研究以找出彼此競爭或交叉競爭之抗體，例如競爭結合至該抗原之抗體。

一種方法係識別該與抗體結合之表位或“表位測繪”。本技藝中已知多種用於測繪和表徵蛋白質上之表位位置的方法，包括解析抗體-抗原複合物之晶體結構、競爭分析、基因片段表現分析及基於合成肽的分析，如描述於，例如 Harlow and Lane, *Using Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999 的第 11 章中所描述者。於另外之實例中，表位測繪可用於測定抗體所結合之序列。表位測繪係從各種來源市售購得，例如 Pepscan Systems(Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad, 荷蘭)。於另外之實例中，可進行抗原結合結構域之誘變、結構域交換實驗和丙胺酸掃描誘

變以鑑定表位結合所需、足夠及/或所要求之殘基。結合親和力和抗原結合結構域交互作用之截止速率可藉由競爭性結合分析來測定。競爭性結合分析的一種實例為放射免疫分析，其包含培育經標記之抗原並偵測與該經標記之抗原結合的分子。本發明之分子對抗原的親和力及結合的截止速率可藉由 Scatchard 分析從飽和度數據測定。

本發明分子對抗原之親和力和結合性質可使用本技藝中已知之用於抗原結合結構域的玻管內分析(以生物化學或免疫學為基礎的分析)進行初步測定，該等分析包括，但不限於酶聯免疫吸附試驗(ELISA)分析、表面電漿共振(surface plasmon resonance)(SPR)分析、生物膜層干涉技術(bio-layer interferometry)或免疫沉澱分析。本發明分子在活體內模型(諸如本文所描述和揭示者)中可具有與基於玻管內分析者類似的結合特性。然而，本發明不排除在以玻管內為基礎的分析中未展現出所需表型，但在活體內展現出所需表型之本發明分子。

如本文所使用之術語“結合親和力(K_D)”意指特定抗原-抗體交互作用之解離速率。 K_D 為解離速率(rate of dissociation)(亦稱為“解離速率(off-rate)(k_{off})”)對結合速率(association rate)(或“進行速率(on-rate)(k_{on})”)之比。因此， K_D 等於 k_{off}/k_{on} 且係以莫耳濃度(M)表示。其依循 K_D 越小，結合親和力越強。因此，與 K_D 為 1nM 相比較， K_D 為 1 μ M 表示結合親和力弱。抗體之 K_D 值可使用本技藝所公認之方法測定。一種用於測定抗體之 K_D 的方法係使用

表面等電漿共振 (SPR) 技術，通常係使用生物傳感器系統，諸如 BIACORE® 系統。BIAcore 動力學分析包含分析來自芯片之抗原與其表面上之固定化分子 (例如包含表位結合結構域之分子) 的結合和解離。用於測定抗體之 K_D 的另一種方法係使用生物膜層干涉技藝，通常係採用 OCTET® 技術 (OctetQK® 系統，ForteBio)。

如本文所使用之術語“核酸”及“核苷酸序列”包括 DNA 分子 (例如 cDNA 或基因組 DNA)、RNA 分子 (例如 mRNA)、DNA 和 RNA 分子之組合或雜種 DNA/RNA 分子及 DNA 或 RNA 分子之類似物。該等類似物可使用，例如核苷酸類似物產生，其包括，但不限於肌苷或三苯甲基化鹼基。該等類似物亦可包含 DNA 或 RNA 分子，此 DNA 或 RNA 分子包含增添該分子有利屬性 (諸如，例如核酸酶抗性或增加之跨越細胞膜的能力) 之經修飾的支架。該核酸或核苷酸序列可為單股、雙股，可同時含有單股和雙股部分且可含有三股部分，但較佳為雙股 DNA。

本發明亦包括編碼本發明之雙特異性異質二聚體雙功能抗體 (包括該抗體之多肽和結合區) 的多核苷酸。編碼本發明之分子的多核苷酸可藉由本技藝中已知之任何方法取得，且該多核苷酸之核苷酸序列可藉由本技藝中已知之任何方法測定。

編碼本發明之雙特異性異質二聚體雙功能抗體的多核苷酸可包括下列者：只有該變體之編碼序列、該變體之編碼序列及另外之編碼序列，諸如功能性多肽或信號或分泌

序列或親蛋白序列；該抗體之編碼序列和該抗體之非編碼序列，諸如內含子或非編碼序列 5'及/或編碼序列之 3'。術語“編碼雙特異性異質二聚體雙功能抗體之多核苷酸”包含其中包括該變體之另外的編碼序列的多核苷酸，但亦包含其中包括另外之編碼及/或非編碼序列的多核苷酸。本技藝中已知經優化以用於特定宿主細胞/表現系統之多核苷酸序列可以很容易地從所需之蛋白質的胺基酸序列取得(見 GENEART®AG，德國雷根斯堡)。

如本文所使用之術語“癌症”係指由細胞異常失控生長所導致之贅生物或腫瘤。於一些態樣中，癌症係指一直保持局部化的良性腫瘤。於其他態樣中，癌症係指已侵入並破壞鄰近之身體結構且擴散至遠方位點的惡性腫瘤。於一些態樣中，該癌症與特定之癌抗原相關。

如本文所使用之“治療有效量”係指足以治療或管理疾病或病症之治療劑的量。治療有效量可指足以使疾病的發作延遲或最小化(例如使癌症的擴散延遲或最小化)的治療劑之量。治療有效量亦可指在治療或管理疾病中提供治療益處之治療劑的量。此外，關於本發明之治療劑的治療有效量意指在治療或管理疾病中提供治療益處之單獨之治療劑的量或與其他療法組合之治療劑的量。

如本文所使用之術語“預防劑”係指任何可用於預防病症或防止疾病復發或擴散的作用劑。預防有效量可指足以防止過度增生性疾病(尤其是癌症)復發或擴散，或這些情況在患者中發生之預防劑的量，前述患者包括，但不限於

那些易罹患過度增生性疾病者，例如那些遺傳上易罹患癌症或先前暴露於致癌物質者。預防有效量亦可指在預防疾病中提供預防益處之預防劑的量。此外，關於本發明之預防劑的預防有效量意指在預防疾病中提供預防益處之單獨之預防劑的量或與其他作用劑組合之預防劑的量。

如本文所使用之術語“預防(prevent、preventing 及 prevention)”係指由投予預防或治療劑所導致之防止個體中之病症之一或多種症狀復發或發作。

如本文所使用之術語“組合”係指使用一種以上之預防及/或治療劑。當使用術語“組合”時並不限制將預防及/或治療劑投予患有病症之個體的順序。換言之，該組合療法可與該治療劑分別、連續或同時進行治療。

本發明分子之重組表現

一旦已取得編碼本發明分子(即，結合結構域)之核酸序列，可使用本技藝中所周知之技術藉由重組 DNA 技術製造該用於製造分子之載體。

編碼本發明之雙特異性異質二聚體雙功能抗體結合結構域之多核苷酸可包括可操作地連接至該抗體編碼序列之表現控制多核苷酸序列，包括本技藝已知之天然關聯或異源啟動子區。該表現控制序列可為在能夠轉化或轉染真核宿主細胞之載體中的真核啟動子系統，但亦可使用用於原核宿主之控制序列。一旦已將載體納入適當之的宿主細胞株中，使該宿主細胞在適合表現該核苷酸序列，及依需

要，適合收集和純化該抗體之條件下繁殖。真核細胞株包括 CHO 細胞株、各種 COS 細胞株、HeLa 細胞、骨髓瘤細胞株、經轉化之 B 細胞或人胚腎細胞株。

雙特異性異質二聚體雙功能抗體

如前述，雙特異性異質二聚體雙功能抗體係指二或多個多肽鏈或蛋白質之複合物，其各自包含至少一個抗體 VL 結構域及一個抗體 VH 結構域或其片段，其中二個抗體結合結構域同時包含在單一多肽鏈內且其中在各多肽鏈中之 VL 和 VH 結構域係來自不同抗體。於特定態樣中，雙特異性異質二聚體雙功能抗體包括同時含有 VL 和 VH 結構域之多肽鏈的二聚體或四聚體。該包含多聚體型蛋白質之個別多肽鏈可藉由鏈間二硫鍵共價連接到至少一個該多聚體之其他肽。

本發明之雙特異性異質二聚體雙功能抗體包含利用雙親和力重新靶向 (Dual-Affinity Re-Targeting) (DART®) 平台技術 (美國專利申請出版物第 2007/0004909、2009/0060910 和 2010/0174053 號) 共價連接至抗 CD3 (CD3) 結合結構域之抗 P-鈣黏蛋白 (P-CAD) 結合結構域。該 DART 技術提供之共價連接可導致可能具有優異之穩定性、理想之重和輕鏈配對和抗原識別的分子。再者，最小之連接子大小和內含物可降低免疫原性之可能。本發明之 DART 蛋白同時對準 T 細胞 (CD3) 和腫瘤細胞 (P-CAD) 並成功地指導和活化 T 細胞之細胞毒性對表現 P-鈣黏蛋白之

腫瘤細胞。

雙特異性異質二聚體雙功能抗體的每個多肽鏈包含 VL 結構域和 VH 結構域，其可經共價連接(連接子 1)從而使抗體結合結構域受自組裝之限制。此外，每個多肽鏈包含異質二聚體化結構域，其提升多個多肽鏈之異質二聚體化並降低不同多肽鏈同質二聚體化之可能性。該異質二聚體化結構域可位於多肽鏈之 N-端或 C 端。該異質二聚體化結構域可包含長度為 1、2、3、4、5、6 或更多個胺基酸殘基之半胱胺酸連接子(連接子 2)。二個多肽鏈之交互作用可能產生二個 VL/VH 配對，形成二個表位結合結構域，即，二價分子。該 VH 或 VL 結構域不會被限制在該多肽鏈內的任何位置，即，限制在胺基或羧基端，該結構域亦不會被限制在彼此之相對位置，即，該 VL 結構域可在 VH 結構域之 N 端，反之亦然。唯一的限制為用於形成功能性雙功能抗體之可用的互補性多肽鏈。當 VL 和 VH 結構域係源自特異於不同抗原之抗體時，形成功能性雙特異性異質二聚體雙功能抗體需要二個不同多肽鏈交互作用，即，形成異質二聚體。相反地，當二個不同的多肽鏈自由交互作用時，例如在重組表現系統中，一個包含 VLA 和 VHB(A 為 第一表位且 B 為第二表位)，而另一個包含 VLB 和 VHA，二個不同的結合位點可形成：VLA-VHA 和 VLB-VHB。在所有雙特異性異質二聚體雙功能抗體多肽鏈對方面，該二條鏈有可能發生錯誤比對或錯誤結合，例如 VL-VL 或 VH-VH 結構域之交互作用。然而，功能性雙

特異性異質二聚體雙功能抗體之純化係根據適當二聚體化之結合位點之免疫特異性，使用本技藝中已知或本文示例之基於親和力的任何方法(例如親和力層析法)很容易地管理。

本發明之雙特異性異質二聚體雙功能抗體可同時結合二個分開和截然不同的表位。於某些態樣中，至少一個表位結合位點係特異於表現在免疫效應子細胞上(例如表現在 T 淋巴細胞上)之 CD3 決定簇。於一態樣中，該雙特異性異質二聚體雙功能抗體分子結合至該效應子細胞決定簇且亦活化該效應子細胞。於一態樣中，該表位結合結構域能夠結合與乳癌、直腸結腸癌、卵巢癌、胃癌、甲狀腺癌、前列腺癌、子宮頸癌、胰腺癌、肺癌(包含，但不限於：非小細胞肺癌和小細胞癌)、膀胱癌、肝癌、子宮內膜癌、頭頸癌、睪丸癌和膠質母細胞瘤癌症相關之 P-鈣黏蛋白腫瘤相關抗原。

本發明之雙特異性異質二聚體雙功能抗體包含通常衍生自免疫球蛋白或抗體之抗原結合結構域。該衍生用於本發明方法中之結合結構域的抗體可來自任何動物來源，包括鳥類和哺乳動物(例如人、非人靈長類、鼠、驢、羊、兔、山羊、天竺鼠、駱駝、馬或雞)。較佳地，該抗體為人或人化單株抗體。如本文所使用之“人”抗體包括具有人免疫球蛋白之胺基酸序列的抗體，並包括從人免疫球蛋白庫或合成之人免疫球蛋白編碼序列庫分離出的抗體、或從表現來自人基因之抗體的小鼠分離出的抗體。

本發明之雙特異性異質二聚體雙功能抗體可以各種方式表徵。尤其是，可分析本發明之分子免疫特異性地結合至抗原的能力。然後，可分析已被鑑定為可免疫特異性地結合至抗原之分子對該抗原之特異性和親和力。

本發明之雙特異性異質二聚體雙功能抗體可使用本技藝中所周知之各種方法製造，包含蛋白質從頭合成及編碼該結合蛋白之核酸的重組表現。該需要之核酸序列可藉由重組方法製造(例如對該所需多核苷酸之較早製備的變體進行 PCR 誘變)或藉由固相合成 DNA 製造。通常係使用重組表現方法。於一態樣中，本發明提供包含編碼抗 CD3 VH 及/或 VL 之序列的多核苷酸；於另一態樣中，本發明提供包含編碼抗 P-鈣黏蛋白 VH 及/或 VL 之序列的多核苷酸。由於遺傳密碼之簡併性，多種不同之核酸序列編碼各免疫球蛋白胺基酸序列且本發明包括所有編碼本文所描述之結合蛋白的核酸。

連接子/肽

該雙特異性異質二聚體雙功能抗體之多肽鏈可包含多種不同之連接子和肽。該連接子和肽可為 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或更多個胺基酸。於某些態樣中，該雙特異性異質二聚體雙功能抗體之多肽鏈可包含甘胺酸-絲胺酸連接子(連接子 1)。於另一態樣中，該連接子 1 可包含，但不限於 GGGSGGGG(SEQ ID NO: 68)和 GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 69 之序列)。

於某些態樣中，該雙特異性異質二聚體雙功能抗體之多肽鏈可包含半胱胺酸連接子(連接子 2)。於另一態樣中，該連接子 2 可進一步包含至少一個甘胺酸殘基。於一態樣中，該連接子 2 可包含，但不限於選自 GFNRGEC(SEQ ID NO: 70)、GVEPKSC(SEQ ID NO: 71)和 GGCGGG(SEQ ID NO: 72)之序列。於某些態樣中，該連接子 2 可包含具有序列 CPPCP(SEQ ID NO: 60)及至少一個甘胺酸殘基之截短的 IgG1 鉸鏈區。於另一態樣中，該連接子 2 可包含，但不限於 GCPPCP (SEQ ID NO: 73)、GGTGGCPPCP(SEQ ID NO: 74)、GEPKSSDKTHTCPPCP(SEQ ID NO: 75)和 GGTGGGEPKSSDKTHTCPPCP(SEQ ID NO: 76) 之序列。

於某些態樣中，該雙特異性異質二聚體雙功能抗體之多肽鏈可包含連接子 3。於一態樣中，該連接子 3 可包含，但不限於 KAPSSSPME(SEQ ID NO: 77)之序列。

於某些態樣中，該雙特異性異質二聚體雙功能抗體之多肽鏈可包含肽 1。於某些態樣中，該肽 1 可包含具有序列 CPPCP(SEQ ID NO: 60)之截短的 IgG1 鉸鏈區。於一態樣中，該肽 1 可包含，但不限於 DKTHTCPPCP(SEQ ID NO: 96)之序列。

VF-DART

於本發明之一態樣中，如第 2 和 3 圖中所示之稱為 VF-DART 的雙特異性異質二聚體雙功能抗體包含第一多

肽鏈(1)和第二條多肽鏈(2)。

於一態樣中，該第一多肽鏈(1)可包含：結構域 1，其包含(i)子結構域 1A，其包含抗 P-鈣黏蛋白抗體(P-CAD VL)或抗 CD3 抗體(CD3 VL)之 VL 結合區，(ii)子結構域 1B，若該子結構域 1A 包含 CD3 VL，則該子結構域 1B 包含抗 P-CAD 抗體之 VH 結合區(P-CAD VH)，或者若該子結構域 1A 包含 P-CAD VL，則該子結構域 1B 包含抗 CD3 抗體之 VH 結合區(CD3 VH)，且該子結構域 1A 和子結構域 1B 可藉由甘胺酸-絲胺酸連接子(連接子 1)共價連接，從而使該子結構域 1B 和子結構域 1A 不相聯結以形成表位結合位點；且可包含在子結構域 1B 上含有半胱胺酸連接子(連接子 2)之第一異質二聚體提升結構域。

於另一態樣中，該第一多肽鏈(1)可包含：結構域 1，其包含(i)子結構域 1A，其包含 P-CAD VH 或 CD3 VH，(ii)子結構域 1B，若該子結構域 1A 包含 CD3 VH，則該子結構域 1B 包含 P-CAD VL，或者若該子結構域 1A 包含 P-CAD VH，則該子結構域 1B 包含 CD3 VL，該子結構域 1A 和子結構域 1B 可藉由甘胺酸-絲胺酸連接子(連接子 1)共價連接從而使該子結構域 1B 和子結構域 1A 不相聯結以形成表位結合位點；且可包含在子結構域 1B 上含有半胱胺酸連接子(連接子 2)之第一異質二聚體提升結構域。

於一態樣中，該第一多肽鏈(1)可包含：結構域 1，其包含(i)子結構域 1A，其包含 P-CAD VL 和(ii)子結構域 1B，其包含 CD3 VH。於另一態樣中，該第一多肽鏈(1)可

包含：結構域 1，其包含(i)子結構域 1A，其包含 CD3 VL 和(ii)子結構域 1B，其包含 P-CAD VH。於進一步之態樣中，該第一多肽鏈(1)可包含：結構域 1，其包含(i)子結構域 1A，其包含 P-CAD VH 和(ii)子結構域 1B，其包含 CD3 VL。於另一態樣中，該第一多肽鏈(1)可包含：結構域 1，其包含(i)子結構域 1A，其包含 CD3 VH 和(ii)子結構域 1B，其包含 P-CAD VL。

於一態樣中，該第二多肽鏈(2)可包含：結構域 2，其包含(i)子結構域 2B，根據所選擇之用於子結構域 1A 的 VL 結構域，其包含抗 P-鈣黏蛋白抗體之 VL 結合區(P-CAD VL)或抗 CD3 抗體之 VL 結合區(CD3 VL)，(ii)子結構域 2A，若該子結構域 2B 包含 CD3 VL，則其包含抗 P-鈣黏蛋白抗體之 VH 結合區(P-CAD VH)，或者若該子結構域 2B 包含 P-CAD VL，則其包含抗 CD3 抗體之 VH 結合區(CD3 VH)，且該子結構域 2B 和子結構域 2A 可藉由甘胺酸-絲胺酸連接子(連接子 1)共價連接，從而使該子結構域 2B 和子結構域 2A 不相聯結以形成表位結合位點；且可包含在子結構域 2A 上含有半胱胺酸連接子(連接子 2)之第二異質二聚體提升結構域。

於另一態樣中，該第二多肽鏈(2)可包含：結構域 2，其包含(i)子結構域 2B，其包含 P-CAD VH 或 CD3 VH，(ii)子結構域 2A，若該子結構域 2B 包含 CD3 VH，則其包含 P-CAD VL，或者若該子結構域 2B 包含 P-CAD VH，則其包含 CD3 VL，且該子結構域 2B 和子結構域 2A 可藉由

甘胺酸-絲胺酸連接子(連接子 1)共價連接，從而使該子結構域 2B 和子結構域 2A 不相聯結以形成表位結合位點；且可包含在子結構域 2A 上含有半胱胺酸連接子(連接子 2)之第二異質二聚體提升結構域。

於一態樣中，該第二多肽鏈(2)可包含：結構域 2，其包含(i)子結構域 2B，其包含 P-CAD VL 和(ii)子結構域 2A，其包含 CD3 VH。於另一態樣中，該第二多肽鏈(2)可包含：結構域 2，其包含(i)子結構域 2B，其包含 CD3 VL 和(ii)子結構域 2A，其包含 P-CAD VH。於進一步之態樣中，該第二多肽鏈(2)可包含：結構域 2，其包含(i)子結構域 2B，其包含 P-CAD VH 和(ii)子結構域 2A，其包含 CD3 VL。於另一態樣中，該第二多肽鏈(2)可包含：結構域 2，其包含(i)子結構域 2B，其包含 CD3 VH 和(ii)子結構域 2A，其包含 P-CAD VL。

於 VF-DART 之另一態樣中，該子結構域 1A 和子結構域 2A 可聯結以形成第一結合位點，其具有結合至在 CD3 或 P-鈣黏蛋白上之表位的 VL/VH 結合結構域，而子結構域 1B 和子結構域 2B 可聯結以形成第二結合位點，其具有結合至在 P-鈣黏蛋白或 CD3 上之表位的 VL/VH 結合結構域。

該第一多肽鏈(1)和第二多肽鏈(2)可彼此共價結合，例如在位於該第一和第二異質二聚體提升結構域內之半胱胺酸殘基處。於一態樣中，該第一異質二聚體提升結構域之連接子 2 中的半胱胺酸殘基和該第二異質二聚體提升結

構域之連接子 2 中的半胱胺酸殘基可藉由至少一個二硫鍵連接。

於本發明之一態樣中，該 CD3 VL 可包含 SEQ ID NO：48 之序列且該 CD3 VH 可為選自由下列所組成之群組的序列：SEQ ID NO：47 和 89。於另一態樣中，該 P-CAD VL 可為選自由下列所組成之群組的序列：SEQ ID NO：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21 和 23 且該 P-CAD VH 可為選自由下列所組成之群組的序列：SEQ ID NO：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22 和 24。於一態樣中，該甘胺酸-絲胺酸連接子(連接子 1)可包含選自由下列所組成之群組的序列：GGGSGGGG(SEQ ID NO：68)和 GGGGSGGGG(SEQ ID NO：69)。於本發明之一態樣中，該第一異質二聚體提升結構域之半胱胺酸連接子(連接子 2)可包含 GFNRGEC 之序列(SEQ ID NO：70)，而該第二異質二聚體提升結構域之半胱胺酸連接子(連接子 2)可包含 GVEPKSC 的序列(SEQ ID NO：71)。於本發明之另一態樣中，該第一異質二聚體提升結構域之半胱胺酸連接子(連接子 2)可包含 GVEPKSC 之序列(SEQ ID NO：71)，而該第二異質二聚體提升結構域之半胱胺酸連接子(連接子 2)可包含 GFNRGEC 之序列(SEQ ID NO：70)。

本文所描述之具有各種不同 P-鈣黏蛋白和 CD3 抗體之 VF-DART 蛋白的第一和第二多肽鏈之序列提供於第 30A 和 30B 圖中。

含有 E/K 卷區之 EK-DART

具有雙特異性異質二聚體雙功能抗體之二種不同的多肽鏈之異質二聚體的形成亦可藉由使用對該相對成員具有親和力且對其本身具排斥作用的結構域來獲得提升。該等結構域之實例為捲曲之卷結構域。例如，第一多肽鏈(1)可包括第一異質二聚體提升結構域(其具有形成帶負電荷之 α -螺旋卷(E-卷)的麩胺酸富集區)，而第二多肽鏈(2)可包括第二異質二聚體提升結構域(其具有形成帶正電荷之螺旋卷(K-卷)的賴胺酸富集區)，其允許靜電交互作用以促進異質二聚體形成。同質二聚體之形成可能減少，因為 E-卷對另一含有 E-卷之多肽將具有排斥力，在 K-卷方面反之亦然。

於本發明之一態樣中，如第 4 圖中所示之稱為 EK-DART 的雙特異性異質二聚體雙功能抗體包含第一多肽鏈(1)和第二多肽鏈(2)。

於一態樣中，該第一多肽鏈(1)可包含：結構域 1，其包含(i)子結構域 1A，其包含抗 P-鈣黏蛋白抗體之 VL 結合區(P-CAD VL)或抗 CD3 抗體之 VL 結合區(CD3 VL)，(ii)子結構域 1B，若該子結構域 1A 包含 CD3 VL，則其包含抗 P-鈣黏蛋白抗體之 VH 結合區(P-CAD VH)，或者若該子結構域 1A 包含 P-CAD VL，則其包含抗 CD3 抗體之 VH 結合區(CD3 VH)，且該子結構域 1A 和子結構域 1B 可藉由甘胺酸-絲胺酸連接子(連接子 1)共價連接，從而使子

結構域 1A 和子結構域 1B 不相聯結以形成表位結合位點；並可包含第一異質二聚體提升結構域，此第一異質二聚體提升結構域包含：(i)在子結構域 1B 上之半胱胺酸連接子(連接子 2)，和(ii)共價連接至該連接子 2 之 E-卷區。

於另一態樣中，該第一多肽鏈(1)可包含：結構域 1，其包含(i)子結構域 1A，其包含 P-CAD VH 或 CD3 VH，(ii)子結構域 1B，若該子結構域 1A 包含 CD3 VH，則其包含 P-CAD VL，或者若該子結構域 1A 包含 P-CAD VH，則其包含 CD3 VL，且該子結構域 1A 和子結構域 1B 可藉由甘胺酸-絲胺酸連接子(連接子 1)共價連接，從而使子結構域 1A 和子結構域 1B 不相聯結以形成表位結合位點；並可包含第一異質二聚體提升結構域，此第一異質二聚體提升結構域包含：(i)在子結構域 1B 上之半胱胺酸連接子(連接子 2)，和(ii)共價連接至該連接子 2 之 E-卷區。

於一態樣中，該第一多肽鏈(1)可包含：結構域 1，其包含(i)子結構域 1A，其包含 P-CAD VL 和(ii)子結構域 1B，其包含 CD3 VH。於另一態樣中，該第一多肽鏈(1)可包含：子結構域 1，其包含(i)子結構域 1A，其包含 CD3 VL 和 (ii)子結構域 1B，其包含 P-CAD VH。於進一步之態樣中，該第一多肽鏈(1)可包含：結構域 1，其包含(i)子結構域 1A，其包含 P-CAD VH 和(ii)子結構域 1B，其包含 CD3 VL。於另一態樣中，該第一多肽鏈(1)可包含：結構域 1，其包含(i)子結構域 1A，其包含 CD3 VH 和(ii)子結構域 1B，其包含 P-CAD VL。

於一態樣中，該第二多肽鏈(2)可包含：結構域 2，其包含(i)子結構域 2B，根據所選擇之用於子結構域 1A 的 VL 結構域，其包含抗 P-鈣黏蛋白抗體之 VL 結合區(P-CAD VL)或抗 CD3 抗體之 VL 結合區(CD3 VL)，(ii)子結構域 2A，若該子結構域 2B 包含 CD3 VL，則其包含抗 P-鈣黏蛋白抗體之 VH 結合區(P-CAD VH)，或者若該子結構域 2B 包含 P-CAD VL，則其包含抗 CD3 抗體之 VH 結合區(CD3 VH)，且該子結構域 2B 和子結構域 2A 可藉由甘胺酸-絲胺酸連接子(連接子 1)共價連接，從而使子結構域 2B 和子結構域 2A 不相聯結以形成表位結合位點；並可包含第二異質二聚體提升結構域，此第二異質二聚體提升結構域包含：(i)在子結構域 2A 上之半胱胺酸連接子(連接子 2)，和(ii)共價連接至該連接子 2 之 K-卷區。

於另一態樣中，該第二多肽鏈(2)可包含：結構域 2，其包含(i)子結構域 2B，其包含 P-CAD VH 或 CD3 VH，(ii)子結構域 2A，若該子結構域 2B 包含 CD3 VH，則其包含 P-CAD VL，或者若該子結構域 2B 包含 P-CAD VH，則其包含 CD3 VL，且該子結構域 2B 和子結構域 2A 可藉由甘胺酸-絲胺酸連接子(連接子 1)共價連接，從而使子結構域 2B 和子結構域 2A 不相聯結以形成表位結合位點；並可包含第二異質二聚體提升結構域，此第二異質二聚體提升結構域包含：(i)在子結構域 2A 上之半胱胺酸連接子(連接子 2)，和(ii)共價連接至該連接子 2 之 K-卷區。

於一態樣中，該第二多肽鏈(2)可包含：結構域 2，其

包含(i)子結構域 2B，其包含 P-CAD VL 及(ii)子結構域 2A，其包含 CD3 VH。於另一態樣中，該第二多肽鏈(2)可包含：結構域 2，其包含(i)子結構域 2B，其包含 CD3 VL 及(ii)子結構域 2A，其包含 P-CAD VH。於進一步之態樣中，該第二多肽鏈(2)可包含：結構域 2，其包含(i)子結構域 2B，其包含 P-CAD VH 及(ii)子結構域 2A，其包含 CD3 VL。於另一態樣中，該第二多肽鏈(2)可包含：結構域 2，其包含(i)子結構域 2B，其包含 CD3 VH 及(ii)子結構域 2A，其包含 P-CAD VL。

於 EK-DART 之另一態樣中，該子結構域 1A 和子結構域 2A 可相聯結以形成具有結合至在 CD3 或 P-鈣黏蛋白上之表位的 VL/VH 結合結構域區之第一結合位點，且該子結構域 1B 和子結構域 2B 可相聯結以形成具有結合至在 P-鈣黏蛋白或 CD3 上之表位的 VL/VH 結合結構域區之第二結合位點。

該第一多肽鏈(1)和該第二多肽鏈(2)可在，例如位於該第一和第二異質二聚體提升結構域內之半胱胺酸殘基處彼此共價結合。於一態樣中，該在第一異質二聚體提升結構域之連接子 2 中之半胱胺酸殘基及該在第二異質二聚體提升結構域之連接子 2 中之半胱胺酸殘基可藉由至少一個二硫鍵連接。

於本發明之一態樣中，該 CD3 VL 可包含 SEQ ID NO：48 之序列且該 CD3 VH 可為選自由下列所組成之群組的序列：SEQ ID NO：47 及 89。於另一態樣中，該 P-

CAD VL 可為選自由下列所組成之群組的序列：SEQ ID NO：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21 和 23 且該 P-CAD VH 可為選自由下列所組成之群組的序列：SEQ ID NO：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22 和 24。於一態樣中，該甘胺酸-絲胺酸連接子(連接子 1)可包含選自由下列所組成之群組的序列：GGGSGGGG(SEQ ID NO：68)和 GGGGSGGGG(SEQ ID NO：69)。本發明的於一態樣中，該第一異質二聚體提升結構域和第二異質二聚體提升結構域之半胱胺酸連接子(連接子 2)可包含 GGCGGG 之序列(SEQ ID NO：72)。於一態樣中，第一異質二聚體提升結構域進一步包含麩胺酸富集區(E-卷)，此麩胺酸富集區(E-卷)包含 EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK 之序列(SEQ ID NO：61)。於另一態樣中，該第二異質二聚體提升結構域進一步包含賴胺酸富集區(K-卷)，此賴胺酸富集區(K-卷)包含 KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE 之序列(SEQ ID NO：62)。

表 1 和第 31A 和 31B 圖提供具有本文所描述之各種不同 P-鈣黏蛋白和 CD3 抗體的 EK-DART 蛋白之第一和第二多肽鏈之序列。

表 1. EK-DART 蛋白之第一和第二多肽鏈的序列。

EK-DART	序列
35	P-CAD 35VL X CD3-1VH-K-COIL SEQ ID NO: 80 QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPD RFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAVVFGGGTKLTVLGGGSGGGGEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATY YADSVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LTVTSSGGCGGGKVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE
	CD3-1-2VL X P-CAD 35VH-E-COIL SEQ ID NO: 81 QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAPW TPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGSGGGG EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTN YAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCATIDTASAFDIWGQGTMTVTSSG GCGGGEVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK
153	P-CAD 153VL X CD3-2VH-K-COIL SEQ ID NO: 82 QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPD RFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSGVVFGGGTKLTVLGGGSGGGGEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATY YADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LTVTSSGGCGGGKVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE
	CD3-1-2VL X P-CAD 153VH-E-COIL SEQ ID NO: 83 QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAPW TPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGSGGGG EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTN YAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCATIDTANAFDIWGQGTMTVTSSG GCGGGEVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK
154	P-CAD 154VL X CD3-2VH-K-COIL SEQ ID NO: 84 QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPD RFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSYVFGTGKTVTLGGGSGGGGEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATY YADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LTVTSSGGCGGGKVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE
	CD3-1-2VL X P-CAD 154VH-E-COIL SEQ ID NO: 85 QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAPW TPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGSGGGG EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTN YAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCATIDTATAFDIWGQGTMTVTSSG GCGGGEVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK
177	P-CAD 177VL X CD3-1VH-K-COIL SEQ ID NO: 86 QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPD RFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAYVFGTGKTVTLGGGSGGGGEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATY YADSVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LTVTSSGGCGGGKVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE
	CD3-1-2VL X P-CAD 177VH-E-COIL SEQ ID NO: 87 QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAPW TPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGSGGGG EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTN YAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCATIDTANAFDIWGQGTMTVTSSG GCGGGEVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK

包含 Fc 區或其部分之雙特異性異質二聚體雙功能抗體

本發明包含含有 Fc 區或結構域，或其部分之雙特異性異質二聚體雙功能抗體。於某些態樣中，該 Fc 區或其部分包含 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 之 Fc 區的一或多個

恆定結構域(例如 CH2 或 CH3 結構域)。於其他態樣中，本發明包含含有 Fc 區或其部分之分子，其中該 Fc 區或其部分相對於與彼等相當之野生型 Fc 區或其部分而言包含至少一個胺基酸修飾(例如取代)。變體 Fc 區為本技藝所周知且如本技藝中所周知之任何結合活性或效應子功能分析(例如 ELISA、SPR 分析或 ADCC) 所分析者，其主要用於改變包含該變體 Fc 區之抗體的表型。該等變體 Fc 區或其部分可延長藉由本發明之包含 Fc 區或其部分的雙功能抗體分子所展現出的血漿半衰期和穩定性。於其他態樣中，本發明包含本技藝中已知之任何 Fc 變體的用途。

於某些態樣中，對該 Fc 區之胺基酸進行的一或多種修飾可降低 Fc 區之親和力和活動性(avidity)，因此，可降低本發明之雙功能抗體分子對一或多個 FcγR 受體之親和力和活動性。於一特定之態樣中，本發明包含含有變體 Fc 區或其部分之雙功能抗體，其中該變體 Fc 區相對於野生型 Fc 區而言包含至少一個胺基酸修飾，該變體 Fc 區僅結合一個 FcγR，其中該 FcγR 為 FcγRⅢA。於另一特定之態樣中，本發明包含含有變體 Fc 區或其部分之雙功能抗體，其中該變體 Fc 區相對於野生型 Fc 區而言包含至少一個胺基酸修飾，該變體 Fc 區僅結合一個 FcγR，其中該 FcγR 為 FcγRⅡA。於另一特定之態樣中，本發明包含含有變體 Fc 區或其部分之雙功能抗體，其中該變體 Fc 區相對於野生型 Fc 區而言包含至少一個胺基酸修飾，該變體 Fc 區僅結合一個 FcγR，其中該 FcγR 為 FcγRⅡB。於某些

態樣中，本發明包含含有變體 Fc 區之分子，其中相對於不包含 Fc 區或包含野生型 Fc 區之分子而言，由使用熟習本技藝之人士所已知及本文中所描述之方法測得該變體賦予或介導降低之 ADCC 活性(或其他效應子功能)及/或增加對 FcγR II B (CD32B)之結合能力。

本發明亦包含含有來自二或多個 IgG 同種異型之結構域或區的 Fc 區之用途。如本技藝中所知，該 Fc 區之胺基酸修飾可深刻地影響經 Fc 介導之效應子功能及/或結合活性。然而，當在選定之 IgG 同種異型的背景下實施時，這些功能特性中之變化可被進一步細修及/或操作。類似地，該同種異型 Fc 之本質特徵可藉由一或多個胺基酸修飾而操作。由於該多種 IgG 同種異型(即，IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4)之鉸鏈及/或 Fc 區的胺基酸序列中之差異，該多種 IgG 同種異型顯示出不同的物理和功能特性，包含血清半衰期、補體結合(complement fixation)、FcγR 結合親和力和效應子功能活性(例如 ADCC、CDC)。於某些態樣中，該胺基酸修飾和 IgG Fc 區係根據其各自、分別的結合及/或效應子功能活性獨立地選擇以將雙功能抗體進行遺傳工程處理成具有所需特性。於大部分態樣中，該胺基酸修飾和 IgG 鉸鏈/Fc 區已在 IgG1 之背景下依本文中之描述或本技藝所知者分別分析結合及/或效應子功能活性。於某些態樣中，在雙功能抗體分子或其他含 Fc 之分子(例如免疫球蛋白和)的背景下，該胺基酸修飾和 IgG 鉸鏈/Fc 區顯示出類似之功能性，例如降低之 ADCC 活性(或

其他效應子功能)及/或對 $\text{Fc}\gamma\text{R II B}$ 之結合力增加。於其他態樣中，本發明包含含有本技藝已知之胺基酸修飾組合及展現新穎性質之選定的 IgG 區之變體 Fc 區，當該修飾及/或區依本文之描述獨立分析時檢測不到這些性質。

LP-DART

於本發明之一態樣中，稱為 LP-DART，具有 Fc 區之雙特異性異質二聚體雙功能抗體顯示於第 1 和 5 圖中。LP-DART 可包含二個結合靶的抗原和 CD3(其融合至 IgG 之 Fc 結構域)之 scFv 結構域。於本發明之一態樣中，該雙特異性異質二聚體雙功能抗體可包含二個結合 P-鈣黏蛋白和 CD3 ϵ (其融合至 IgG1 之 Fc 結構域)之 scFv 結構域。尤其是，第 1A 和 1B 圖顯示出四種替換之抗 P-鈣黏蛋白/抗人 CD3 LP-DART 的代表，而第 5 圖顯示經組裝之 LP-DART 的一般示意圖。該 LP-DART 類似於上述 VF-DART 或 EK-DART 之結構，除了該第一和第二異質二聚體提升結構域包含具有免疫球蛋白 Fc 區之 CH 2 及/或 CH3 結構域的免疫球蛋白 Fc 區外，其中該 CH 2 及/或 CH3 結構域已經過改變以包含球形突起(突起)或孔(腔)。對該 LP-DART 之 Fc 部分所進行之修飾描述於下文中。

於本發明之一態樣中，如第 1A、1B 和 5 圖中所示之 LP-DART 雙特異性異質二聚體雙功能抗體包含第一多肽鏈(1)和第二多肽鏈(2)。

於一態樣中，該第一多肽鏈(1)可包含：結構域 1，其

包含(i)子結構域 1A，其包含抗 P-鈣黏蛋白抗體之 VL 結合區(P-CAD VL)或抗 CD3 抗體之 VL 結合區(CD3 VL)，(ii)子結構域 1B，若該子結構域 1A 包含 CD3 VL，則其包含抗 P-鈣黏蛋白抗體之 VH 結合區(P-CAD VH)，或者若該子結構域 1A 包含 P-CAD VL，則其包含抗 CD3 抗體之 VH 結合區(CD3 VH)，且該子結構域 1A 和子結構域 1B 可藉由甘胺酸-絲胺酸連接子(連接子 1)共價連接，從而使該子結構域 1A 和子結構域 1B 不相聯結以形成表位結合位點；並可包含第一異質二聚體提升結構域，該第一異質二聚體提升結構域包含：(i)在子結構域 1B 上之半胱胺酸連接子(連接子 2)及(ii)Fc 區，其具有經改變之 CH2 及/或 CH3 結構域以包含共價連接至該連接子 2 之球形突起 Fc 鏈(突起)或孔 Fc 鏈(腔)。

於另一態樣中，該第一多肽鏈(1)可包含：結構域 1，其包含(i)子結構域 1A，其包含 P-CAD VH 或 CD3 VH，(ii)子結構域 1B，若該子結構域 1A 包含 CD3 VH，則其包含 P-CAD VL，或者若該子結構域 1A 包含 P-CAD VH，則其包含抗 CD3 VL，且該子結構域 1A 和子結構域 1B 可藉由甘胺酸-絲胺酸連接子(連接子 1)共價連接，從而使該子結構域 1A 和子結構域 1B 不相聯結以形成表位結合位點；並可包含第一異質二聚體提升結構域，該第一異質二聚體提升結構域包含：(i)在子結構域 1B 上之半胱胺酸連接子(連接子 2)及(ii)Fc 區，其具有經改變之 CH2 及/或 CH3 結構域以包含共價連接至該連接子 2 之球形突起 Fc

鏈(突起)或孔 Fc 鏈(腔)。

於一態樣中，該第一多肽鏈(1)可包含：結構域 1，其包含(i)子結構域 1A，其包含 P-CAD VL 及(ii)子結構域 1B，其包含 CD3 VH。於另一態樣中，該第一多肽鏈(1)可包含：結構域 1，其包含(i)子結構域 1A，其包含 CD3 VL 及(ii)子結構域 1B，其包含 P-CAD VH。於進一步之態樣中，該第一多肽鏈(1)可包含：結構域 1，其包含(i)子結構域 1A，其包含 P-CAD VH 及(ii)子結構域 1B，其包含 CD3 VL。於另一態樣中，該第一多肽鏈(1)可包含：結構域 1，其包含(i)子結構域 1A，其包含 CD3 VH 及(ii)子結構域 1B，其包含 P-CAD VL。

