I710675

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本　**(11)證書號數：TW I710675 B**

(45)公告日： 中華民國 109 (2020) 年 11 月 21 日

(21)申請案號：101136222　(22)申請日： 中華民國 101 (2012) 年 10 月 01 日

(51)Int. Cl.：　*C40B40/02* *(2006.01)*　*C40B50/06* *(2006.01)*

C07K16/00 *(2006.01)*　*C07K19/00* *(2006.01)*

C12N15/62 *(2006.01)*　*C12N15/73* *(2006.01)*

(30)優先權：2011/09/30　日本　2011-218006

2012/05/30　日本　2012-123479

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

(72)發明人：井川智之 IGAWA, TOMOYUKI (JP)；石井慎也 ISHII, SHINYA (JP)；船木美步 FUNAKI, MIHO (JP)；廣庭奈緒香 HIRONIWA, NAOKA (JP)；清水駿 SHIMIZU, SHUN (JP)

(74)代理人：洪澄文

(56)參考文獻：

CN　102056946A

Luttrell BM et al., "Reaction coupling of chelation and antigen binding in the calcium ion-dependent antibody binding of cyclic AMP", The Journal of Biological Chemistry, vol.266, No. 32, p. 21626-21630, 1991/11/15

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：25 項　圖式數：19　共 411 頁

(54)名稱

離子濃度依存性結合分子庫

(57)摘要

本發明係揭示主要由隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原之結合活性會變化之至少一個胺基酸殘基係包含於抗原結合結構域(domain)中之彼此序列互異之複數個抗原結合分子所構成之分子庫。又，亦揭示包含編碼抗原結合分子之複數個聚核苷酸分子之組成物、包含含有前述聚核苷酸分子之複數個載體的組成物、前述抗原結合分子之選擇方法、前述聚核苷酸分子之單離方法、前述抗原結合分子之製造方法、包含前述抗原結合分子之醫藥組成物。

指定代表圖：

圖4

圖4A

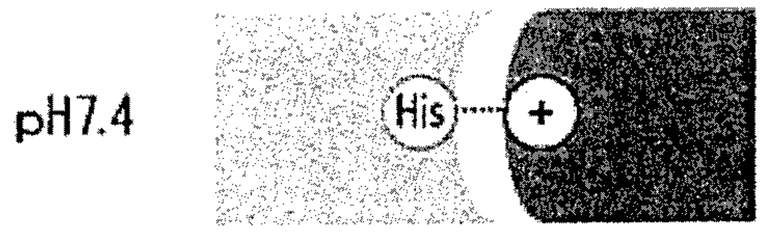


圖4B

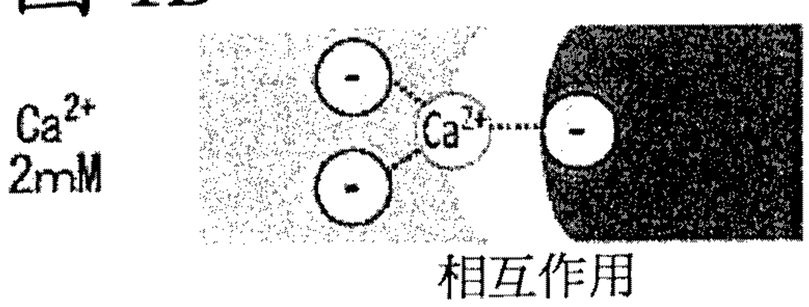
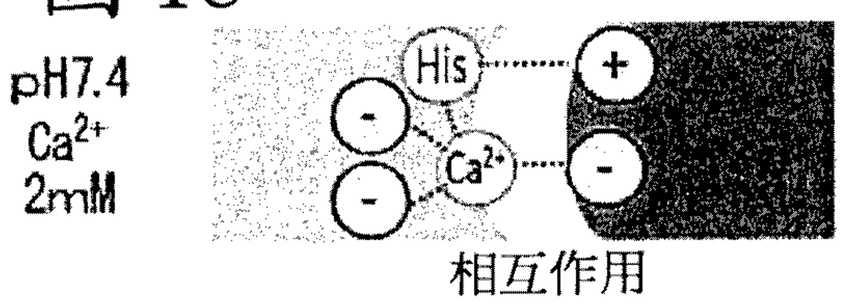
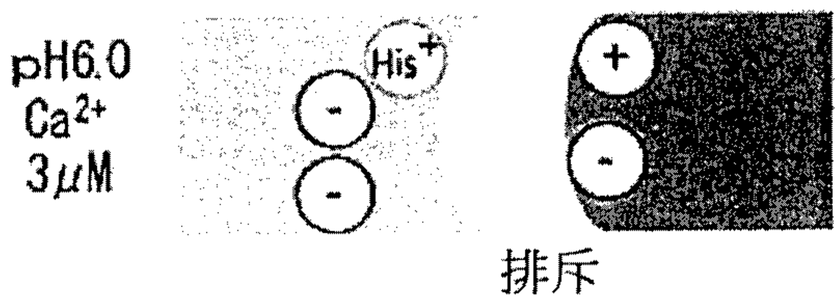