於一態樣中，該第二多肽鏈(2)可包含：結構域 2，其包含(i)子結構域 2B，根據所選擇之用於子結構域 1A 的 VL 結構域，其包含抗 P-鈣黏蛋白抗體(P-CAD VL)之 VL 結合區或抗 CD3 抗體之 VL 結合區(CD3 VL)，(ii)子結構域 2A，若該子結構域 2B 包含 CD3 VL，則其包含抗 P-鈣黏蛋白抗體之 VH 結合區(P-CAD VH)，或者若該子結構域 2B 包含 P-CAD VL，則其包含抗 CD3 抗體之 VH 結合區(CD3 VH)，且該子結構域 2B 和子結構域 2A 可藉由甘胺酸-絲胺酸連接子(連接子 1)共價連接，從而使該子結構域 2B 和子結構域 2A 不相聯結以形成表位結合位點；並可包含第二異質二聚體提升結構域，該第二異質二聚體提升結構域包含：(i)在子結構域 2A 上之半胱胺酸連接子(連接子 2)及(ii)Fc 區，其具有經改變之 CH2 及/或 CH3 結構域以

包含共價連接至該連接子 2 之球形突起 Fc 鏈(突起)(若該第一異質二聚體區包含孔 Fc 鏈(腔))或孔 Fc 鏈(腔)(若該第一異質二聚體區包含球形突起 Fc 鏈(突起))。

於另一態樣中，該第二多肽鏈(2)可包含：結構域 2，其包含(i)子結構域 2B，其包含 P-CAD VH 或 CD3 VH，(ii)子結構域 2A，若該子結構域 2B 包含 CD3 VH，則其包含 P-CAD VL，或者若該子結構域 2B 包含 P-CAD VH，則其包含 CD3 VL，且該子結構域 2B 和子結構域 2A 可藉由甘胺酸-絲胺酸連接子(連接子 1)共價連接，從而使該子結構域 2B 和子結構域 2A 不相聯結以形成表位結合位點；並可包含第二異質二聚體提升結構域，該第二異質二聚體提升結構域包含：(i)在子結構域 2A 上之半胱胺酸連接子(連接子 2)及(ii)Fc 區，其具有經改變之 CH2 及/或 CH3 結構域以包含共價連接至該連接子 2 之球形突起 Fc 鏈(突起)(若該第一異質二聚體區包含孔 Fc 鏈(腔))或孔 Fc 鏈(腔)(若該第一異質二聚體區包含球形突起 Fc 鏈(突起))。

於一態樣中，該第二多肽鏈(2)可包含：結構域 2，其包含(i)子結構域 2B，其包含 P-CAD VL 及(ii)子結構域 2A，其包含 CD3 VH。於另一態樣中，該第二多肽鏈(2)可包含：結構域 2，其包含(i)子結構域 2B，其包含 CD3 VL 及(ii)子結構域 2A，其包含 P-CAD VH。於進一步之態樣中，該第二多肽鏈(2)可包含：結構域 2，其包含(i)子結構域 2B，其包含 P-CAD VH 及(ii)子結構域 2A，其包含 CD3 VL。於另一態樣中，該第二多肽鏈(2)可包含：結構

域 2，其包含(i)子結構域 2B，其包含 CD3 VH 及(ii)子結構域 2A，其包含 P-CAD VL。

於 LP-DART 之另一態樣中，該子結構域 1A 和子結構域 2A 可相聯結以形成第一結合位點，其具有結合至在 CD3 或 P-鈣黏蛋白上之表位的 VL/VH 結合結構域區，且該子結構域 1B 和子結構域 2B 可相聯結以形成第二結合位點，其具有結合至在 P-鈣黏蛋白或 CD3 上之表位的 VL/VH 結合結構域區。

該第一多肽鏈(1)和第二多肽鏈(2)可彼此共價鍵結，例如在位於該第一和第二異質二聚體提升結構域之內的半胱胺酸殘基處。於一態樣中，該第一異質二聚體提升結構域之連接子 2 中的半胱胺酸殘基和該第二異質二聚體提升結構域之連接子 2 中的半胱胺酸殘基可藉由至少一個二硫鍵連接。

於本發明之一態樣中，該 CD3 VL 可包含 SEQ ID NO：48 之序列且該 CD3 VH 可為選自由下列所組成之群組的序列：SEQ ID NO：47 和 89。於另一態樣中，該 P-CAD VL 可為選自由下列所組成之群組的序列：SEQ ID NO：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21 和 23 且 P-CAD VH 可為選自由下列所組成之群組的序列：SEQ ID NO：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22 和 24。於一態樣中，該甘胺酸-絲胺酸連接子(連接子 1)可包含選自由下列所組成之群組的序列：GGGSGGGG(SEQ ID NO：68)和 GGGGSGGGG(SEQ ID NO：69)。

於本發明之另一態樣中，該半胱胺酸連接子(連接子 2)可包含具有序列 CPPCP(SEQ ID NO：60)之截短的 IgG1 鉸鏈區及至少一個在該鉸鏈區前之甘胺酸殘基。於一態樣中，該連接子 2 可包含選自由下列所組成之群組的序列：GCPPCP(SEQ ID NO：73)、GGTGGCPPCP(SEQ ID NO：74)、GEPKSSDKTHTCPPCP(SEQ ID NO：75) 和 GGTGGGEPKSSDKTHTCPPCP(SEQ ID NO：76)。

於一態樣中，該第一異質二聚體提升結構域可包含 Fc 區，其具有經改變之 CH2 及/或 CH3 結構域以包含含有 SEQ ID NO：63 之序列的球形突起 Fc 鏈(突起)或含有 SEQ ID NO：64 之序列的孔 Fc 鏈(腔)。於另一態樣中，該第二異質二聚體提升結構域可包含 Fc 區，其具有經改變之 CH2 及/或 CH3 結構域以包含含有 SEQ ID NO：63 之序列的球形突起 Fc 鏈(突起)(若該第一異質二聚體區包含孔 Fc 鏈(腔))或含有 SEQ ID NO：64 之序列的孔 Fc 鏈(腔)(若該第一異質二聚體區包含球形突起 Fc 鏈(突起))。

表 2 和第 32A 和 32B 圖提供 LP-DART 蛋白之第一和第二多肽鏈的胺基酸序列，該 LP-DART 蛋白具有本文所描述之各種不同的 P-鈣黏蛋白和 CD3 抗體。SEQ ID NO：117 至 124 提供之對應的核苷酸序列參看括號中者。

表 2. LP-DART 蛋白之第一和第二多肽鏈的序列。

LP-DART	序列
35	P-CAD 35VL x CD3-1VH-Knob, SEQ ID NO: 88 QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPD RFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSLSAVVFGGGTKLTVLGGGSGGGGEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATY YADSVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LTVVSSGCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 117)
	CD3-1-2VL x P-CAD 35VH-Hole, SEQ ID NO: 89 QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPW TPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSLWVFGGGTKLTVLGGGSGGGGG EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTN YAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCATIDTASAFDIWGQGTMTVTVSSG CPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 118)
153	P-CAD 153VL x CD3-1VH-Knob (153 LP-DART B), SEQ ID NO: 90 QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPD RFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSLSGVVFGGGTKLTVLGGGSGGGGEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATY YADSVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LTVVSSGCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 119)
	CD3-1-2VL x P-CAD 153VH-Hole (153 LP-DART A), SEQ ID NO: 91 QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPW TPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSLWVFGGGTKLTVLGGGSGGGGG EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTN YAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCATIDTANAFGIWGQGTMTVTVSSG CPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 120)

154	P-CAD 154VL x CD3-1VH-Knob, SEQ ID NO: 92 QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPD RFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSLSAYVFGTGKVTVLGGGSGGGGEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATY YADSVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTL VTVSSGCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 121)
	CD3-1-2VL x P-CAD 154VH-Hole, SEQ ID NO: 93 QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPW TPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGSGGGG EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTN YAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCATIDTATAFDIWGGGTMTVSSG CPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPCREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 122)
177	P-CAD 177VL x CD3-1VH-Knob, SEQ ID NO: 94 QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPD RFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSLSAYVFGTGKVTVLGGGSGGGGEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATY YADSVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTL VTVSSGCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 123)
	CD3-1-2VL x P-CAD 177VH-Hole, SEQ ID NO: 95 QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPW TPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGSGGGG EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTN YAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCATIDTANAFDIWGQGTMTVSSG CPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPCREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 124)

人 IgG1 CH2-CH3 中之效應子無效突變和移除 C 端 Lys

修飾人 IgG1 之 Fc 區以移除該經常在轉譯後裂解之 C-端賴胺酸殘基，並使用標準之引物定向的 PCR 誘變法引入突變 L234A、L235A 和 G237A 至因結合至 FcγRⅢ的扁圓的效應子功能(效應子無效表型)。

人 IgG1 CH2-CH3 中之孔中球形突起(knobs-in-holes)突變

“孔中球形突起”為本技藝中已知之用於將抗體重鏈同型二聚體進行遺傳工程處理以使之異質二聚體化的有效設計策略。在此方法中，“球形突起”變體係藉由以較大之胺

基酸替換 IgG1 之 Fc 區的一個鏈中之小胺基酸（例如 Y349C 和 T366W）來取得。該“球形突起”係設計成插入 Fc 區之互補鏈的 CH3 結構域內之“孔”中，該孔係經由以較小之殘基替換較大之殘基（例如 S354C、T366S、L368A 和 Y407V）來創建。

該孔中球形突起之命名類似於突起和腔之命名且可互換使用。

“突起”或“球形突起”係指至少一個從該第一多肽之界面突出的胺基酸側鏈，因此其可定位在相鄰界面（即，該第二多肽之界面）中之補償性腔中以藉此穩定該異質二聚體，因而較有利於形成異質二聚體，勝過，例如形成同質二聚體。該突起可能存在於該原始界面或可以合成方式引入（例如經由改變編碼該界面之核酸）。通常，編碼該第一多肽之界面的核酸係經過修改成編碼該突起。為了實現此點，以編碼至少一個具有較該“原始”胺基酸殘基更大之側鏈體積的“輸入”胺基酸殘基的核酸替換該編碼至少一個第一多肽之界面中的“原始”胺基酸殘基之核酸。被替換之原始殘基的數目之上限為該第一多肽之界面中的殘基總數。

某些用於形成突起的輸入殘基通常為天然存在之胺基酸殘基且較佳地，選自精胺酸(R)、苯丙胺酸(F)、酪胺酸(Y)和色胺酸(W)。

“腔”或“孔”係指從該第二多肽之界面凹陷，因此可容納在該第一多肽之相鄰界面上的對應突起的至少一個胺基

酸側鏈。該腔可存在於原始界面中或可以合成方式引入(例如藉由改變編碼該界面之核酸)。通常，編碼該第二多肽之界面的核酸被修改以編碼該腔。為了實現此點，以編碼至少一個具有較該“原始”胺基酸殘基更小之側鏈體積的“輸入”胺基酸殘基的 DNA 替換編碼在該第二多肽之界面中的至少一個“原始”胺基酸殘基的核酸。被替換之原始殘基的數目之上限為該第二多肽之界面中的殘基總數。

某些用於形成腔的輸入殘基通常為天然存在之胺基酸殘基且較佳地，選自丙胺酸(A)、絲胺酸(S)、蘇胺酸(T)和纈胺酸(V)。

“原始”胺基酸殘基為被“輸入”殘基替換之胺基酸殘基，該“輸入”殘基可具有較該“原始”殘基更小或更大之側鏈體積。該輸入之胺基酸殘基可為天然存在或非天然存在之胺基酸殘基，但較佳為前者。“天然存在”之胺基酸殘基意指由遺傳密碼編碼的那些殘基。“非天然存在”之胺基酸殘基意指非由遺傳密碼編碼的殘基，但其可與該多肽鏈中之相鄰胺基酸殘基共價結合。非天然存在之胺基酸殘基的實例為正白胺酸、鳥胺酸、正纈胺酸、高絲胺酸及其他胺基酸殘基類似物，諸如，例如描述於 Ellman et al., *Meth. Enzym.* 202: 301-336 (1991)中者。本發明之方法涉及替換至少一個原始胺基酸殘基，但可替換一個以上之原始殘基。通常，該第一或第二多肽之界面中可包含之被替換的原始胺基酸殘基不超過全部殘基數。

該突起或球形突起“可定位”在腔或孔中，此意指該分

別在第一多肽和第二多肽之界面上的突起和腔之空間位置及該突起和腔之尺寸為使得該突起可位於該腔內而不會顯著干擾該第一和第二多肽在界面處之正常聯結。因為突起，諸如 Tyr、Phe 和 Trp 通常不會從界面的軸垂直延伸，突起與對應之腔的比對係依賴根據三維結構塑造之突起/腔對的模型，諸如藉由 X 射線晶體學或核磁共振 (NMR) 所取得者。此可使用本技藝中被廣為接受之技術實現。

因此，為了有利於所產生之 Fc 區的異質二聚體化，引入互補性突變，從而使得各 Fc 鏈可攜帶一組突變，用於球形突起(或突起)Fc 鏈 (SEQ ID NO：63) 的突變為 Y349C 和 T366W，或者用於孔(或腔)Fc 鏈 (SEQ ID NO：64) 的突變為 S354C、T366S、L368A 和 Y407V (如表 3 中所提供者)。當被共轉染入合適之哺乳動物宿主中時，編碼 SEQ ID NO：63 和 64 之胺基酸序列的 DNA 製造 Fc 區，此 Fc 區主要為與一個孔(或腔)Fc 鏈相聯結之雙特異性異質二聚體加工的球形突起(或突起)Fc 鏈。

表 3. Fc 區之序列

SEQ ID NO:	序列
SEQ ID NO: 63 球形突起 Fc 鏈突變	APEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVCTLPSPREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 64 孔 Fc 鏈突變	APEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP PVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

使用重疊引物延伸 PCR，引入 5’BspEI 限制酶識別序

列 TCCGGA(SEQ ID NO: 67)以用於將該球形突起(突起)和孔(腔)Fc 鏈分殖入含有 3'BspEI 位點之各 DART 鏈中。此限制位點編碼在 DART-Fc 交界處框架內插入胺基酸絲胺酸和甘胺酸(ser-gly)。依實施例 6 中之描述建構抗 P-鈣黏蛋白/抗 CD3 LP-DART 蛋白。

在熱穩定性研究中，本發明之抗 P-鈣黏蛋白/抗 CD3 LP-DART 蛋白係穩定防止聚集且為針對人 CD3 和 P-鈣黏蛋白之強力的雙特異性雙功能抗體-Fc 融合物。該孔中球形突起 Fc 結構域允許提升在 CHO 細胞中之表現並改善純化從而獲致高純度之所需異質二聚體。在 Fc 結構域內之經遺傳工程處理之突變廢止 Fc γ R 結合，因而有可能避免 ADCC 介導之 T 細胞耗竭。此外，如差示掃描量熱法(DSC)和強制聚集分析所顯示者，當與臨床核准之單株抗體相比較時，將 Fc 結構域納入 DART 蛋白可增強該分子之穩定性。此外，該 Fc 結構域改善該藥代動力學變化形廓。

MP3 DART

第 6 和 7 圖分別為 N 端 MP3-DART 和 C 端 MP3-DART 雙特異性異質二聚體雙功能抗體的示意圖示。該等 MP3-DART 蛋白係由三個多肽鏈所組成：第一多肽鏈(1)、第二多肽鏈(2)和第三多肽鏈(3)。

於本發明之一態樣中，如第 6 圖中所示之 N-端 MP3-DART 可包含(依 N 端至 C 端之方向)：第一多肽鏈(1)，其

包含：結構域 1，其包含(i)子結構域 1A，其包含抗 P-鈣黏蛋白抗體之 VL 結合區(P-CAD VL)或抗 CD3 抗體之 VL 結合區(CD3 VL)，(ii)子結構域 1B，若該子結構域 1A 包含 CD3 VL，則其包含抗 P-鈣黏蛋白抗體之 VH 結合區(P-CAD VH)，或者若該子結構域 1A 包含 P-CAD VL，則其包含抗 CD3 抗體之 VH 結合區(CD3 VH)，且該子結構域 1A 和子結構域 1B 可藉由甘胺酸-絲胺酸連接子(連接子 1)共價連接，從而使該子結構域 1A 和子結構域 1B 不相聯結以形成表位結合位點；並可包含第一異質二聚體提升結構域，該第一異質二聚體提升結構域包含：(i)在子結構域 1B 上之半胱胺酸連接子(連接子 2)及(ii)在連接子 2 上之半胱胺酸肽 1，及(iii)具有 IgG 結構域之 CH2 及/或 CH3 結構域的 Fc 區，其共價連接至該肽 1。

於本發明之另一態樣中，如第 7 圖中所示之 C-端 MP3-DART 可包含(依 N 端至 C 端之方向)：第一多肽鏈(1)，其包含：第一異質二聚體提升結構域，其包含(i)半胱胺酸肽 1，(ii)具有 IgG Fc 結構域之 CH2 及/或 CH3 結構域的 Fc 區，和(iii)在 Fc 區上之連接子 3；及結構域 1，其包含(i)子結構域 1A，其包含抗 P-鈣黏蛋白抗體之 VL 結合區(P-CAD VL)或抗 CD3 抗體之 VL 結合區(CD3 VL)，(ii)子結構域 1B，若該子結構域 1A 包含 CD3 VL，則其包含抗 P-鈣黏蛋白抗體之 VH 結合區(P-CAD VH)，或者若該子結構域 1A 包含 P-CAD VL，則其包含抗 CD3 抗體之 VH 結合區(CD3 VH)，且該子結構域 1A 和子結構

域 1B 可藉由甘胺酸-絲胺酸連接子(連接子 1)共價連接，從而使該子結構域 1A 和子結構域 1B 不相聯結以形成表位結合位點，和(iv) 在子結構域 1B 上之半胱胺酸連接子(連接子 2)。

於另一態樣中，該 N-端 MP3-DART 或 C-端 MP3-DART 之第一多肽鏈(1)可包含：結構域 1，其包含(i)子結構域 1A，其包含 P-CAD VH 或 CD3 VH，(ii)子結構域 1B，若該子結構域 1A 包含 CD3 VH，則其包含 P-CAD VL，或者若該子結構域 1A 包含 P-CAD VH，則其包含 CD3 VL。

於一態樣中，該 N-端 MP3-DART 或 C-端 MP3-DART 之第一多肽鏈(1)可包含：結構域 1，其包含(i)子結構域 1A，其包含 P-CAD VL 及 (ii)子結構域 1B，其具有 CD3 VH。於另一態樣中，該第一多肽鏈(1)可包含：結構域 1，其包含(i)子結構域 1A，其包含 CD3 VL 和(ii)子結構域 1B，其包含 P-CAD VH。於進一步之態樣中，該第一多肽鏈(1)可包含：結構域 1，其包含(i)子結構域 1A，其包含 P-CAD VH 和(ii)子結構域 1B，其包含 CD3 VL。於另一態樣中，該第一多肽鏈(1)可包含：結構域 1，其包含(i)子結構域 1A，其具有 CD3 VH 和(ii)子結構域 1B，其包含 P-CAD VL。

於另一態樣中，該 N-端 MP3-DART 或 C-端 MP3-DART 之第二多肽鏈(2)可包含：結構域 2，其包含(i)子結構域 2B，根據所選擇之用於該 MP3-DART 之第一多肽鏈

的 VL 結構域，其包含抗 P-鈣黏蛋白抗體之 VL 結合區(P-CAD VL)或抗 CD3 抗體之 VL 結合區(CD3 VL)，(ii)子結構域 2A，若該子結構域 2B 包含 CD3 VL，則其包含抗 P-鈣黏蛋白抗體之 VH 結合區(P-CAD VH)，或者若該子結構域 2B 包含 P-CAD VL，則其包含抗 CD3 抗體之 VH 結合區(CD3 VH)且該子結構域 2B 和子結構域 2A 可藉由甘胺酸-絲胺酸連接子(連接子 1)共價連接，從而使該子結構域 2B 和子結構域 2A 不相聯結以形成表位結合位點；並可包含第二異質二聚體提升結構域，此第二異質二聚體提升結構域包含在子結構域 2A 上之半胱胺酸連接子(連接子 2)。

於另一態樣中，該第二多肽鏈(2)可包含：結構域 2，其包含(i)子結構域 2B，其包含 P-CAD VH 或 CD3 VH，(ii)子結構域 2A，若該子結構域 2B 包含 CD3 VH，則其包含 P-CAD VL，或者若該子結構域 2B 包含 P-CAD VH，則其包含 CD3 VL。

於一態樣中，該第二多肽鏈(2)可包含：結構域 2，其包含(i)子結構域 2B，其包含 P-CAD VL 和(ii)子結構域 2A，其具有 CD3 VH。於另一態樣中，該第二多肽鏈(2)可包含：結構域 2，其包含(i)子結構域 2B，其包含 CD3 VL 和(ii)子結構域 2A，其包含 P-CAD VH。於進一步之態樣中，該第二多肽鏈(2)可包含：結構域 2，其包含(i)子結構域 2B，其包含 P-CAD VH 和(ii)子結構域 2A，其包含 CD3 VL。於另一態樣中，該第二多肽鏈(2)可包含：結構域 2，其包含(i)子結構域 2B，其具有 CD3 VH 和(ii)子結

構域 2A，其包含 P-CAD VL。

於一態樣中，該 N-端 MP3-DART 或 C-端 MP3-DART 之第三多肽鏈(3)可包含(依 N 端至 C 端之方向)：第三異質二聚體提升結構域，其包含(i)半胱胺酸肽 1 和(ii) 具有 IgG Fc 結構域之 CH2 及/或 CH3 結構域的 Fc 區。

於本發明之一態樣中，該子結構域 1A 和子結構域 2A 可相聯結以形成具有 VL/VH 區之第一結合位點，其結合至在 CD3 或 P-鈣黏蛋白上之表位，而該子結構域 1B 和子結構域 2B 可相聯結以形成具有 VL/VH 區之第二結合位點，其結合至在 P-鈣黏蛋白或 CD3 上之表位。

該第一多肽鏈(1)和第二多肽鏈(2)可彼此共價結合，例如在位於該第一和第二異質二聚體提升結構域內之半胱胺酸殘基處。於一態樣中，該在第一異質二聚體提升結構域上之連接子 2 中的半胱胺酸殘基和在第二異質二聚體提升結構域上之連接子 2 中的半胱胺酸殘基可藉由至少一個二硫鍵連接。

該第一多肽鏈(1) 之第一異質二聚體提升結構域及第三多肽鏈(3)之第三異質二聚體提升結構域可彼此相聯結以形成免疫球蛋白 Fc 區。該第一多肽鏈(1)和第三多肽鏈(3)可彼此共價結合，例如在位於該第一和第三異質二聚體提升結構域內之半胱胺酸殘基處。於另一態樣中，該在第一異質二聚體提升結構域上之肽 1 中的半胱胺酸殘基及在第三異質二聚體提升結構域上之肽 1 中的半胱胺酸殘基可藉由至少一個二硫鍵連接。

於本發明之一態樣中，該 CD3 VL 可包含 SEQ ID NO：48 之序列且該 CD3 VH 可為選自由下列所組成之群組的序列：SEQ ID NO：47 和 89。於另一態樣中，該 P-CAD VL 可為選自由下列所組成之群組的序列：SEQ ID NO：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21 和 23 且 P-CAD VH 可為選自由下列所組成之群組的序列：SEQ ID NO：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22 和 24。於一態樣中，該甘胺酸-絲胺酸連接子(連接子 1)可包含選自由下列所組成之群組的序列：GGGSGGGG(SEQ ID NO：68)和 GGGGSGGGG(SEQ ID NO：69)。

於本發明之一態樣中，該半胱胺酸連接子(連接子 2)可包含選自由下列所組成之群組的序列：GFNRGEC(SEQ ID NO：70)和 GVEPKSC(SEQ ID NO：71)。於另一態樣中，該第一異質二聚體提升結構域之半胱胺酸連接子(連接子 2)可包含 GFNRGEC 之序列(SEQ ID NO：70) 且該第二異質二聚體提升結構域之半胱胺酸連接子(連接子 2)可包含 GVEPKSC 之序列(SEQ ID NO：71)。

於某些態樣中，該第三異質二聚體提升結構域之連接子 3 可包含 KAPSSSPME 之序列(SEQ ID NO：77)。

於某些態樣中，該在第一和第三異質二聚體提升區上之肽 1 可包含具有序列 CPPCP(SEQ ID NO：60)之截短的 IgG1 鉸鏈區。於一態樣中，該肽 1 可包含，但不限於 DKTHTCPPC 之序列(SEQ ID NO：96)。

本文所描述之球形突起和孔策略可用於 MP3-DART

構建體中以確保該第一和第三多肽鏈正確配對。類似於本文中所描述之 LP-DART，人 IgG1 之 Fc 區可經修飾以除去該經常在轉譯後裂解之 C-端賴胺酸殘基，並引入突變 L234A、L235A 和 G237A 至因為結合至 FcγRIII 的扁圓的效應子功能(效應子無效表型)。於一態樣中，球形突起係藉由修飾天然 IgG Fc 區，使其包含修飾的 T366W 來創建。於另一態樣中，孔係藉由修飾天然 IgG Fc 區，使其包含修飾的 T366S、L368A 和 Y407V 來創建。較佳地，該第一多肽鏈包含該球形突起且該第三多肽鏈包含孔。為了協助從該第三多肽鏈之任何同型二聚體純化 MP3-DART™，較佳地，該第三多肽鏈之 CH2 和 CH3 結構域的蛋白 A 結合位點係藉由位置 435(H435R)處之胺基酸取代發生突變。因此，該第三多肽鏈之任一同型二聚體不會結合至蛋白 A，而該 MP3-DART™保留其經由在該第一多肽鏈上之蛋白 A 結合位點結合蛋白 A 之能力。因此，該球形突起(或突起)Fc 鏈可具有 SEQ ID NO：65 之序列而該孔(或腔)Fc 鏈可具有 SEQ ID NO：66 之序列(如表 4 中所提供者)。

表 4. Fc 區之序列

SEQ ID NO:	序列
SEQ ID 65 球形突起 Fc 鏈突變	APEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP PVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRYTQKSLSLSPGK
SEQ ID 66 孔 Fc 鏈突變	APEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

表 5 描述以本文所描述之各種不同 P-鈣黏蛋白和 CD3-1 抗體建構之示例性 N-端 MP3-DART 和 C-端 MP3-DART 蛋白的第一(1)、第二(2)和第三(3)多肽鏈。SEQ ID NO：125-158 提供表 5 中所描述之 N-端和 C-端 MP3-DART 雙特異性異質二聚體雙功能抗體之多肽鏈 1、2 和 3 的胺基酸和核苷酸序列(參考括號中者)。

表 5. MP3-DART 蛋白之第一、第二和第三多肽鏈

	第一多肽鏈 (1) 序列	第二多肽鏈 (2) 序列	第三多肽鏈 (3) 序列
C-端 MP3-DART P-CAD 35 VH 和 VL	P-CAD 35VLXCD3-1VH SEQ ID NO: 127 (SEQ ID NO: 128)	CD3-1-2VLXP-CAD 35VH SEQ ID NO: 129 (SEQ ID NO: 130)	SEQ ID NO: 125 (SEQ ID NO: 126)
C-端 MP3-DART P-CAD153 VH 和 VL	P-CAD 153VLXCD3-1VH SEQ ID NO: 131 (SEQ ID NO: 132)	CD3-1-2VLXP-CAD 153VH SEQ ID NO: 133 (SEQ ID NO: 134)	SEQ ID NO: 125 (SEQ ID NO: 126)
C-端 MP3-DART P-CAD154 VH 和 VL	P-CAD 154VLXCD3-1VH SEQ ID NO: 135 (SEQ ID NO: 136)	CD3-1-2VLXP-CAD 154VH SEQ ID NO: 137 (SEQ ID NO: 138)	SEQ ID NO: 125 (SEQ ID NO: 126)
C-端 MP3-DART P-CAD177 VH 和 VL	P-CAD 177VLXCD3-1VH SEQ ID NO: 139 (SEQ ID NO: 140)	CD3-1-2VLXP-CAD 177VH SEQ ID NO: 141 (SEQ ID NO: 142)	SEQ ID NO: 125 (SEQ ID NO: 126)
N-端 MP3-DART P-CAD 35 VH 和 VL	P-CAD 35VLXCD3-1VH SEQ ID NO: 143 (SEQ ID NO: 144)	CD3-1-2VLXP-CAD 35VH SEQ ID NO: 145 (SEQ ID NO: 146)	SEQ ID NO: 125 (SEQ ID NO: 126)
N-端 MP3-DART P-CAD 153 VH 和 VL	P-CAD 153VLXCD3-1VH SEQ ID NO: 147 (SEQ ID NO: 148)	CD3-1-2VLXP-CAD 153VH SEQ ID NO: 149 (SEQ ID NO: 150)	SEQ ID NO: 125 (SEQ ID NO: 126)
N-端 MP3-DART P-CAD 154 VH 和 VL	P-CAD 154VLXCD3-1VH SEQ ID NO: 151 (SEQ ID NO: 152)	CD3-1-2VLXP-CAD 154VH SEQ ID NO: 153 (SEQ ID NO: 154)	SEQ ID NO: 125 (SEQ ID NO: 126)
N-端 MP3 DART P-CAD 177 VH 和 VL	P-CAD 177VLXCD3-1VH SEQ ID NO: 155 (SEQ ID NO: 156)	CD3-1-2VLXP-CAD 177VH SEQ ID NO: 157 (SEQ ID NO: 158)	SEQ ID NO: 125 (SEQ ID NO: 126)

經遺傳工程處理之半胱胺酸殘基

於某些態樣中，該雙特異性異質二聚體雙功能抗體之每個多肽鏈可經遺傳工程處理以包含至少一個半胱胺酸殘基，該至少一個半胱胺酸殘基可與本發明之另一多肽鏈上的對應半胱胺酸殘基交互作用以形成鏈間二硫鍵。該鏈間二硫鍵可用於穩定該雙功能抗體分子，提升表現並在重組

系統中回復，導致穩定且一致之調製劑並改善該經分離及/或純化之產物在活體內的穩定性。該半胱胺酸殘基可以單一胺基酸形式或該多肽鏈之任一部分中的較大胺基酸序列(例如鉸鏈區)之一部分的形式引入。於一特定之態樣，至少一個半胱胺酸殘基經遺傳工程處理以出現在多肽鏈之 C 端。

癌症治療

本發明包含用於治療、預防或管理個體中之癌症的方法和組成物，其包含投予該個體治療上有效量之根據本發明進行遺傳工程處理的雙特異性異質二聚體雙功能抗體，該分子進一步結合癌抗原。本發明之分子可於預防、抑制、減少原發性腫瘤和轉移之癌細胞的生長及/或消退特別有用。雖然不欲受特定之作用機制的束縛，本發明之分子可介導可能導致腫瘤清除、腫瘤減少或彼等之組合的效應子功能。

因此，本發明提供預防或治療特徵為 P-鈣黏蛋白癌抗原之癌症的方法，該方法藉由將雙特異性異質二聚體雙功能抗體進行遺傳工程處理以使其免疫特異性地識別在 T 細胞上之 P-鈣黏蛋白癌抗原和 CD3 抗原。該已根據本發明進行遺傳工程處理之雙特異性異質二聚體雙功能抗體係用於預防或治療癌症，因為其具有由抗 CD3 誘導之活化的殺手 T 細胞之細胞毒性活性。

因此，本發明之一態樣提供治療有需要治療 P-鈣黏蛋

白陽性癌症之患者中的 P-鈣黏蛋白陽性癌症之方法，其中該癌症係選自由下列所組成之群組：乳癌、結腸直腸癌、卵巢癌、胃癌、甲狀腺癌、前列腺癌、子宮頸癌、胰腺癌、肺癌(包含，但不限於非小細胞肺癌和小細胞肺癌)、膀胱癌、肝癌、子宮內膜癌、頭頸癌、睪丸癌及膠質母細胞癌。

本發明亦提供本發明之雙特異性異質二聚體雙功能抗體於治療本文所定義之癌症之方法中的用途。此外，本發明提供本發明之雙特異性異質二聚體雙功能抗體於製造用於治療如本文所定義之癌症的藥物之用途。

於一特定之態樣中，相對於沒有本發明之雙特異性異質二聚體雙功能抗體存在時癌細胞生長，本發明之雙特異性異質二聚體雙功能抗體抑制或減少癌細胞生長至少 99%、至少 95%、至少 90%、至少 85%、至少 80%、至少 75%、至少 70%、至少 60%、至少 50%、至少 45%、至少 40%、至少 35%、至少 30%、至少 25%、至少 20%或至少 10%。

於一特定之態樣中，相較於沒有本發明之雙特異性異質二聚體雙功能抗體存在時，本發明之雙特異性異質二聚體雙功能抗體可增加殺死細胞或增加抑制或減少癌細胞增長至少 5%、至少 10%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%或至少 100%。

本發明進一步包含將本發明之分子與熟習本技藝之人士所已知之用於治療或預防癌症之其他療法組合投予，該用於治療或預防癌症之其他療法包含，但不限於目前之標準和實驗性化療、生物療法、免疫療法、放射療法或手術。於一些態樣中，本發明之分子可與治療或預防上有效量之一或多種作用劑、治療性抗體或其他熟習本技藝之人士所已知之用於治療及/或預防癌症的作用劑組合投予。

因此，用於治療癌症之方法包含投予有需要治療癌症之患者有效量之本發明的雙特異性異質二聚體雙功能抗體和化療劑的組合。該等組合治療可分別、依序或同時投予。適合之化療劑包含，但不限於 5-氟尿嘧啶、天門冬醯胺酶、BCNU、博萊黴素(bleomycin)、加利車黴素(calicheamicin)、喜樹鹼(camptothecin)、卡鉑(carboplatin)、順鉑(cisplatin)、環磷醯胺(cyclophosphamide)、阿糖胞苷(cytarabine)、癌得星(cytosan)、達卡巴嗪(dacarbazine)、更生黴素(dactinomycin)、柔紅黴素(daunorubicin)、多西紫杉醇(docetaxel)、阿黴素(doxorubicin)、依托泊苷(etoposide)、羥基脲、伊達比星(idarubicin)、異環磷醯胺(ifosfamide)、伊立替康(irinotecan)、L-天門冬醯胺酶、巯嘌呤(mercaptopurine)、甲胺蝶呤(methotrexate)、絲裂黴素(mitomycin)、米托蒽醌(mitoxantrone)、氮芥、亞硝基脲(nitrosourea)、太平洋紫杉醇(paclitaxel)、普卡黴素(plicamycin)、丙卡巴肼(procarbazine)、紫杉醇(taxol)、硫

鳥嘌呤 (thioguanine)、托泊替康 (topotecan)、長春鹼 (vinblastine)、長春新鹼 (vincristine) 和長春瑞濱 (vinorelbine)。

本文所提供之投予劑量和頻率係包含在術語治療上有效和預防上有效之內。該劑量和頻率可進一步根據特異於各患者之因素而有不同，其取決於投予之特定治療或預防劑、癌症之嚴重性和類型、投予途徑及該患者之年齡、體重、反應和過往病史。合適之方案可由熟習本技藝之人士經由考慮該等因素，並依照，例如文獻中報導及 Physician's Desk Reference (56 版，2002) 中建議之劑量來選擇。

本發明之雙特異性異質二聚體雙功能抗體可為用於投予之醫藥組成物形式，該醫藥組成物係配製成適合用於所選擇之投予模式及醫藥上可接受之稀釋劑或賦形劑(諸如緩衝劑、表面活性劑、防腐劑、增溶劑、等張劑、穩定劑、載體和類似物)。Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton Pa., 18th ed., 1995 提供從業者大致上已知之配製技術概要。

這些醫藥組成物可藉由本技藝中已知之可達成一般預期之治療癌症的目的之任何方式來投予。該投予路線可為胃腸道外途徑，本文中所定義之胃腸道外途徑包含，但不限於靜脈內、肌肉內、腹膜內、皮下和關節內注射和輸注之投予模式。投予之劑量可取決於接受者之年齡、健康和體重、同時進行之治療(如果有)種類、治療頻率及期望之

效果的性質。

在本發明之範圍內的組成物包括所有其中存在能有效取得所需之治療癌症的醫療效果之雙特異性異質二聚體雙功能抗體的量之組成物。雖然患者彼此間的個別需求可能有所不同，測定所有成分之有效量的最佳範圍係在一般技術之臨床醫師的能力範圍之內。

本發明提供可用於上述方法中之套組。於一態樣中，套組包含本發明之雙特異性異質二聚體雙功能抗體。於另一態樣中，套組進一步包含在一或多個容器中之一或多種用於治療癌症之其他預防或治療劑。於某些態樣中，該其他預防或治療劑為化療劑。於其他態樣中，該預防或治療劑為生物或激素治療。

較佳地，本發明之數種醫藥組成物、預防或治療劑之態樣在用於人體中之前先在活體外、細胞培養系統及動物模型有機體，諸如啮齒類動物模型系統中測試所需之治療活性。

本發明之預防及/或治療方案的毒性和效力可能藉由標準醫藥程序在細胞培養或實驗動物中測定，例如用於測定 LD_{50} (造成 50% 群體死亡之劑量) 和 ED_{50} (在 50% 群體中治療有效之劑量)。毒性和治療效果之間的劑量比為治療指數且其可以 LD_{50}/ED_{50} 比表示。展現大的治療指數之預防及/或治療劑為較佳者。

此外，可使用熟習本技藝之技術人員所已知之任何分析來評估本文所揭示之療法或組合療法於治療或預防癌症

之預防及/或治療用途。

生物寄存

本發明之代表性物質於 2013 年 12 月 20 日寄存在美國典型培養物保藏中心(ATCC)，美國維吉尼亞州馬納薩斯(Manassas)大學大道(University Boulevard)10801 號，20110-2209。具有 ATCC 登錄編號為 PTA-120809 之載體 153 LP-DARTA 包含編碼 P-鈣黏蛋白 LP-DART(Fc 融合雙功能抗體)鏈 A 之重組人 DNA 插入子，而具有 ATCC 登錄編號為 PTA-120810 之載體 153 LP-DART B 包含編碼 P-鈣黏蛋白 LP-DART(Fc 融合雙功能抗體)鏈 B 之重組人 DNA 插入子。其寄存係根據布達佩斯條約中關於用於專利程序目的之微生物寄存的國際認可條款和根據布達佩斯條約之管理條款進行。這確保該寄存之培養物從寄存之日起可維持存活 30 年。該寄存之培養物將根據布達佩斯條約的條款由 ATCC 予以提供，並受制於輝瑞公司和 ATCC 之間的協議，此確保該寄存之培養物的後代在相關之美國專利發佈時或任何美國或外國專利申請案對公眾公開(以先行者為準)時能被永久和不受限制地取得，並保證美國專利商標局專員所決定之可取用該寄存之培養物的後代之個人將有權按 35 U.S.C.第 122 節及根據之比此 35 U.S.C.第 122 節之專員規則(包括 37 C.F.R. 第 1.14 節，特別參考 886 OG 638) 來取得。

本申請案之受讓人已同意若寄存物質之培養在合適之

條件下培養而死亡或損失或被破壞，該物質將在通知時以另一相同物質及時更換。寄存物質之可用性並不能被解釋為被許可在違反任何政府當局根據其專利法所授予的權利下實施本發明。

下列用於實行本發明之特定態樣的實施例僅用於說明目的且不欲以任何方式限制本發明的範圍。

【實施方式】

實施例 1

P-鈣黏蛋白抗體和雙特異性異質二聚體雙功能抗體之產生

構建雙特異性異質二聚體雙功能抗體以評估各抗體之重組製造、純化和結合特性。藉由本文所描述之重組表現系統製造該經親和純化之雙特異性異質二聚體雙功能抗體。ELISA 和 SPR 分析進一步揭露該共價雙特異性異質二聚體雙功能抗體同時對靶抗原，P-鈣黏蛋白和 CD-3 表現出親和力且可同時結合二種抗原。

A. 噬菌體展示

利用本技藝中已知之技術，以包含衍生自未經免疫化之人供體的單鏈片段可變(scFv)之噬菌體顯示庫鑑定結合至該 P-鈣黏蛋白之胞外結構域(ECD)的 scFv 部分。藉由標準 ELISA 技術，在 P-鈣黏蛋白蛋白構建體和 P-鈣黏蛋白表現細胞上測量表現在該噬菌體表面上之 scFv 結合。

B. 定序分析

使用習知方法，以引物 5'GGAGATTTTCAACGTGAA 3'(SEQ ID NO : 58)和 5'CTCTTCTGAGATGAGTTTTTG 3'(SEQ ID NO : 59)將未純化之細菌甘油貯存物或純化之質粒形式的 ScFv 片段進行測序。

C.轉化成 DART

選擇顯示出強力之重組 P-鈣黏蛋白或細胞表面結合(>3x 背景或陰性細胞之結合)的 ScFv 片段以用於分殖入 DART 蛋白質。DART 設計和選殖方法先前已有描述(Johnson et al, J Mol Biol, 399 : 436-449, 2010; Moore et al, Blood,117(17):4542-51, 2011)。用於改造來自噬菌體展示庫之新穎抗 P-鈣黏蛋白 scFv 的方法如下：以納入用於 VH 之 BamHI/ BspEI 和用於 VL 之 BssHII/BamHI 的引物藉由標準聚合酶鏈反應(PCR)擴增片段。根據製造商的說明書(新英格蘭生物實驗室(New England Biolabs))，以對應之限制性內切酶切斷片段。

為了產生 DART 表現載體，將抗 P-鈣黏蛋白 VH(P-CAD VH)或 VL(P-CAD VL)scFv 進行凝膠純化(QIAGEN®凝膠純化套組)並分別連接入含有抗 CD3 VL(CD3 VL)或 VH(CD3 VH)scFv 之哺乳動物表現載體中。

為了產生如第 2 和 3 圖所示之 VF-DART，該 DART 表現載體進一步包含各自具有半胱胺酸連接子(連接子 2)之第一和第二異質二聚體提升結構域，諸如 GFNRGEC

(SEQ ID NO : 70)或 GVEPKSC(SEQ ID NO : 77)。

為了產生如第 4 圖中所示之 EK-DART，該 DART 表現載體進一步包含各自具有半胱胺酸連接子(連接子 2)，諸如 GGCGGG(SEQ ID NO : 72)和 E-卷結構域(SEQ ID NO : 61)或 K-卷結構域(SEQ ID NO : 62)之第一和第二異質二聚體提升結構域。

為了產生如第 1 和 5 圖中所示之 LP-DART，該 DART 表現載體進一步包含各自具有半胱胺酸連接子(連接子 2)，諸如 GCPPCP(SEQ ID NO : 73)、GGTGGCPPCP(SEQ ID NO : 74)、GEPKSSDKTHTCPPCP(SEQ ID NO : 75)或 GGTGGGEPKSSDKTHTCPPCP(SEQ ID NO : 76)及“球形突起”Fc 鏈(SEQ ID NO : 63)或“孔”Fc 鏈(SEQ ID NO : 64)之第一和第二異質二聚體提升結構域。

除了來自噬菌體展示庫之新穎的抗 P-鈣黏蛋白 scFv 外，亦將來自抗 P-鈣黏蛋白臨床 mAb PF-03732010VH (Zhang et al, Clin Cancer Res. 16(21), 5177-5188, 2010)之 VH 和 VL 結構域分殖入上述各種 DART 表現載體中以作為陽性對照組。

然後，藉由將表現載體共同轉染入 HEK 293 細胞中來將 DART 蛋白瞬時表現在哺乳動物細胞中。使用與 CNBr- 活化之瓊脂糖 4B(GE Healthcare，紐澤西州 Piscataway)偶合之抗捲曲的卷 mAb 15F1 將保留 P-鈣黏蛋白親和力之 DART 蛋白進行親和純化。藉由 SDS-PAGE 和 SEC 評估該純化之 DART 蛋白的生化性質。

表 6 提供藉由本文所描述之技術產生的抗 P-鈣黏蛋白 scFv 選殖株之 VL 和 VH 胺基酸序列。根據 Kabat 之選殖株 20 和 30 的 CDR 下方有劃線。SEQ ID NO：97-116 提供該對應之核苷酸序列(參考括號中者)。

表 6. P-CAD VL 和 VH 序列。

SEQ ID NO. P-CAD Clone #	序列
SEQ ID NO: 1 P-CAD 33 VL	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKR PSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAYVFGTGKVTVL
SEQ ID NO: 2 P-CAD 33 VH	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAY YNGNTNYAQLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCALIGSGVAFDIW QGTMVTVSS
SEQ ID NO: 3 P-CAD 34 VL	QSVVTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKR PSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 4 P-CAD 34 VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAY NGNTNYAQLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCATIDTASAFDIWG QGTMVTVSS
SEQ ID NO: 5 P-CAD 35 VL (SEQ ID NO: 97)	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKR PSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAVVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 6 P-CAD 35 VH (SEQ ID NO: 98)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAY NGNTNYAQLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCATIDTASAFDIWG QGTMVTVSS
SEQ ID NO: 7 P-CAD 153 VL (SEQ ID NO: 99)	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKR PSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSGVVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 8 P-CAD 153 VH (SEQ ID NO: 100)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAY NGNTNYAQLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCATIDTANAFGIWG QGTMVTVSS
SEQ ID NO: 9 P-CAD 154 VL (SEQ ID NO: 101)	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKR PSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSYVFGTGKVTVL
SEQ ID NO: 10 P- CAD 154 VH (SEQ ID NO: 102)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAY NGNTNYAQLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCATIDTATAFDIWG QGTMVTVSS
SEQ ID NO: 11 P-CAD 163 VL (SEQ ID NO: 103)	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKR PSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAYVFGTGKVTVL
SEQ ID NO: 12 P-CAD 163 VH (SEQ ID NO: 104)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYGFSWVRQAPGQGLEWMGWISAY YNGNTNYAQLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCATIDTASAFDIW QGTMVTVSS
SEQ ID NO: 13 P-CAD 165 VL (SEQ ID NO: 105)	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKR PSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQAGDEADYYCGTWDSSLSAYVFGTGKVTVL
SEQ ID NO: 14 P-CAD 165 VH (SEQ ID NO: 106)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAY NGNTNYAQLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCATIDTANAFDIWG QGTMVTVSS
SEQ ID NO: 15 P-CAD 177 VL (SEQ ID NO: 107)	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKR PSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAYVFGTGKVTVL
SEQ ID NO: 16 P-CAD 177 VH (SEQ ID NO: 108)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAY NGNTNYAQLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCATIDTANAFDIWG QGTMVTVSS
SEQ ID NO: 17 P-CAD 178 VL (SEQ ID NO: 109)	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKR PSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAVVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 18 P-CAD 178 VH (SEQ ID NO: 110)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAY NGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCATIDTANAFDIWG QGTMVTVSS
SEQ ID NO: 19 P-CAD 179 VL (SEQ ID NO: 111)	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSRNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDSNKR PSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSSWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 20 P-CAD 179 VH (SEQ ID NO: 112)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAY NGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCATIDTANAFDIWG QGTMVTVSS
SEQ ID NO: 21 P-CAD 180 VL (SEQ ID NO: 113)	QSVVTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKR PSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAYVFGTGKTVL
SEQ ID NO: 22 P-CAD 180 VH (SEQ ID NO: 114)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAY NGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCATIDTANAFDIWG QGTMVTVSS
SEQ ID NO: 23 P-CAD 281 VL (SEQ ID NO: 115)	QSVVTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKR PSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 24 P-CAD 281 VH (SEQ ID NO: 116)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAY NGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCATINAPNNFDIWG QGTMVTVSS
SEQ ID NO: 236 P-CAD 20 VL	AIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSIGKYLNWYQQIPGKAPKLLIYTASTLQTG VPSRFSGSGSGTDFLTIVSLQPEDFATYYCQQSFNTPRTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 237 P-CAD 20 VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHVVRQAPGQGLEWMGRINP NSGGTNYAQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSLRSDDTAVYYCAKSGSGGAFDI WGQGTMTVTVSS
SEQ ID NO: 238 P-CAD 30 VL	DIVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLHWFQQRPGQSPRRLIYK VSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYCMQGTHTWPPFLFGQGTKV EIK
SEQ ID NO: 239 P-CAD 30 VH	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISY DGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSSSDRTFDYW GQGTLVTVSS

表 7a 和 7b 分別提供使用 Kabat 和 AbM 編號命名之
所產生的抗 P-鈣黏蛋白 VH scFv 選殖株的 CDR 序列。

表 7a. 使用 Kabat 編號之 P-CAD VH CDR 序列。

P-CAD scFv 選殖株 #	P-CAD VH CDR1	P-CAD VH CDR2	P-CAD VH CDR3
33	SYGIS SEQ ID NO: 25	WISAYNGNTNYAQLQG SEQ ID NO: 26	IGSGVAFDI SEQ ID NO: 27
34	SYGIS SEQ ID NO: 25	WISAYNGNTNYAQLQG SEQ ID NO: 26	IDTASAFDI SEQ ID NO: 28
35	SYGIS SEQ ID NO: 25	WISAYNGNTNYAQLQG SEQ ID NO: 26	IDTASAFDI SEQ ID NO: 28
153	SYGIS SEQ ID NO: 25	WISAYNGNTNYAQLQG SEQ ID NO: 26	IDTANAFDI SEQ ID NO: 29
154	SYGIS SEQ ID NO: 25	WISAYNGNTNYAQLQG SEQ ID NO: 26	IDTATAFDI SEQ ID NO: 30
163	SYGIS SEQ ID NO: 25	WISAYNGNTNYAQLQG SEQ ID NO: 26	IDTASAFDI SEQ ID NO: 28
165	SYGIS SEQ ID NO: 25	WISAYNGNTNYAQLQG SEQ ID NO: 26	IDTANAFDI SEQ ID NO: 31
177	SYGIS SEQ ID NO: 25	WISAYNGNTNYAQLQG SEQ ID NO: 26	IDTANAFDI SEQ ID NO: 31
178	SYGIS SEQ ID NO: 25	WISAYNGNTNYAQLQG SEQ ID NO: 26	IDTANAFDI SEQ ID NO: 31
179	SYGIS SEQ ID NO: 25	WISAYNGNTNYAQLQG SEQ ID NO: 26	IDTANAFDI SEQ ID NO: 31
180	SYGIS SEQ ID NO: 25	WISAYNGNTNYAQLQG SEQ ID NO: 26	IDTANAFDI SEQ ID NO: 31
281	SYGIS SEQ ID NO: 25	WISAYNGNTNYAQLQG SEQ ID NO: 26	INAPNNFDI SEQ ID NO: 32

表 7b. 使用 AbM 編號之 P-CAD VH CDR 序列。

P-CAD scFv 選殖株 #	P-CAD VH CDR1	P-CAD VH CDR2	P-CAD VH CDR3
33	GYTFTSYGIS SEQ ID NO: 33	WISAYNGNTN SEQ ID NO: 34	IGSGVAFDI SEQ ID NO: 27
34	GYTFTSYGIS SEQ ID NO: 33	WISAYNGNTN SEQ ID NO: 34	IDTASAFDI SEQ ID NO: 28
35	GYTFTSYGIS SEQ ID NO: 33	WISAYNGNTN SEQ ID NO: 34	IDTASAFDI SEQ ID NO: 28
153	GYTFTSYGIS SEQ ID NO: 33	WISAYNGNTN SEQ ID NO: 34	IDTANAFDI SEQ ID NO: 29
154	GYTFTSYGIS SEQ ID NO: 33	WISAYNGNTN SEQ ID NO: 34	IDTATAFDI SEQ ID NO: 30
163	GYTFTSYGIS SEQ ID NO: 33	WISAYNGNTN SEQ ID NO: 34	IDTASAFDI SEQ ID NO: 28
165	GYTFTSYGIS SEQ ID NO: 33	WISAYNGNTN SEQ ID NO: 34	IDTANAFDI SEQ ID NO: 31
177	GYTFTSYGIS SEQ ID NO: 33	WISAYNGNTN SEQ ID NO: 34	IDTANAFDI SEQ ID NO: 31
178	GYTFTSYGIS SEQ ID NO: 33	WISAYNGNTN SEQ ID NO: 34	IDTANAFDI SEQ ID NO: 31
179	GYTFTSYGIS SEQ ID NO: 33	WISAYNGNTN SEQ ID NO: 34	IDTANAFDI SEQ ID NO: 31
180	GYTFTSYGIS SEQ ID NO: 33	WISAYNGNTN SEQ ID NO: 34	IDTANAFDI SEQ ID NO: 31
281	GYTFTSYGIS SEQ ID NO: 33	WISAYNGNTN SEQ ID NO: 34	INAPNNFDI SEQ ID NO: 32

表 7c 中提供所產生之抗 P-鈣黏蛋白 VL scFv 選殖株的 CDR 序列。

表 7c. 使用 Kabat/AbM 編號之 P-CAD VL CDR 序列。

P-CAD scFv 選殖株 #	P-CAD VL CDR1	P-CAD VL CDR2	P-CAD VL CDR3
33	SGSSSNIGNNYVS SEQ ID NO: 35	DNNKRPS SEQ ID NO: 37	GTWDSSLSAYV SEQ ID NO: 39
34	SGSSSNIGNNYVS SEQ ID NO: 35	DNNKRPS SEQ ID NO: 37	GTWDSSLSAWV SEQ ID NO: 40
35	SGSSSNIGNNYVS SEQ ID NO: 35	DNNKRPS SEQ ID NO: 37	GTWDSSLSAVV SEQ ID NO: 41
153	SGSSSNIGNNYVS SEQ ID NO: 35	DNNKRPS SEQ ID NO: 37	GTWDSSLSGVV SEQ ID NO: 42
154	SGSSSNIGNNYVS SEQ ID NO: 35	DNNKRPS SEQ ID NO: 37	GTWDSSLSYV SEQ ID NO: 43
163	SGSSSNIGNNYVS SEQ ID NO: 35	DNNKRPS SEQ ID NO: 37	GTWDSSLSAYV SEQ ID NO: 39
165	SGSSSNIGNNYVS SEQ ID NO: 35	DNNKRPS SEQ ID NO: 37	GTWDSSLSAYV SEQ ID NO: 39
177	SGSSSNIGNNYVS SEQ ID NO: 35	DNNKRPS SEQ ID NO: 37	GTWDSSLSAYV SEQ ID NO: 39
178	SGSSSNIGNNYVS SEQ ID NO: 35	DNNKRPS SEQ ID NO: 37	GTWDSSLSAVV SEQ ID NO: 41
179	SGSRNIGNNYVS SEQ ID NO: 36	DSNKRPS SEQ ID NO: 38	GTWDSSLSWV SEQ ID NO: 44
180	SGSSSNIGNNYVS SEQ ID NO: 35	DNNKRPS SEQ ID NO: 37	GTWDSSLSAYV SEQ ID NO: 39
281	SGSSSNIGNNYVS SEQ ID NO: 35	DNNKRPS SEQ ID NO: 37	GTWDSSLSAWV SEQ ID NO: 40

表 8 顯示在親和力成熟之 P-鈣黏蛋白選殖株中發現的胺基酸突變。這些數據表明基於該解析之晶體結構的對 VL/VH 折疊和配體交互作用的潛在影響。CDR 結合袋內之突變顯示出改善配體交互作用之潛力。CDR 結合袋外所發現之突變表明改善 VL/VH 之折疊的作用。

表 8. 親和力成熟之 P-鈣黏蛋白選殖株的胺基酸突變。

P-CAD 選殖株 #	VL 突變 P-CAD 35			VH 突變 P-CAD 35		
	序號	VL 鏈	VL Chothia	序號	VH 鏈	VH Chothia
153	A98G	A98G	A95BG	S103N, D106G	S221N, D224G	S99N, D101G
154	A98S (V99Y, G103T, L107V)	A98S V99Y G103T L107V	A95BS V96Y G100T L104V	S103T	S221T	S99T
165	T81A (V99Y, G103T, L107V)	T81A V99Y G103T L107V	T80A V96Y G100T L104V	S103N	S221N	S99N
177	(V99Y, G103T, L107V)	V99Y G103T L107V	V96Y G100T L104V	S103N	S221N	S99N
178	-	-	-	S103N	S221N	S99N
179	S26R, N52S, A98S, V99W	S26R N52S A98S V99W	S27R N51S A95BS V96W	S103N	S221N	S99N
180	L4V, (V99Y, G103T, L107V)	L4V V99Y G103T L107V	L4V V96Y G100T L104V	S103N	S221N	S99N

表 9 提供藉由本文中所描述之技術產生之抗 CD3 scFv 選殖株的 VL 和 VH 胺基酸序列。

表 9. CD3 VL 和 VH 胺基酸序列。

SEQ ID NO.	序列
SEQ ID NO: 45 抗 hu CD3 人化 CD3-1 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWV GRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCV RHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSS
SEQ ID NO: 46 抗 hu CD3 人化 CD3-2 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCV RHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSS
SEQ ID NO: 47 抗 hu CD3 人化 CD3-1 VL 和 CD3-2 VL (CD3-1-2)	QAVVTQEPSTLVSPGGTTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLI GGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVF GGGTKLTVL

表 10a 和 10b 分別提供使用 Kabat 和 AbM 編號命名之所產生之抗 CD3 VH scFv 選殖株的 CDR 序列。

表 10a. 使用 Kabat 編號之 CD3 VH CDR 序列。

CD3 選殖株 #	CD3 VH CDR1	CD3 VH CDR2	CD3 VH CDR3
CD3-1	TYAMN SEQ ID NO: 48	RIRSKYNNYATYYADSVKG SEQ ID NO: 49	HGNFGNSYVSWFAY SEQ ID NO: 51
CD3-2	TYAMN SEQ ID NO: 48	RIRSKYNNYATYYADSVKD SEQ ID NO: 50	HGNFGNSYVSWFAY SEQ ID NO: 51

表 10b.使用 AbM 編號之 CD3 VH CDR 序列。

CD3 選殖株 #	CD3 VH CDR1	CD3 VH CDR2	CD3 VH CDR3
CD3-1	GFTFSTYAMN SEQ ID NO: 52	RIRSKYNNYATY SEQ ID NO: 54	HGNFGNSYVSWFAY SEQ ID NO: 51
CD3-2	GFTFNTYAMN SEQ ID NO: 53	RIRSKYNNYATY SEQ ID NO: 54	HGNFGNSYVSWFAY SEQ ID NO: 51

表 10c 提供所產生之抗 CD3 VL scFv 選殖株的 CDR 序列。

表 10c.使用 Kabat/AbM 編號之 CD3-1 和 CD3-2 VL CDR 序列。

CD3 選殖株 #	CD3 VL CDR1	CD3 VL CDR2	CD3 VL CDR3
CD3-1 和 CD3-2	RSSTGAVTTSNYAN SEQ ID NO: 55	GTNKRAP SEQ ID NO: 56	ALWYSNLWV SEQ ID NO: 57

實施例 2

構建抗 P-鈣黏蛋白/抗人 CD3 LP-DART

藉由 PCR 擴增抗 P-鈣黏蛋白/抗人 CD3 DART 蛋白，從而使各 DART 蛋白在每一端含有一用於選殖入哺乳動物表現載體中之限制性內切酶選殖位點，參見表 11 和第 33A 和 33B 圖。

表 11.抗 P-鈣黏蛋白/抗人 CD3 DART 蛋白。

DART	序列 S
35	P-CAD 35VL(SEQ ID NO: 5)-連接子 1(SEQ ID NO: 68)-CD3-1 VH(SEQ ID NO: 45 or 46), 和 CD3-1-2VL(SEQ ID NO: 47)-連接子 1(SEQ ID NO: 69)-P-CAD 35VH(SEQ ID NO: 6)
153	P-CAD 153 VL (SEQ ID NO: 7)-連接子 1 (SEQ ID NO: 68)-CD3 VH (SEQ ID NO: 45 or 46), 和 CD3 VL (SEQ ID NO: 47)-連接子 1 (SEQ ID NO: 69)-P-CAD 153 VH (SEQ ID NO: 8)
154	P-CAD 154 VL (SEQ ID NO: 9)-連接子 1 (SEQ ID NO: 68)-CD3 VH (SEQ ID NO: 45 or 46), 和 CD3 VL (SEQ ID NO: 47)-連接子 1 (SEQ ID NO: 69)-P-CAD 153 VH (SEQ ID NO: 10)

然後，將編碼該 DART 蛋白序列之核酸融合至各編碼

該經修飾之 Fc 構建體(例如該“球形突起” Fc 鏈(SEQ ID NO: 63)和“孔”Fc 鏈(SEQ ID NO: 64))的核酸，該經修飾之 Fc 構建體各自以半胱胺酸連接子(諸如 GCPPCP(SEQ ID NO: 73)、GGTGGCPPCP(SEQ ID NO: 74)、GEPKSSDKTHTCPPCP(SEQ ID NO: 75)和GGTGGGEPKSSDKTHTCPPCP(SEQ ID NO: 76))連接至 DART 之 C 端。

PCR 擴增後，以 BspEI 和 HindIII (5'DART 選殖位點)或 EcoRI(3' Fc 選殖位點)其中之一分解 DART 和 Fc 鏈核酸二者。經由從瓊脂糖凝膠切除來將經分解之 DNA 分離出，接著在室溫下純化 30 分鐘，再連接入經 HindIII - EcoRI 分解之表現載體中。然後，將連接物轉化入勝任之大腸桿菌 DH5α 中，並在 37°C 下，在含有 100μg/mL 羧苄青黴素(carbenicillin)之瓊脂糖平皿上生長一整夜。計算株落數，揀選後在 YT-肉湯+ 100μg/mL 羧苄青黴素中生長過夜，並使用標準方法分離出 DNA。然後，在哺乳動物細胞中表現之前，將所有 DNA 構建體的二股進行測序。然後，將互補性構建體對共同轉染入含有 HEK 293 細胞(100 萬個細胞/ml)的 1L 對數期培養物中。轉染後 24 小時，加入蛋白腴，使最終濃度為 0.75%並在收穫前令細胞再另外生長 5 天。然後，收集耗盡之培養物，離心以去除細胞碎片，再通過 20μm 過濾器。然後，利用本技藝中已知之技術純化蛋白質。抗 P-鈣黏蛋白/抗人 CD3 LP-DART 之示意實例顯示於第 1A 和 1B 圖中。

實施例 3

P-鈣黏蛋白 scFv-Fc 和 DART 蛋白之結合性質

使用標準 ELISA 技術分析 P-鈣黏蛋白 scFv-Fc 構建體(融合至人 IgG Fc 區之 P-鈣黏蛋白 VH 和 VL)和 DART 蛋白對 P-鈣黏蛋白蛋白構建體及對 P-鈣黏蛋白表現細胞之結合性質。表 12 中之數據證明噬菌體來源之 P-鈣黏蛋白 scFv-Fc 構建體與重組人 P-鈣黏蛋白具有強力結合且與鼠 P-鈣黏蛋白沒有可檢測之結合。

表 12. P-鈣黏蛋白 scFv-Fc 對 P-鈣黏蛋白蛋白構建體之結合性質。

P-CAD 選植株 #	huP-cad-ECD EC50 (nM)	huP-cad-ECD 生物素化之 EC50(nM)	muP-cad-ECD EC50 (nM)
33 scFv-Fc	3.464	0.1012	NB
34 scFv-Fc	11.16	0.1943	NB
35 scFv-Fc	2.5	0.01762	NB
PF03732010	1.936	0.0188	2.333
陰性對照組	NB	NB	NB

NB =沒有可檢測之結合

P-鈣黏蛋白 scFv-Fc 在以細胞為基礎之 ELISA 中對各種 P-鈣黏蛋白表現細胞類型的結合性質顯示於表 13 中。該噬菌體來源之 P-鈣黏蛋白 scFv-Fc 構建體顯現出與 H1650 細胞及與 SW480-huPcad 和 CHO-huPcad 細胞類型具有強力結合。

表 13. P-鈣黏蛋白 scFv-Fc 對 P-鈣黏蛋白表現細胞之結合性質。

P-CAD 選植株 #	SW480-huPcad EC50 (nM)	H1650 EC50 (nM)	CHO-huPcad EC50(nM)	CHO Parental EC50 (nM)
33 scFv-Fc	0.4243	0.5669	0.4931	NB
34 scFv-Fc	0.4422	0.494	0.3938	NB
35 scFv-Fc	0.1734	0.1631	0.2761	NB
PF-03732010	0.1665	0.2092	0.3293	NB
陰性對照組	NB	NB	NB	NB

NB =沒有可檢測之結合

如表 14 中所顯示者，本發明之抗 P-鈣黏蛋白 EK-DART 蛋白質在 ELISA 格式中顯示出與 H1650 細胞上之細胞表面表現的 P-鈣黏蛋白及與重組人 P-鈣黏蛋白-Fc 具有強力結合，但與其他鈣黏蛋白家族成員，E-鈣黏蛋白和 VE-鈣黏蛋白則無結合。EK-DART 係為 E/K 卷結構域建構體。PF EK-DART 為利用如實施例 1 中所描述之來自抗 P-鈣黏蛋白臨床 mAb PF-03732010 之 VH 和 VL 的陽性對照組。表 14 中之所有 EK-DART 蛋白包含 CD3-2。

表 14.P-鈣黏蛋白 EK-DAR 蛋白之結合性質。

DART	Hu P-鈣黏蛋白-Fc EC50 (nM)	E-鈣黏蛋白-Fc EC50 (nM)	VE-鈣黏蛋白-Fc EC50 (nM)	H1650 EC50 (nM)	CHO 母 EC50 (nM)
33 EK-DART	1.8	NB	NB	60.1	NB
34 EK-DART	2.85	NB	NB	67.95	NB
35 EK-DART	1.92	NB	NB	24.87	NB
PF EK-DART	2.1	NB	NB	19.69	NB
20 EK-DART	12.3	NB	NB	~114.7	NB
30 EK-DART	3.68	NB	NB	141.9	NB
陰性對照組 EK-DART	NB	NB	NB	NB	NB

NB =沒有可檢測之結合

實施例 4

DART 蛋白之表面電漿共振 (SPR) 分析

使用 BIAcore®3000 生物傳感器 (GE Healthcare) 藉由 SPR 分析 EK-DART 蛋白對 P-鈣黏蛋白和 CD3 之結合親和力。依製造商之建議，藉由胺偶合套組將抗原 huCD3_{εδ} 和人 P-鈣黏蛋白-Fc 或人/食蟹猴/鼠 P-鈣黏蛋白-ECD 其中之一固定在 CM-5 傳感器晶片上。表 15 顯示出噬菌體來源之 EK-DART 蛋白對食蟹猴 (“cyno”) P-鈣黏蛋白 ECD 之

結合親和力，而表 16 顯示出噬菌體來源之 EK-DART 蛋白對人可溶性 CD3 蛋白之結合親和力。表 15 和 16 中之所有 EK-DART 蛋白包含 CD3-2。

表 15.EK-DART 蛋白對 cyno P-鈣黏蛋白 ECD 之結合親和力。

DART	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D (nM)
33 EK-DART	1.15E+06	5.78E-02	46.4
34 EK-DART	7.05E+05	8.33E-02	129.3
35 EK-DART	3.18E+05	1.38E-02	43.4
PF EK-DART	2.11E+05	2.51E-03	11.90
20 EK-DART	3.46E+06	7.04E-03	2.03
30 EK-DART	4.72E+06	6.48E-03	1.37

表 16. EK-DART 蛋白針對人可溶性 CD3 之結合親和力。

DART	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D (nM)
33 EK-DART	2.28E+05	4.03E-03	17.7
34 EK-DART	1.95E+05	4.45E-03	22.8
35 EK-DART	1.89E+05	4.47E-03	23.6
PF EK-DART	4.11E+05	3.95E-03	9.61
20 EK-DART	9.79E+05	6.09E-03	5.19
30 EK-DART	3.53E+05	4.57E-03	13.6

表 17 中，該 Biacore 數據顯示具 CD3-2 之經優化的 EK-DART 蛋白對 cyno P-鈣黏蛋白 ECD 的結合親和力與具 CD3-2 之親代 35 EK-DART 的比較。表 17 中之所有 EK-DART 蛋白均包含 CD3-2。

表 17. EK-DART 蛋白對 cyno P-鈣黏蛋白 ECD 的結合親和力。

DART	ka (1/Ms)	kd(1/s)	KD (pM)
35 EK-DART	6.14E+05	2.15E-02	35050 ± 2950
153 EK-DART	7.32E+05	1.72E-05	231.5 ± 17.5
154 EK-DART	1.04E+06	3.90E-03	3930.0 ± 910
165 EK-DART	8.34E+05	3.09E-04	370.0 ± 87
177 EK-DART	8.02E+05	3.83E-04	483.0 ± 82
178 EK-DART	1.67E+05	2.16E-04	1310.0 ± 140
179 EK-DART	1.11E+06	4.58E-03	4165.0 ± 255
180 EK-DART	7.71E+05	7.44E-04	965.5 ± 19.5

表 18 中，該 Biacore 數據證明親代 35 EK-DART 和經優化之 EK-DART 蛋白對可溶性 CD3_{δε} 之結合親和力。表 18 中之所有 EK-DART 蛋白均包含 CD3-2。

表 18. EK-DART 蛋白對人可溶性 CD3 之結合親和力。

DART	ka (1/Ms)	kd(1/s)	KD (nM)
35 EK-DART	1.89E+05	4.47E-03	23.6
153 EK-DART	4.03E+05	6.31E-03	15.65 ± 1.75
154 EK-DART	4.56E+05	7.68E-03	17.10 ± 0.90
165 EK-DART	2.78E+05	4.17E-03	14.90 ± 2.80
177 EK-DART	2.53E+05	4.43E-03	19.95 ± 6.55
178 EK-DART	2.30E+05	5.26E-03	23.10 ± 1.10
179 EK-DART	3.06E+05	6.41E-03	25.75 ± 9.25
180 EK-DART	7.06E+05	1.11E-02	15.9 ± 1.00

表 19 中顯示出各種 DART 格式在 pH7.4 下對 cyno P-鈣黏蛋白之結合親和力。比較 VF、EK、LP、MP3-C 端及 MP3-N-端格式中之 DART 蛋白與 P-鈣黏蛋白選殖株 153 VH 和 VL 結合結構域。153 VF-DART 顯示出最高之結合親和力和最快之進行速率。153 EK-DART 和 153 LP-DART 蛋白之 KD 值類似。速率較慢所指示者，153 MP3-DART 蛋白對 cyno P-鈣黏蛋白之結合親和力稍低。該 %活性(Rmax)低，所有 153 DART 蛋白質之 Rmax 均類似。除了包含 CD3-2 的 153 EK-DART 外，表 19 中之所有 DART 蛋白均包含 CD3-1。

表 19. 各種 DART 格式對 cyno P-鈣黏蛋白之結合親和力。

DART	配體	ka (1/Ms)	kd(1/s)	t1/2 (min)	Rmax (RU)	*% Rmax	% Chi2/Rmax	KD (nM)
153 EK-DART CD3-2	Cyno P-鈣黏蛋白	5.24E+05	2.11E-04	51.56	23.2	17.3	0.24	0.403
153 EK-DART	Cyno P-鈣黏蛋白	5.17E+05	2.22E-04	48.98	14.0	14.9	0.33	0.430
						16.1	AVG	0.417 ± 0.014
153 VF-DART CD3-1	Cyno P-鈣黏蛋白	7.22E+05	2.40E-04	45.35	22.66	15.0	0.32	0.332
153 VF-DART	Cyno P-鈣黏蛋白	7.52E+05	2.29E-04	47.59	21.68	14.4	0.43	0.304
						14.7	AVG	0.318 ± 0.014
153 LP-DART	Cyno P-鈣黏蛋白	2.93E+05	2.00E-04	54.36	36.6	12.1	0.16	0.683
153 LP-DART	Cyno P-鈣黏蛋白	5.81E+05	2.09E-04	52.20	75.1	11.7	0.37	0.359
						11.9	AVG	0.521 ± 0.162
153-MP3 C端 DART	Cyno P-鈣黏蛋白	6.80E+04	1.06E-04	102.38	129.1	19.5	0.15	1.56
153-MP3 C端 DART	Cyno P-鈣黏蛋白	8.46E+04	1.79E-04	60.90	73.9	16.3	0.19	2.11
						17.9	AVG	1.84 ± 0.28
153-MP3 N端 DART	Cyno P-鈣黏蛋白	1.22E+05	2.96E-04	36.82	72.4	16.1	1.34	2.43
153-MP3 N端 DART	Cyno P-鈣黏蛋白	8.19E+04	2.28E-04	47.78	149.6	22.7	0.71	2.78
						19.4	AVG	2.610.18

表 20 中顯示出各種 DART 格式在 pH7.4 下對 shCD3(可溶性人 CD3)之結合親和力。比較 VF、EK、LP、MP3-C 端及 MP3-N-端格式之 DART 蛋白與 P-鈣黏蛋白選殖株#153 VH 和 VL 結合結構域。153 VF-DART 顯示出對 shCD3 之進行速率最快且結合親和力最高。153 EK、LP 和 MP3 DART 蛋白對 shCD3 之親和力類似。對 shCD3 之%活性(Rmax)較所觀察到之對 cyno P-鈣黏蛋白的%活性為佳。除了包含 CD302 的 153 EK-DART 外，表 20 中之所有 DART 蛋白均包含 CD3-1。

表 20. 各種 DART 格式對人可溶性 CD3 之結合親和力。

DART	配體	ka (1/Ms)	kd(1/s)	t1/2 (min)	Rmax (RU)	*% Rmax	% Chi2/Rmax	KD (nM)
153 EK-DART CD3-2	shCD3	2.77E+05	6.18E-03	1.76	80.94	55.5	0.09	22.3
153 EK-DART CD3-2	shCD3	2.83E+05	6.80E-03	1.60	62.68	31.1	0.04	24.0
						43.3	AVG	23.15 ± 0.85
153 VF-DART CD3-1	shCD3	1.13E+06	5.25E-03	2.07	90.92	69.1	0.85	4.65
153 VF-DART	shCD3	1.16E+06	5.55E-03	1.96	89.81	68.2	0.94	4.77
						68.7	AVG	4.71 ± 0.06
153 LP-DART	shCD3	4.18E+05	5.20E-03	2.09	170.3	64.7	1.07	12.4
153 LP-DART	shCD3	5.37E+05	5.72E-03	1.90	129.8	35.7	0.64	10.6
						50.2	AVG	11.5 ± 0.9
153 MP3-C端 DART	shCD3	4.20E+05	7.14E-03	1.52	133	35.3	0.29	17.0
153 MP3-C端 DART	shCD3	5.65E+05	7.19E-03	1.51	113.9	30.2	0.40	12.7
						32.8	AVG	14.9 ± 2.2
153 MP3-N端 DART	shCD3	4.74E+05	6.62E-03	1.65	120.7	32.3	0.65	14.0
153 MP3-N端 DART	shCD3	5.32E+05	5.82E-03	1.87	128.1	34.3	0.42	11.0
						33.3	AVG	12.5 ± 1.5

實施例 5

P-鈣黏蛋白 DART 蛋白之表徵

使用差示掃描量熱(DSC)分析決定噬菌體來源之 EK-DART 蛋白之熱穩定性的特徵。表 21 顯示該 P-鈣黏蛋白 EK-DART 蛋白具有有利之熱變化形廓，其 Tm1 轉變溫度高於 65℃。強制聚集分析證明 P-鈣黏蛋白 EK-DART 蛋白在 40℃ 下對熱壓力之抗性。表 21 中之所有 EK-DART 蛋白均包含 CD3-2。

表 21.P-鈣黏蛋白 EK-DART 蛋白之 DSC 分析。

DART	DSC T _{onset}	DSC T _{m1}	強制聚集 (在40°C下之聚集%)	pH 可逆性 (% 單體)
35 EK-DART	NA	67.15 ± 0.09	NA	NA
153 EK-DART	59.8	67.82 ± 0.02	41	6
154 EK-DART	63.06	68.40 ± 0.01	40	3
165 EK-DART	63.28	68.53 ± 0.01	39	<1
177 EK-DART	63.31	68.54 ± 0.01	39	1
178 EK-DART	61.96	66.92 ± 0.02	32	<1
179 EK-DART	61.56	67.15 ± 0.03	31	7
180 EK-DART	63.36	68.52 ± 0.01	32	1.5

親和力成熟之 P-鈣黏蛋白 EK-DART 蛋白之其他生物物理性質顯示於表 22a 中。這些分子之理論 pI 約為 8.5。表 22a 中之所有 EK-DART 蛋白均包含 CD3-2。

表 22a. P-鈣黏蛋白 EK-DART 蛋白之生物物理性質。

DART	計算 DART 生物化學特性					
	殘基數	莫耳質量 (g/mol)	pI	於pH 7.00 電荷	$\epsilon_{280}(\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$	$\epsilon_{280}(\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\text{cm}^{-1})$
35 EK-DART	547	57223.56	8.5	6.67	116365	2.0335
153 EK-DART	547	57179.54	8.62	7.67	116365	2.0351
154 EK-DART	547	57347.65	8.5	6.67	117855	2.0551
165 EK-DART	547	57314.63	8.5	6.67	117855	2.0563
177 EK-DART	547	57344.66	8.5	6.67	117855	2.0552
178 EK-DART	547	57250.59	8.5	6.67	116365	2.0326
179 EK-DART	547	57396.76	8.62	7.67	121865	2.1232
180 EK-DART	547	57330.63	8.5	6.67	117855	2.0557

表 22b 顯示出親和力成熟之 P-鈣黏蛋白 VF-DART 蛋白的功能性表徵。來自二種類型之細胞毒性 T 淋巴細胞 (CTL) 分析的數據顯示出沒有 E-K 卷之雙特異性異質二聚體雙功能抗體保留了細胞毒性。在 EK-DART 中可見到對配體之較高親和力相當於 CTL 之較高效力。表 22b 中之所有 VF-DART 蛋白均包含 CD3-1。

表 22b. P-鈣黏蛋白 VF-DART 蛋白之功能性表徵。

DART	Biacore 親和力 P-CAD Cyno 單體 ECD (nM)	Biacore 親和力 可溶性 CD3 (nM)	DU145 CTL (LDH) EC50 (nM)	HCT116 CTL (Luc) EC50 (nM)
153 VF-DART	0.31	4.71	0.0004	0.0005
154 VF-DART	2.85	3.69	0.0024	0.008
35 VF-DART	NT	NT	0.012	.041

表 22c 含有親和力成熟之 P-鈣黏蛋白 VF-DART 蛋白之生物物理特徵數據。VF-DART 蛋白之分析指出直到 65 °C 才檢測到聚集顯著增加。數據表明 VF-DART 格式可改善在低溫下之強制聚集變化形廓，但不影響 Tm1。LC/MS 數據指出在表現和純化之後形成適當之異質二聚體。表 22c 中之所有 VF-DART 蛋白均包含 CD3-1。

表 22c. P-鈣黏蛋白 VF-DART 蛋白之生物物理表徵數據。

DART	DSC Tm1	強制聚集	pH 敏感性 - % Increase in Aggregation	質譜觀察 (最後匯集庫)	毛細管電泳 PI 和 觀察
153 VF-DART	69.82	HMW >55C O/N 增加; 與臨床 mAb 類似之變化形廓	0	>99% 正確	8.18
154 VF-DART	70.08	HMW >55C O/N 增加; 與臨床 mAb 類似之變化形廓	0	>99% 正確	NT
35 VF-DART	68.68	HMW >55C O/N 增加; 與臨床 mAb 類似之變化形廓	0	>99% 正確	NT

實施例 6

P-鈣黏蛋白 LP-DART 蛋白之表徵

表 23 摘述以親代選殖株 P-CAD 35 和 CD3-2 產生之 8 個不同的 P-鈣黏蛋白 LP-DART 構建體(# 1 ~ # 8) 之各種功能和生物物理數據。

例如 LP-DART # 1 之第一多肽鏈(1)之名稱為：CD3 VL x P-CAD 35 VH-球形突起，其中該 CD3 VL 係指具有 SEQ ID NO：47 之抗 CD3-2 抗體 VL 結合區，P-CAD 35

VH 係指具有 SEQ ID NO：6 之抗 P-鈣黏蛋白抗體選殖株 35 VH 結合區，而“球形突起”係指具有 SEQ ID NO：63 之 Fc 球形突起鏈。LP-DART#1 之第二多肽鏈(2)之名稱為：P-CAD 35VL xCD3VH-孔，其中該 P-CAD 35VL 係指具有 SEQ ID NO：5 之抗 P-鈣黏蛋白抗體選殖株 35 VL 結合區，CD3 VH 係指具有 SEQ ID NO：46 之抗 CD3-2 抗體 VH 結合區，而“孔”係指具有 SEQ ID NO：64 之 Fc 孔鏈。分析具有序列 CPPCP(SEQ ID NO：60)及至少一個甘胺酸殘基之帶有截短之 IgG1 鉸鏈的各種半胱胺酸連接子(連接子 2)。將 LP-DART 構建體 #1-#8 與親代 35 EK-DART 進行比較。

數據證明介於 DART 部分和 Fc 結構域之間的較短連接子(連接子 2)與對各配體之較高親和力和 CTL 分析中之較高效力有關。這表明較短之連接子(連接子 2)可防止 Fc 結構域干擾在 DART 部分上之配體結合位點。該數據亦表明方向：CD3 VL x P-CAD 35 VH 孔和 P-CAD 35 VL x CD3 VH-球形突起(如 LP-DART#5 至 LP-DART#8 中所示)對產生 LP-DART 最為理想。

表 23. P-鈣黏蛋白 LP-DART 蛋白之功能和生物物理數據。

	LP-DART #1	LP-DART #2	LP-DART #3	LP-DART #4	LP-DART #5	LP-DART #6	LP-DART #7	LP-DART #8	35 EK-DART
第一鏈	CD3VLx P-CAD 35VH- 球形突起	CD3VLx P-CAD 35VH-球 形突起	CD3VLx P-CAD 35VH- 球形突起	CD3VLx P-CAD 35VH- 球形突起	CD3VLx P-CAD 35VH- 孔	CD3VLx P-CAD 35VH-孔	CD3VLx P-CAD 35VH-孔	CD3VLx P-CAD 35VH-孔	
第二鏈	P-CAD 35VLx CD3VH- 孔	P-CAD 35VLx CD3VH- 孔	P-CAD 35VLx CD3VH- 孔	P-CAD 35VLx CD3VH- 孔	P-CAD 35VLx CD3VH- 球形突起	P-CAD 35VLx CD3VH- 球形突起	P-CAD 35VLx CD3VH- 球形突起	P-CAD 35VLx CD3VH- 球形突起	
連接子 (連接子 2)	GCPPCP SEQ ID NO: 73	GGTGG CPPCP SEQ ID NO:74	GEPKSS DKTHTC PPCP SEQ ID NO:75	GGTGG GEPKSS DKTHTC PPCP SEQ ID NO:76	GCPPCP SEQ ID NO: 73	GGTGG CPPCP SEQ ID NO:74	GEPKSS DKTHTC PPCP SEQ ID NO:75	GGTGG GEPKSS DKTHTC PPCP SEQ ID NO:76	
截留 產量 (mg/L)	24	23	35	28	20	24	27	34	5
截留後 % 聚集	40%	37%	33%	39%	33%	40%	40%	45%	7%
Cyno- Pcad KD (nM)	108.0	73.5	85.7	128.0	62.1	86.6	96.6	104.0	42.8
shCD3 KD (nM)	32.9	47.9	47.2	55.1	30.2	42.1	49.1	55.6	17.1
T cell Cytotoxicity (nM)	0.79	0.92	1.60	2.45	0.74	1.29	2.85	2.27	0.33

表 24 顯示出納入高親合力 P-鈣黏蛋白 VH 和 VL 結合結構域及高親和力抗 CD3 VH 和 VL 結合結構域之數個 P-鈣黏蛋白 LP-DART 蛋白在玻管內的功能性表徵。這些數據證明增加之親和力與增加之 CTL 效力有關；類似於在 P-鈣黏蛋白 VF-DART 和 EK-DART 格式中所觀察到之關聯性。表 24 中之所有 LP-DART 蛋白均包含 CD3-1。如同 33、34 及 35 親代選殖株，153 LP-DART 不結合至鼠 P-鈣黏蛋白。

表 24.P-鈣黏蛋白 LP-DART 蛋白之功能性表徵。

DART	Biacore 親和力 Cyno P-鈣黏蛋白單體 ECD (nM)	Biacore 親和力 鼠 P-鈣黏蛋白 ECD	Biacore 親和力 溶性 CD3 (nM)	DU145 CTL (LDH) EC50 (nM)	HCT116 CTL (Luc) EC50 (nM)
153 LP-DART	0.521	NB	11.5	0.0006	0.0004
154 LP-DART	5.5	NT	7.18	0.0017	0.0072
35 LP-DART	NT	NT	NT	0.0073	0.107

NT =未測試; NB=無結合

表 25 顯示出數個 P-鈣黏蛋白 LP-DART 蛋白之生物物理特徵。P-鈣黏蛋白 LP-DART 蛋白之 DSC 顯示出與使用 P-鈣黏蛋白 EK-DART 和 VF-DART 蛋白所取得者類似之 Tm1 值。強制聚集分析表明在較低之溫度下穩定性較 P-鈣黏蛋白 EK-DART 格式更提升且整體變化形廓類似於臨床 mAb。LC/MS 數據指出在表現和純化後形成適當之異質二聚體。表 25 中之所有 LP-DART 蛋白均包含 CD3-1。

表 25.P-鈣黏蛋白 LP-DART 蛋白之生物物理特性。

構建體	DSC Tm1	強制聚集	pH 敏感性 - 聚集增加%	質譜觀察 (最後匯集庫)	毛細管電泳 pI 和 觀察值
153 LP-DART	68.91	HMW >55C O/N 增加; 類似於臨床 mAb 之變化形廓	0	>99% 正確	8.26, 接近
154 LP-DART	68.63	HMW >55C O/N 增加; 類似於臨床 mAb 之變化形廓	0	>99% 正確	NT
35 LP-DART	68.39	HMW >55C O/N 增加; 類似於臨床 mAb 之變化形廓	0	>99% 正確	NT

NT =未測試

表 26 提供結合至 cyno P-鈣黏蛋白 ECD 和可溶性 CD35₈₈ 之 P-鈣黏蛋白 LP-DART 蛋白、153 LP-DART 和 154 LP-DART 的 Biacore SPR 數據。該數據證明與對應之

EK-DART 的親和力相比較，彼等對各配體之親和力稍微下降。表 26 中之所有 LP-DART 蛋白均包含 CD3-1。

表 26.P-鈣黏蛋白 LP-DART 蛋白對 cyno P-鈣黏蛋白和可溶性 CD35 之結合性質。

DART	配體	ka (1/Ms)	kd(1/s)	t1/2 (min)	Rmax (RU)	*% Rmax	% Chi2/Rmax	KD (nM)
153 LP-DART	Cyno P-鈣黏蛋白	2.93E+05	2.00E-04	54.36	36.6	12.1	0.16	0.683
		5.81E+05	2.09E-04	52.20	75.1	11.7	0.37	0.359
						11.9	AVG	0.521 ± 0.162
154 LP-DART	Cyno P-鈣黏蛋白	6.07E+05	3.32E-03	3.27	46.29	32.3	0.49	5.47
		6.20E+05	3.43E-03	3.18	46.38	32.4	0.56	5.53
						32.35	AVG	5.50 ± 0.03
153 LP-DART	shCD3	4.18E+05	5.20E-03	2.09	170.3	64.7	1.07	12.4
		5.37E+05	5.72E-03	1.90	129.8	35.7	0.64	10.6
						50.2	AVG	11.5 ± 0.9
154 LP-DART	shCD3	6.13E+05	4.42E-03	2.47	476.7	42.5	5.73	7.20
		6.37E+05	4.56E-03	2.39	475.0	42.3	5.41	7.16
						42.4	AVG	7.18 ± 0.02

實施例 7

定量 P-鈣黏蛋白之表現

A.在用於玻管內研究之經遺傳工程處理以表現螢光素酶的癌細胞株上定量 P-鈣黏蛋白之表現

進行流式細胞術實驗以評估抗 P-鈣黏蛋白 mAb(PF-03732010)結合，以測定在 10 種癌細胞株之小組間的內源性細胞表面 P-鈣黏蛋白表現之相對水準。將用於玻管內試驗之所有腫瘤細胞株進行遺傳工程處理以表現螢光素酶。依用於飽和 FACS 結合之描述收集顯示出在一個範圍內之 P-鈣黏著蛋白受體表現的腫瘤細胞株。將每一樣本之

2.5×10^5 細胞轉移至 96 孔圓底聚丙稀培養盤。在室溫下，以 $5\mu\text{g/ml}$ 和 $10\mu\text{g/ml}$ 之經藻紅蛋白(phycoerythrin)(PE)標記的抗人 P-鈣黏蛋白 mAb(PF-03732010)(mAb 與 PE(eBioscience)係以 1:1 之比例共軛結合)為細胞染色 30 分鐘或以與對照組小鼠 IgG1mAb(Biolegend)共軛結合之 PE 為細胞染色 30 分鐘。使用 LSR II，以 FACS Diva 軟體取得細胞之前，以 FACS 緩衝液加上 10ng/ml 碘化丙啶清洗細胞並將其重新懸浮。使用 0.5mL FACS 緩衝液將 QuantiBRITE PE 小珠(BD Pharmingen)重構成，並以與腫瘤細胞樣本相同之電壓設定，使用 LSR II 取得。依照製造商規定之用於 QuantiBRITE PE 小珠套組的實驗計劃，使用小珠和腫瘤細胞二者之 PE 幾何平均螢光強度來計算每一個細胞結合之經 PE 標記的抗體數目(ABC)。以 $5\mu\text{g/mL}$ 和 $10\mu\text{g/mL}$ 之用於各腫瘤細胞株之經 PE 標記的抗人 P-鈣黏蛋白 mAb 進行 Quantibrite 分析以測定平均受體密度之 Log_{10} 值，使用 GraphPad Prism 5.0 軟體，將所測定之平均受體密度之 Log_{10} 值相對於相同靶的腫瘤細胞株之平均玻管內細胞毒性 EC_{50} 的 Log_{10} 值進行繪圖，以測定介於受體密度和細胞毒性 EC_{50} 之間的線性回歸曲線擬合。

表 27 中所顯示，在整個小組和與源自多種癌症類型(包括乳癌、肺癌和結腸直腸癌)之細胞株結合的抗 P-鈣黏蛋白 mAb 之間可觀察到廣範圍之細胞表面 P-鈣黏蛋白表現。相反地，該對照 mAb 並未表現出可察知之結合。MFI = 平均螢光強度；ABC = 每一細胞結合之抗體。

表 27. 在表現螢光素酶之癌細胞株上之內源性細胞表面 P-鈣黏蛋白表現水準。

細胞株	腫瘤類型	MFI, 對照組 mAb	MFI, P-鈣黏蛋白 mAb	ABC, P-鈣黏蛋白 mAb
H1650_Luc	肺癌	254	7,958	37,582
HCT116_Luc	結腸直腸癌	229	5,661	26,421
BT20_Luc	乳癌	225	5,235	24,349
SUM149_Luc	乳癌	213	3,717	16,982
H322_Luc	肺癌	242	3,233	16,576
H1975_Luc	肺癌	373	3,155	15,429
LoVo_Luc	結腸直腸癌	175	1,389	5,805
SW480_Luc	結腸直腸癌	151	1,256	5,304
HT29_Luc	結腸直腸癌	282	787	2,421
Ls174T_Luc	結腸直腸癌	94	290	929
Colo205_Luc	結腸直腸癌	173	357	874
SW620_Luc	結腸直腸癌	125	276	715

B.在用於活體內研究之 癌細胞株上定量 P-鈣黏蛋白之表現

進行流式細胞術實驗以評估抗 P-鈣黏蛋白 mAb(PF-03732010)結合，以測定在用於活體內研究之癌細胞株小組之間的內源性細胞表面 P-鈣黏蛋白表現之相對水準。依用於飽和 FACS 結合之描述收集顯示出在一個範圍內之 P-鈣黏著蛋白受體表現的腫瘤細胞株。將每一樣本之 2.5×10^5 細胞轉移至 96 孔圓底聚丙烯培養盤。在室溫下，以 $5 \mu\text{g/ml}$ 和 $10 \mu\text{g/ml}$ 之經藻紅蛋白(PE)標記的抗人 P-鈣黏蛋白 mAb(PF-03732010) (mAb 與 PE(eBioscience)係以 1 : 1 之比例共軛結合)為細胞染色 30 分鐘或以 $7.5 \mu\text{g/ml}$ 之與對照組小鼠 IgG1mAb(Biolegend)共軛結合之 PE 為細胞染色 30 分鐘。使用 LSR II，以 FACS Diva 軟體取得細胞之前，以 FACS 緩衝液加上 10ng/ml 碘化丙啶清洗細胞並將其重新懸浮。使用 0.5mL FACS 緩衝液將

QuantiBRITE PE 小珠(BD Pharmingen)重構成，並以與腫瘤細胞樣本相同之電壓設定，使用 LSR II 取得。依照製造商規定之用於 QuantiBRITE PE 小珠套組的實驗計劃，使用小珠和腫瘤細胞二者之 PE 幾何平均螢光強度來計算每一個細胞結合之經 PE 標記的抗體數目(ABC)。

在源自結腸直腸癌和乳癌之細胞株上觀察到廣範圍之細胞表面 P-鈣黏蛋白表現並據此評定等級；如表 28 中所示，HCT116> SUM149> SW480> LS174T> SW620。相反地，該同種異型對照 mAb 對任何細胞株均未顯示出可察知之結合。

表 28. 在癌細胞株上之內源性細胞表面 P-鈣黏蛋白表現水準。

細胞株	腫瘤類型	MFI, 對照組 mAb	MFI, P-鈣黏蛋白 mAb	ABC, P-鈣黏蛋白 mAb
HCT116	結腸直腸癌	239	8,033	43,801
SW480	結腸直腸癌	171	2,468	12,665
Ls174T	結腸直腸癌	222	986	4,160
SW620	結腸直腸癌	88	297	1,117
SUM149	乳癌	68	2,872	15,426

實施例 8

玻管內細胞毒性分析

A. EK-DART 細胞毒性 T 淋巴細胞(CTL)分析

依先前之描述 (Moore et al.,Blood, 117(17): 4542-4551, 2011)，在 T 細胞定向之細胞滅殺分析中篩選顯示出強力之重組 P-鈣黏蛋白/CD3 蛋白結合及強烈之細胞結合信號(> 3x 背景或 EC50 約等於 PF03732010-DART)的 EK-DART 蛋白。表 29 顯示出有效之對本發明之 P-鈣黏蛋

白 EK-DART 蛋白的 T 細胞定向細胞毒性。如使用 LDH 釋出分析所測得者，在 E：T 比為 30：1 之人 PBMC 的存在下，經遺傳工程處理以過度表現人 P-鈣黏蛋白之 CHO 細胞和內源性表現高水準 P-鈣黏蛋白之癌細胞株(H1650) 在培育 24 小時後同時被 EK-DART 蛋白有效溶解。如同以 P-鈣黏蛋白 EK-DART 分子重新定向之 T 細胞滅殺的作用機制所預期者，將培育時間延長至 40 小時可進一步增加細胞滅殺的效力。相反地，如同基於缺乏 P-鈣黏蛋白之表現所預期者，在親代 CHO 細胞株上未觀察到滅殺。表 29 中之所有 EK-DART 蛋白均包含 CD3-2。

表 29. 對 P-鈣黏蛋白 EK-DART 蛋白之 T 細胞定向的細胞毒性。

DART	CHO-CDh3 (24h) EC50 (nM)	H1650 (24h) EC50 (nM)	H1650 (40h) EC50 (nM)
33 EK-DART	0.309	4.104	1.124
34 EK-DART	0.7365	5.604	1.6
35 EK-DART	0.0398	0.5014	0.0532
PF EK-DART	0.0284	0.4038	0.505
20 EK-DART	168.64	36.44	NT
30 EK-DART	NR	NR	NT

對抗表現人 P-鈣黏蛋白和組成性表現螢光素酶報告子構建體之腫瘤細胞，經優化的 P-鈣黏蛋白 EK-DART 蛋白的 T 細胞定向之細胞毒性顯示於表 30 中。表 30 中之所有 EK-DART 蛋白均包含 CD3-2。

表 30. 對 P-鈣黏蛋白 EK-DART 蛋白之 T 細胞定向的細胞毒性。

DART	HCT116 Luc 48hr 10:1 D43905 EC50 nM	H1650 LDH 24hr 30:1 D41183 EC50 nM
153 EK-DART	0.0005	0.0008
154 EK-DART	0.0166	0.0107
165 EK-DART	0.0015	0.0011
177 EK-DART	0.0007	0.0011
178 EK-DART	0.0018	0.0008
179 EK-DART	0.0432	0.0178
180 EK-DART	0.0018	0.0016
35 EK-DART	0.2051	0.1016

B. LP-DART 細胞毒性 T 淋巴細胞(CTL)分析

藉由細胞毒性 T 淋巴細胞(CTL)分析評估經介導之 153 LP-DART 的細胞滅殺。在逐漸增加濃度之 153 LP-DART 的存在下，以比例為 10：1 之效應子(T 細胞)對靶的(CHO 細胞)將 CHO 親代和 CHO P-鈣黏蛋白細胞與 CD3+T 細胞一起培育。48 小時後測量細胞存活力，計算出之半最大有效濃度(EC50)為 0.41pM。結果顯示出 153 LP-DART 表現出對 CHO P-鈣黏蛋白細胞具強大滅殺力，但在上述陰性對照組 CHO 親代細胞上未測到活性。因此，CTL 活性係取決於 P-鈣黏蛋白表現。

藉由細胞毒性 T 淋巴細胞(CTL)分析評估經介導之 153 LP-DART 的腫瘤滅殺。分析經優化之 153 LP-DART 蛋白對抗表現人 P-鈣黏蛋白和組成性表現之螢光素酶報告子構建體的腫瘤細胞之 T 細胞定向的細胞毒性。在逐漸增加濃度之 153 LP-DART 的存在下，以 3：1 之效應子(T 細胞)對靶的(腫瘤細胞)的比例將 CD3+T 細胞與一組癌細胞株一起培育。72 小時後測量細胞存活力並計算各癌細胞株之半最大有效濃度(EC50)(如表 31 中所示)。該數據證明

153 LP-DART 在癌症模型中介導有效之抗腫瘤活性。
EC50 =半最大有效濃度；S.D.=標準偏差；pM =微微莫耳；NA =無活性。

表 31. 在表現螢光素酶之癌細胞株中的 153 LP-DART 之細胞毒性 T 淋巴細胞活性。

細胞株	腫瘤類型	EC50 ± S.D. (pM)
H1650_Luc	肺癌	4.24 ± 0.66
HCT116_Luc	結腸直腸癌	5.6 ± 3.61
BT20v_Luc	乳癌	4.72 ± 2.43
SUM149_Luc	乳癌	0.35 ± 0.10
H1975_Luc	肺癌	0.96 ± 0.31
H322_Luc	肺癌	5.78 ± 3.09
LoVo_Luc	結腸直腸癌	1.65 ± 0.91
SW480_Luc	結腸直腸癌	53.37 ± 30.73
HT29_Luc	結腸直腸癌	41.19 ± 22.17
Ls174T_Luc	結腸直腸癌	1439.07 ± 2462.25
Colo205_Luc	結腸直腸癌	191.28 ± 203.58
SW620_Luc	結腸直腸癌	NA

C.CTL 活性對細胞表面 P-鈣黏蛋白表現水準的比較

收集來自 A 部分之顯示出在一個範圍內之 P-鈣黏著蛋白受體表現的腫瘤細胞株並將每一樣本之 2.5×10^5 細胞轉移至 96 孔圓底聚丙烯培養盤。在室溫下，以 $5 \mu\text{g/ml}$ 和 $10 \mu\text{g/ml}$ 之經藻紅蛋白(PE)標記的抗人 P-鈣黏蛋白 mAb(輝瑞 PF-03732010) (mAb 與 PE(eBioscience)係以 1：1 之比例共軛結合)為細胞染色 30 分鐘或以與對照組小鼠 IgG1mAb(Biolegend)共軛結合之 PE 為細胞染色 30 分鐘。使用 LSR II，以 FACS Diva 軟體取得細胞之前，以 FACS 緩衝液加上 10ng/ml 碘化丙啶清洗細胞並將其重新懸浮。使用 0.5mL FACS 緩衝液將 QuantiBRITE PE 小珠(BD Pharmingen)重構成，並以與腫瘤細胞樣本相同之電壓設定，使用 LSR II 取得。依照製造商規定之用於

QuantiBRITE PE 小珠套組的實驗計劃，使用小珠和腫瘤細胞二者之 PE 幾何平均螢光強度來計算每一個細胞結合之經 PE 標記的抗體數目(ABC)。

以 5 μ g/mL 和 10 μ g/mL 之用於各腫瘤細胞株之經 PE 標記的抗 P-鈣黏蛋白 mAb 進行 Quantibrite 分析以測定平均受體密度之 Log₁₀ 值，使用 GraphPad Prism 5.0 軟體，將所測定之平均受體密度之 Log₁₀ 值相對於相同靶的腫瘤細胞株之平均玻管內細胞毒性 EC₅₀ 的 Log₁₀ 值進行繪圖，以測定介於受體密度和細胞毒性 EC₅₀ 之間的線性回歸曲線擬合。如第 8 圖中所示，較低之 EC₅₀ 與增加之抗 P-鈣黏蛋白 mAb 與細胞表面結合之間有顯著的關係，P 值 = 0.0127。這表明 CTL 活性與 P-鈣黏蛋白表現水準相關。

實施例 9

人 PBMC 重構異種移植研究

依下述在活體內異種移植重構實驗中測試各種顯示出強力之 T 細胞定向的細胞毒性(<10ng/ml EC₅₀)之 DART 蛋白。

A. 從人全血分離 PBMC 和 T 細胞

藉由使用 Ficoll 梯度離心，從全血中分離出來自健康人供體之 PBMC。簡單地說，以無菌 PBS 將全血 1:1 稀釋。將 35mL 之稀釋血液層疊在 50mL 試管中之 15mL FICOLL-PAQUE™ PLUS 上，將試管在 1400rpm 離心 20

分鐘並關閉剎車。將二種相之間的淺黃覆蓋層收集入 50 mL 試管中並以 45 mL PBS，經由在 $600\times g$ (1620rpm) 離心 5 分鐘清洗之。丟棄上清液並以 PBS 清洗細胞小丸一次，藉由錐蟲藍染料排除法測定活細胞數。將 PBMC 重新懸浮在完全培養基 (RPMI 1640、10%FBS、2mM 麩胺鹽胺、10mM HEPES、 $100\mu\text{g}/100\mu\text{mL}$ 青黴素/鏈黴素(P/S)) 中，使 PBMC 之最終濃度為 2.5×10^6 細胞/mL。

B. T 細胞分離及活化

根據 RosettaSep T 細胞分離套組中所提供之製造商之實驗計劃，從肝素化之全血分離出人 T 細胞。接著，將該純化之 T 細胞與抗 CD3 (OKT-3； $1\mu\text{g}/\text{mL}$) 和抗 CD28 ($66\mu\text{g}/\text{mL}$) 抗體接觸 48 小時以活化該 T 細胞。刺激後，在 IL-2 (7.6 毫微克/毫升) 之存在下，使細胞生長在具有 10%FBS 和 1% 青黴素/鏈黴素之 RPMI1640 培養基中長達 3 週。

C. 腫瘤模型

將人 T 細胞和腫瘤細胞 (HCT116、Du145 或 H1650) 以 1:5 (分別為 1×10^6 和 5×10^6) 之比例合併並懸浮在 200 μL 之無菌生理鹽水中，再於研究第 0 天 (SD0) 經由皮下途徑注射 (SC)。在 SD0、1、2 和 3，藉由尾靜脈注射，經靜脈內途徑 (IV) 投予在 100 μL 中之各種 P-鈣黏蛋白 EK-DART (CD3-2)、P-DART (CD3-1) 或對照 DART (CD3-2) 蛋白

連同對照組。各治療組包含 8 隻動物。

HCT116 腫瘤模型中之 P-CAD 177 EK-DART：將劑量為 0.5、0.2、0.1 或 0.05mg/kg 之 P-CAD 177 EK-DART 投予四個治療組並將載劑對照組(單獨植入之 HCT116 細胞或+T 細胞)投予一個治療組(0mg/kg)。

HCT116 腫瘤模型中之 P-CAD 153 EK-DART：將劑量為 0.5、0.2、0.1 或 0.05mg/kg 之 P-CAD 153 EK-DART 投予四個治療組並將載劑對照組(單獨植入之 HCT116 細胞或+T 細胞)投予一個治療組(0mg/kg)。

HCT116 腫瘤模型中之 P-CAD 154 EK-DART：將劑量為 0.5、0.2、0.1 或 0.05mg/kg 之 P-CAD 154 EK-DART 投予四個治療組並將載劑對照組(單獨植入之 HCT116 細胞或+T 細胞)投予一個治療組(0mg/kg)。

HCT116 腫瘤模型中之 P-CAD 35 EK-DART：將劑量為 0.5、0.2、0.1 或 0.05mg/kg 之 P-CAD 35 EK-DART 投予四個治療組並將載劑對照組(單獨植入之 HCT116 細胞或+T 細胞)投予一個治療組(0mg/kg)。

HCT116 腫瘤模型中之 P-CAD 153 LP-DART：將劑量為 0.5、0.2、0.1 或 0.05mg/kg 之 P-CAD 153 LP-DART 或載劑對照組(單獨植入之

HCT116 細胞或+T 細胞)投予治療組。

HCT116 腫瘤模型中之 P-CAD 153 LP-DART：將劑量為 100、10、1、0.1 或 0.01μg/kg 之 P-CAD 153 LP-DART 或載劑對照組(單獨植入之 HCT116 細胞)、載劑對照組(植

入之 HCT116 細胞 +T 細胞) 或 4420-hXR32 LP-DART(100μg/kg)對照組投予治療組。

Du145 腫瘤模型中之 P-CAD 153 LP-DART：將劑量為 100、10、1、0.1 或 0.01μg/kg 之 P-CAD 153 LP-DART 或載劑對照組(單獨植入之 Du145 細胞)、載劑對照組(植入之 HCT116 細胞 +T 細胞) 或 4420-hXR32 LP-DART(100μg/kg)對照組投予治療組。

H1650 腫瘤模型中之 P-CAD 153 LP-DART：將劑量為 100、10、1、0.1 或 0.01μg/kg 之 P-CAD 153 LP-DART 或載劑對照組(單獨植入之 H1650 細胞)、載劑對照組(植入之 H1650 細胞 +T 細胞) 或 4420-hXR32 LP-DART(100μg/kg)對照組投予治療組。

C. 收集數據和統計分析

動物重量：在注射腫瘤細胞之時間開始每週記錄個別動物的體重二次，直到研究完成。

瀕死/死亡率：每週觀察動物的總體瀕死情形二次，並每日觀察動物之死亡率。評估動物之死亡為與藥物相關或技術上基於，包括大體觀察和體重減輕之因素；每日記錄動物死亡。

腫瘤體積：在植入腫瘤一週內開始每週記錄個別腫瘤體積二次，一直持續到研究完成。

$$\text{腫瘤體積(mm}^3\text{)} = \frac{\text{長(mm)} \times \text{寬}^2}{2}$$

從計算數據來審查經歷技術或藥物相關之死亡的動物。

腫瘤生長抑制：使用下列公式計算包含經治療之動物的每一組之腫瘤生長抑制(TGI)數值：

$$1 - \frac{\text{最終腫瘤體積平均值(經治療的)} - \text{初始腫瘤體積平均值(經治療的)}}{\text{最終腫瘤體積平均值(對照組)} - \text{初始腫瘤體積平均值(對照組)}} \times 100$$

從計算之 TGI 來審查經歷部分或完全反應之動物，或經歷技術相關或藥物相關之死亡的動物。國家癌症協會之化合物活性的標準為 $TGI > 58\%$ (Corbett et al. (2004) *Anticancer Drug Development Guide*; Totowa, NJ: Humana 99-123)。

部分/完整腫瘤反應：將第 1 天之腫瘤測量值小於 1mm^3 的個別小鼠歸類為具有部分反應(PR) 並使用下列公式測定腫瘤消退百分比(%TR)數值：

$$1 - \frac{\text{最終腫瘤體積}(\text{mm}^3)}{\text{初始腫瘤體積}(\text{mm}^3)} \times 100$$

缺乏可觸知之腫瘤的個別小鼠被歸類為經歷完整反應(CR)。

腫瘤體積統計：在治療組和對照組之間進行比較腫瘤體積之統計分析。在這些分析方面，使用方差雙向分析，再使用 Bonferroni 事後檢定。使用 GraphPad PRISM®軟體(5.02 版本)進行所有分析。從分析中審查來自經歷技術或藥物相關之死亡的個別動物之重量和腫瘤數據。不過，來自報告部分或完全反應之動物的腫瘤數據包含在這些計

算中。

D. HCT116 腫瘤模型結果

將細胞株 HCT116 與活化之 T 細胞預先混合並在研究第 0 天(SD0) 依上文中之詳細描述經由皮下(SC) 植入 NOD/SCID γ 基因剔除小鼠中(N = 8/組)。在植入腫瘤細胞/T 細胞混合物的同一天[(SD0)]開始以各種 P-鈣黏蛋白 EK-DART、LP-DART 或對照組 DART 蛋白進行治療，隨後額外進行每日注射 3 天，共進行 4 次每日注射。以 4 種劑量水準(0.5、0.2、0.1 和 0.05mg/kg)之 P-鈣黏蛋白 EK-DART、LP-DART 或對照組 DART 蛋白治療動物。結果顯示於第 9-14 圖中。

載劑治療組(單獨之 HCT 116 細胞或加上 T 細胞)中之 HCT 116 腫瘤顯示出相對積極生長的活體內變化形廓。在研究第 20 天 (SD20)，載劑治療組中之腫瘤的平均體積為約 125mm³，而到研究第 35 天(SD35)前，腫瘤平均體積已經達到約 450 mm³。在研究第 45 天(SD45)實驗結束前，腫瘤平均體積已經達到約 750 mm³。對大部分測試之 P-鈣黏蛋白 DART 蛋白而言，在所有劑量水準下 HCT 116 腫瘤之生長受到明顯抑制。在 SD45 實驗結束前，所有治療組之腫瘤平均體積範圍為約 100 至 0 mm³，除了 177 EK-DART 之腫瘤平均體積範圍為約 500 至 100 mm³。

E. Du145 結果

將細胞株 Du145 與活化之 T 細胞預先混合並在 SD0 依上文中之詳細描述，經由 SC 植入 NOD/SCID γ 基因剔除小鼠中(N = 8/組)。在植入腫瘤細胞/T 細胞混合物的同一天[(SD0)]開始以 153 LP-DART 進行治療，隨後額外進行每日注射 3 天，共進行 4 次每日注射。以 5 種劑量水準(100、10、1、0.1 和 0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$)之 153 LP-DART 治療動物。結果顯示於第 15 圖中。

在載劑治療組(單獨之 Du145 細胞或加上 T 細胞)中之 Du145 腫瘤顯示出在活體內具有相對積極生長的變化形廓。Du145 腫瘤之生長受到劑量水準為 100、10 和 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之 153 LP-DART 明顯抑制，且在實驗結束(SD74)前，腫瘤平均體積為 0 mm^3 。劑量水準為 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之 153 LP-DART 明顯抑制 Du145 腫瘤之生長且在實驗結束前(SD74)，腫瘤的平均體積為約 500 mm^3 。

F. H1650 結果

將細胞株 H1650 與活化之 T 細胞預先混合並在 SD0 依上文中之詳細描述，經由 SC 植入 NOD/SCID γ 基因剔除小鼠中(N = 8/組)。在植入腫瘤細胞/T 細胞混合物的同一天[(SD0)]開始以 153 LP-DART 進行治療，隨後額外進行每日注射 3 天，共進行 4 次每日注射。以 5 種劑量水準(100、10、1、0.1 和 0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$)之 153 LP-DART 治療動物。結果顯示於第 16 圖中。

在載劑治療組(單獨之 H1650 細胞或加上 T 細胞)中之

H1650 腫瘤顯示出具有相對積極生長的活體內變化形廓。H1650 腫瘤之生長明顯受到劑量水準為 100、10 和 1 μ g/kg 之 153 LP-DART 抑制，且在實驗結束(SD49)前，腫瘤平均體積為 50 mm³。劑量水準為 0.1 μ g/kg 之 153 LP-DART 明顯抑制 H1650 腫瘤之生長且在實驗結束(SD49)前，腫瘤的平均體積為約 400 mm³。

在 Winn 模型之背景下，當在植入當日開始給藥並持續 3 天或連續更多天時，各種 EK-DART、LP-DART 和對照 DART 蛋白可有效地抑制 SC 植入 NOD/SCID 小鼠中之 HCT116、Du145 和 H1650 腫瘤的生長。根據國家癌症協會所建立之標準，在三種模型中，劑量水準為 0.1mg/kg 及更高之各種 DART 蛋白(TGI> 58)被認為是有活性的。

實施例 10

建立之腫瘤人 PBMC 移植模型

根據定量型流式細胞術分析，設立四個藉著 P-鈣黏蛋白高(HCT116)、中(SW480)、低(Ls174T)和陰性(SW620)表現分類之獨立的人大腸結腸癌的異種移植腫瘤模型。HCT116 顯示出相對最高之細胞表面 P-鈣黏蛋白表現水準(43,801ABC，表 28)，SW480 顯示出相對適度之細胞表面 P-鈣黏蛋白表現水準(12,665 ABC，表 28)，而 Ls174T 顯示出相對低之細胞表面 P-鈣黏蛋白表現水準(4,160 ABC，表 28)。

在第 0 天，經由皮下途徑在 NOD scid γ (NSG)動物右

側植入 5×10^6 HCT116、 5×10^6 SW480、 2×10^6 Ls174T 或 5×10^6 SW620 腫瘤細胞。根據預測之腫瘤生長隨機分組(第 5 天)的前 7 天經由腹膜內途徑為動物注射 0.2 毫升在 PBS 中之細胞懸浮液，以為動物接種 5×10^6 新鮮分離之人外周血單核細胞(PBMC)。PBMC 植入後一週(第 12 天)，測量所有研究動物之腫瘤體積並收集用於流式細胞術之血液樣本。以 BD Pharmlyse 溶液(BD Pharmingen)溶解來自各樣本之紅血球細胞，將所產生之細胞小丸進行人 CD3、人 CD4 和人 CD8 染色並使用 BD Pharmingen LSR II，以 FACS Diva 軟體，藉由流式細胞術分析。建立每一隻動物之藉由前向散射相對側邊散射門控所測定之以淋巴細胞總數之百分比表示的人 CD3+細胞。使用數字游標卡尺(digital vernier caliper) (Mitutoyo America，伊利諾州 Aurora)收集腫瘤測量值，並藉由使用經修改之橢球公式 $1/2(\text{寬度}^2 \times \text{長度})$ 計算體積。

使用雙參數隨機化來建立每組包含 10 隻動物之治療組，腫瘤體積和人 CD3+細胞植入值之間權重相等。經由靜脈內注射，在每隻動物之側尾靜脈給予動物劑量為 0.05mg/kg 或 0.5 mg/kg 之 153 LP-DART(CD3-1)、0.5mg/kg 之陰性對照雙特異性(抗 FITC 和 CD3 ϵ 異質二聚體雙功能抗體 Fc 融合蛋白)或作為載劑之 DPBS。每二週收集腫瘤測量值以相對於對照組評估對腫瘤生長之抑制，並持續監測移植物抗宿主病(例如體重下降、脫髮、駝背姿勢)之跡象。

顯現出腫瘤體積(mm³)相對時間作圖之腫瘤生長圖顯示於第 17A-17D 圖中，對應之數據表顯示於下列表 32-35 中。該數據證明每週投予用於 HCT116(高)、SW480(中)腫瘤模型之最高劑量(0.5mg/kg)時會導致腫瘤消退，而投予用於 LSs174T(低)腫瘤模型之最高劑量(0.5mg/kg)時會導致適度功效。與經載劑治療之小鼠相比較，投予陰性對照雙特異性抗體顯示出並未增加腫瘤抑制。在 HCT116 腫瘤模型中，第 17A 圖顯示出在 0.05 和 0.5mg/kg 之 153 LP-DART 劑量下，腫瘤生長抑制(TGI)分別為 61.9%和 105.1%。第 17A-17D 圖進一步證明已建立之異種移植腫瘤的腫瘤生長抑制係取決於 P-鈣黏蛋白表現水準。

表 32. 在 HCT116 腫瘤模型中之腫瘤生長抑制。

從研究開始的天數	載劑		0.5 mg/kg 對照 LP-DART		0.05 mg/kg P-鈣黏蛋白 LP-DART		0.5 mg/kg P-鈣黏蛋白 LP-DART	
	平均腫瘤體積 (mm ³)	SEM	平均腫瘤體積 (mm ³)	SEM	平均腫瘤體積 (mm ³)	SEM	平均腫瘤體積 (mm ³)	SEM
0	107	13	106	13	105	12	106	12
3	436	58	522	35	426	74	608	73
6	759	92	766	71	410	52	511	95
9	871	124	929	115	444	56	241	49
13	1005	127	1017	93	446	42	60	10

表 33. 在 SW480 腫瘤模型中之腫瘤生長抑制。

從研究開始的天數	載劑		0.5 mg/kg 對照 LP-DART		0.05 mg/kg P-鈣黏蛋白 LP-DART		0.5 mg/kg P-鈣黏蛋白 LP-DART	
	平均腫瘤體積 (mm ³)	SEM	平均腫瘤體積 (mm ³)	SEM	平均腫瘤體積 (mm ³)	SEM	平均腫瘤體積 (mm ³)	SEM
0	67	6	68	7	68	6	64	7
4	132	14	130	18	123	13	101	13
7	167	12	180	37	129	8	81	13
11	232	31	216	40	157	20	26	3
14	305	39	278	42	240	41	10	3

表 34. 在 Ls174T 腫瘤模型中之腫瘤生長抑制。

從研究開始的天數	載劑		0.5 mg/kg 對照 LP-DART		0.05 mg/kg P-鈣黏蛋白 LP-DART		0.5 mg/kg P-鈣黏蛋白 LP-DART	
	平均腫瘤體積 (mm ³)	SEM	平均腫瘤體積 (mm ³)	SEM	平均腫瘤體積 (mm ³)	SEM	平均腫瘤體積 (mm ³)	SEM
0	121	12	121	14	118	13	126	18
3	301	43	328	40	366	51	393	51
7	686	103	801	59	619	104	420	107
10	1142	175	1099	116	796	110	451	106
14	1565	253	1456	206	1072	152	751	158

表 35. 以移植之人 T 細胞抑制 SW620 之腫瘤生長。

從研究開始的天數	載劑		0.5 mg/kg 對照 LP-DART		0.05 mg/kg P-鈣黏蛋白 LP-DART		0.5 mg/kg P-鈣黏蛋白 LP-DART	
	平均腫瘤體積 (mm ³)	SEM	平均腫瘤體積 (mm ³)	SEM	平均腫瘤體積 (mm ³)	SEM	平均腫瘤體積 (mm ³)	SEM
0	308	29	305	29	319	28	304	28
3	467	74	605	76	440	37	441	64
7	622	102	628	91	480	47	528	106
10	1014	219	930	125	790	117	767	106

第 17E 圖顯示出在 HCT116 腫瘤模型中，在移植後第 25 天收集之腫瘤體積(mm³)的單向 ANOVA 分析，此係使用 Dunnet 氏多重比較試驗相對於載劑對照組進行。該數據證明在給予劑量為 0.05 mg/kg 和 0.5mg/kg 之 153 LP-DART 的組別中腫瘤生長均明顯受抑制(* p<0.05)。

帶有 HCT116 腫瘤之 NSG 動物經 P-鈣黏蛋白 153 LP-DART 治療後的藥代動力學分析結果顯示於表 36 中。投予動物單次 0.05 或 0.5 mg/kg 之 153 LP-DART 的 IV 劑量，並在給藥後之指定時間點將 n= 3 組別中之動物安樂死以收集血清和腫瘤。藉由三明治 ELISA，相對標準曲線進行 LP-DART 的分析。該 153 LP-DART 在血清和腫瘤中顯示出延長之半衰期。

表 36. 經 153 LP-DART 治療之動物的藥代動力學分析。

IV 劑量 (mg/kg)	組織	Co (µg/mL)	Cmax (µg/mL)	Tmax (小時)	AUC(0- Tlast) (µg*小時 /mL)	AUC(0,inf) (µg*小時 /mL)	CL (0-t) (mL/kg/小 時)	Vdss (L/kg)	T1/2 (小時)	T1/2 (天)
0.05	Serum	0.675	0.648	0.25	43.7	61	1.14	150	144	6
0.5	Serum	11.5	11	0.25	647	827	0.773	89.9	115	4.79
0.05	Tumor	nd	0.0561	48	7.48	10.8	nd	nd	130	5.42
0.5	Tumor	nd	1.04	48	167	199	nd	nd	88.4	3.68

實施例 11

建立之腫瘤人 T 細胞繼承性轉移模式

分析藉由繼承性轉移人 T 細胞來抑制 HCT 116(結腸)和 SUM149(乳腺)之腫瘤生長。HCT116 顯現出相對最高之細胞表面 P-鈣黏蛋白表現水準(43,801 ABC，表 28)，而 SUM149 顯示出相對適度之細胞表面 P-鈣黏蛋白表現水準(15,426 ABC，表 28)。以輔以 2X GlutaMax-1、1%PenStrep 和 20ng/ml 重組之人 IL-2(Life Technologies 公司，加州 Carlsbad)的 OpTmizer CTS T 細胞擴增無血清培養基(T Cell Expansion Serum-Free Media)將 T 細胞再懸浮成 0.5×10^6 細胞/ml。然後，以 1×10^6 珠/ml(2 珠/細胞)將 Dynabeads Human T-Expander CD3/CD28 磁珠(Life Technologies 公司)加入 T 細胞中，並根據製造商之實驗計劃將細胞培養一週。在收穫時，以磁鐵除去珠並以 1×10^7 細胞/ml 將細胞再懸浮於 DPBS 中以用於活體內接種。

在異種移植研究方面，在 NSG 小鼠之側邊接種 5×10^6 之 HCT116 細胞或在乳房脂肪墊中接種 5×10^6 之 SUM149 細胞，總注射量為 0.2mL。將 HCT116 細胞懸浮在 DPBS

中，將 SUM149 細胞懸浮在生長培養基中並以 1：1 之比例與 Matrigel 基底膜基質(BD Biosciences 公司，加州聖荷西市)混合。

使用數字游標卡尺(Mitutoyo America，伊利諾州 Aurora)收集腫瘤測量值，並藉由使用經修改之橢球公式 $1/2(\text{寬度}^2 \times \text{長度})$ 計算體積。一旦腫瘤已經達到增長階段，將小鼠隨機分配並接受初始劑量，第二天為小鼠接種 2×10^6 培養之 T 細胞。每週給予小鼠在 0.2mL 中之大丸劑注射液中的劑量 5 次，並經由每隻動物之側尾靜脈，經靜脈內途徑投予所有化合物和 T 細胞。每二週收集腫瘤測量值，並持續監測移植物抗宿主病之跡象(例如體重減輕、脫髮、駝背姿勢)。

第 18A 圖(表 37)中顯示藉由繼承性轉移人 T 細胞來抑制 HCT 116(結腸)之腫瘤生長，而第 18B 圖(表 38)中顯示藉由繼承性轉移人 T 細胞來抑制 SUM149(乳腺)之腫瘤生長。每週投予最高劑量 (0.5mg/kg) 之 153 LP-DART(CD3-1)會導致具有腫瘤消退之劑量反應，而投予較低劑量 (0.05mg/kg) 時會導致腫瘤停滯，而最終腫瘤復發。與經載劑治療之小鼠相比較，投予陰性對照 LP-DART 顯示出並未增加腫瘤抑制。與上述實施例 10 之移植 T 細胞模型相比較，繼承性 T 細胞轉移模型允許在小鼠死於 GVHD 前(分別為 2 週和 ≥ 6 週)的延長 153 LP-DART 給藥。

表 37. 藉由繼承性轉移人 T 細胞抑制 HCT 116 之腫瘤生長。

從隨機分派開始的天數	載劑		0.05 mg/kg P-鈣黏蛋白 153 LP-DART		0.5 mg/kg P-鈣黏蛋白 153 LP-DART	
	腫瘤體積平均值 (mm ³)	SEM	腫瘤體積平均值 (mm ³)	SEM	腫瘤體積平均值 (mm ³)	SEM
0	144	11	147	10	147	12
4	310	22	333	19	333	34
8	573	37	429	31	430	34
11	803	38	365	35	354	35
15	1074	48	357	29	114	22
18	1340	53	473	30	65	22
22	1577	48	720	49	18	13
25	1655	53	911	56	0	0
29	-	-	1175	46	0	0
32	-	-	1339	44	0	0
35	-	-	1523	50	0	0
38	-	-	-	-	0	0
42	-	-	-	-	0	0
45	-	-	-	-	0	0

表 38. 藉由繼承性轉移人 T 細胞抑制 SUM149 之腫瘤生長。

從隨機分派開始的天數	載劑		0.5 mg/kg 對照 LP-DART		0.05 mg/kg P-鈣黏蛋白 153 LP-DART		0.5 mg/kg P-鈣黏蛋白 153 LP-DART	
	平均腫瘤體積 (mm ³)	SEM	腫瘤體積平均值 (mm ³)	SEM	腫瘤體積平均值 (mm ³)	SEM	腫瘤體積平均值 (mm ³)	SEM
0	208	5	207	5	209	6	207	13
4	348	13	342	41	393	18	400	22
8	528	18	541	30	424	17	306	27
11	733	36	782	42	389	24	183	15
14	889	39	856	36	330	18	101	7
17	1132	42	1137	49	435	26	50	10
23	1464	61	1524	57	620	47	0	0
25	1671	81	1696	75	694	60	0	0
29	-	-	-	-	874	89	0	0
32	-	-	-	-	-	-	0	0
36	-	-	-	-	-	-	0	0
39	-	-	-	-	-	-	0	0
42	-	-	-	-	-	-	0	0

實施例 12

P-鈣黏蛋白陽性患者來源之異種移植(PDX)

分析活體內 P-鈣黏蛋白陽性 PDX 的腫瘤生長抑制。以抗 P-鈣黏蛋白抗體進行 FFPE 腫瘤樣本之陽性染色來鑑定 P-鈣黏蛋白陽性患者來源之大腸結腸腫瘤異種移植，PDX-CRX-11260。將 PDX-CRX-11260 腫瘤組織植入 NSG 動物並生長至大約為 100mm³。將動物隨機分成 n = 7 之

劑量組並每週給予載劑、0.05mg/kg 153 LP-DART (CD3-1)或 0.5mg/kg153 LP-DART(CD3-1)。在初始劑量後一天，所有動物接受 2×10^6 個在活體外擴增之人 T 細胞。

PDX-CRX-11260 之腫瘤生長抑制顯示於第 19A 圖(表 39)中。0.05mg/kg 153 LP-DART 劑量組證實 7 隻動物中有 3 隻具有完全反應，而 0.5 mg/kg 153 LP-DART 劑量組證實 7 隻動物中有 7 隻具有完全反應。該數據證明 153 LP-DART 表現出強力抑制 P-鈣黏蛋白陽性結腸腫瘤 PDX 之腫瘤生長。

表 39. P-鈣黏蛋白陽性 PDX-CRX-11260 之腫瘤生長抑制。

從隨機分配 開始之天數	載劑		0.05 mg/kg P-鈣黏蛋白 153 LP-DART		0.5 mg/kg P-鈣黏蛋白 153 LP-DART	
	腫瘤體積平均值 (mm ³)	SEM	腫瘤體積平均值 (mm ³)	SEM	腫瘤體積平均值 (mm ³)	SEM
0	107	6	106	5	106	6
5	206	22	226	23	215	22
8	311	20	290	37	186	16
13	579	52	224	52	104	28
16	591	77	227	93	33	17
20	725	67	165	87	25	17
23	884	79	172	89	0	0
27	1101	99	292	161	0	0
30	1318	136	294	179	0	0
34	1463	161	370	240	0	0
37	1473	181	132	101	0	0
40	-	-	181	141	0	0

實施例 13

劑量依賴性腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)之累積

將人外周血單核細胞(PBMC)移植入帶有 HCT116 腫瘤之小鼠中並給予不同劑量之 153 LP-DART(CD3-1)(n = 3)，在給藥後 6 天將小鼠安樂死以評估腫瘤浸潤性人

CD3+淋巴細胞。將腫瘤樣本收集入含有人腫瘤細胞分離緩衝液(Miltenyi Biotech)的 gentleMACS C 管中並採用製造商建議之用於人軟腫瘤之實驗計劃，使用 gentleMACS 組織分離器(Miltenyi Biotech)將腫瘤樣本加工成單一細胞懸浮液。然後，以含有 2mM EDTA 之 DPBS 清洗細胞懸浮液，並藉由錐蟲藍排除法和血球計數器測定存活細胞數。從每個樣本收集 1×10^6 個活細胞，置入含有 2%FBS 和 0.02%疊氮化鈉之 PBS 中，並在冰上以 CD3 FITC(BD Pharmingen 公司)染色 30 分鐘。清洗後，在使用 LSR II，以 FACS Diva 軟體(BD Pharmingen 公司)分析前不久，在各樣本中立即加入碘化丙錠。

藉由 FlowJo 軟體(Treestar)分析數據，使用 GraphPad Prism5.0 軟體將總活細胞中之 CD3+細胞百分比相對於未經治療之對照組繪製分組圖，該分組係藉由 Dunnet's 多重比較試驗，經由單向 ANOVA 測定顯著性。結果顯示於第 20 圖中，表 40 證明腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)係以劑量依賴方式增加。此外，腫瘤組織之人 CD3 的免疫組織化學(IHC)染色(未顯示出)證明以 153 LP-DART 治療具有 P-鈣黏蛋白陽性腫瘤和人 T 細胞之動物會導致腫瘤內累積 CD3 +淋巴細胞。

表 40. 腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)之劑量依賴性累積。

153 LP-DART 之劑量	小鼠	所有存活細胞之% CD3+
0.01 mg/kg	1	7.60
	2	6.48
	3	12.40
0.05 mg/kg	1	43.00
	2	21.70
	3	25.70
0.5 mg/kg	1	61.30
	2	63.40
	3	50.30

實施例 14

使用FMT成像之P-鈣黏蛋白LP-DART之生物分佈和腫瘤靶向

使用具有建立之皮下 HCT116 異種移植物的 NSG 或無胸腺裸鼠。包含移植 T 細胞之研究接受從健康之人志願者分離出的 T 細胞。當腫瘤達到 300-500mm³ 時開始生物分佈研究。將 P-鈣黏蛋白 153 LP-DART(CD3-1)或陰性對照-DART(非靶向結構域 x CD3 結合結構域) 與近紅外線螢光團 VivoTag680XL(VT680)共軛結合，該螢光團對雙特異性標記之比係介於 1 至 2.75，結果產生：P-鈣黏蛋白 153 LP-DART-VivoTag680XL 和 對 照 -LP-DART-VivoTag680XL。

藉由分光光度計測定標記效率。以 CellVue815 (CV815)標記用於輸送研究之 T 細胞。藉由流式細胞術測定細胞表面 P-鈣黏蛋白之表現和 P-鈣黏蛋白 153 LP-DART 結合。以細胞毒性 T 淋巴細胞(CTL) 分析測量 T 細胞活性。在注射經標記之雙特異性抗體後縱向進行 FMT 成像。使用 TrueQuant 軟體分析數據。在不同時間點收集血漿和組織以藉由 ELISA 進行 PK 分析。

A. 在試管內表徵經標記之生物分子

為了測定 VT680 標記是否影響該分子性質，進行品質控制研究：藉由 FACS 分析玻管內與細胞之結合及藉由細胞毒性分析進行分子活性之分析。比較經 VT680 標記和未經標記之對照 LP-DART 和 P-鈣黏蛋白 153 LP-DART 之性質。在以 CV815 標記之 T 細胞方面，評估 T 細胞擴增，亦評估在效應子細胞上之細胞毒性。表 41 顯示出用於生物分佈研究之分子。

DOL=標記程度。

表 41. 經 VivoTag680XL 標記之分子。

分子	DOL	~Ab/劑量
P-鈣黏蛋白 153 LP-DART-VivoTag680X	2.62	0.925 mg/kg
對照-LP-DART-VivoTag680XL	2.75	0.9 mg/kg

進行直接可溶性 P-鈣黏蛋白之 ELISA 以評估結合能力：第 21A 圖顯示出在 P-鈣黏蛋白 153 LP-DART 上標記 VT680 對 P-鈣黏蛋白結合的影響最小。最小降幅為 DOL 依賴性。對照 -LP-DART(經標記或未經標記的)不與 P-鈣黏蛋白結合。

進行直接可溶性 CD3 之 ELISA 以評估結合能力：第 21 B 圖顯示出在 P-鈣黏蛋白 153 LP-DART 上標記 VT680 會顯著降低對 CD3 ϵ/δ 蛋白之結合。降低之結合度為 DOL 依賴性。對照 -LP-DART 之結合力較 P-鈣黏蛋白 153 LP-DART 低。VT680 標記顯著降低對 CD3 ϵ/δ 之結合。

使用表現螢光素酶之 HCT116 細胞作為用於玻管內細胞毒性之“靶細胞”，在對 P-鈣黏蛋白 153 LP-DART 進行滴定之 24 小時分析中，純化之人 T 淋巴細胞“效應子”細胞對靶的之比=10：1。第 21C 圖中所示之細胞毒性圖說明當以 VT680 標記 P-鈣黏蛋白 153 LP-DART，DOL 為 2.0 時細胞細胞毒性降低。

比較以細胞標記染料標記後 T 細胞之細胞存活力和擴增：以螢光細胞追蹤染料 - VivoTrack680 和 CellVue815(CV815)標記從供體分離出之人 T 細胞。第 21D 圖顯示出 VivoTrack680 或 CV815 均不會影響 T 細胞之細胞存活力和擴增。

B. 活體內 FMT 成像和 PK 分析數據

採用縱向 FMT 成像分析在 HCT116 異種移植模型中之 P-鈣黏蛋白 153 LP-DART 的生物分佈和靶向。將在 50%基質膠(matrigel) 中之一百萬個 HCT116 細胞注射入雌性 nu/nu 小鼠(8 週齡)之 SQ 側邊。令腫瘤生長至大小~300-500mm³。為動物注射等同於 1nmole 之 VT680 的探針(經 VT680 標記之生物分子)(表 41)。在注射後 5min、24hr、48 hr、96 hr 和 240hr 縱向進行活體內 FMT 成像(全身)。在每個時間點收集血液(血漿)樣本。在研究之間歇時間點和結束時，將動物安樂死並灌注 PBS/生理鹽水以從血管腔室除去血液。在活體外進行組織(腫瘤、肝、脾、腎、肺和腦)成像。使用 TrueQuant 軟體分析該 FMT 數

據。在活體外成像後，將組織快速冷凍以用於未來的 PK 分析。藉由 ELISA 進行血漿和組織樣本的 PK 分析。在生物分佈研究中未進行 T 細胞植入。

FMT 成像顯示出 P-鈣黏蛋白 153 LP-DART 特異針對 HCT116 腫瘤。活體內非侵入性 FMT 成像揭露出與對照 LP-DART 相比較，腫瘤中累積大量之 P-鈣黏蛋白 153 LP-DART (圖像未顯示)。活體內動力學顯示出腫瘤中之尖峰累積約在注射後 96 小時，如第 22A 圖所示。如第 22B 圖所示，證明累積之組成及從各種組織、腫瘤與血管腔室清除的全身分佈和清除數據顯示出 P-鈣黏蛋白 153 LP-DART 與對照-LP-DART 之間並無全面之顯著差異。

如第 22C 和 22D 圖所示，腫瘤和在 48，96 和 240 小時選擇之組織的活體外分析證明 P-鈣黏蛋白 153 LP-DART 滲透入組織中。腫瘤顯示出其在所有時間點之 P-鈣黏蛋白 153 LP-DART 累積較對照-LP-DART 高出 20-30 倍。在注射 240 小時後，腫瘤中仍檢測到可測得之 P-鈣黏蛋白 153 LP-DART。在活體外比較在各種器官(肝(第 22D 圖)、腎、脾、肺和腦(數據未顯示))中之累積顯示出 P-鈣黏蛋白 153 LP-DART 或陰性對照 DART 之間並無差異。

藉由藥代動力學方法比較 FMT 數據以確認 FMT 成像的變化形廓。藉由例行之藥代動力學方法，ELISA 評估來自 FMT 研究之樣本。來自腫瘤和肝之 PK 數據顯示出與上述之 FMT 成像數據具有類似之趨勢。如第 23A 圖所示，該血漿變化形廓顯示出 P-CAD-LP-DART 之血漿暴露較對

照 LP-DART 延長~2-3 倍。如第 23B 圖所示，活體外腫瘤樣本之評估顯示出 P-CAD-LP-DART 的累積增加~7 倍。如第 23 C 圖所示，活體外肝臟樣本之評估顯示出在 48 小時累積增加，然而，在 96 小時和 240 小時則無顯著差異。

C. 細胞性追蹤植入之 T 細胞

使用 FMT 成像進行 HCT116 模型中植入之 T 細胞的細胞性追蹤。將在 50%基質膠(matrigel)中之一百萬個 HCT116 細胞注射入雌性 NSG 小鼠(8 週齡)的 SQ 側邊。當腫瘤尺寸為~300-500mm³ 時，經由 SQ 途徑注射 P-鈣黏蛋白 153 LP-DART(以 VT680 標記或未經標記)。注射藥物後 24 小時，經由靜脈內途徑注射五百萬個以 CV815 標記之 T 細胞。在細胞植入後進行縱向 FMT 成像。使用用於 P-鈣黏蛋白 153 LP-DART-VT680 和 T 細胞 CV815 組之 680nm 的和 800nm 雷射進行連續成像。

以 CellVue 標記之 T 細胞的細胞進蹤研究顯示出 T 細胞和 P-鈣黏蛋白 153 LP-DART 共同定位在腫瘤內。如第 24A 圖所示，以 CV815 標記和未經標記之 T 細胞的 T 細胞活性評估證明以螢光團標記 T 細胞對 T 細胞之細胞毒性的能力並無影響(試管內)。如第 24B 圖所示，藉由 FMT 成像以螢光團標記之 T 細胞在腫瘤內之活體內輸送動力學證明植入細胞後第 7 天，在 P-鈣黏蛋白 153 LP-DART 注射組中之 T 細胞輸送和累積顯著增加。

FMT 圖像(未顯示出)證明經 VivoTag680 標記之 P-鈣黏蛋白 153 LP-DART 對準腫瘤及經 CV815 標記之 T 細胞在植入細胞後第 5 天和第 7 天輸送至腫瘤。此組接受經 CV815 標記之 T 細胞+經 VivoTag680 標記之 P-鈣黏蛋白 153 LP-DART。使用 DOL 為 1.0 之 P-鈣黏蛋白 153 LP-DART-VT680。DOL 為 1.0 顯示出對結合至 P-鈣黏著蛋白和 CD3 蛋白質的影響最低。

實施例 15

結晶化和結構測定

在結晶化試驗方面，利用第 25 圖中所顯示之純化的 DART 蛋白。尤其是，設計不具有異質二聚體提升結構域之用於結晶學的 DART 蛋白(具有選殖株 35 P-CAD VLNH 結合結構域及選殖株 CD3 結合結構域)，其具有稱為“6XHIS”之共價連接至 P-CAD 35 VH 結構域之 C-端 His 標籤 HHHHHH(SEQ ID NO: 78) 及稱為“FLAG”之共價連接至 CD3 VH 結構域的 C 端 FLAG 序列 GGCGGDYKDDDDK(SEQ ID NO: 79) (以下稱為“晶體 35 DART”)。

將純化之晶體 35 DART 在含有 TBS 之蛋白溶液中濃縮成 9.6mg/mL。藉由懸滴蒸氣擴散法，從含有 15% PEG 8K 和 0.5M 硫酸鋰之條件取得晶體。該六角盤樣晶體具有與三方晶系空間群(trigonal space group)P321 一致之對稱性，晶胞參數 $a = b = 142.81 \text{ \AA}$; $c = 62.69 \text{ \AA}$ 且在晶體不對

稱單位中具有一個晶體 35 DART 分子。使用含有 25% 乙二醇貯庫溶液將晶體冷凍保護，然後在液態氮中快速冷凍。在 Argonne 國家實驗室(APS)中，在 IMCA 光束線 17-ID 處從單一冷凍晶體收集解析度設為 2.0 Å 之數據。使用 autoPROC 和 SCALA 處理和調整數據規模。最終數據組為 96.8% 完成度，平均冗餘為 9.9 且 R_{sym} 為 14.2%。

從單鏈 Fv 片段模型(從 Brookhaven PDB 紀錄碼，1moe 製備)開始，以 PHASER 進行分子置換來測定該結構。經由分別搜尋晶體 35 DART 分子之四個次單位的每一次單位來取得溶液。進行幾個手工調整迭代輪並使用 COOT 重建模型和使用 autoBUSTER 細化晶體來產生最終之晶體 35 DART 模型，晶體 R_{work} 為 17.6% 且 R_{free} 為 20.5%，其中 $R_{\text{work}} = ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|| / |F_{\text{obs}}|$ 且 R_{free} 等於 R_{work} ，但計算從細化過程省略之隨機選擇的 5% 反射。

最終之晶體 35 DART 模型包含二個鏈，重鏈(H)和輕鏈(L)，具有 H 鏈之殘基 1-110、117- 239 和 L 鏈之殘基 2-110、116-246。存在於該模型中之非蛋白質原子包括 574 個水分子和 5 個硫酸離子。由於缺乏電子密度(很可能是由於紊亂)，連接子區中缺失之胺基酸(11 個殘基)並未模塑在結構中。

第 26 圖顯示出晶體 35 DART 蛋白之晶體結構的圖示。在該結晶中，晶體 35 DART 組裝成非常緊密之球形結構，其與先前發表之雙功能抗體結構(第 27 圖)差別相當大(參見 Carmichael et al., J. Mol. Biol. 326: 341- 351

(2003) ; Perisic, et al., Structure, 2(12) : 1217-1226(1994))。其在次單位之間具有意料外之擴展的界面且具有作為穩定結構之明確證據的在二條多肽鏈之間的二硫鍵聯，Cys²³⁹(VH1B)-Cys²⁴⁶(VL2A)。該四個次單位，VL1A、VH1B、VL2B 和 VH2A 均促成該結合界面，來自該二條鏈之框架胺基酸殘基的貢獻最大。稍後之觀察表明以其他 CDR 序列構建之其他 DART 蛋白(結合至不同的腫瘤相關抗原)可與晶體 35 DART 分享類似之架構及類似之結構域界面。

儘管包裝相當緊密，該晶體 35 DART 界面並不像 Fab 分子中之天然存在的界面般高度富集和形狀互補，該 Fab 分子之特徵在於重鏈和輕鏈結構域之間具有高度的鏈間聯結。在晶體 35 DART 中，在一個鏈或結構域中之未被另一個鏈或結構域的突起互補的幾個凹陷導致小的內部包裝缺陷和大的空孔，在晶體結構中填滿結合水(第 28 圖)。

在晶體 35 DART 上的二個抗原結合位點彼此分隔約 40 Å 且位於分子之正交相對側。在此背景下，“正交相對側”意指在晶體 35 DART 上的二個結合位點彼此之相對角度為~90°。

該抗 CD3 CDR 區係位在次單位界面之遠端，而抗 P-CAD CDR 區係在較鄰近之區域內(參見第 27 圖)。

此外，產生新穎之單鏈 DART(scDART)變體以解決雙鏈雙功能抗體錯配之問題(根據該晶體結構可使用各種不同的 VH 和 VL 鏈方向性)。將另外之半胱胺酸殘基進行遺

傳工程處理以誘導在 scDART 蛋白內之共價鍵聯，以進一步改善單鏈雙功能抗體之穩定性。該方法為 Dani et al. (Prot. Eng. 16(3) : 187-193 (2003))之變化，其採用進一步分析來將各個位點之品質分級。亦使用此方法將各種二硫鍵位置進行遺傳工程處理以減少二硫鍵之溶劑可及性並縮短連接子之長度。例如，用於引入立體化學上最佳之二硫化物的造型位置建議下列用於半胱胺酸誘變之胺基酸殘基對(參見第 29 圖)：

此外，使用 Discovery Studio (Accelrys 軟體公司)穩定性預測實驗計劃及 Rosetta v2.3 穩定性實驗計劃，透過在域間界面進行定點誘變來將 DART 變體(包括 scDART 變體)進行遺傳工程處理以填補大的內部空隙/孔(第 26 圖)，以試圖進一步改善域間聯結之穩定性。例如，經由以具有大體積之芳香族側鏈像是苯丙胺酸、酪胺酸或色胺酸替換相對較小之胺基酸來增加在 Ala⁴⁴(VL1A)、Val²¹³(VH2A)、Leu²³⁸(VH2A)或 Met²³¹(VL2B) 位置處的側鏈體積。將單一表面半胱胺酸突變體進一步根據晶體結構進行遺傳工程處理，探查用於位點特異性生物結合方法之各種位置。

實施例 16

P-鈣黏蛋白 153 LP-DART 之表位測繪

為了鑑別 P-鈣黏蛋白 153 LP-DART 之結合表位，產生可溶性 P-鈣黏蛋白胞外結構域(ECD)-Fc 融合蛋白構建

體。各 P-鈣黏蛋白-Fc 構建體包含一個信號肽、前肽和 P-鈣黏蛋白 ECD 子結構域區(ECD1、ECD1-2、ECD1-3、ECD1-4 或 ECD1-5)，其經由可裂解之連接子遺傳融合至人 IgG1 之鉸鏈及 CH2 和 CH3 結構域，如第 34 圖所示。用於產生 ECD-Fc 構建體之 ECD1、ECD2、ECD3、ECD4 和 ECD5 P-鈣黏蛋白子結構域片段對應於在全長 P-鈣黏蛋白表位中識別之序列(UniProt P22223、CADH3、人鈣黏蛋白-3)，其顯示於第 35 圖中且進一步表徵在表 42 中。

表 42. 產生之 P-鈣黏蛋白結構域和子結構域。

結構域	殘基	SEQ ID NO:
全長 P-鈣黏蛋白 (UniProt P22223)	1-829	159
P-鈣黏蛋白 信號肽	1-24	160
P-鈣黏蛋白前肽	25-107	161
P-鈣黏蛋白胞外結構域 1	108-215	162
P-鈣黏蛋白胞外結構域 2	216-328	163
P-鈣黏蛋白胞外結構域 3	329-440	164
P-鈣黏蛋白胞外結構域 4	441-546	165
P-鈣黏蛋白胞外結構域 5	547-650	166
P-鈣黏蛋白跨膜和細胞質	651-829	167
P-鈣黏蛋白胞外結構域 1-2	108-328	168
P-鈣黏蛋白胞外結構域 1-3	108-440	169
P-鈣黏蛋白胞外結構域 1-4	108-546	170
P-鈣黏蛋白胞外結構域 1-5	108-650	171

藉由 DNA 測序確認所有構建體且根據製造商之方法瞬時轉染入 FreeStyle™293 HEK 細胞(Life Technologies 公司，紐約州格蘭德島)中，並表現 5-7 天。為了增進前肽之加工處理，將含有 PACE 裂解酶之表現載體隨著含有 P-鈣黏蛋白之載體共同轉染。使用標準的蛋白 A 層析技術(Protein A FF，GE Healthcare，紐澤西州 Piscataway)，隨

後藉由凝膠過濾尺寸排阻層析法 (Superdex200，GE Healthcare，紐澤西州 Piscataway)來純化所欲之可溶性蛋白。使用市售之抗人 P-鈣黏蛋白單株和多株抗體，藉由結合 ELISA 來決定純化之蛋白質的純度和活性特徵。在蛋白質 ELISA 中使用純化之 P-鈣黏蛋白 ECD-Fc 構建體來測定與 153 LP-DART 結合之 P-鈣黏蛋白的 ECD 子結構域為何者。

表 43 顯示出 153LP-DART 及其他各種抗 P-鈣黏蛋白 DART 分子，連同用於確認 ECD-Fc 構建體之正確表現和折疊的多株抗體(R&D 系統，明尼蘇達州 Minneapolis)與所產生之 P-鈣黏蛋白 ECD-Fc 構建體的結合結果。結果顯示出 153 LP-DART 不與 ECD1-Fc 或 ECD1-2-FC 結合，但確實與所有包含 ECD3 之構建體(ECD1-3-Fc、ECD1-4-Fc 和 ECD1-5-Fc)結合。此數據證明 153 LP-DART 在 ECD3 內與人 P-鈣黏蛋白結合。

表 43. P-鈣黏蛋白 DART 與 P-鈣黏蛋白 ECD-Fc 構建體之結合。

P-cad ECD -Fc 構建體	35 EK- DART	153 EK- DART	153 LP- DART	PF EK- DART	20 EK- DART	30 EK- DART	多株 Ab (AF-761)
ECD 1-Fc	否	否	否	否	否	是	是
ECD 1-2-Fc	否	否	否	是	是	是	是
ECD 1-3-Fc	是	是	是	是	是	是	是
ECD 1-4-Fc	是	是	是	是	是	是	是
ECD 1-5-Fc	是	是	是	是	是	是	是

如表 24(上文)中所示，153 LP-DART 不會與鼠 P-鈣黏蛋白結合，因此，153 LP-DART 識別人 P-鈣黏蛋白之 ECD3 上的表位(SEQ ID NO：164)，人 P-鈣黏蛋白 ECD3

之序列與來自鼠 P-鈣黏蛋白 ECD3 之序列 (SEQ ID NO : 172)不同。表 44 顯示出人與鼠 P-鈣黏蛋白 ECD-3 之比對，說明這些直系同源物之間的差異。(；)代表相似，(.)代表不同且(-)代表非常不同的殘基。

表 44.人與鼠 P-鈣黏蛋白胞外結構域 3(ECD3)之比對。

ECD3	序列
huPcadECD3	DPQKYEAHVPENAVGHEVQRLTVTDLDAPNSPAWRATYILIMGGDDGDHFTITTHPESNQGILTTRK
muPcadECD3	EPQKYEAWVPENEVGHEVQRLTVTDLDVPNSPAWRATYHIVGGDDGDHFTITTHPETNQGVLTTRK :*****-*****-*****.*****-*.*****:***:***:*
huPcadECD3	GLDFEAKNQHTLYVEVTNEAPFVLKLPSTATIVVHVEDVNEAPVF (SEQ ID NO: 164)
muPcadECD3	GLDFEAQDQHTLYVEVTNEAPFAVKLPATATVTVVHVKDVNEAPVF (SEQ ID NO: 172) *****:*****.*****:***:***:*****

為了測定結合表位及結合親和力在 T 細胞重新靶向細胞毒性分析中對效力是否有影響，分析各種抗 P-鈣黏蛋白 EK-DART 之細胞毒性 T-淋巴細胞(CTL)分析的結果。藉由 Biacore 和 ELISA 比較該細胞毒性值(見表 29)與對可溶性和細胞表面表現之 P-鈣黏蛋白的結合親和力(見表 14-16、24)。PF-DART 以個位數 nM 之結合親和力在 ECD2 中結合 P-鈣黏蛋白且具有 nM 以下之 CTL 細胞毒活性。35 EK-DART(153 EK-DART 之親代選殖株)以約 35nM 之結合親和力在 ECD3 中結合 P-鈣黏蛋白，幾乎較 PF-DART 之結合親和力低 35 倍，但仍以類似之效力滅殺(低於 nM)。此數據表明在 ECD3 (其更接近細胞膜)中結合導致較高之 CTL 效力。153 LP-DART 亦以較 35 EK-DART(0.5nM)更強之結合親合力在 ECD3 中結合 P-鈣黏蛋白且顯示出最高之 CTL 活性(低於 pM)。

實施例 17

抗 P-鈣黏蛋白 CDR 之互補位(paratope) 測繪

為了進一步了解互補決定區(CDR)中有哪些胺基酸(AA)殘基涉及 scFv 153 結合至人 P-鈣黏蛋白，藉由並行定點誘變將所有非丙胺酸 CDR AA 個別突變成丙胺酸。

定點誘變

設計 63 個寡核苷酸(長度為 33-45 個鹼基)(表 45)。調整各個寡核苷酸之寡核苷酸長度以具有彼此相當之預測的熔解溫度(T_m)值。設計各個寡核苷酸使成為選殖株 153 scFv 之有義股的反向互補且 “AGC”(丙胺酸密碼子，GCT 的反向互補)之任一側均鄰接 15-21 個鹼基。

表 45.設計之寡核苷酸。

序列 Name	序列	Tm	SEQ ID NO.
pcdAlaH1-1	GCT GGT AAA GGT GTA AGC AGA AGC CTT GCA GGA	66	173
pcdAlaH1-2	ACC GTA GCT GGT AAA GGT AGC ACC AGA AGC CTT GCA GGA	69	174
pcdAlaH1-3	GAT ACC GTA GCT GGT AAA AGC GTA ACC AGA AGC CTT GCA	66	175
pcdAlaH1-4	GAT ACC GTA GCT GGT AGC GGT GTA ACC AGA AGC	65	176
pcdAlaH1-5	CCA GCT GAT ACC GTA GCT AGC AAA GGT GTA ACC AGA AGC	66	177
pcdAlaH1-6	CAC CCA GCT GAT ACC GTA AGC GGT AAA GGT GTA ACC AGA	67	178
pcdAlaH1-7	TCG CAC CCA GCT GAT ACC AGC GCT GGT AAA GGT GTA ACC	70	179
pcdAlaH1-8	TCG CAC CCA GCT GAT AGC GTA GCT GGT AAA GGT	67	180
pcdAlaH1-9	CTG TCG CAC CCA GCT AGC ACC GTA GCT GGT AAA	68	181
pcdAlaH1-10	GGC CTG TCG CAC CCA AGC GAT ACC GTA GCT GGT	71	182
pcdAlaH2-1	ACC ATT GTA AGC GCT GAT AGC TCC CAT CCA CTC AAG CCC	69	183
pcdAlaH2-2	GTT ACC ATT GTA AGC GCT AGC CCA TCC CAT CCA CTC AAG	67	184
pcdAlaH2-3	TGT GTT ACC ATT GTA AGC AGC GAT CCA TCC CAT CCA CTC	66	185
pcdAlaH2-5	TGC ATA GTT TGT GTT ACC ATT AGC AGC GCT GAT CCA TCC CAT CCA	68	186
pcdAlaH2-6	TGC ATA GTT TGT GTT ACC AGC GTA AGC GCT GAT CCA TCC	67	187
pcdAlaH2-7	CTG TGC ATA GTT TGT GTT AGC ATT GTA AGC GCT GAT CCA	65	188
pcdAlaH2-8	GAG CTT CTG TGC ATA GTT TGT AGC ACC ATT GTA AGC GCT GAT CCA	67	189
pcdAlaH2-9	GAG CTT CTG TGC ATA GTT AGC GTT ACC ATT GTA AGC GCT	65	190
pcdAlaH2-10	CTG GAG CTT CTG TGC ATA AGC TGT GTT ACC ATT GTA AGC	65	191
pcdAlaH2-11	GCC CTG GAG CTT CTG TGC AGC GTT TGT GTT ACC ATT GTA	68	192
pcdAlaH2-13	GAC TCT GCC CTG GAG CTT AGC TGC ATA GTT TGT GTT ACC	66	193
pcdAlaH2-14	GGT GAC TCT GCC CTG GAG AGC CTG TGC ATA GTT TGT GTT	69	194
pcdAlaH2-15	CAT GGT GAC TCT GCC CTG AGC CTT CTG TGC ATA GTT TGT	68	195
pcdAlaH2-16	GGT CAT GGT GAC TCT GCC AGC GAG CTT CTG TGC ATA GTT	69	196
pcdAlaH2-17	GGT CAT GGT GAC TCT AGC CTG GAG CTT CTG TGC	67	197
pcdAlaH3-1	ACC AAA AGC ATT AGC TGT ATC AGC AGT CGC ACA GTA ATA CAC GGC	67	198
pcdAlaH3-2	AAA AGC ATT AGC TGT AGC GAT AGT CGC ACA GTA	62	199
pcdAlaH3-3	GAT ACC AAA AGC ATT AGC AGC ATC GAT AGT CGC ACA GTA	64	200
pcdAlaH3-5	GCC CCA GAT ACC AAA AGC AGC AGC TGT ATC GAT AGT CGC	68	201
pcdAlaH3-7	TTG GCC CCA GAT ACC AGC AGC ATT AGC TGT ATC	65	202
pcdAlaH3-8	CCC TTG GCC CCA GAT AGC AAA AGC ATT AGC TGT	66	203
pcdAlaH3-9	CAT TGT CCC TTG GCC CCA AGC ACC AAA AGC ATT AGC TGT	69	204
pcdAlaL1-1	GTT GGA GCT GCT TCC AGC GCA GGA GAT GGT GAC	69	205
pcdAlaL1-2	AAT GTT GGA GCT GCT AGC AGA GCA GGA GAT GGT	66	206
pcdAlaL1-3	ATT CCC AAT GTT GGA GCT AGC TCC AGA GCA GGA GAT GGT	68	207
pcdAlaL1-4	ATT ATT CCC AAT GTT GGA AGC GCT TCC AGA GCA GGA GAT	66	208
pcdAlaL1-5	ATA ATT ATT CCC AAT GTT AGC GCT GCT TCC AGA GCA GGA	65	209
pcdAlaL1-6	GGA TAC ATA ATT ATT CCC AAT AGC GGA GCT GCT TCC AGA GCA GGA	67	210
pcdAlaL1-7	GGA TAC ATA ATT ATT CCC AGC GTT GGA GCT GCT TCC AGA	65	211
pcdAlaL1-8	CCA GGA TAC ATA ATT ATT AGC AAT GTT GGA GCT GCT TCC	62	212
pcdAlaL1-9	GTA CCA GGA TAC ATA ATT AGC CCC AAT GTT GGA GCT GCT	65	213
pcdAlaL1-10	CTG GTA CCA GGA TAC ATA AGC ATT CCC AAT GTT GGA GCT	65	214
pcdAlaL1-11	CTG CTG GTA CCA GGA TAC AGC ATT ATT CCC AAT GTT GGA	65	215
pcdAlaL1-12	GAG CTG CTG GTA CCA GGA AGC ATA ATT ATT CCC AAT GTT	64	216
pcdAlaL1-13	TGG GAG CTG CTG GTA CCA AGC TAC ATA ATT ATT CCC AAT	65	217
pcdAlaL2-1	TGA GGG TCG CTT ATT ATT AGC ATA AAT GAG GAG TTT GGG	63	218
pcdAlaL2-2	CCC TGA GGG TCG CTT ATT AGC GTC ATA AAT GAG GAG TTT	65	219
pcdAlaL2-3	AAT CCC TGA GGG TCG CTT AGC ATT GTC ATA AAT GAG GAG	65	220
pcdAlaL2-4	GTC AGG AAT CCC TGA GGG TCG AGC ATT ATT GTC ATA AAT GAG GAG	66	221
pcdAlaL2-5	TCG GTC AGG AAT CCC TGA GGG AGC CTT ATT ATT GTC ATA AAT GAG	66	222
pcdAlaL2-6	TCG GTC AGG AAT CCC TGA AGC TCG CTT ATT ATT GTC ATA	64	223

pcdAlaL2-7	TCG GTC AGG AAT CCC AGC GGG TCG CTT ATT ATT	66	224
pcdAlaL3-1	GCT GCT ATC CCA TGT AGC GCA GTA ATA ATC GGC	64	225
pcdAlaL3-2	CAG GCT GCT ATC CCA AGC TCC GCA GTA ATA ATC	64	226
pcdAlaL3-3	ACC ACT CAG GCT GCT ATC AGC TGT TCC GCA GTA ATA ATC	66	227
pcdAlaL3-4	ACC ACT CAG GCT GCT AGC CCA TGT TCC GCA GTA	69	228
pcdAlaL3-5	CAC ACC ACT CAG GCT AGC ATC CCA TGT TCC GCA	68	229
pcdAlaL3-6	GAA TAC CAC ACC ACT CAG AGC GCT ATC CCA TGT TCC GCA	68	230
pcdAlaL3-7	GCC GAA TAC CAC ACC ACT AGC GCT GCT ATC CCA TGT TCC	69	231
pcdAlaL3-8	GCC GAA TAC CAC ACC AGC CAG GCT GCT ATC CCA	70	232
pcdAlaL3-9	TCC GCC GAA TAC CAC AGC ACT CAG GCT GCT ATC	68	233
pcdAlaL3-10	CCC TCC GCC GAA TAC AGC ACC ACT CAG GCT GCT	71	234
pcdAlaL3-11	GGT CCC TCC GCC GAA AGC CAC ACC ACT CAG GCT	72	235

使用已發表之實驗計劃(Tonikian R et al, Nat. Protoc. 2007; 2(6):1368-86)製造單股 DNA。簡單地說，根據製造商(Lucigen，威斯康辛州米德爾頓)之實驗計劃將噬菌體表現載體轉化入 CJ236 電穿孔勝任細胞(electro-competent cell)並將 0.05%之細胞平皿接種在 LB/Amp 盤上。增長一整夜後，在六個生長在輔以 100µg/mL 之胺苄青黴素、10µg/mL 之氯黴素和 1e+ 10 M13KO7 輔助噬菌體顆粒的 2xTY/2%葡萄糖中的 1 毫升培養物中接種獨立之選殖株，在 37°C 下生長 2 小時後，再加入卡那黴素，使濃度為 25µg/mL。在 37°C 下振盪 4 個多小時之後，匯集顯示出濁度之培養物並在 2-L 震盪三角培養瓶中擴展成 120 毫升之培養物(輔以 100µg/mL 之胺苄青黴素、25µg/mL 之卡那黴素、0.25µg/mL 之尿嘧啶核苷的 2xTY/2%葡萄糖)。增長一整夜後，經由離心(6000rpm，10 分鐘)收集培養上清液並在 100mL 之上清液中加入 20mL PEG/NaCl 且藉由 PEG-沉澱純化噬菌體。將純化之噬菌體(重新懸浮在 1 mL 之 PBS 中)溶解並根據製造商的實驗計劃(Qiaprep spin M13 套組，目錄編號 27704)純化單股尿嘧啶 DNA。藉由

NanoDrop(Thermo)量化 DNA。

將寡核苷酸在三-EDTA 緩衝液(50 μ M，在 200 μ L 中)中調整為正規形式。接著，在 37 $^{\circ}$ C 下，在 96 孔格式中將 200 皮莫耳之各寡核苷酸(4 μ L)磷酸化 90 分鐘並在 65 $^{\circ}$ C 下熱滅活 20 分鐘。該反應混合物含有下列者：4 μ L 之寡核苷酸、2 μ L 之 10xPNK 緩衝液、2 μ L 之 10mM ATP、1 μ L 之 100mM DTT、11 μ L 之水、2 μ L 之 T4 PNK(T4 多核苷酸激酶)。依下述在 96 孔格式中設立定點誘變反應：2.2 μ L 之單股尿嘧啶模板 DNA(200ng)、2 μ L 之 Pfu Turbo Cx 緩衝液、2 μ L 之 100mM DTT、0.4 μ L 之 NAD⁺、0.16 μ L 之 dNTP、10 μ L 之水、0.2 μ L (0.5 單位之 Pfu Turbo Cx)、1 μ L 之 Taq DNA 連接酶、2 μ L 之 20 倍稀釋的磷酸化反應物(0.9 皮莫耳)。將反應依下述培育：95 $^{\circ}$ C 下 3 分鐘，55 $^{\circ}$ C 下 90 秒，68 $^{\circ}$ C 下 15 分鐘，45 $^{\circ}$ C 下 15 分鐘。接著，加入 1 μ L(1 皮莫耳)之 5'磷酸化之 OmpA 寡核苷酸並將反應物依下述進一步培育：95 $^{\circ}$ C 下 30 秒，55 $^{\circ}$ C 下 45 秒，68 $^{\circ}$ C 下 10 分鐘，45 $^{\circ}$ C 下 15 分鐘。在這些培育之後，加入 2 μ L 或 2 單位之 UDG：尿嘧啶 DNA 糖基化酶和 5 個單位之外切核酸酶 III (Exonuclease III)混合物以分解該模板，先在 37 $^{\circ}$ C 下 60 分鐘，然後在 65 $^{\circ}$ C 下 20 分鐘。最後，將 2 μ L 之各反應物匯集起來(共 63 個反應物)並將 0.3 μ L 電穿孔入用於測序之 ER2738 電勝任細胞。

製備用於 ELISA 之表現 scFv 的噬菌體

scFv 可表現在噬菌體顆粒之表面上。為了製備在其表面上表現 scFv 的噬菌體，使用 QPix™2 Colony 採選器 (Molecular Devices，加州 Sunnyvale)，在含有 1mL 輔以 2%葡萄糖/100μg/mL 胺苄青黴素的 2X TY 培養基之 96-深孔盤中接種 0.5-1μL 解凍之甘油貯存物(每一個孔一個選殖株)並在 37℃ 下(900rpm)生長~4 小時。接著，加入 5 μL 之輔助噬菌體的 1:29 稀釋液(8.3×10^{13} pfu)，並將該盤進一步在 37℃ 下培育 30 分鐘，不搖動，再在 300 rpm 下培育 1 小時。將該 96-深孔盤進行離心並以含有介質的卡那黴素/非葡萄糖培養基(輔以 50μg/mL 之卡那黴素和 100μg/mL 之胺苄青黴素的 2X TY)替換該培養基。令盤在 25℃ 下(900rpm)生長過夜，並在離心後收穫在該上清液中之噬菌體。

ELISA 測量 scFv 蛋白對人 P-鈣黏蛋白-Fc 之結合

在 4℃ 下，將在 PBS+Ca²⁺和 Mg²⁺中之濃度為 2μg/mL 的 P-鈣黏蛋白-ECD1-3-Fc 蛋白或陰性對照蛋白塗層在 96 孔 Nunc Maxisorp®盤(Thermo Fisher Scientific，康乃迪克州 Madison)上一整夜。使用 PBS+Ca²⁺和 Mg²⁺將盤清洗三次並在室溫下，在 3%乳汁/PBS+Ca²⁺和 Mg²⁺中阻斷 1 小時。在室溫下，將依上述製備之噬菌體樣本加入該經阻斷之盤中 1 小時。以 PBS+Ca²⁺和 Mg²⁺將盤清洗三次，再加入二級抗體(抗 M13-HRP 1:2000，GE Healthcare，紐澤西州 Piscataway)。在室溫下將盤進一步培育 1 小時並以

PBS+Ca²⁺和 Mg²⁺清洗六次。使用 TMB(SurModics, 明尼蘇達州 Eden Prairie)發展信號, 以 H₂SO₄ 終止反應並在 EnVision® 盤式分析儀 (Perkin Elmer, 麻薩諸塞州 Waltham) 上, 在 450nm 讀取吸光度。

評估與人 P-鈣黏蛋白之結合

藉由 ELISA 測試抗 P-鈣黏蛋白 scFv 153 丙胺酸突變體之噬菌體製劑與人 P-鈣黏蛋白-Fc 蛋白之結合。以總結合信號(OD450)及與親代選殖株 153 相比較之結合百分比的形式繪製數據圖。然後, 根據選殖株 153 之結合百分比的標準偏差計算 Z-積分。此分析之數據呈現於表 46 和表 47 中。

結果指出噬菌體上之 scFv 表現良好並顯現出預期之選殖株 153 的結合活性。某些 CDR 殘基被認為重要, 因為突變成 Ala 將負面影響人 P-鈣黏蛋白之結合且 Z 積分小於 -1。某些 CDR 殘基被認為是中等重要, 因為突變成 Ala 將導致 Z 積分介於 -0.2 和 -1.0 之間。這些結果表明 H_{1.8}、H_{2.5}、H_{3.1}、H_{3.7} 和 L_{3.3} 對人 P-鈣黏蛋白之結合而言是重要的 AA, 而 H_{2.6}、H_{2.16}、H_{3.5}、H_{3.9}、L_{1.8}、L_{2.2}、L_{2.3}、L_{3.2} 和 L_{3.2} 對結合而言是適度重要的。

表 48.替換之 VH CDR1 殘基(DDG<=1.0kcal/mol)

CDR 位置 (行 1)	來自 P-cad 153 之殘基 (行 2)	替換之殘基 (行 3)
H1.1	G	R, Q, I, L, C, F, T, G, V, W, M, Y, N, E, P, K, H, D, S, or A
H1.2	Y	H, R, C, Q, Y, I, F, K, M, V, L, N, or T
H1.3	T	N, C, R, V, L, T, I, S, K, Q, M, W, A, F, Y, H, or D
H1.4	F	F or Y
H1.5	T	W, R, I, C, K, Y, M, V, F, T, S, L, Q, E, A, N, H, D, or G
H1.6	S	R, I, M, N, Y, C, H, Q, L, K, F, V, T, E, A, S, D, W, or G
H1.7	Y	K, R, L, H, F, Q, N, C, Y, M, I, T, V, or A
H1.8	G	P, R, F, W, H, C, Y, I, M, K, G, S, Q, A, L, N, T, or D
H1.9	I	Y, F, K, I, W, or L
H1.10	S	R, C, L, N, S, V, T, or A

表 49.替換之 VH CDR1 殘基(DDG<=0.5kcal/mol)

CDR 位置 (行 1)	來自 P-cad 153 之殘基 (行 2)	替換之殘基 (行 3)
H1.1	G	R, Q, I, L, C, F, T, G, V, W, M, Y, N, or E
H1.2	Y	H, R, C, Q, Y, I, F, K, M, V, or L
H1.3	T	N, C, R, V, L, T, I, S, K, Q, or M
H1.4	F	F or Y
H1.5	T	W, R, I, C, K, Y, M, V, F, T, S, L, Q, E, A, N, or H
H1.6	S	R, I, M, N, Y, C, H, Q, L, K, F, V, T, E, A, S, D, or W
H1.7	Y	K, R, L, H, F, Q, N, C, Y, M, I, or T
H1.8	G	P, R, F, W, H, C, Y, I, M, K, G, S, Q, A, L, or N
H1.9	I	Y, F, K, I, W, or L
H1.10	S	R, C, L, N, S, V, or T

表 50.替換之 VH CDR1 殘基(DDG<=0kcal/mol)

CDR 位置 (行 1)	來自 P-cad 153 之殘基 (行 2)	替換之殘基 (行 3)
H1.1	G	R, Q, I, L, C, F, T, or G
H1.2	Y	H, R, C, Q, or Y
H1.3	T	N, C, R, V, L, or T
H1.4	F	F
H1.5	T	W, R, I, C, K, Y, M, V, F, or T
H1.6	S	R, I, M, N, Y, C, H, Q, L, K, F, V, T, E, A, or S
H1.7	Y	K, R, L, H, F, Q, N, C, or Y
H1.8	G	P, R, F, W, H, C, Y, I, M, K, or G
H1.9	I	Y, F, K, or I
H1.10	S	R, C, L, N, or S

表 51.替換之 VH CDR2 殘基(DDG<=1.0kcal/mol)

CDR 位置 (行 1)	來自 P-cad 153 之殘基 (行 2)	替換之殘基 (行 3)
H2.1	W	W
H2.2	I	W, F, Y, I, V, H, L, or Q
H2.3	S	W, F, L, R, C, H, T, N, Y, Q, K, A, I, V, S, M, E, or D
H2.4	A	I, Y, V, Q, F, H, K, C, N, T, E, L, M, D, P, S, A, or W
H2.5	Y	C, P, T, S, L, V, M, F, W, Q, K, G, I, A, N, H, E, D, Y, R
H2.6	N	I, Q, W, V, C, L, K, E, T, M, F, Y, R, S, A, N, H, D, or G
H2.7	G	G, C, L, N, W, F, S, Y, T, D, I, or M
H2.8	N	Q, C, I, Y, W, L, T, V, K, M, H, F, S, R, A, E, N, D, or G
H2.9	T	F, L, V, W, H, C, Y, K, I, Q, R, T, M, N, A, S, or D
H2.10	N	R, W, K, F, C, T, L, Y, N, Q, V, H, M, A, S, or D
H2.11	Y	L, F, W, N, Y, H, K, R, I, M, V, C, Q, or E
H2.12	A	W, F, I, Y, L, R, V, M, H, N, C, Q, K, T, D, E, A, or S
H2.13	Q	P, R, Q, C, T, I, W, F, K, L, Y, S, V, M, D, or H
H2.14	K	W, C, I, F, T, R, Y, L, Q, S, V, D, N, M, K, A, H, E, or G
H2.15	L	W, I, L, V, F, K, R, H, Y, or M
H2.16	Q	W, F, C, T, L, R, N, Q, A, S, M, K, E, H, Y, or G
H2.17	G	P, G, T, M, C, E, or V

表 52.替換之 VH CDR2 殘基(DDG<=0.5kcal/mol)

CDR 位置 (行 1)	來自 P-cad 153 之殘基 (行 2)	替換之殘基 (行 3)
H2.1	W	W
H2.2	I	W, F, Y, I, or V
H2.3	S	W, F, L, R, C, H, T, N, Y, Q, K, A, I, V, S, M, or E
H2.4	A	I, Y, V, Q, F, H, K, C, N, T, E, L, M, D, P, S, A, or W
H2.5	Y	C, P, T, S, L, V, M, F, W, Q, K, G, I, A, N, H, E, D, or Y
H2.6	N	I, Q, W, V, C, L, K, E, T, M, F, Y, R, S, A, N, H, D, or G
H2.7	G	G, C, L, or N
H2.8	N	Q, C, I, Y, W, L, T, V, K, M, H, F, S, R, A, E, N, or D
H2.9	T	F, L, V, W, H, C, Y, K, I, Q, R, T, M, N, A, or S
H2.10	N	R, W, K, F, C, T, L, Y, N, Q, V, H, M, A, or S
H2.11	Y	L, F, W, N, Y, H, K, R, I, M, or V
H2.12	A	W, F, I, Y, L, R, V, M, H, N, C, Q, K, T, D, E, A, or S
H2.13	Q	P, R, Q, C, T, I, W, F, K, L, Y, or S
H2.14	K	W, C, I, F, T, R, Y, L, Q, S, V, D, N, M, K, A, H, or E
H2.15	L	W, I, L, V, F, K, R, or H
H2.16	Q	W, F, C, T, L, R, N, Q, A, S, M, or K
H2.17	G	P or G

表 53.替換之 VH CDR2 殘基(DDG<=0kcal/mol)

CDR 位置 (行 1)	來自 P-cad 153 之殘基 (行 2)	替換之殘基 (行 3)
H2.1	W	W
H2.2	I	W, F, Y, or I
H2.3	S	W, F, L, R, C, H, T, N, Y, Q, K, A, I, V, or S
H2.4	A	I, Y, V, Q, F, H, K, C, N, T, E, L, M, D, P, S, or A
H2.5	Y	C, P, T, S, L, V, M, F, W, Q, K, G, I, A, N, H, E, D, or Y
H2.6	N	I, Q, W, V, C, L, K, E, T, M, F, Y, R, S, A, N, or H
H2.7	G	G
H2.8	N	Q, C, I, Y, W, L, T, V, K, M, H, F, S, R, A, E, or N
H2.9	T	F, L, V, W, H, C, Y, K, I, Q, R, or T
H2.10	N	R, W, K, F, C, T, L, Y, or N
H2.11	Y	L, F, W, N, or Y
H2.12	A	W, F, I, Y, L, R, V, M, H, N, C, Q, K, T, D, E, or A
H2.13	Q	P, R, or Q
H2.14	K	W, C, I, F, T, R, Y, L, Q, S, V, D, N, M, or K
H2.15	L	W, I, or L
H2.16	Q	W, F, C, T, L, R, N, or Q
H2.17	G	P or G

表 54.替換之 VH CDR3 殘基(DDG<=1.0kcal/mol)

CDR 位置 (行 1)	來自 P-cad 153 之殘基 (行 2)	替換之殘基 (行 3)
H3.1	I	F, Y, I, R, W, or L
H3.2	D	F, I, C, M, W, Q, L, H, V, N, R, T, D, S, E, A, Y, or K
H3.3	T	H, W, C, I, S, L, T, F, Q, Y, V, A, M, K, N, G, D, or E
H3.4	A	Y, I, M, W, R, H, V, F, C, K, N, Q, L, D, T, S, A, or E
H3.5	N	W, L, V, I, P, C, Y, M, H, T, N, F, D, A, or S
H3.6	A	F, W, C, H, N, R, Y, L, A, Q, E, M, T, I, S, K, or D
H3.7	F	Y, F, or W
H3.8	G	W, F, Y, I, L, Q, R, H, M, N, V, C, T, K, E, D, S, A, P, or G
H3.9	I	W, Y, F, R, I, L, C, V, H, N, K, T, Q, M, or D

表 55.替換之 VH CDR3 殘基(DDG<=0.5kcal/mol)

CDR 位置 (行 1)	來自 P-cad 153 之殘基 (行 2)	替換之殘基 (行 3)
H3.1	I	F, Y, I, or R
H3.2	D	F, I, C, M, W, Q, L, H, V, N, R, T, D, S, E, A, Y, or K
H3.3	T	H, W, C, I, S, L, T, F, Q, Y, V, A, or M
H3.4	A	Y, I, M, W, R, H, V, F, C, K, N, Q, L, D, T, S, A, or E
H3.5	N	W, L, V, I, P, C, Y, M, H, T, N, F, or D
H3.6	A	F, W, C, H, N, R, Y, L, A, Q, E, M, T, I, or S
H3.7	F	Y, F, or W
H3.8	G	W, F, Y, I, L, Q, R, H, M, N, V, C, T, K, E, D, S, A, P, or G
H3.9	I	W, Y, F, R, I, L, C, V, H, N, or K

表 56.替換之 VH CDR3 殘基(DDG<=0kcal/mol)

CDR 位置 (行 1)	來自 P-cad 153 之殘基 (行 2)	替換之殘基 (行 3)
H3.1	I	F, Y, I, or R
H3.2	D	F, I, C, M, W, Q, L, H, V, N, R, T, or D
H3.3	T	H, W, C, I, S, L, or T
H3.4	A	Y, I, M, W, R, H, V, F, C, K, N, Q, L, D, T, S, or A
H3.5	N	W, L, V, I, P, C, Y, M, H, T, or N
H3.6	A	F, W, C, H, N, R, Y, L, or A
H3.7	F	Y or F
H3.8	G	W, F, Y, I, L, Q, R, H, M, N, V, C, T, K, E, D, S, A, P, or G
H3.9	I	W, Y, F, R, or I

表 57.替換之 VL CDR1 殘基(DDG<=1.0kcal/mol)

CDR 位置 (行 1)	來自 P-cad 153 之殘基 (行 2)	替換之殘基 (行 3)
L1.1	S	W, C, I, F, Y, T, H, N, M, Q, K, L, S, A, V, D, R, E, or G
L1.2	G	G
L1.3	S	R, Q, Y, L, K, F, M, N, W, C, I, T, V, S, E, A, H, D, or G
L1.4	S	C, L, F, S, I, T, W, N, Y, V, D, A, K, Q, M, H, or R
L1.5	S	F, C, I, T, V, N, H, L, Y, S, R, Q, W, A, M, E, K, or D
L1.6	N	L, Q, F, M, N, C, K, H, or T
L1.7	I	I, Q, H, F, L, or V
L1.8	G	R, Q, L, T, G, C, E, D, M, Y, or S
L1.9	N	C, W, I, L, F, R, V, T, K, N, S, M, Q, Y, E, A, H, or D
L1.10	N	Q, F, N, L, C, Y, H, R, W, or M
L1.11	Y	M, H, K, V, Q, L, Y, C, I, N, F, T, S, E, or W
L1.12	V	I, N, V, L, C, or T
L1.13	S	W, R, F, K, I, H, V, C, T, L, N, M, Q, Y, S, A, D, or E

表 58.替換之 VL CDR1 殘基(DDG<=0.5kcal/mol)

CDR 位置 (行 1)	來自 P-cad 153 之殘基 (行 2)	替換之殘基 (行 3)
L1.1	S	W, C, I, F, Y, T, H, N, M, Q, K, L, S, A, V, D, R, or E
L1.2	G	G
L1.3	S	R, Q, Y, L, K, F, M, N, W, C, I, T, V, S, E, A, H, or D
L1.4	S	C, L, F, S, I, T, W, N, Y, or V
L1.5	S	F, C, I, T, V, N, H, L, Y, S, R, Q, W, A, M, or E
L1.6	N	L, Q, F, M, N, or C
L1.7	I	I, Q, or H
L1.8	G	R, Q, L, T, G, or C
L1.9	N	C, W, I, L, F, R, V, T, K, N, S, M, Q, Y, E, A, H, or D
L1.10	N	Q, F, N, L, or C
L1.11	Y	M, H, K, V, Q, L, Y, C, or I
L1.12	V	I, N, or V
L1.13	S	W, R, F, K, I, H, V, C, T, L, N, M, Q, Y, S, or A

表 59.替換之 VL CDR1 殘基(DDG<=0kcal/mol)

CDR 位置 (行 1)	來自 P-cad 153 之殘基 (行 2)	替換之殘基 (行 3)
L1.1	S	W, C, I, F, Y, T, H, N, M, Q, K, L, or S
L1.2	G	G
L1.3	S	R, Q, Y, L, K, F, M, N, W, C, I, T, V, or S
L1.4	S	C, L, F, or S
L1.5	S	F, C, I, T, V, N, H, L, Y, or S
L1.6	N	L, Q, F, M, or N
L1.7	I	I
L1.8	G	R, Q, L, T, or G
L1.9	N	C, W, I, L, F, R, V, T, K, or N
L1.10	N	Q, F, or N
L1.11	Y	M, H, K, V, Q, L, or Y
L1.12	V	I, N, or V
L1.13	S	W, R, F, K, I, H, V, C, T, L, N, M, Q, Y, or S

表 60.替換之 VL CDR2 殘基(DDG<=1.0kcal/mol)

CDR 位置 (行 1)	來自 P-cad 153 之殘基 (行 2)	替換之殘基 (行 3)
L2.1	D	I, L, V, F, Y, W, C, R, Q, N, M, H, E, T, P, K, D, S, A, or G
L2.2	N	W, L, F, I, C, N, R, V, Q, Y, E, D, H, or M
L2.3	N	C, Q, L, F, Y, W, E, R, M, H, A, N, T, K, D, S, I, V, or G
L2.4	K	R, K, I, L, C, Q, V, W, Y, M, F, or H
L2.5	R	R, Q, L, W, K, or H
L2.6	P	R, K, I, W, F, L, Q, C, M, Y, H, V, N, T, A, E, S, P, or D
L2.7	S	C, L, I, T, S, K, M, R, V, F, P, A, W, Q, D, N, G, or Y

表 61.替換之 VL CDR2 殘基(DDG<=0.5kcal/mol)

CDR 位置 (行 1)	來自 P-cad 153 之殘基 (行 2)	替換之殘基 (行 3)
L2.1	D	I, L, V, F, Y, W, C, R, Q, N, M, H, E, T, P, K, D, S, or A
L2.2	N	W, L, F, I, C, N, R, V, or Q
L2.3	N	C, Q, L, F, Y, W, E, R, M, H, A, N, T, K, D, S, or I
L2.4	K	R, K, I, L, C, Q, or V
L2.5	R	R or Q
L2.6	P	R, K, I, W, F, L, Q, C, M, Y, H, V, N, T, A, E, S, or P
L2.7	S	C, L, I, T, S, K, M, R, V, F, P, or A

表 62.替換之 VL CDR2 殘基(DDG<=0kcal/mol)

CDR 位置 (行 1)	來自 P-cad 153 之殘基 (行 2)	替換之殘基 (行 3)
L2.1	D	I, L, V, F, Y, W, C, R, Q, N, M, H, E, T, P, K, or D
L2.2	N	W, L, F, I, C, or N
L2.3	N	C, Q, L, F, Y, W, E, R, M, H, A, or N
L2.4	K	R or K
L2.5	R	R
L2.6	P	R, K, I, W, F, L, Q, C, M, Y, H, V, N, T, A, E, S, or P
L2.7	S	C, L, I, T, or S

表 63.替換之 VL CDR3 殘基(DDG<=1.0kcal/mol)

CDR 位置 (行 1)	來自 P-cad 153 之殘基 (行 2)	替換之殘基 (行 3)
L3.1	G	W, R, Y, F, L, N, Q, C, M, I, H, T, A, D, E, S, K, V, or G
L3.2	T	N, C, V, T, S, or A
L3.3	W	W
L3.4	D	F, N, D, E, H, Q, Y, R, or W
L3.5	S	T, I, R, L, C, F, Y, W, Q, M, H, E, N, V, S, D, K, or A
L3.6	S	I, H, C, M, N, L, V, Q, E, S, T, A, K, D, F, Y, G, R, or W
L3.7	L	L, C, R, I, H, Q, E, T, V, M, K, F, or Y
L3.8	S	W, L, C, F, T, N, V, Y, I, M, H, Q, S, K, E, D, A, R, or G
L3.9	G	L, Y, Q, F, H, I, C, R, M, N, D, W, E, K, T, V, A, S, or G
L3.10	V	I, F, K, L, H, Y, M, V, Q, W, T, N, or C
L3.11	V	Q, W, R, F, T, C, Y, V, E, L, N, I, K, or M

表 64.替換之 VL CDR3 殘基(DDG<=0.5kcal/mol)

CDR 位置 (行 1)	來自 P-cad 153 之殘基 (行 2)	替換之殘基 (行 3)
L3.1	G	W, R, Y, F, L, N, Q, C, M, I, H, T, A, D, E, S, K, V, or G
L3.2	T	N, C, V, or T
L3.3	W	W
L3.4	D	F, N, D, or E
L3.5	S	T, I, R, L, C, F, Y, W, Q, M, H, E, N, V, S, D, K, or A
L3.6	S	I, H, C, M, N, L, V, Q, E, S, T, A, or K
L3.7	L	L, C, R, I, H, Q, E, T, or V
L3.8	S	W, L, C, F, T, N, V, Y, I, M, H, Q, S, K, E, D, A, or R
L3.9	G	L, Y, Q, F, H, I, C, R, M, N, D, W, E, K, T, V, A, S, or G
L3.10	V	I, F, K, L, H, Y, M, V, Q, W, or T
L3.11	V	Q, W, R, F, T, C, Y, V, E, L, or N

表 65.替換之 VL CDR3 殘基(DDG<=0kcal/mol)

CDR 位置 (行 1)	來自 P-cad 153 之殘基 (行 2)	替換之殘基 (行 3)
L3.1	G	W, R, Y, F, L, N, Q, C, M, I, H, T, A, D, E, S, K, V, or G
L3.2	T	N, C, V, or T
L3.3	W	W
L3.4	D	F, N, D, or E
L3.5	S	T, I, R, L, C, F, Y, W, Q, M, H, E, N, V, or S
L3.6	S	I, H, C, M, N, L, V, Q, E, or S
L3.7	L	L
L3.8	S	W, L, C, F, T, N, V, Y, I, M, H, Q, or S
L3.9	G	L, Y, Q, F, H, I, C, R, M, N, D, W, E, K, T, V, A, S, or G
L3.10	V	I, F, K, L, H, Y, M, or V
L3.11	V	Q, W, R, F, T, C, Y, or V

表 66-71 顯示出在每個 CDR 位置之人序列的 Abysis 分析結果。將來自抗 P-鈣黏蛋白 153 之各 CDR 與來自數

據庫之人抗體序列的對應 CDR 相比較。此數據庫結合來自多個數據庫之所有人序列，該多個數據庫包括：PDB、Kabat 數據庫、IMGT 數據庫、VBASE 和輝瑞之內部數據庫。在此數據庫中之人抗體序列為以 Abysis 編號之 Kabat，而 CDR 殘基之頻率僅使用與抗 P-鈣黏蛋白選殖株 153 中所發現者具有相同長度的 CDR 計算。表 66-71 顯示出每個位置處之替換胺基酸，其中該所列出之殘基存在於至少 5%或 10%之人序列中。原始 P-鈣黏蛋白 153 殘基亦包含在第 3 行和第 4 行中，即使他們並不在上述之 5%或 10%類別中。

表 66.替換之 VH CDR1 殘基(Abysis)

CDR 位置 (行 1)	來自 P-cad 153 之殘基 (行 2)	替換之殘基 (>5% 之人序列) (行 3)	替換之殘基 (>10% 之人序列) (行 4)
H1.1	G	G	G
H1.2	Y	Y, F, or G	Y, F, or G
H1.3	T	T or S	T or S
H1.4	F	F	F
H1.5	T	S or T	S or T
H1.6	S	S, G, N, or D	S, G, or N
H1.7	Y	Y	Y
H1.8	G	A, Y, W, or G	A, Y, W, or G
H1.9	I	M, I, or W	M or I
H1.10	S	S, H, N, or G	S, H, N, or G

表 67. 替換之 VH CDR2 殘基(Abysis)

CDR 位置 (行 1)	來自 P-cad 153 之殘基 (行 2)	替換之殘基 (>5% 之人序列) (行 3)	替換之殘基 (>10% 之人序列) (行 4)
H2.1	W	W, I, G, A, V, R, or S	W, I, G, or A
H2.2	I	I	I
H2.3	S	S, N, Y, or I	S, N, Y, or I
H2.4	A	P, G, Y, A, or S	P, G, or A
H2.5	Y	S, N, D, G, I, or Y	S, N, D, G, I, or Y
H2.6	N	G, S, D, N, or F	G, S, D, or N
H2.7	G	G or S	G or S
H2.8	N	N, S, T, D, G, or Y	N, S, T, D, or G
H2.9	T	T, K, A, or I	T, K, or A
H2.10	N	Y, N, R, S, or G	Y, N, or R
H2.11	Y	Y	Y
H2.12	A	A or S	A or S
H2.13	Q	Q, D, or P	Q, D, or P
H2.14	K	S or K	S or K
H2.15	L	F, V, or L	F, V, or L
H2.16	Q	Q or K	Q or K
H2.17	G	G	G

表 68. 替換之 VH CDR3 殘基(Abysis)

CDR 位置 (行 1)	來自 P-cad 153 之殘基 (行 2)	替換之殘基 (>5% 之人序列) (行 3)	替換之殘基 (>10% 之人序列) (行 4)
H3.1	I	G, D, P, V, F, S, or I	G, D, or I
H3.2	D	G, R, I, L, V, S, Q, or D	G, R, or D
H3.3	T	G, R, V, S, L, K, Y, or T	G or T
H3.4	A	G, I, Y, R, F, L, S, or A	G, I, Y, R, or A
H3.5	N	G, S, Y, D, V, E, R, or N	G, S, Y, or N
H3.6	A	G, A, R, Y, or P	G, A, or R
H3.8	F	F, M, P, or L	F, M, or P
H3.9	G	D, E, or G	D, E, or G
H3.10	I	Y, V, or I	Y, V, or I

表 69.替換之 VL CDR1 殘基(Abysis)

CDR 位置 (行 1)	來自 P-cad 153 之殘基 (行 2)	替換之殘基 (>5% 之人序列) (行 3)	替換之殘基 (>10% 之人序列) (行 4)
L1.1	S	S or T	S
L1.2	G	G or R	G
L1.3	S	S	S
L1.4	S	S, R, or T	S
L1.5	S	S or G	S
L1.6	N	N or S	N
L1.7	I	I or V	I
L1.8	G	G or A	G
L1.9	N	S, N, or G	S or N
L1.10	N	N or Y	N
L1.11	Y	Y, T, or S	Y or T
L1.12	V	V	V
L1.13	S	S, N, Y, or Q	S, N, or Y

表 70.替換之 VL CDR2 殘基(Abysis)

CDR 位置 (行 1)	來自 P-cad 153 之殘基 (行 2)	替換之殘基 (>5% 之人序列) (行 3)	替換之殘基 (>10% 之人序列) (行 4)
L2.1	D	D, G, E, A, S, or R	D, G, E, A, or S
L2.2	N	A, N, V, D, or T	A, N, or V
L2.3	N	S, N, or T	S or N
L2.4	K	N, S, Q, K, or T	N, S, Q, or K
L2.5	R	R or L	R or L
L2.6	P	P, A, Q, or E	P, A, or Q
L2.7	S	S or T	S or T

表 71.替換之 VL CDR3 殘基(Abysis)

CDR 位置 (行 1)	來自 P-cad 153 之殘基 (行 2)	替換之殘基 (>5% 之人序列) (行 3)	替換之殘基 (>10% 之人序列) (行 4)
L3.1	G	A, Q, G, or S	A, Q, G, or S
L3.2	T	S, A, T, or V	S, A, or T
L3.3	W	W, Y, or R	W or Y
L3.4	D	D, A, or T	D
L3.5	S	S, D, or G	S or D
L3.6	S	S	S
L3.7	L	L, S, or G	L or S
L3.8	S	S, N, T, R, or D	S, N, or T
L3.9	G	G, A, H, or L	G or A
L3.10	V	V, W, Y, G, or P	V, W, or Y
L3.11	V	V, L, or I	V

本文所引用之每一專利、專利申請案和出版物之揭示

內容的全文以引用方式併入本文中。

雖然本發明已參考特定之實施態樣揭示，顯然地，其他熟習本技藝之人士可設計本發明之其他實施態樣和變化而不悖離本發明之真正精神和範圍。所附之申請專利範圍包括所有該等實施態樣和等效之變化。

序 列 表

<110> 美商輝瑞股份有限公司
(Pfizer Inc.)

<120> 雙特異性異質二聚體雙功能抗體及彼等之用途

<130> PC72054A DIV 02

<140> TW 107142295

<141> 2015-06-29

<160> 239

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成之肽序列

<400> 1

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

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

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

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

<210> 2

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成之肽序列

<400> 2

Gln Met 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 Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Leu Ile Gly Ser Gly Val Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 3
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 3

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

<210> 4
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 4

Glu 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 Ser Tyr
20 25 30
Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 5
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 5

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

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

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

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 6
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 6

Glu 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 Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 7
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 7

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

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

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

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 8
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 8

Glu 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 Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 9
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 9

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

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

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

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ser Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

<210> 10
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 10

Glu 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 Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Thr Ile Asp Thr Ala Thr Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 11
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 11

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

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

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

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

<210> 12
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 12

Glu 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 Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 13
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 13

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

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 20 25 30

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

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
 65 70 75 80

Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
 85 90 95

Ser Ala Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 14
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 14
Glu 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 Ser Tyr
20 25 30
Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Thr Ile Asp Thr Ala Asn Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 15
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 15
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15
Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30
Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80
Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95
Ser Ala Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

<210> 16
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 16

Glu 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 Ser Tyr
20 25 30
Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Thr Ile Asp Thr Ala Asn Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 17
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 17

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

<210> 18
<211> 118

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 18

Glu 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 Ser Tyr
20 25 30
Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Thr Ile Asp Thr Ala Asn Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 19
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 19

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

<210> 20
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 20

Glu 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 Ser Tyr
20 25 30
Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Thr Ile Asp Thr Ala Asn Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 21
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 21

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

Ser Ala Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

<210> 22
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 22

Glu 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 Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 23
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 23

Gln Ser Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

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

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu

859095

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100105110

<210> 24
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 24

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
151015

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
202530

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
354045

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
505560

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65707580

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
859095

Ala Thr Ile Asn Ala Pro Asn Asn Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100105110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 25
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 25

Ser Tyr Gly Ile Ser
15

<210> 26
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 26

Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln
151015

Gly

<210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 27

Ile Gly Ser Gly Val Ala Phe Asp Ile
1 5

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 28

Ile Asp Thr Ala Ser Ala Phe Asp Ile
1 5

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 29

Ile Asp Thr Ala Asn Ala Phe Gly Ile
1 5

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 30

Ile Asp Thr Ala Thr Ala Phe Asp Ile
1 5

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 31

Ile Asp Thr Ala Asn Ala Phe Asp Ile
1 5

<210> 32
<211> 9
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成之肽序列

<400> 32

Ile Asn Ala Pro Asn Asn Phe Asp Ile
1 5

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成之肽序列

<400> 33

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly Ile Ser
1 5 10

<210> 34

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成之肽序列

<400> 34

Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn
1 5 10

<210> 35

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成之肽序列

<400> 35

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 36

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成之肽序列

<400> 36

Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 37

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成之肽序列

<400> 37

Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 38
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 38

Asp Ser Asn Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 39
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 39

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

<210> 40
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 40

Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu Ser Ala Trp Val
1 5 10

<210> 41
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 41

Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu Ser Ala Val Val
1 5 10

<210> 42
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 42

Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu Ser Gly Val Val
1 5 10

<210> 43
<211> 11
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成之肽序列

<400> 43

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

<210> 44

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成之肽序列

<400> 44

Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu Ser Ser Trp Val
1 5 10

<210> 45

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成之肽序列

<400> 45

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

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

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

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

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

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 46

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成之肽序列

<400> 46

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 47
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 47

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

<210> 48
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 48
Thr Tyr Ala Met Asn
1 5

<210> 49
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 49
Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 50
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 50
Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Asp

<210> 51
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 51
His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 52
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 52
Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn
1 5 10

<210> 53
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成之肽序列

<400> 53

Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn
1 5 10

<210> 54
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 54

Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
1 5 10

<210> 55
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 55

Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn
1 5 10

<210> 56
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 56

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro
1 5

<210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 57

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val
1 5

<210> 58
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 58
ggagattttc aacgtgaa

18

<210> 59

<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 59
ctcttctgag atgagttttt g

21

<210> 60
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 60
Cys Pro Pro Cys Pro
1 5

<210> 61
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 61
Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
20 25

<210> 62
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 62
Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
20 25

<210> 63
<211> 216
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 63
Ala Pro Glu Ala Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
210 215

<210> 64
<211> 216
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 64

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Glu Glu Met
 115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
210 215

<210> 65
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 65

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 66
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 66

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 67
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 67
tccgga

6

<210> 68
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 68

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 69
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 69

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 70
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 70

Gly Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1 5

<210> 71
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成之肽序列

<400> 71

Gly Val Glu Pro Lys Ser Cys
1 5

<210> 72

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成之肽序列

<400> 72

Gly Gly Cys Gly Gly Gly
1 5

<210> 73

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成之肽序列

<400> 73

Gly Cys Pro Pro Cys Pro
1 5

<210> 74

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成之肽序列

<400> 74

Gly Gly Thr Gly Gly Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 75

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成之肽序列

<400> 75

Gly Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 76

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成之肽序列

<400> 76

Gly Gly Thr Gly Gly Gly Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr
1 5 10 15

Cys Pro Pro Cys Pro
20

<210> 77
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 77

Lys Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Glu
1 5

<210> 78
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 78

His His His His His
1 5

<210> 79
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 79

Gly Gly Cys Gly Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys
1 5 10

<210> 80
<211> 277
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 80

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

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

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

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
130 135 140

Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160

Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr
165 170 175

Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
180 185 190

Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr
195 200 205

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn
210 215 220

Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
225 230 235 240

Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
245 250 255

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val
260 265 270

Ala Ala Leu Lys Glu
275

<210> 81
<211> 270
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 81

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

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

<210> 82
<211> 277
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 82

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15
Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30
Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
130 135 140

Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr
165 170 175

Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg
180 185 190

Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr
195 200 205

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn
210 215 220

Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
225 230 235 240

Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
245 250 255

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val
260 265 270

Ala Ala Leu Lys Glu
275

<210> 83
<211> 270
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 83

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly

35

40

45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe

505560

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala

65707580

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn

859095

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly

100105110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu

115120125

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly

130135140

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly

145150155160

Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr

165170175

Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr

180185190

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp

195200205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Ile Asp Thr Ala Asn Ala Phe Gly

210215220

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly

225230235240

Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys

245250255

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys

260265270

<210> 84

<211> 277

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成之肽序列

<400> 84

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln

151015

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn

202530

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

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ser Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
130 135 140

Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr
165 170 175

Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg
180 185 190

Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr
195 200 205

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn
210 215 220

Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
225 230 235 240

Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
245 250 255

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val
260 265 270

Ala Ala Leu Lys Glu
275

<210> 85
<211> 270
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 85

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
115 120 125

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
130 135 140

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160

Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr
165 170 175

Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr
180 185 190

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp
195 200 205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Ile Asp Thr Ala Thr Ala Phe Asp
210 215 220

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly
225 230 235 240

Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
245 250 255

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
260 265 270

<210> 86
<211> 277
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 86

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

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

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

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
130 135 140

Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160

Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr
165 170 175

Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
180 185 190

Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr
195 200 205

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn
210 215 220

Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
225 230 235 240

Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
245 250 255

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val
260 265 270

Ala Ala Leu Lys Glu
275

<210> 87
<211> 270
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 87
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95
Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
100 105 110
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
115 120 125
Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
130 135 140
Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160
Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr
165 170 175
Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr
180 185 190
Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp
195 200 205
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Ile Asp Thr Ala Asn Ala Phe Asp
210 215 220
Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly
225 230 235 240
Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
245 250 255
Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
260 265 270

<210> 88
<211> 465
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成之肽序列

<400> 88

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

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

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

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
130 135 140

Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160

Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr
165 170 175

Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
180 185 190

Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr
195 200 205

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn
210 215 220

Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
225 230 235 240

Val Ser Ser Gly Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Ala
245 250 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
260 265 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
275 280 285

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

290 295 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
305 310 315 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
325 330 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
340 345 350

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
355 360 365

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
370 375 380

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450 455 460

Gly
465

<210> 89
<211> 458
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 89

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
115 120 125

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
130 135 140

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160

Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr
165 170 175

Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr
180 185 190

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp
195 200 205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Ile Asp Thr Ala Ser Ala Phe Asp
210 215 220

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Cys Pro Pro
225 230 235 240

Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
245 250 255

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
260 265 270

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
275 280 285

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
290 295 300

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
305 310 315 320

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
325 330 335

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
340 345 350

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Glu
355 360 365

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe
370 375 380

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu

Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr
195 200 205

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn
210 215 220

Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
225 230 235 240

Val Ser Ser Gly Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Ala
245 250 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
260 265 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
275 280 285

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
290 295 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
305 310 315 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
325 330 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
340 345 350

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
355 360 365

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
370 375 380

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450 455 460

Gly
465

<210> 91
<211> 458
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 91

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95
Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
100 105 110
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
115 120 125
Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
130 135 140
Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160
Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr
165 170 175
Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr
180 185 190
Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp
195 200 205
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Ile Asp Thr Ala Asn Ala Phe Gly
210 215 220
Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Cys Pro Pro
225 230 235 240
Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
245 250 255
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
260 265 270
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
275 280 285

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
290 295 300

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
305 310 315 320

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
325 330 335

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
340 345 350

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Glu
355 360 365

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe
370 375 380

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
385 390 395 400

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

Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
420 425 430

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
435 440 445

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455

<210> 92
<211> 465
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 92

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

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

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

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ser Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
130 135 140

Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160

Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr
165 170 175

Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
180 185 190

Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr
195 200 205

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn
210 215 220

Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
225 230 235 240

Val Ser Ser Gly Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Ala
245 250 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
260 265 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
275 280 285

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
290 295 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
305 310 315 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
325 330 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
340 345 350

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
355 360 365

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
370 375 380

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450 455 460

Gly
465

<210> 93
<211> 458
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 93

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
115 120 125

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
130 135 140

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160

Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr
165 170 175

Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr
180 185 190

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp
195 200 205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Ile Asp Thr Ala Thr Ala Phe Asp
210 215 220

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Cys Pro Pro
225 230 235 240

Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
245 250 255

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
260 265 270

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
275 280 285

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
290 295 300

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
305 310 315 320

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
325 330 335

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
340 345 350

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Glu
355 360 365

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe
370 375 380

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
385 390 395 400

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

Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
420 425 430

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
435 440 445

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455

<210> 94
<211> 465
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 94

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

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

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

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
130 135 140

Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160

Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr
165 170 175

Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
180 185 190

Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr
195 200 205

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn
210 215 220

Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
225 230 235 240

Val Ser Ser Gly Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Ala
245 250 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
260 265 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
275 280 285

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
290 295 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
305 310 315 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
325 330 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
340 345 350

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
355 360 365

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
370 375 380

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450 455 460

Gly
465

<210> 95
<211> 458
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列
<400> 95

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
 100 105 110
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
 115 120 125
 Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 130 135 140
 Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 145 150 155 160
 Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr
 165 170 175
 Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr
 180 185 190
 Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp
 195 200 205
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Ile Asp Thr Ala Asn Ala Phe Asp
 210 215 220
 Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Cys Pro Pro
 225 230 235 240
 Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 245 250 255
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 260 265 270
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 275 280 285
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 290 295 300
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 305 310 315 320
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 325 330 335
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 340 345 350
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Glu
 355 360 365
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe
 370 375 380
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 385 390 395 400

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

Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
420 425 430

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
435 440 445

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455

<210> 96
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 96

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 97
<211> 330
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 97
cagtctgtgc tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60
tctgtctctg gaagcagctc caacattggg aataattatg tctcctggta ccagcagctc 120
ccaggaacag cccccaaact cctcatattat gacaataata agcgaccctc agggattcct 180
gaccgattct ctggctccaa gtcctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag 240
actggggacg agggccgatta ttactgcgga acatgggata gcagcctgag tgctgtggta 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 98
<211> 354
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 98
gaggtccagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcttgcaagg cttctggtta cacctttacc agctacggta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acaatggtaa cacaactat 180
gcacagaagc tccagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gactatcgat 300
acagctagtg cttttgatat ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc ttcc 354

<210> 99
<211> 330

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 99
cagtcgtgtgc tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60
tcctgctctg gaagcagctc caacattggg aataattatg taccctggta ccagcagctc 120
ccaggaacag cccccaaact cctcatitat gacaataata agcgaccctc agggattcct 180
gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag 240
actggggacg aggccgatta ttactgcgga acatgggata gcagcctgag tgggtgtgta 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 100
<211> 354
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 100
gaggtccagc tgggtcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg ctcttggtta cacccttacc agctacggta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acaatggtaa cacaactat 180
gcacagaagc tccagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240
atggagctga gaggcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gactatcgat 300
acagctaatt cttttgggtat ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc gtcc 354

<210> 101
<211> 330
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 101
cagtcgtgtgc tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60
tcctgctctg gaagcagctc caacattggg aataattatg taccctggta ccagcagctc 120
ccaggaacag cccccaaact cctcatitat gacaataata agcgaccctc agggattcct 180
gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag 240
actggggacg aggccgatta ttactgcgga acatgggata gcagcctgag ttcttatgtc 300
ttcgggaactg ggaccaaggt caccgtccta 330

<210> 102
<211> 354
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 102
gaggtccagc tgggtcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg ctcttggtta cacccttacc agctacggta tcagctgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acaatggtaa cacaaactat 180
gcacagaagc tccagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgag cactgcctac 240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gactatcgat 300
acagctactg cttttgatat ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc gtcc 354

<210> 103
<211> 330
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 103
cagtcgtctt tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60
tcctgctctg gaagcagctc caacattggg aataattatg tatccttgta ccagcagctc 120
ccaggaacag cccccaact cctcatttat gacaataata agcgaccctc agggattcct 180
gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag 240
actggggacg aggccgatta ttactgcgga acatgggata gcagcctgag tgcatatgtc 300
ttcgggaactg ggaccaaggt caccgtccta 330

<210> 104
<211> 354
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 104
gaggtccagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg ctctcttgta cacctttacc agctacggtt tcagctggat gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acaatggtaa cacaaactat 180
gcacagaagc tccagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gactatcgat 300
acagctagtg cttttgatat ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc gacg 354

<210> 105
<211> 330
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 105
cagtcgtctt tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60
tcctgctctg gaagcagctc caacattggg aataattatg tatccttgta ccagcaactc 120
ccaggtacag cccccaact cctcatttat gacaataata agcgaccctc agggattcct 180
gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag 240
gctggggacg aggccgatta ttactgcgga acatgggata gcagcctgag tgcttatgtc 300
ttcgggaactg ggaccaaggt caccgtccta 330

<210> 106
<211> 354

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 106
gagggtccagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggccctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc agctacggta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acaatggtaa cacaaactat 180
gcacagaagc tccagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gactatcgat 300
acagctaattg cttttgatat ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc gagg 354

<210> 107
<211> 330
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 107
cagtcctgtct tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60
tcctgctctg gaagcagctc caacattggg aataattatg tatcctggta ccagcagctc 120
ccaggaaacag cccccaaact cctcatttat gacaataata agcgaccctc agggattcct 180
gaccgattct ctggctccaa gtctggcagc tcagccaccc tgggcatcac cggactccag 240
actggggacg aggccgatta ttactgcgga acatgggata gcagcctgag tgcttatgtc 300
ttcggaaactg ggaccaaggt caccgtccta 330

<210> 108
<211> 354
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 108
gagggtccagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggccctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc agctacggta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acaatggtaa cacaaactat 180
gcacagaagc tccagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gactatcgat 300
acagctaattg cttttgatat ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc gagg 354

<210> 109
<211> 330
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 109
cagtcctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60
tcctgctctg gaagcagctc caacattggg aataattatg tatcctggta ccagcagctc 120

ccaggaacag cccccaaact cctcatttat gacaataata agcgaccctc agggattcct 180
gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag 240
actggggacg aggccgatta ttactgcgga acatgggata gcagcctgag tgctgtggta 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 110
<211> 354
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 110
gaggtccagc tgggtcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg ctcttggtta cacctttacc agctacggtt tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acaatggtaa cacaaactat 180
gcacagaagc tccagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gactatcgat 300
acagctaattg cttttgatat ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc gagg 354

<210> 111
<211> 330
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 111
cagtcctgcc tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60
tcctgctcig gaagcaggtc caacattgga aataattatg tatcctggta ccagcaactc 120
ccaggaacag cccccaaact cctcatttat gacagtaata agcgaccctc agggattcct 180
gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag 240
actggggacg aggccgatta ttactgcgga acatgggata gcagcctgag ttcttgggtg 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 112
<211> 354
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 112
gaggtccagc tgggtcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg ctcttggtta cacctttacc agctacggtt tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acaatggtaa cacaaactat 180
gcacagaagc tccagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gactatcgat 300
acagctaattg cttttgatat ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc gagg 354

<210> 113
<211> 330

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 113
cagtcctgtgg tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60
tcctgctctg gaagcagctc caacattggg aataattatg tatcctggta ccagcagctc 120
ccaggaacag cccccaaact cctcatttat gacaataata agcgaccctc agggattcct 180
gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag 240
actggggacg aggccgatta ttactgcgga acatgggata gcagcctgag tgcttatgtc 300
ttcgggaactg ggaccaaggt caccgtccta 330

<210> 114
<211> 354
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 114
gaggtccagc tgggtcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg ctcttggtta caccittacc agctacggtt tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acaatggtaa cacaactat 180
gcacagaagc tccaggcgag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gactatcgat 300
acagctaagt cttttgatat ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc gagg 354

<210> 115
<211> 330
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 115
cagtcctgtgg tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60
tcctgctctg gaagcagctc caacattggg aataattatg tatcctggta ccagcagctc 120
ccaggaacag cccccaaact cctcatttat gacaataata agcgaccctc agggattcct 180
gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag 240
actggggacg aggccgatta ttactgcgga acatgggata gcagcctgag tgcttgggtg 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 116
<211> 354
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 116
gaggtccagc tgggtcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg ctcttggtta caccittacc agctacggtt tcagctgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acaatggtaa cacaaactat 180
gcacagaagc tccagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gactattaat 300
gcgcctaata attttgatat ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc gtcc 354

<210> 117
<211> 1395
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 117
cagtcctgtc tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60
tcctgctctg gaagcagctc caacattggg aataattatg tatectggta ccagcagctc 120
ccaggaacag ccccaaaact cctcatttat gacaataata agcgaccctc agggattcct 180
gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag 240
actggggacg aggccgatta ttactcggga acatgggata gcagcctgag tgcctgtgta 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggtggcggat ccggcggcgg aggcgagggtg 360
cagctggtgg agtctggggg aggcctggtc cagcctggag ggtccctgag actctcctgt 420
gcagcctctg gattcacctt cagcacatac gctatgaatt gggtcggcca ggtccagggt 480
aaggggctgg agtgggttgg caggatcagg tccaagtaca acaattatgc aacctactat 540
gccgactctg tgaagggcag attcaccatc tcaagagatg attcaaagaa ctactgtat 600
ctgcaaatga acagcctgaa aaccgaggac acggccgtgt attactgtgt gagacacggt 660
aacttcggca attcttacct gtcttgggtt gcttattggg gacaggggac actggtgact 720
gtgtcttccg gatgccacc gtgccagca cctgaagccg ctggggcacc gtcagtcttc 780
ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 840
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 900
gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 960
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 1020
aaggcttcca acaaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1080
cagccccgag aaccacaggt gtgcaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac 1140
caggtcagcc tgtggtgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1200
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1260
ggctccttct tcctctatag caagctcacc gtggacaaga gcagggtggca gcaggggaac 1320
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1380
tccctgtccc cgggt 1395

<210> 118
<211> 1374
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 118
caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg 60

acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcagcag 120
aagccaggac aggcaccaag gggcctgaic ggggggtacaa acaaaagggc tccctggacc 180
cctgcacggt tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca 240
caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc 300
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga ggggggtggat ccggtggagg tggcgaggtc 360
cagctggtgc agtctggagc tgaggatgaag aagcctgggg cctcagtgaa ggtctcctgc 420
aaggcttctg gttacacctt taccagctac ggtatcagct ggggtcgaca gcccctgga 480
caaggccttg agtggatggg atggatcagc gcttacaatg gtaacacaaa ctatgcacag 540
aagctccagg gcagagtcac catgaccaca gacacatcca cgagcacagc ctacatggag 600
ctgaggagcc tgagatctga cgacacggcc gtgtattact gtgcgactat cgatacagct 660
agtgtctttt atatctgggg ccaagggaca atgggcaccg tctcttccgg atgtccaccg 720
tgcccagcac ctgaagccgc tggggcaccg tcagtcctcc tcttcccccc aaaacccaag 780
gacaccctca tgatctcccc gacccttgag gtcacatgcg tgggtgggtga cgtgagccac 840
gaagaccctg aggtcaagtt caactgggtac gtggacggcg tggagggtga taatgccaaag 900
acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc 960
ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtga aggtctccaa caaagccctc 1020
ccagccccc a tcgagaaaa ccatctccaa gccaaagggc agcccccaga accacaggtg 1080
tacaccctgc ccccatgccg ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gtcctgcgcg 1140
gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 1200
aacaactaca agaccacgcc tcccgtgcg gactccgacg gctccttctt cctcgttagc 1260
aagctcaccg tggacaagag cagggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg 1320
catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct cctgtcccc gggt 1374

<210> 119
<211> 1395
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 119
cagtctgtgc tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60
tcctgtctcg gaagcagctc caacattggg aataattatg tatcctggta ccagcagctc 120
ccaggaacag cccccaact cctcatttat gacaataata agcgaccctc agggattcct 180
gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatac cggactccag 240
actggggacg aggccgatta ttactgcgga acatgggata gcagcctgag tgggtgtgta 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggtggcggat ccggcggcgg aggcgaggtg 360
cagctggtgg agtctggggg aggccttggtc cagcctggag ggtccctgag actctcctgt 420
gcagcctctg gattcacctt cagcacatac gctatgaati gggtccgcca ggctccaggg 480
aaggggctgg agtgggttgg caggatcagg tccaagtaca acaattatgc aacctactat 540
gccgactctg tgaagggcag attcaccatc tcaagagatg attcaaagaa ctactgtat 600
ctgcaaatga acagcctgaa aaccgaggac acggccgtgt attactgtgt gagacacggt 660

aacttcggca attcttacgt gtcttggttt gcttattggg gacaggggac actggtgact 720
gtgtcttccg gatgcccacc gtgcccagca cctgaagccg ctggggcacc gtcagtcttc 780
ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 840
gtggtgggtg acgtgagcca cgaagaccct gaggtaagt tcaactggtg cgtggacggc 900
gtggagggtg ataattgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 960
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 1020
aaggcttcca acaaagccct ccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1080
cagccccgag aaccacaggt gtgcaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac 1140
caggtcagcc tgtggtgctt ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1200
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctccgtgct ggaactccgac 1260
ggctccttct tcctctatag caagctcacc gtggacaaga gcagggtgga gcaggggaac 1320
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1380
tccctgtccc cgggt 1395

<210> 120
<211> 1374
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 120
caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg 60
acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcagcag 120
aagccaggac aggcaccaag gggcctgac ggggtgtaaa aaaaagggc tccctggacc 180
cctgcacggt ttcttggaag tcgtctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca 240
caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc 300
gggggtgga caaaactgac tgtctggga ggggtggat ccggtggagg tggcgaggtc 360
cagctggtgc agtctggagc tgaggigaag aagcctgggg cctcagtga ggtctcctgc 420
aaggcttctg gttacacctt taccagctac ggtatcagct ggggtgcgaca ggcccctgga 480
caagggcttg agtggatggg atggatcagc gttacaatg gtaacacaaa ctatgcacag 540
aagctccagg gcagagtcac catgaccaca gacacatcca cgagcacagc ctacatggag 600
ctgaggagcc tgagatctga cgacacggcc gtgtattact gtgcgactat cgatacagct 660
aatgcttttg gtatctgggg ccaagggaca atggtcaccg tctcgtccgg atgtccaccg 720
tgcccagcac ctgaagccgc tggggcaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag 780
gacaccctca tgatctcccg gaccctgag gtcacatgcg tgggtgtgga cgtgagccac 840
gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg tggagggtga taatgccaa 900
acaaagccgc gggaggagca giacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc 960
ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtga aggtctccaa caaagccctc 1020
ccagccccca tcgagaaaac catctccaa gccaaagggc agccccgaga accacagggtg 1080
tacaccctgc cccatgccg ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gtcctgcgcg 1140
gtcaaaggct tctatccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 1200
aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg gactccgacg gtccttctt cctcgttagc 1260

aagctcaccg tggacaagag caggtaggcag cagggggaacg 1cttctcatg ctccgtgatg 1320
catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct ccctgtcccc gggt 1374

<210> 121
<211> 1395
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 121
cagtcctgtgc tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60
tctgtctctg gaagcagctc caacattggg aataattatg tatcctggta ccagcagctc 120
ccaggaacag cccccaact cctcatttat gacaataata agcgaccctc agggattcct 180
gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag 240
actggggacg aggccgattia ttactgcgga acatgggata gcagcctgag ttcttatgtc 300
ttcgggaactg ggaccaaggt caccgtccta ggtggcggat ccggcggcgg aggcgaggtg 360
cagctggtgg agtctggggg aggccttggtc cagcctggag ggtccctgag actctcctgt 420
gcagcctctg gattcacctt cagcacatag gctatgaatt gggtcggcca ggctccaggg 480
aaggggctgg agtgggttgg caggatcagg tccaagtaca acaattatgc aacctactat 540
gccgactctg tgaaggcgag attcaccatc tcaagagatg attcaaagaa ctactgtat 600
ctgcaaatga acagcctgaa aaaccaggag acggccgtgt attactgtgt gagacacggt 660
aacttcggca attcttacgt gtcttggttt gcttattggg gacaggggac actggtgact 720
gtgtcttccg gatgccacc gtgccagca cctgaagccg ctggggcacc gtcagtcttc 780
ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 840
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggicaagt tcaactggta cgtggacggc 900
gtggagggtg ataattgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 960
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 1020
aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1080
cagccccgag aaccacaggt gtgcaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac 1140
caggtcagcc tgtgtgtcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1200
gagagcaatg ggagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1260
ggctccttct tcctctatag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1320
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggt ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1380
tcctgtccc cgggt 1395

<210> 122
<211> 1374
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 122
caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg 60
acatgcagat ccagcacagg cgcatgacc acatctaact acgccaattg ggtgcagcag 120

aagccaggac aggcaccaag gggcctgac ggggttaciaa aaaaagggc tccctggacc 180
cctgcacggt tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca 240
caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc 300
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga ggggttggat ccggtggagg tggcgaggtc 360
cagctgggtgc agtctggagc tgagggtgaag aagcctgggg cctcagtga ggtctcctgc 420
aaggcttctg gttacacctt taccagctac ggtatcagct ggggtcgaca ggcccttggg 480
caagggtctg agtggatggg atggatcagc gcttacaatg gtaacacaaa ctatgcacag 540
aagctccagg gcagagtcac catgaccaca gacacatcca cgagcactgc ctacatggag 600
ctgaggagcc tgagatctga cgacacggcc gtgtattact gtgcgactat cgatacagct 660
actgcttttg atatctgggg ccaagggaca atggtcaccg tctcgtccgg atgtccaccg 720
tgcccagcac ctgaagccgc tggggcaccg tcagttctcc tcttcccccc aaaacccaag 780
gacaccttca tgaatccccg gacctctgag gtcacatcgc tgggtgttga cgtgagccac 840
gaagacctg aggtcaagtt caactgttac gtggacggcg tggagggtga taatgccaag 900
aaaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc 960
ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtga aggtctccaa caaagccctc 1020
ccagcccca tcgagaaaac catctccaa gccaaagggc agccccgaga accacaggtg 1080
tacacctgc ccccatgccg ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gtcttgcgcg 1140
gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 1200
aacaactaca agaccagcc tcccgtgctg gactccgacg gctccttctt cctcgttagc 1260
aagctcaccg tggacaagag cagggtggcag cagggaacg tcttctcatg ctccgtgatg 1320
catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct cctgtcccc gggt 1374

<210> 123
<211> 1395
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 123
cagttctgtc tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60
tcctgtcttg gaagcagctc caacattggg aataattatg tatcctggta ccagcagctc 120
ccaggaacag ccccaaaact cctcatttat gacaataata agcgacctc agggattcct 180
gaccgattct ctggctccaa gtciggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag 240
actggggacg agggcgatta ttactgcgga acatgggata gcagcctgag tgcttatgtc 300
ttcggaaactg ggaccaaggt caccgtccta ggtggcggat ccggcggcgg aggcgagggtg 360
cagcttggtg agtctggggg aggccttggtc cagcctggag ggtccctgag actctcctgt 420
gcagcctctg gattcacctt cagcacatac gctatgaatt gggtcgccca ggctccaggg 480
aaggggcttg agtgggttgg caggatcagg tccaagtaca acaattatgc aacctactat 540
gccgactctg tgaaggcgag attcaccatc tcaagagatg attcaaagaa ctactgtat 600
ctgcaaatga acagcctgaa aaccgaggac acggccgtgt attactgtgt gagacacggt 660
aacttcggca atcttacctg gctttggttt gcttattggg gacaggggac actgggtgact 720
gtgtcttccg gatgcccacc gtgcccagca cctgaagccg ctggggcacc gtcagtcttc 780

ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 840
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 900
gtggagggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 960
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 1020
aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1080
cagccccgag aaccacaggt gtgcaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac 1140
caggtcagcc tgtggtgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcg cgtggagtgg 1200
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1260
ggctccttct tcctctatag caagtcacc gggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1320
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1380
tcctgtccc cgggt 1395

<210> 124
<211> 1374
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 124
caggctgtgg tgactcagga gccttcaact accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg 60
acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaaact acgccaattg ggtgcagcag 120
aagccaggac aggcaccaag gggcctgac gggggtaaa acaaaagggc tccttggacc 180
cctgcacggt tttctggaag tctgtgtggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca 240
caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgttgt atagcaatct gtgggtgttc 300
gggggtggca caaaactgac tgtgtgtgga ggggtgtgat cgggtggagg tggcagggtc 360
cagctgtgtg agtctggagc tgaggtgaag aagcctgggg cctcagtga ggtctcctgc 420
aaggcttctg gttacacctt taccagctac ggtatcagct gggtgcgaca ggcacctgga 480
caagggtctg agtggatggg atggatcagc gcttacaatg gtaacacaaa ctatgcacag 540
aagctccagg gcagagtcac catgaccaca gacacatcca cgagcacagc ctacatggag 600
ctgaggagcc tgagatctga cgacacggcc gtgtattact gtgcgactat cgatacagct 660
aatgcttttg atatctgggg ccaagggaca atggtcaccg tctcgtccgg atgtccaccg 720
tgcccagcac ctgaagccgc tggggcaccg tcagtcttcc tcttccccc aaaacccaag 780
gacaccctca tgatctccc gaccctgag gtcacatgcg tgggtgtgga cgtgagccac 840
gaagaccctg aggtcaagtt caactgttac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag 900
acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacctc 960
ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtga aggtctccaa caaagccctc 1020
ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacagggtg 1080
tacaccctgc ccccatgccg ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gtcctgcgcg 1140
gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 1200
aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg gactccgacg gtccttctt cctcgttagc 1260
aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg 1320

catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct cctgtcccc gggt 1374

<210> 125
<211> 227
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列
<400> 125

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
1 5 10 15
Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140
Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205
His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220
Pro Gly Lys
225

<210> 126
<211> 681
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 126
gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaag ccgcgggggc accgtcagtc 60
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120
tgcgtaggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac 180
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcggggagg agcagtacaa cagcacgtac 240
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaacctctc caaagccaaa 360
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag 420
aaccagggtca gcctgagttg cgcagtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccggt gctggactcc 540
gacggctcct tcttctcgt cagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg 600
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accgctacac gcagaagagc 660
ctctccctgt ctccgggtaa a 681

<210> 127
<211> 486
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 127
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
1 5 10 15

Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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

145	150	155	160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro	165	170	175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val	180	185	190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met	195	200	205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser	210	215	220
Pro Gly Lys Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Glu Gln Ser Val Leu Thr	225	230	240
Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser	245	250	255
Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser Trp Tyr	260	265	270
Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Asn Asn	275	280	285
Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly	290	295	300
Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln Thr Gly Asp Glu Ala	305	310	320
Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu Ser Ala Val Val Phe	325	330	335
Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly	340	345	350
Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro	355	360	365
Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser	370	375	380
Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu	385	390	400
Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr	405	410	415
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys	420	425	430
Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala	435	440	445
Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser	450	455	460

Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
465 470 475 480

Val Glu Pro Lys Ser Cys
485

<210> 128
<211> 1458
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 128
gacaaaactc acacatgccc accgtgccc a gcacctgaag ccgcgggggc accgtcagtc 60
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120
tgcgtaggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac 180
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcggggagg agcagtacaa cagcacgtac 240
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300
tgcaaggctc ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggagga gatgaccaag 420
aaccagggtc gcctgtggtg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgcctgggag 480
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcttccgt gctggactcc 540
gacggctcct tcttctctca cagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg 600
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660
ctctccctgt ctccgggtaa agccccttcc agctccccta tggaacagtc cgtctgact 720
cagcctccct ccgtgtccgc agctcctggg cagaagggtca caatcagttg ctctgggtca 780
tcctcaaaca ttggcaacaa ttacgtgtct tggtatcagc agctgcccgg gacagccct 840
aagctgctga tctacgacaa caacaagcgg ccaagtggca ttcccgatcg gttcagcggc 900
agcaagtctg gcaccagcgc cacactgggc atcactgggc tgacagccgg ggacgaggct 960
gattactatt gcggaacctg ggactcttca ctgtctgccg tcgtcttcgg agggggaacc 1020
aaactgaccg tcttgggttg aggcggatcc ggcgggcgag gcgagggtga gctggtggag 1080
tctgggggag gcttgggtca gcctggaggg tccctgagac tctcctgtgc agcctctgga 1140
ttcaccttca gcacatacgc tatgaattgg gtccgccagg ctccagggaa ggggctggag 1200
tgggttggaa ggatcaggtc caagtacaac aattatgcaa cctactatgc cgactctgtg 1260
aagggtagat tcaccatctc aagagatgat tcaaagaact cactgtatct gcaaatgaac 1320
agcctgaaaa ccgaggacac ggccgtgtat tactgtgtga gacacggtaa cttcggaat 1380
tcttacgtgt cttggtttgc ttattgggga caggggacac tggtagactgt gtcttccgga 1440
gttgagccca aatcttgt 1458

<210> 129
<211> 243
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 129

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95
Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
100 105 110
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
115 120 125
Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
130 135 140
Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160
Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr
165 170 175
Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr
180 185 190
Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp
195 200 205
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Ile Asp Thr Ala Ser Ala Phe Asp
210 215 220
Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Phe Asn Arg
225 230 235 240
Gly Glu Cys

<210> 130
<211> 729
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 130
caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgacctg

acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcagcag 120
aagccaggac aggcaccaag gggcctgac ggggttacia acaaaagggc tccctggacc 180
cctgcacggt tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca 240
caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc 300
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga ggggttggat ccggcggagg tggagaagtc 360
cagctggtgc agagtggggc agaagtcaag aaacccggcg catcagtga agtctcatgt 420
aaagcatcag gctatacctt tacatcatac ggaatcagct ggggtaggca ggctccagga 480
cagggactgg agtggatggg atggatttct gcatacaacg gcaatacaaa ctatgccag 540
aagctgcagg gccgggtgac tatgaccaca gacactagca cctccacagc ctatatggaa 600
ctgcggtctc tgagaagtg cgatactgcc gtctactatt gcgctacat tgataccgct 660
tcagccttcg acatttgggg gcaggggact atggtgacag tgagctccgg attcaacagg 720
ggagagtgt 729

<210> 131
<211> 486
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 131

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
1 5 10 15

Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

165	170	175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
180	185	190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
195	200	205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
210	215	220
Pro Gly Lys Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Glu Gln Ser Val Leu Thr		
225	230	235
Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser		
245	250	255
Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser Trp Tyr		
260	265	270
Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Asn Asn		
275	280	285
Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly		
290	295	300
Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln Thr Gly Asp Glu Ala		
305	310	315
Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu Ser Gly Val Val Phe		
325	330	335
Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
340	345	350
Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro		
355	360	365
Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser		
370	375	380
Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu		
385	390	395
Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr		
405	410	415
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys		
420	425	430
Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala		
435	440	445
Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser		
450	455	460
Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly		
465	470	475
		480

Val Glu Pro Lys Ser Cys
485

<210> 132
<211> 1458
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 132
gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaag ccgcgggggc accgtcagtc 60
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggta agttcaactg gtacgtggac 180
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaag ccgcggggagg agcagtacaa cagcacgtac 240
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300
tgcaaggctc ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag 420
aaccaggta gcctgtggtg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctccccgt gctggactcc 540
gacggctcct tcttctctta cagcaagctc accgtggaca agagcaggta gcagcagggg 600
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660
ctctccctgt ctccgggtaa agccccctcc agctccccta tggaacagtc cgtcctgact 720
cagcctccct ccgtgtccgc agctcctggg cagaaggta caatcagttg ctctgggtca 780
tcctcaaaca ttggcaacaa ttacgtgtct tggatcagc agctgcccgg gacagcccct 840
aagctgtcta tctacgacaa caacaagcgg ccaagtgga tccccgatcg gttcagcggc 900
agcaagtctg gcaccagcgc cacactgggc atcactgggc tgacagaccg ggacgaggct 960
gattactatt gcggaacctg ggactcttca ctgtctggcg tcgtcttcgg agggggaacc 1020
aaactgaccg tgctgggtgg aggcggatcc ggccggcggag gcgagggtga gctgggtggag 1080
tctgggggag gcttgggtcca gcctggaggg tccctgagac tctcctgtgc agcctctgga 1140
ttcaccttca gcacatacgc tatgaattgg gtccgccagg ctccaggga ggggctggag 1200
tgggttgaa ggatcaggta caagtacaac aattatgcaa cctactatgc cgactctgtg 1260
aagggtagat tcaccatctc aagagatgat tcaaagaact cactgtatct gcaaatgaac 1320
agcctgaaaa ccgaggacac ggccgtgtat tactgtgtga gacacggtaa cttcggcaat 1380
tcttacgtgt cttgggttgc ttattgggga caggggacac tgggtactgt gtcttccgga 1440
gttgagccca aatcttgt 1458

<210> 133
<211> 243
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 133
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly

1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95
Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
100 105 110
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
115 120 125
Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
130 135 140
Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160
Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr
165 170 175
Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr
180 185 190
Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp
195 200 205
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Ile Asp Thr Ala Asn Ala Phe Gly
210 215 220
Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Phe Asn Arg
225 230 235 240
Gly Glu Cys

<210> 134
<211> 729
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 134
caggctgtgg tgactcagga gccitcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgacctg 60
acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcagcag 120
aagccaggac aggcaccaag gggcctgata ggggggtacaa acaaaagggc tccttgagcc 180

cctgcacggt tttctggaag tctgctgggc ggaaggccg ctctgactat taccggggca 240
caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc 300
gggggtggca caaaactgac tgtctggga ggggtggat ccggcggagg tggagaagtc 360
cagctggtgc agagtgggc agaagtcaag aaacccggcg catcagtga agtctcatgt 420
aaagcatcag gctataccit tacatcatac ggaatcagct gggtgaggca ggctccagga 480
cagggactgg agtggatggg atggatttct gcatacaacg gcaatacaaa ctatgccag 540
aagctgcagg gccgggtgac tatgaccaca gacactagca cctccacagc ctatatggaa 600
ctgcggtctc tgagaagtga cgatactgcc gtctactatt gcgctacat tgataccgct 660
aacgccttcg gcatttgggg gcaggggact atggigacag tgagctccgg attcaacagg 720
ggagagtgt 729

<210> 135
<211> 486
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 135

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
1 5 10 15

Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

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

180	185	190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met 195 200 205		
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser 210 215 220		
Pro Gly Lys Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Glu Gln Ser Val Leu Thr 225 230 235 240		
Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser 245 250 255		
Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser Trp Tyr 260 265 270		
Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Asn Asn 275 280 285		
Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly 290 295 300		
Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln Thr Gly Asp Glu Ala 305 310 315 320		
Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu Ser Ser Tyr Val Phe 325 330 335		
Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly 340 345 350		
Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro 355 360 365		
Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser 370 375 380		
Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu 385 390 395 400		
Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr 405 410 415		
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys 420 425 430		
Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala 435 440 445		
Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser 450 455 460		
Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly 465 470 475 480		
Val Glu Pro Lys Ser Cys 485		

<210> 136
<211> 1458
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 136
gacaaaactc acacatgccc accgtgcccga gcacctgaag ccgcgggggc accgtcagtc 60
ttcctcttcc ccccaaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120
tgcgtaggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggta agttcaactg gtacgtggac 180
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 240
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300
tgcaaggctc ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctcccccat cccgggagga gatgaccaag 420
aaccagggtc gcctgtggtg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccggt gctggactcc 540
gacggctcct tcttctctca cagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg 600
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660
ctctccctgt ctccgggtaa agccccttcc agctccccta tggaaacagtc cgtcctgact 720
cagcctccct ccgtgtccgc agctcctggg cagaaggta caatcagttg ctctgggtca 780
tcctcaaaca ttggcaacaa ttacgtgtct tggatcagc agctgcccg gacagccct 840
aagctgctga tctacgacaa caacaagcgg ccaagtggca ttcccgatcg gttcagcggc 900
agcaagtctg gcaccagcgc cacactgggc atcactgggc tgcagaccgg ggacgaggct 960
gattactatt gcggaacctg ggactcttca ctgtcttct acgtcttcgg aacgggaacc 1020
aaagtgaccg tgcgtgggtg aggcggatcc ggcggcggag gcgaggtgca gctggtggag 1080
tctgggggag gcttgggtcca gcctggaggg tccctgagac tctcctgtgc agcctctgga 1140
ttcaccttca gcacatacgc tatgaattgg gtccgccagg ctccagggaa ggggctggag 1200
tgggttgaa ggatcaggtc caagtacaac aattatgcaa cctactatgc cgactctgtg 1260
aagggtagat tcaccatctc aagagatgat tcaaagaact cactgtatct gcaaatgaac 1320
agcctgaaaa ccgaggacac ggccgtgtat tactgtgtga gacacggtaa cttcggcaat 1380
tcttacgtgt cttggtttgc ttattgggga caggggacac tggtgactgt gtcttccgga 1440
gttgagccca aatcttgt 1458

<210> 137
<211> 243
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 137
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
115 120 125

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
130 135 140

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160

Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr
165 170 175

Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr
180 185 190

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp
195 200 205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Ile Asp Thr Ala Thr Ala Phe Asp
210 215 220

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Phe Asn Arg
225 230 235 240

Gly Glu Cys

- <210> 138
- <211> 729
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 合成之核苷酸序列

<400> 138
caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgacctg 60
acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcagcag 120
aagccaggac aggcaccaag gggcctgata ggggggtacaa acaaaagggc tccctggacc 180
cctgcacggt ttcttggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca 240
caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgiggt atagcaatct gtgggtgttc 300

gggggtggca caaaactgac tgtgctggga gggggtggat ccggcggagg tggagaagtc 360
cagctggtgc agagtggggc agaagtcaag aaacccggcg catcagtga agtctcatgt 420
aaagcatcag gctatacctt tacatcatac ggaatcagct ggggtgaggca ggctccagga 480
cagggactgg agtggatggg atggatttct gcatacaacg gcaatacaaa ctatgcccag 540
aagctgcagg gccgggtgac tatgaccaca gacactagca cctccacagc ctatatggaa 600
ctgcggtctc tgagaagtga cgatactgcc gctactatt gcgctacat tgataccgct 660
acagccttcg acatttgggg gcaggggact atggtgacag tgagctccgg attcaacagg 720
ggagagtgt 729

<210> 139
<211> 486
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 139
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
1 5 10 15
Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140
Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Glu Gln Ser Val Leu Thr
225 230 235 240

Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser
245 250 255

Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser Trp Tyr
260 265 270

Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Asn Asn
275 280 285

Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly
290 295 300

Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln Thr Gly Asp Glu Ala
305 310 315 320

Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu Ser Ala Tyr Val Phe
325 330 335

Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
340 345 350

Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
355 360 365

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
370 375 380

Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
385 390 395 400

Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr
405 410 415

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys
420 425 430

Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala
435 440 445

Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser
450 455 460

Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
465 470 475 480

Val Glu Pro Lys Ser Cys
485

<210> 140
<211> 1458

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 140
gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaag ccgcgggggc accgtcagtc 60
ttctcttccc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120
tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac 180
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaa cgcggggagg agcagtacaa cagcacgtac 240
cgtgtgtgca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300
tgcaagggtc ccaacaaga cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag 420
aaccagggtc gcctgtgtg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccg tctggactcc 540
gacggctcct tcttctcta cagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg 600
aacgtcttct catgtccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660
ctctccctgt ctccgggtaa agcccttcc agctccccta tggaacagtc cgtcctgact 720
cagcctccct ccgtgtccgc agctcctggg cagaagggtca caatcagttg ctctgggtca 780
tcctcaaaac ttggcaaaac ttacgtgtct tggatcagc agctgcccg gacagcccct 840
aagctgtgta tctacgaaa caacaagcgg ccaagtggca tccccgatcg gttcagcggc 900
agcaagtctg gcaccagcgc cactctgggc atcactgggc tgcagaccgg ggacgaggct 960
gattactatt gcggaacctg ggactcttca ctgtctgcct acgtcttcgg aacgggaacc 1020
aaagtgaccg tgctgggtgg aggcggatcc ggcggcggag gcgaggtgca gctggtggag 1080
tctgggggag gcttgggtcca gcctggaggg tccctgagac tctcctgtgc agcctctgga 1140
ttcaccttca gcacatacgc tatgaattgg gtccgccagg ctccagggaa ggggctggag 1200
tgggttgga ggtacaggct caagtacaac aattatgcaa cctactatgc cgactctgtg 1260
aagggtagat tcaccatctc aagagatgat tcaaagaact cactgtatct gcaaatgaac 1320
agcctgaaaa ccgaggacac ggccgtgtat tactgtgtga gacacggtaa cttcgccaat 1380
tcttacgtgt cttggtttgc ttattgggga caggggacac tgggtactgt gtcttccgga 1440
gttgagccca aatcttgt 1458

<210> 141
<211> 243
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 141
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly

35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
115 120 125

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
130 135 140

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160

Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr
165 170 175

Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr
180 185 190

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp
195 200 205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Ile Asp Thr Ala Asn Ala Phe Asp
210 215 220

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Phe Asn Arg
225 230 235 240

Gly Glu Cys

<210> 142
<211> 729
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 142
caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg 60
acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcagcag 120
aagccaggac aggcaccaag gggcctgac gggggtacaa aaaaagggc tccctggacc 180
cctgcacggt tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca 240
caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc 300
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga gggggtggat ccggcggagg tggagaagtc 360
cagctgtgtc agagtgggc agaagtcaag aaacccggcg catcagtga agtctcatgt 420

aaagcatcag gctataccit tacatcatac ggaatcagct gggtgaggca ggctccagga 480
cagggactgg agtggatggg atggatttct gcatacaacg gcaatacaaa ctatgcccg 540
aagctgcagg gccgggtgac tatgaccaca gacactagca cctccacagc ctatatggaa 600
ctgcggtctc tgagaagtga cgatactgcc gtctactatt gcgctacat tgataccgct 660
aacgccttcg acatttgggg gcaggggact atggtgacag tgagctccgg attcaacagg 720
ggagagtgt 729

<210> 143
<211> 478
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 143

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

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

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

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
130 135 140

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro
145 150 155 160

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn
165 170 175

Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
180 185 190

Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys
195 200 205

Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly

210 215 220

Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
225 230 235 240

Thr Val Ser Ser Gly Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
245 250 255

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe
260 265 270

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
275 280 285

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
290 295 300

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
305 310 315 320

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
325 330 335

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
340 345 350

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
355 360 365

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
370 375 380

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
385 390 395 400

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
405 410 415

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
420 425 430

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
435 440 445

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
450 455 460

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470 475

<210> 144
<211> 1434
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 144
cagtcggtcc tgactcagcc tccctccgtg tccgcagctc ctgggcagaa ggtcacaatc

agttgctctg ggtcatcctc aaacattggc aacaattacg tgtcttggtg tcagcagctg 120
cccgggacag cccctaagct gctgatctac gacaacaaca agcgccaag tggcattccc 180
gatcgggttca gcggcagcaa gtctggcacc agcgccacac tgggcatcac tgggctgcag 240
accggggacg aggcigattia ctattgcgga acctgggact cticactgtc tgccgtcgtc 300
ttcggagggg gaaccaaact gaccgtgctg ggtggaggcg gatccggcgg cggaggcgag 360
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtccagcctg gagggtcctt gagactctcc 420
tgtgcagcct ctggattcac cttcagcaca tacgctatga attgggtccg ccaggctcca 480
gggaaggggc tggagtgggt tgggaaggatc aggtccaagt acaacaatta tgcaacctac 540
tatgccgact ctgtgaaggg tagattcacc atctcaagag atgattcaaa gaactcactg 600
tatctgcaaa tgaacagcct gaaaaccgag gacacggccg tgtattactg tgtgagacac 660
ggtaacttcg gcaattctta cgtgtcttgg tttgcttatt ggggacaggg gacactggtg 720
actgtgtctt ccggagttag gcccaaactt tgtgacaaaa ctacacatg cccaccgtgc 780
ccagcaccig aagccgcggg ggcaccgtca gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac 840
accttcatga tctcccgagc ccctgaggtc acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa 900
gacctgaggg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 960
aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgttg tcagcgtcct caccgtcctg 1020
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa agccctccca 1080
gcccccatcg agaaaacct atccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acagggtgtac 1140
accttgcccc catcccgagg gagatgacc aagaaccagg tcagcctgtg gtgcctggtc 1200
aaaggtctct atcccgagca catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagAAC 1260
aactacaaga ccacgcctcc cgtgtgggac tccgacggct ccttcttctt ctacagcaag 1320
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 1380
gaggctctgc acaaccacta cagcgagaag agcctctccc tgtctccggg taaa 1434

<210> 145
<211> 243
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 145

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
115 120 125

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
130 135 140

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160

Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr
165 170 175

Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr
180 185 190

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp
195 200 205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Ile Asp Thr Ala Ser Ala Phe Asp
210 215 220

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Phe Asn Arg
225 230 235 240

Gly Glu Cys

<210> 146
<211> 729
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 146
caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg 60
acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtagcagcag 120
aagccaggac aggcaccaag gggcctgac gggggtacaa aaaaaagggc tccctggacc 180
cctgcacggt ttcttgaag tctgctgggc ggaaggccg ctcgactat taccggggca 240
caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc 300
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga gggggtggat ccggcgagg tggagaagtc 360
cagctggtgc agagtggggc agaagtcag aaaccggcg catcagtga agtctcatgt 420
aaagcatcag gctatacctt tacatcatac ggaatcagct gggtgaggca ggctccagga 480
cagggactgg agtggatggg atggatttct gcatacaacg gcaatacaaa ctatgccag 540
aagctgcagg gccgggtgac tatgaccaca gacactagca cctccacagc ctatatggaa 600
ctgcggtctc tgagaagtga cgatactgcc gtctactatt gcgctaccat tgataccgct 660
tcagccttcg acatttgggg gcaggggact atggtgacag tgagctccgg attcaacagg 720

ggagagtgt

729

- <210> 147
- <211> 478
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 合成之肽序列
- <400> 147

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

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

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

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
130 135 140

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro
145 150 155 160

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn
165 170 175

Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
180 185 190

Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys
195 200 205

Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly
210 215 220

Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
225 230 235 240

Thr Val Ser Ser Gly Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
245 250 255

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe
260 265 270

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
275 280 285

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
290 295 300

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
305 310 315 320

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
325 330 335

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
340 345 350

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
355 360 365

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
370 375 380

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
385 390 395 400

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
405 410 415

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
420 425 430

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
435 440 445

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
450 455 460

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470 475

<210> 148
<211> 1434
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 148
cagtccgtcc tgactcagcc tccctccgtg tccgcagctc ctgggcagaa ggtcacaatc 60
agttgctctg ggtcatcctc aaacattggc aacaattacg tgtcttggtg tcagcagctg 120
cccgggacag cccctaagct gctgatctac gacaacaaca agcggccaag tggcattccc 180
gatcgggtica gcggcagcaa gtctggcacc agcgccacac tgggcatcac tgggctgcag 240
accggggacg aggcigatta ctattgcgga acctgggact cttcactgtc tggcgtcgtc 300
ttcggagggg gaaccaaact gaccgtgctg ggtggaggcg gatccggcgg cggaggcgag 360

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtccagcctg gagggtcctt gagactctcc 420
tgtgcagcct ctggattcac cttcagcaca tacgctatga attgggtccg ccaggctcca 480
gggaaggggc tggagtgggt tgggaaggatc aggtccaagt acaacaatta tgcaacctac 540
tatgccgact ctgtgaaggg tagattcacc atctcaagag atgattcaaa gaactcactg 600
tatctgcaaa tgaacagcct gaaaaccgag gacacggccg tgtattactg tgtgagacac 660
ggtaacttcg gcaattctta cgtgtcttgg tttgcttatt ggggacaggg gacactggtg 720
actgtgtctt ccggagtga gcccaaattc tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc 780
ccagcacctg aagccgcggg ggcaccgtca gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac 840
accctcatga tctcccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa 900
gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 960
aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 1020
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa agccctcca 1080
gcccccatcg agaaaacat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acagggtgtac 1140
accttgcccc catcccgga ggagatgacc aagaaccagg tcagcctgtg gtgcctggtc 1200
aaaggcttct atcccagcga catgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagAAC 1260
aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttct ctacagcaag 1320
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggAACgtct tctcatgctc cgtgatgcat 1380
gaggctctgc acaaccacta cagcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa 1434

<210> 149
<211> 243
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 149
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95
Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
100 105 110
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu

115 120 125
Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
130 135 140
Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160
Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr
165 170 175
Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr
180 185 190
Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp
195 200 205
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Ile Asp Thr Ala Asn Ala Phe Gly
210 215 220
Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Phe Asn Arg
225 230 235 240
Gly Glu Cys

<210> 150
<211> 729
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 150
caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg 60
acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaaact acgccaattg ggtgcagcag 120
aagccaggac aggcaccaag gggcctgac ggggggtacaa acaaaagggc tccctggacc 180
cctgcacggt ttcttgaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca 240
caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc 300
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga gggggtggat ccggcggagg tggagaagtc 360
cagctgggtgc agagtggggc agaagtcaag aaaccgggcg catcagtga agtctcatgt 420
aaagcatcag gctatacctt tacatcatac ggaatcagct gggtgaggca ggctccagga 480
cagggactgg agtggtggg atggatttct gcatacaacg gcaatacaaa ctatgccag 540
aagctgcagg gccgggtgac tatgaccaca gacactagca cctccacagc ctatatggaa 600
ctgcggtctc tgagaagtga cgatactgcc gtctactatt gcgctacat tgataccgct 660
aacgccttcg gcatttgggg gcaggggact atggtagacg tgagctccgg attcaacagg 720
ggagagtgt 729

<210> 151
<211> 478
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成之肽序列

<400> 151

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

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

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

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ser Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
130 135 140

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro
145 150 155 160

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn
165 170 175

Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
180 185 190

Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys
195 200 205

Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly
210 215 220

Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
225 230 235 240

Thr Val Ser Ser Gly Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
245 250 255

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe
260 265 270

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
275 280 285

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val

290295300

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
305310315320

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
325330335

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
340345350

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
355360365

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
370375380

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
385390395400

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
405410415

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
420425430

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
435440445

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
450455460

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465470475

<210> 152
<211> 1434
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 152

cagtcctgcc tgactcagcc tccctccgtg tccgcagctc ctgggcagaa ggtcacaatc60

agttgctctg ggtcatcctc aaacattggc aacaattacg tgtcttggtg tcagcagctg120

cccgaggacag cccctaagct gctgatctac gacaacaaca agcgccaag tggcattccc180

gatcgggtca gcggcagcaa gtctggcacc agcgccacac tgggcatcac tgggctgcag240

accggggacg aggcgtgatta ctattgcgga acctgggact ctctactgtc ttcctacgtc300

ttcggaacgg gaaccaaagt gaccgtgctg ggtggaggcg gatccggcgg cggaggcgag360

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtccagcctg gagggtcctt gagactctcc420

tgtgcagcct ctggattcac cttcagcaca tacgctatga attgggtccg ccaggctcca480

gggaaggggc tggagtgggt tggaggatc aggtccaagt acaacaatta tgcaacctac540

tatgccgact ctgtgaaggg tagattcacc atctcaagag atgattcaaa gaactcactg600

tatctgcaaa tgaacagcct gaaaaccgag gacacggccg tgtattactg tgtgagacac660

ggtaacttcg gcaattctta cgtgtcttgg ttgtcttatt ggggacaggg gacactggtg 720
actgtgtctt ceggagttga gccc aaatct tgtgacaaaa ctacacatg cccaccgtgc 780
ccagcacctg aagccgcggg ggcaccgtca gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac 840
acctcatga tcicccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tggtagacgt gagccacgaa 900
gacctgagg tcaagttaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 960
aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 1020
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa agccctccca 1080
gcccccatcg agaaaacat ctcaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acagggtgac 1140
acctgcccc catcccgga ggagatgacc aagaaccagg tcagcctgtg gtgcctggtc 1200
aaaggcttct atcccagcga catgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagAAC 1260
aactacaaga ccacgcctcc cgtgtctggac tccgacggct ccttcttct ctacagcaag 1320
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 1380
gaggctctgc acaaccacta cagcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa 1434

<210> 153
<211> 243
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 153
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95
Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
100 105 110
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
115 120 125
Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
130 135 140
Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160

Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr
165 170 175

Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr
180 185 190

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp
195 200 205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Ile Asp Thr Ala Thr Ala Phe Asp
210 215 220

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Phe Asn Arg
225 230 235 240

Gly Glu Cys

<210> 154
<211> 729
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 154
caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgacctg 60
acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcagcag 120
aagccaggac aggcaccaag gggcctgac gggggtacaa aaaaaagggc tccctggacc 180
cctgcacggt tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca 240
caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc 300
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga gggggtggat ccggcggagg tggagaagtc 360
cagctggtgc agagtggggc agaagtcaag aaacccggcg catcagtga agtctcatgt 420
aaagcatcag gctatacctt tacatcatac ggaatcagct gggtagggca ggctccagga 480
cagggactgg agtggatggg atggatttct gcatacaacg gcaatacaaa ctatgccag 540
aagctgcagg gccgggtgac tatgaccaca gacactagca cctccacagc ctatatggaa 600
ctgcggtctc tgagaagtga cgatactgcc gtctactatt gcgctacat tgataccgct 660
acagccttcg acatttgggg gcaggggact atggtgacag tgagctccgg attcaacagg 720
ggagagtgt 729

<210> 155
<211> 478
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 155
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15
Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

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

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
130 135 140

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro
145 150 155 160

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn
165 170 175

Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
180 185 190

Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys
195 200 205

Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly
210 215 220

Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
225 230 235 240

Thr Val Ser Ser Gly Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
245 250 255

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe
260 265 270

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
275 280 285

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
290 295 300

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
305 310 315 320

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
325 330 335

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
340 345 350

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
355 360 365

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
370 375 380

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
385 390 395 400

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
405 410 415

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
420 425 430

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
435 440 445

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
450 455 460

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470 475

<210> 156
<211> 1434
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 156
cagtccgtcc tgactcagcc tccctccgtg tccgcagctc ctgggcagaa ggtcacaatc 60
agtgtctctg ggtcatcctc aaacattggc aacaattacg tgtcttggtg tcagcagctg 120
cccgaggacag cccctaagct gctgatctac gacaacaaca agcggccaag tggcattccc 180
gatcggttca gcggcagcaa gtctggcacc agcgccacac tgggcatcac tgggctgcag 240
accggggacg aggcgtgatta ctattgcgga acctgggact cttcactgtc tgcctacgtc 300
ttcggaaacgg gaaccaaagt gaccgtgctg ggtggaggcg gatccggcgg cggaggcgag 360
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtccagcctg gagggtcctt gagactctcc 420
tgtgcagcct ctggattcac cticagcaca tacgctatga attgggtccg ccaggctcca 480
gggaaggggc tggagtgggt tggaggatc aggtccaagt acaacaatta tgcaacctac 540
tatgccgaet ctgtgaaggg tagattcacc atctcaagag atgattcaaa gaactcactg 600
tatctgcaaa tgaacagcct gaaaaccgag gacacggccg tgtattactg tgtgagacac 660
ggtaacttcg gcaattctta cgtgtcttgg tttgcttatt ggggacaggg gacactggtg 720
actgtgtctt ccggagttag gcccaaatct tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc 780
ccagcaccctg aagccgcggg ggcaccgtca gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac 840
accctcatga tctcccggac ccttgaggtc acatgcgtgg tggtaggacgt gagccacgaa 900
gaccttgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 960

aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 1020
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgaagg tctccaacaa agccctccca 1080
gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acagggtgtac 1140
accctgcccc catccccgga ggagatgacc aagaaccagg tcagcctgtg gtgcctggtc 1200
aaaggcttct atcccgagga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagAAC 1260
aactacaaga ccacgccicc cgtgctggac tccgacggct ccttcttctt ctacagcaag 1320
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 1380
gaggctctgc acaaccacta cagcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa 1434

<210> 157
<211> 243
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 157

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
115 120 125

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
130 135 140

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160

Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr
165 170 175

Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr
180 185 190

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp

195200205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Ile Asp Thr Ala Asn Ala Phe Asp
210215220

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Phe Asn Arg
225230235240

Gly Glu Cys

<210> 158
<211> 729
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 158

caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg60

acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcagcag120

aagccaggac aggcaccaag gggcctgatc gggggtacaa aaaaagggc tccctggacc180

cctgcacggt ttcttgaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca240

caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc300

gggggtggca caaaactgac tgtgctggga ggggtggat ccggcggagg tggagaagtc360

cagctgtgtc agagtggggc agaagtcaag aaacccggcg catcagtga agtctcatgt420

aaagcatcag gctatacctt tacatcatac ggaatcagct gggtgaggca ggctccagga480

cagggactgg agtggatggg atggatttct gcatacaacg gcaatacaaa ctatgccag540

aagctgcagg gccgggtgac tatgaccaca gacactagca cctccacagc ctatatggaa600

ctgcggtctc tgagaagtga cgatactgcc gtctactatt gcgctacat tgataccgct660

aacgccttcg acatttgggg gcaggggact atggtgacag tgagctccgg attcaacagg720

ggagagtgt729

<210> 159
<211> 829
<212> PRT
<213> 現代人

<400> 159

Met Gly Leu Pro Arg Gly Pro Leu Ala Ser Leu Leu Leu Leu Gln Val
151015

Cys Trp Leu Gln Cys Ala Ala Ser Glu Pro Cys Arg Ala Val Phe Arg
202530

Glu Ala Glu Val Thr Leu Glu Ala Gly Gly Ala Glu Gln Glu Pro Gly
354045

Gln Ala Leu Gly Lys Val Phe Met Gly Cys Pro Gly Gln Glu Pro Ala
505560

Leu Phe Ser Thr Asp Asn Asp Asp Phe Thr Val Arg Asn Gly Glu Thr
65707580

Val Gln Glu Arg Arg Ser Leu Lys Glu Arg Asn Pro Leu Lys Ile Phe
85 90 95

Pro Ser Lys Arg Ile Leu Arg Arg His Lys Arg Asp Trp Val Val Ala
100 105 110

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

Asn Gln Leu Lys Ser Asn Lys Asp Arg Asp Thr Lys Ile Phe Tyr Ser
130 135 140

Ile Thr Gly Pro Gly Ala Asp Ser Pro Pro Glu Gly Val Phe Ala Val
145 150 155 160

Glu Lys Glu Thr Gly Trp Leu Leu Leu Asn Lys Pro Leu Asp Arg Glu
165 170 175

Glu Ile Ala Lys Tyr Glu Leu Phe Gly His Ala Val Ser Glu Asn Gly
180 185 190

Ala Ser Val Glu Asp Pro Met Asn Ile Ser Ile Ile Val Thr Asp Gln
195 200 205

Asn Asp His Lys Pro Lys Phe Thr Gln Asp Thr Phe Arg Gly Ser Val
210 215 220

Leu Glu Gly Val Leu Pro Gly Thr Ser Val Met Gln Val Thr Ala Thr
225 230 235 240

Asp Glu Asp Asp Ala Ile Tyr Thr Tyr Asn Gly Val Val Ala Tyr Ser
245 250 255

Ile His Ser Gln Glu Pro Lys Asp Pro His Asp Leu Met Phe Thr Ile
260 265 270

His Arg Ser Thr Gly Thr Ile Ser Val Ile Ser Ser Gly Leu Asp Arg
275 280 285

Glu Lys Val Pro Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Gln Ala Thr Asp Met Asp
290 295 300

Gly Asp Gly Ser Thr Thr Thr Ala Val Ala Val Val Glu Ile Leu Asp
305 310 315 320

Ala Asn Asp Asn Ala Pro Met Phe Asp Pro Gln Lys Tyr Glu Ala His
325 330 335

Val Pro Glu Asn Ala Val Gly His Glu Val Gln Arg Leu Thr Val Thr
340 345 350

Asp Leu Asp Ala Pro Asn Ser Pro Ala Trp Arg Ala Thr Tyr Leu Ile
355 360 365

Met Gly Gly Asp Asp Gly Asp His Phe Thr Ile Thr Thr His Pro Glu
370 375 380

Ser Asn Gln Gly Ile Leu Thr Thr Arg Lys Gly Leu Asp Phe Glu Ala
385 390 395 400

Lys Asn Gln His Thr Leu Tyr Val Glu Val Thr Asn Glu Ala Pro Phe
405 410 415

Val Leu Lys Leu Pro Thr Ser Thr Ala Thr Ile Val Val His Val Glu
420 425 430

Asp Val Asn Glu Ala Pro Val Phe Val Pro Pro Ser Lys Val Val Glu
435 440 445

Val Gln Glu Gly Ile Pro Thr Gly Glu Pro Val Cys Val Tyr Thr Ala
450 455 460

Glu Asp Pro Asp Lys Glu Asn Gln Lys Ile Ser Tyr Arg Ile Leu Arg
465 470 475 480

Asp Pro Ala Gly Trp Leu Ala Met Asp Pro Asp Ser Gly Gln Val Thr
485 490 495

Ala Val Gly Thr Leu Asp Arg Glu Asp Glu Gln Phe Val Arg Asn Asn
500 505 510

Ile Tyr Glu Val Met Val Leu Ala Met Asp Asn Gly Ser Pro Pro Thr
515 520 525

Thr Gly Thr Gly Thr Leu Leu Leu Thr Leu Ile Asp Val Asn Asp His
530 535 540

Gly Pro Val Pro Glu Pro Arg Gln Ile Thr Ile Cys Asn Gln Ser Pro
545 550 555 560

Val Arg Gln Val Leu Asn Ile Thr Asp Lys Asp Leu Ser Pro His Thr
565 570 575

Ser Pro Phe Gln Ala Gln Leu Thr Asp Asp Ser Asp Ile Tyr Trp Thr
580 585 590

Ala Glu Val Asn Glu Glu Gly Asp Thr Val Val Leu Ser Leu Lys Lys
595 600 605

Phe Leu Lys Gln Asp Thr Tyr Asp Val His Leu Ser Leu Ser Asp His
610 615 620

Gly Asn Lys Glu Gln Leu Thr Val Ile Arg Ala Thr Val Cys Asp Cys
625 630 635 640

His Gly His Val Glu Thr Cys Pro Gly Pro Trp Lys Gly Gly Phe Ile
645 650 655

Leu Pro Val Leu Gly Ala Val Leu Ala Leu Leu Phe Leu Leu Val
660 665 670

Leu Leu Leu Leu Val Arg Lys Lys Arg Lys Ile Lys Glu Pro Leu Leu
675 680 685

Leu Pro Glu Asp Asp Thr Arg Asp Asn Val Phe Tyr Tyr Gly Glu Glu

690 695 700

Gly Gly Gly Glu Glu Asp Gln Asp Tyr Asp Ile Thr Gln Leu His Arg
705 710 715 720

Gly Leu Glu Ala Arg Pro Glu Val Val Leu Arg Asn Asp Val Ala Pro
725 730 735

Thr Ile Ile Pro Thr Pro Met Tyr Arg Pro Arg Pro Ala Asn Pro Asp
740 745 750

Glu Ile Gly Asn Phe Ile Ile Glu Asn Leu Lys Ala Ala Asn Thr Asp
755 760 765

Pro Thr Ala Pro Pro Tyr Asp Thr Leu Leu Val Phe Asp Tyr Glu Gly
770 775 780

Ser Gly Ser Asp Ala Ala Ser Leu Ser Ser Leu Thr Ser Ser Ala Ser
785 790 795 800

Asp Gln Asp Gln Asp Tyr Asp Tyr Leu Asn Glu Trp Gly Ser Arg Phe
805 810 815

Lys Lys Leu Ala Asp Met Tyr Gly Gly Gly Glu Asp Asp
820 825

<210> 160
<211> 24
<212> PRT
<213> 現代人

<400> 160

Met Gly Leu Pro Arg Gly Pro Leu Ala Ser Leu Leu Leu Leu Gln Val
1 5 10 15

Cys Trp Leu Gln Cys Ala Ala Ser
20

<210> 161
<211> 83
<212> PRT
<213> 現代人

<400> 161

Glu Pro Cys Arg Ala Val Phe Arg Glu Ala Glu Val Thr Leu Glu Ala
1 5 10 15

Gly Gly Ala Glu Gln Glu Pro Gly Gln Ala Leu Gly Lys Val Phe Met
20 25 30

Gly Cys Pro Gly Gln Glu Pro Ala Leu Phe Ser Thr Asp Asn Asp Asp
35 40 45

Phe Thr Val Arg Asn Gly Glu Thr Val Gln Glu Arg Arg Ser Leu Lys
50 55 60

Glu Arg Asn Pro Leu Lys Ile Phe Pro Ser Lys Arg Ile Leu Arg Arg
65 70 75 80

His Lys Arg

<210> 162
<211> 108
<212> PRT
<213> 現代人

<400> 162

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

<210> 163
<211> 113
<212> PRT
<213> 現代人

<400> 163

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

Phe

<210> 164
<211> 112
<212> PRT
<213> 現代人

<400> 164
Asp Pro Gln Lys Tyr Glu Ala His Val Pro Glu Asn Ala Val Gly His
1 5 10 15
Glu Val Gln Arg Leu Thr Val Thr Asp Leu Asp Ala Pro Asn Ser Pro
20 25 30
Ala Trp Arg Ala Thr Tyr Leu Ile Met Gly Gly Asp Asp Gly Asp His
35 40 45
Phe Thr Ile Thr Thr His Pro Glu Ser Asn Gln Gly Ile Leu Thr Thr
50 55 60
Arg Lys Gly Leu Asp Phe Glu Ala Lys Asn Gln His Thr Leu Tyr Val
65 70 75 80
Glu Val Thr Asn Glu Ala Pro Phe Val Leu Lys Leu Pro Thr Ser Thr
85 90 95
Ala Thr Ile Val Val His Val Glu Asp Val Asn Glu Ala Pro Val Phe
100 105 110

<210> 165
<211> 106
<212> PRT
<213> 現代人

<400> 165
Val Pro Pro Ser Lys Val Val Glu Val Gln Glu Gly Ile Pro Thr Gly
1 5 10 15
Glu Pro Val Cys Val Tyr Thr Ala Glu Asp Pro Asp Lys Glu Asn Gln
20 25 30
Lys Ile Ser Tyr Arg Ile Leu Arg Asp Pro Ala Gly Trp Leu Ala Met
35 40 45
Asp Pro Asp Ser Gly Gln Val Thr Ala Val Gly Thr Leu Asp Arg Glu
50 55 60
Asp Glu Gln Phe Val Arg Asn Asn Ile Tyr Glu Val Met Val Leu Ala
65 70 75 80
Met Asp Asn Gly Ser Pro Pro Thr Thr Gly Thr Gly Thr Leu Leu Leu
85 90 95
Thr Leu Ile Asp Val Asn Asp His Gly Pro
100 105

<210> 166
<211> 104
<212> PRT
<213> 現代人

<400> 166

Val Pro Glu Pro Arg Gln Ile Thr Ile Cys Asn Gln Ser Pro Val Arg
1 5 10 15

Gln Val Leu Asn Ile Thr Asp Lys Asp Leu Ser Pro His Thr Ser Pro
20 25 30

Phe Gln Ala Gln Leu Thr Asp Asp Ser Asp Ile Tyr Trp Thr Ala Glu
35 40 45

Val Asn Glu Glu Gly Asp Thr Val Val Leu Ser Leu Lys Lys Phe Leu
50 55 60

Lys Gln Asp Thr Tyr Asp Val His Leu Ser Leu Ser Asp His Gly Asn
65 70 75 80

Lys Glu Gln Leu Thr Val Ile Arg Ala Thr Val Cys Asp Cys His Gly
85 90 95

His Val Glu Thr Cys Pro Gly Pro
100

<210> 167
<211> 179
<212> PRT
<213> 現代人

<400> 167

Trp Lys Gly Gly Phe Ile Leu Pro Val Leu Gly Ala Val Leu Ala Leu
1 5 10 15

Leu Phe Leu Leu Leu Val Leu Leu Leu Leu Val Arg Lys Lys Arg Lys
20 25 30

Ile Lys Glu Pro Leu Leu Leu Pro Glu Asp Asp Thr Arg Asp Asn Val
35 40 45

Phe Tyr Tyr Gly Glu Glu Gly Gly Gly Glu Glu Asp Gln Asp Tyr Asp
50 55 60

Ile Thr Gln Leu His Arg Gly Leu Glu Ala Arg Pro Glu Val Val Leu
65 70 75 80

Arg Asn Asp Val Ala Pro Thr Ile Ile Pro Thr Pro Met Tyr Arg Pro
85 90 95

Arg Pro Ala Asn Pro Asp Glu Ile Gly Asn Phe Ile Ile Glu Asn Leu
100 105 110

Lys Ala Ala Asn Thr Asp Pro Thr Ala Pro Pro Tyr Asp Thr Leu Leu
115 120 125

Val Phe Asp Tyr Glu Gly Ser Gly Ser Asp Ala Ala Ser Leu Ser Ser
130 135 140

Leu Thr Ser Ser Ala Ser Asp Gln Asp Gln Asp Tyr Asp Tyr Leu Asn
145 150 155 160

Glu Trp Gly Ser Arg Phe Lys Lys Leu Ala Asp Met Tyr Gly Gly Gly

165

170

175

Glu Asp Asp

<210> 168
<211> 221
<212> PRT
<213> 現代人

<400> 168

Asp Trp Val Val Ala Pro Ile Ser Val Pro Glu Asn Gly Lys Gly Pro
1 5 10 15

Phe Pro Gln Arg Leu Asn Gln Leu Lys Ser Asn Lys Asp Arg Asp Thr
20 25 30

Lys Ile Phe Tyr Ser Ile Thr Gly Pro Gly Ala Asp Ser Pro Pro Glu
35 40 45

Gly Val Phe Ala Val Glu Lys Glu Thr Gly Trp Leu Leu Leu Asn Lys
50 55 60

Pro Leu Asp Arg Glu Glu Ile Ala Lys Tyr Glu Leu Phe Gly His Ala
65 70 75 80

Val Ser Glu Asn Gly Ala Ser Val Glu Asp Pro Met Asn Ile Ser Ile
85 90 95

Ile Val Thr Asp Gln Asn Asp His Lys Pro Lys Phe Thr Gln Asp Thr
100 105 110

Phe Arg Gly Ser Val Leu Glu Gly Val Leu Pro Gly Thr Ser Val Met
115 120 125

Gln Val Thr Ala Thr Asp Glu Asp Asp Ala Ile Tyr Thr Tyr Asn Gly
130 135 140

Val Val Ala Tyr Ser Ile His Ser Gln Glu Pro Lys Asp Pro His Asp
145 150 155 160

Leu Met Phe Thr Ile His Arg Ser Thr Gly Thr Ile Ser Val Ile Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Asp Arg Glu Lys Val Pro Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Gln
180 185 190

Ala Thr Asp Met Asp Gly Asp Gly Ser Thr Thr Thr Ala Val Ala Val
195 200 205

Val Glu Ile Leu Asp Ala Asn Asp Asn Ala Pro Met Phe
210 215 220

<210> 169
<211> 333
<212> PRT
<213> 現代人

<400> 169

Asp Trp Val Val Ala Pro Ile Ser Val Pro Glu Asn Gly Lys Gly Pro
 1 5 10 15
 Phe Pro Gln Arg Leu Asn Gln Leu Lys Ser Asn Lys Asp Arg Asp Thr
 20 25 30
 Lys Ile Phe Tyr Ser Ile Thr Gly Pro Gly Ala Asp Ser Pro Pro Glu
 35 40 45
 Gly Val Phe Ala Val Glu Lys Glu Thr Gly Trp Leu Leu Leu Asn Lys
 50 55 60
 Pro Leu Asp Arg Glu Glu Ile Ala Lys Tyr Glu Leu Phe Gly His Ala
 65 70 75 80
 Val Ser Glu Asn Gly Ala Ser Val Glu Asp Pro Met Asn Ile Ser Ile
 85 90 95
 Ile Val Thr Asp Gln Asn Asp His Lys Pro Lys Phe Thr Gln Asp Thr
 100 105 110
 Phe Arg Gly Ser Val Leu Glu Gly Val Leu Pro Gly Thr Ser Val Met
 115 120 125
 Gln Val Thr Ala Thr Asp Glu Asp Asp Ala Ile Tyr Thr Tyr Asn Gly
 130 135 140
 Val Val Ala Tyr Ser Ile His Ser Gln Glu Pro Lys Asp Pro His Asp
 145 150 155 160
 Leu Met Phe Thr Ile His Arg Ser Thr Gly Thr Ile Ser Val Ile Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Asp Arg Glu Lys Val Pro Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Gln
 180 185 190
 Ala Thr Asp Met Asp Gly Asp Gly Ser Thr Thr Thr Ala Val Ala Val
 195 200 205
 Val Glu Ile Leu Asp Ala Asn Asp Asn Ala Pro Met Phe Asp Pro Gln
 210 215 220
 Lys Tyr Glu Ala His Val Pro Glu Asn Ala Val Gly His Glu Val Gln
 225 230 235 240
 Arg Leu Thr Val Thr Asp Leu Asp Ala Pro Asn Ser Pro Ala Trp Arg
 245 250 255
 Ala Thr Tyr Leu Ile Met Gly Gly Asp Asp Gly Asp His Phe Thr Ile
 260 265 270
 Thr Thr His Pro Glu Ser Asn Gln Gly Ile Leu Thr Thr Arg Lys Gly
 275 280 285
 Leu Asp Phe Glu Ala Lys Asn Gln His Thr Leu Tyr Val Glu Val Thr
 290 295 300
 Asn Glu Ala Pro Phe Val Leu Lys Leu Pro Thr Ser Thr Ala Thr Ile

305 310 315 320

Val Val His Val Glu Asp Val Asn Glu Ala Pro Val Phe
 325 330

<210> 170
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> 現代人

<400> 170

Asp Trp Val Val Ala Pro Ile Ser Val Pro Glu Asn Gly Lys Gly Pro
 1 5 10 15

Phe Pro Gln Arg Leu Asn Gln Leu Lys Ser Asn Lys Asp Arg Asp Thr
 20 25 30

Lys Ile Phe Tyr Ser Ile Thr Gly Pro Gly Ala Asp Ser Pro Pro Glu
 35 40 45

Gly Val Phe Ala Val Glu Lys Glu Thr Gly Trp Leu Leu Leu Asn Lys
 50 55 60

Pro Leu Asp Arg Glu Glu Ile Ala Lys Tyr Glu Leu Phe Gly His Ala
 65 70 75 80

Val Ser Glu Asn Gly Ala Ser Val Glu Asp Pro Met Asn Ile Ser Ile
 85 90 95

Ile Val Thr Asp Gln Asn Asp His Lys Pro Lys Phe Thr Gln Asp Thr
 100 105 110

Phe Arg Gly Ser Val Leu Glu Gly Val Leu Pro Gly Thr Ser Val Met
 115 120 125

Gln Val Thr Ala Thr Asp Glu Asp Asp Ala Ile Tyr Thr Tyr Asn Gly
 130 135 140

Val Val Ala Tyr Ser Ile His Ser Gln Glu Pro Lys Asp Pro His Asp
 145 150 155 160

Leu Met Phe Thr Ile His Arg Ser Thr Gly Thr Ile Ser Val Ile Ser
 165 170 175

Ser Gly Leu Asp Arg Glu Lys Val Pro Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Gln
 180 185 190

Ala Thr Asp Met Asp Gly Asp Gly Ser Thr Thr Thr Ala Val Ala Val
 195 200 205

Val Glu Ile Leu Asp Ala Asn Asp Asn Ala Pro Met Phe Asp Pro Gln
 210 215 220

Lys Tyr Glu Ala His Val Pro Glu Asn Ala Val Gly His Glu Val Gln
 225 230 235 240

Arg Leu Thr Val Thr Asp Leu Asp Ala Pro Asn Ser Pro Ala Trp Arg
 245 250 255

Ala Thr Tyr Leu Ile Met Gly Gly Asp Asp Gly Asp His Phe Thr Ile
260 265 270

Thr Thr His Pro Glu Ser Asn Gln Gly Ile Leu Thr Thr Arg Lys Gly
275 280 285

Leu Asp Phe Glu Ala Lys Asn Gln His Thr Leu Tyr Val Glu Val Thr
290 295 300

Asn Glu Ala Pro Phe Val Leu Lys Leu Pro Thr Ser Thr Ala Thr Ile
305 310 315 320

Val Val His Val Glu Asp Val Asn Glu Ala Pro Val Phe Val Pro Pro
325 330 335

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

Cys Val Tyr Thr Ala Glu Asp Pro Asp Lys Glu Asn Gln Lys Ile Ser
355 360 365

Tyr Arg Ile Leu Arg Asp Pro Ala Gly Trp Leu Ala Met Asp Pro Asp
370 375 380

Ser Gly Gln Val Thr Ala Val Gly Thr Leu Asp Arg Glu Asp Glu Gln
385 390 395 400

Phe Val Arg Asn Asn Ile Tyr Glu Val Met Val Leu Ala Met Asp Asn
405 410 415

Gly Ser Pro Pro Thr Thr Gly Thr Gly Thr Leu Leu Leu Thr Leu Ile
420 425 430

Asp Val Asn Asp His Gly Pro
435

<210> 171
<211> 543
<212> PRT
<213> 現代人

<400> 171

Asp Trp Val Val Ala Pro Ile Ser Val Pro Glu Asn Gly Lys Gly Pro
1 5 10 15

Phe Pro Gln Arg Leu Asn Gln Leu Lys Ser Asn Lys Asp Arg Asp Thr
20 25 30

Lys Ile Phe Tyr Ser Ile Thr Gly Pro Gly Ala Asp Ser Pro Pro Glu
35 40 45

Gly Val Phe Ala Val Glu Lys Glu Thr Gly Trp Leu Leu Leu Asn Lys
50 55 60

Pro Leu Asp Arg Glu Glu Ile Ala Lys Tyr Glu Leu Phe Gly His Ala
65 70 75 80

Val Ser Glu Asn Gly Ala Ser Val Glu Asp Pro Met Asn Ile Ser Ile

	85		90		95
Ile Val Thr	Asp 100	Gln Asn Asp His	Lys 105	Pro Lys Phe Thr	Gln Asp Thr 110
Phe Arg Gly	Ser 115	Val Leu Glu	Gly 120	Val Leu Pro Gly	Thr 125
Gln Val Thr	Ala 130	Thr Asp Glu	Asp 135	Ala Ile Tyr	Thr 140
Val Val Ala	Tyr 145	Ser Ile His	Ser 150	Gln Glu Pro	Lys 155
Leu Met Phe	Thr 165	Ile His Arg	Ser 170	Gly Thr Ile	Ser 175
Ser Gly Leu	Asp 180	Arg Glu Lys	Val 185	Pro Glu Tyr	Thr 190
Ala Thr Asp	Met 195	Asp Gly Asp	Gly 200	Ser Thr Thr	Thr 205
Val Glu Ile	Leu 210	Asp Ala Asn	Asp 215	Ala Pro Met	Phe 220
Lys Tyr Glu	Ala 225	His Val Pro	Glu 230	Asn Ala Val	Gly 235
Arg Leu Thr	Val 245	Thr Asp Leu	Asp 250	Ala Pro Asn	Ser 255
Ala Thr Tyr	Leu 260	Ile Met Gly	Gly 265	Asp Asp Gly	Asp 270
Thr Thr His	Pro 275	Glu Ser Asn	Gln 280	Gly Ile Leu	Thr 285
Leu Asp Phe	Glu 290	Ala Lys Asn	Gln 295	His Thr Leu	Tyr 300
Asn Glu Ala	Pro 305	Phe Val Leu	Lys 310	Leu Pro Thr	Ser 315
Val Val His	Val 325	Glu Asp Val	Asn 330	Glu Ala Pro	Val 335
Ser Lys Val	Val 340	Glu Val Gln	Glu 345	Gly Ile Pro	Thr 350
Cys Val Tyr	Thr 355	Ala Glu Asp	Pro 360	Asp Lys Glu	Asn 365
Tyr Arg Ile	Leu 370	Arg Asp Pro	Ala 375	Gly Trp Leu	Ala 380
Ser Gly Gln	Val 385	Thr Ala Val	Gly 390	Thr Leu Asp	Arg 395
				Glu Asp Glu	Gln 400

Phe Val Arg Asn Asn Ile Tyr Glu Val Met Val Leu Ala Met Asp Asn
405 410 415

Gly Ser Pro Pro Thr Thr Gly Thr Gly Thr Leu Leu Leu Thr Leu Ile
420 425 430

Asp Val Asn Asp His Gly Pro Val Pro Glu Pro Arg Gln Ile Thr Ile
435 440 445

Cys Asn Gln Ser Pro Val Arg Gln Val Leu Asn Ile Thr Asp Lys Asp
450 455 460

Leu Ser Pro His Thr Ser Pro Phe Gln Ala Gln Leu Thr Asp Asp Ser
465 470 475 480

Asp Ile Tyr Trp Thr Ala Glu Val Asn Glu Glu Gly Asp Thr Val Val
485 490 495

Leu Ser Leu Lys Lys Phe Leu Lys Gln Asp Thr Tyr Asp Val His Leu
500 505 510

Ser Leu Ser Asp His Gly Asn Lys Glu Gln Leu Thr Val Ile Arg Ala
515 520 525

Thr Val Cys Asp Cys His Gly His Val Glu Thr Cys Pro Gly Pro
530 535 540

<210> 172
<211> 112
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 172

Glu Pro Gln Lys Tyr Glu Ala Trp Val Pro Glu Asn Glu Val Gly His
1 5 10 15

Glu Val Gln Arg Leu Thr Val Thr Asp Leu Asp Val Pro Asn Ser Pro
20 25 30

Ala Trp Arg Ala Thr Tyr His Ile Val Gly Gly Asp Asp Gly Asp His
35 40 45

Phe Thr Ile Thr Thr His Pro Glu Thr Asn Gln Gly Val Leu Thr Thr
50 55 60

Lys Lys Gly Leu Asp Phe Glu Ala Gln Asp Gln His Thr Leu Tyr Val
65 70 75 80

Glu Val Thr Asn Glu Ala Pro Phe Ala Val Lys Leu Pro Thr Ala Thr
85 90 95

Ala Thr Val Val Val His Val Lys Asp Val Asn Glu Ala Pro Val Phe
100 105 110

<210> 173
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 173
gctggtaaag gtgtaagcag aagccttgca gga 33

<210> 174
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 174
accgtagctg gtaaaggtag caccagaagc ctgcagga 39

<210> 175
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 175
gataccgtag ctggtaaaag cgtaaccaga agccttgca 39

<210> 176
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 176
gataccgtag ctggtagcgg tgtaaccaga agc 33

<210> 177
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 177
ccagctgata ccgtagctag caaaggigtgta accagaagc 39

<210> 178
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 178
caccagctg ataccgtaag cggtaaaggt gtaaccaga 39

<210> 179
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 179

tcgcacccag ctgataccag cgctggtaaa ggtgtaacc 39

<210> 180
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 180
tcgcacccag ctgatacgct agctggtaaa ggt 33

<210> 181
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 181
ctgtcgacc cagctagcac cgtagctggt aaa 33

<210> 182
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 182
ggcctgtcgc acccaagcga taccgtagct ggt 33

<210> 183
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 183
accattgtaa gcgctgatag ctcccatcca ctcaagccc 39

<210> 184
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 184
gttaccattg taagcgctag cccatcccat ccaactcaag 39

<210> 185
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 185
tgtgtacca ttgtaagcag cgatccatcc catccactc 39

<210> 186
<211> 45

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成之核苷酸序列	
<400> 186	
tgcatagttt gtgttaccat tagcagcgct gatccatccc atcca	45
<210> 187	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成之核苷酸序列	
<400> 187	
tgcatagttt gtgttaccag cgtaagcgct gatccatcc	39
<210> 188	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成之核苷酸序列	
<400> 188	
ctgtgcatag ttgtgttag cattgtaagc gctgatcca	39
<210> 189	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成之核苷酸序列	
<400> 189	
gagcttctgt gcatagttag tagcaccatt gtaagcgctg atcca	45
<210> 190	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成之核苷酸序列	
<400> 190	
gagcttctgt gcatagttag cggtaccatt gtaagcgct	39
<210> 191	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成之核苷酸序列	
<400> 191	
ctggagcttc tgtgcataag ctgtgttacc attgtaagc	39
<210> 192	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成之核苷酸序列	

<400> 192 gccctggagc ttctgtgcag cgtttgtgtt accattgta	39
<210> 193 <211> 39 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成之核苷酸序列	
<400> 193 gactctgccc tggagcttag ctgcatagtt tgtgttacc	39
<210> 194 <211> 39 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成之核苷酸序列	
<400> 194 ggtgactctg ccctggagag cctgtgcata gtttgtgtt	39
<210> 195 <211> 39 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成之核苷酸序列	
<400> 195 catggtgact ctgccctgag ccttctgtgc atagtttgt	39
<210> 196 <211> 39 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成之核苷酸序列	
<400> 196 ggtcatggtg actctgccag cgagcttctg tgcatagtt	39
<210> 197 <211> 33 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成之核苷酸序列	
<400> 197 ggtcatggtg actctagcct ggagcttctg tgc	33
<210> 198 <211> 45 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成之核苷酸序列	
<400> 198 accaaagca ttagctgtat cagcagtcgc acagtaatac acggc	45

<210> 199
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 199
aaaagcatta gctgtagcga tagtcgcaca gta 33

<210> 200
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 200
gataccaaaa gcattagcag catcgatagt cgcacagta 39

<210> 201
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 201
gccccagata ccaaaagcag cagctgtatc gatagtcgc 39

<210> 202
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 202
ttggccccag ataccagcag cattagctgt atc 33

<210> 203
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 203
cccttggccc cagatagcaa aagcattagc tgt 33

<210> 204
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 204
cattgtccct tggccccaag caccaaaaagc attagctgt 39

<210> 205
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>		
<223>	合成之核苷酸序列	
<400>	205	
	gttgagctg ctccagcgc aggagatggt gac	33
<210>	206	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成之核苷酸序列	
<400>	206	
	aatgttgag ctgctagcag agcaggagat ggt	33
<210>	207	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成之核苷酸序列	
<400>	207	
	attcccaatg ttggagctag ctccagagca ggagatggt	39
<210>	208	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成之核苷酸序列	
<400>	208	
	attattccca atgttgaag cgcttcaga gcaggagat	39
<210>	209	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成之核苷酸序列	
<400>	209	
	ataattattc ccaatgttag cgctgcttcc agagcagga	39
<210>	210	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成之核苷酸序列	
<400>	210	
	ggatacataa ttattcccaa tagcggagct gcttccagag cagga	45
<210>	211	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成之核苷酸序列	
<400>	211	
	ggatacataa ttattcccag cgttgagct gcttccaga	39

<210> 212
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 212
ccaggataca taattattag caatgttgga gctgcttcc 39

<210> 213
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 213
gtaccaggat acataattag ccccaatggt ggagctgct 39

<210> 214
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 214
ctggtaccag gatacataag cattcccaat gttggagct 39

<210> 215
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 215
ctgctggtac caggatacag cattattccc aatgttgga 39

<210> 216
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 216
gagctgctgg taccaggaag cataattatt cccaatgtt 39

<210> 217
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 217
tgggagctgc tggtaaccaag ctacataatt attcccaat 39

<210> 218
<211> 39
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 218
tgagggtcgc ttattattag cataaatgag gagtttggg 39

<210> 219
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 219
ccctgagggt cgcittattag cgtcataaat gaggagttt 39

<210> 220
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 220
aatccctgag ggtcgcttag cattgtcataaatgaggag 39

<210> 221
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 221
gtcaggaatc cctgagggtc gagcattatt gtcataaatgaggag 45

<210> 222
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 222
tcggtcagga atccctgagg gaggcattatt attgtcataa atgag 45

<210> 223
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 223
tcggtcagga atccctgaag ctgcgttatt attgtcata 39

<210> 224
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 224 tcggtcagga atcccagcgg gtcgcttatt att	33
<210> 225 <211> 33 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成之核苷酸序列	
<400> 225 gctgctatcc catgtagcgc agtaataatc ggc	33
<210> 226 <211> 33 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成之核苷酸序列	
<400> 226 caggctgcta tcccaagctc cgcagtaata atc	33
<210> 227 <211> 39 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成之核苷酸序列	
<400> 227 accactcagg ctgctatcag ctgttccgca gtaataatc	39
<210> 228 <211> 33 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成之核苷酸序列	
<400> 228 accactcagg ctgctagccc atgttccgca gta	33
<210> 229 <211> 33 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成之核苷酸序列	
<400> 229 cacaccactc aggctagcat cccatgttcc gca	33
<210> 230 <211> 39 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成之核苷酸序列	
<400> 230 gaataccaca ccactcagag cgctatccca tgttccgca	39
<210> 231	

<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 231
gccgaatacc acaccactag cgctgctatc ccatgttcc 39

<210> 232
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 232
gccgaatacc acaccagcca ggctgctatc cca 33

<210> 233
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 233
tccgccgaat accacagcac tcaggctgct atc 33

<210> 234
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 234
ccctccgccg aatacagcac cactcaggct gct 33

<210> 235
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之核苷酸序列

<400> 235
ggtccctccg ccgaaagcca caccactcag gct 33

<210> 236
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 236
Ala 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 Gly Lys Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Phe Asn Thr Pro Arg
85 90 95

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

<210> 237
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 237

Glu 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 Gly Tyr
20 25 30

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

Gly Arg Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Gly Ser Gly Ser Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 238
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 238

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Asp 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 Met Gln Gly
85 90 95

Thr His Trp Pro Pro Leu Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 239
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成之肽序列

<400> 239

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe 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 Lys Ser Ser Ser Asp Arg Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

發明摘要

【發明名稱】(中文/英文)

雙特異性異質二聚體雙功能抗體及彼等之用途

BISPECIFIC HETERODIMERIC DIABODIES AND USES THEREOF

【中文】

雙特異性異質二聚體雙功能抗體(diabody)分子及彼等於治療癌症之用途。該雙特異性異質二聚體雙功能抗體分子包含二個相聯結以形成二個表位結合位點的多肽鏈，該二個表位結合位點識別 P-鈣黏蛋白(cadherin)腫瘤細胞相關抗原及 CD3 T 細胞抗原。

【英文】

Bispecific heterodimeric diabody molecules and uses thereof in the treatment of cancer. The bispecific heterodimeric diabody molecules comprise two polypeptide chains that associate to form two epitope binding sites recognizing the P-cadherin tumor cell associated antigen and the CD3 T cell antigen.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第(1A)圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：無

申請專利範圍

1. 一種能夠特異結合至 P-鈣黏蛋白之表位及結合至 CD3 之表位的雙特異性異質二聚體雙功能抗體，其包含第一多肽鏈及第二多肽鏈，其中該第一多肽鏈及該第二條多肽鏈包含如第 30A、30B、31 A、31B、32A 或 32B 圖中所提出之序列。

2. 一種結合至 P-鈣黏蛋白且競爭結合至如申請專利範圍第 1 項之雙特異性異質二聚體雙功能抗體的雙特異性異質二聚體雙功能抗體。

3. 一種醫藥組成物，其包含治療有效量之如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之雙特異性異質二聚體雙功能抗體和醫藥上可接受之載體。

4. 一種如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之雙特異性異質二聚體雙功能抗體於製造用於治療 P-鈣黏蛋白相關病症之藥物的用途。

5. 如申請專利範圍第 4 項之用途，其中該 P-鈣黏蛋白相關病症為癌症。

6. 如申請專利範圍第 5 項之用途，其中該癌症係選自由下列所組成之群組：乳癌、結腸直腸癌、卵巢癌、胃癌、甲狀腺癌、前列腺癌、子宮頸癌、胰腺癌、肺癌、膀胱癌、肝癌、子宮內膜癌、頭頸癌、睪丸癌及膠質母細胞癌。

7. 如申請專利範圍第 4 項之用途，其中該藥物活化細胞毒性 T 細胞反應。

8. 一種經分離之宿主細胞，其重組製造如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之雙特異性異質二聚體雙功能抗體。

9. 一種經分離之多核苷酸，其包含編碼如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之雙特異性異質二聚體雙功能抗體的核苷酸序列。

10. 一種載體，其包含如申請專利範圍第 9 項之多核苷酸。