圖4C





公告本

I710675

發明專利說明書

（本申請書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫）

※申請案號：101136222

※申請日：101 年 10 月 01 日　　※IPC 分類：*C40B 40/02* (2006.01)
C40B 50/06 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/73 (2006.01)

一、發明名稱：（中文／英文）

離子濃度依存性結合分子庫

二、中文發明摘要：

本發明係揭示主要由隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原之結合活性會變化之至少一個胺基酸殘基係包含於抗原結合結構域(domain)中之彼此序列互異之複數個抗原結合分子所構成之分子庫。又，亦揭示包含編碼抗原結合分子之複數個聚核苷酸分子之組成物、包含含有前述聚核苷酸分子之複數個載體的組成物、前述抗原結合分子之選擇方法、前述聚核苷酸分子之單離方法、前述抗原結合分子之製造方法、包含前述抗原結合分子之醫藥組成物。

三、英文發明摘要：

四、指定代表圖：

（一）本案指定代表圖為：第（4）圖。

（二）本代表圖之元件符號簡單說明：無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：無

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

相關之申請案

本申請案係以日本專利申請案 2011-218006(2011 年 9 月 30 日申請)及 2012-123479(2012 年 5 月 30 日申請)作爲優先權而主張，該等內容係作爲參考而採入本說明書中。

發明之領域

本發明係關於隨著離子濃度之條件不同，對抗原之結合活性會變化的抗原結合分子庫及其製造方法、如此抗原結合分子之選擇方法及製造方法、以及含有如此抗原結合分子之醫藥組成物。

【先前技術】

抗體在血漿中之安定性高，副作用亦少，因而作爲醫藥品而受到注目。其中尤以 IgG 型之抗體醫藥有多數上市，現在亦有大量的抗體醫藥正被開發(非專利文獻 1、非專利文獻 2)。另一方面，作爲可應用於第 2 世代之抗體醫藥的技術，係開發有各種的技術，而被報導使效用(effector)功能、抗原結合能力、藥物動力學、安定性提高；或免疫原性風險降低之技術等(非專利文獻 3)。抗體醫藥一般而言投與量非常之高，因此被認爲其課題爲皮下投與製劑製造困難、且製造成本高等。作爲使抗體醫藥之投與量降低之方法，可考慮使抗體之藥物動力學提高的方

法、及使抗體與抗原之親和性(affinity)提高之方法。

作爲使抗體之藥物動力學提高的方法，被報導有恆定區域之人工胺基酸取代(非專利文獻 4、5)。作爲使抗原結合能力、抗原中和能力を增強之技術，被報導有親和性成熟化技術(非專利文獻 6)，藉由於可變區域之 CDR 區域等的胺基酸導入變異，可使對抗原之結合活性增強。藉由抗原結合能力之增強，可使 in vitro 之生物活性提高、或使投與量降低，進一步地亦可提高 in vivo 之藥效(非專利文獻 7)。

另一方面，抗體每 1 分子可中和之抗原量係依存於親和性，藉由使親和性變強，能夠以少的抗體量來中和抗原，可用各種方法來使抗體之親和性變強(非專利文獻 6)。進一步地，若能與抗原共價地鍵結，使親和性無限大，則能夠以 1 分子抗體來中和 1 分子之抗原(2 價的情況爲 2 個抗原)。但是，至今爲止的方法中，以 1 分子之抗體對 1 分子之抗原(2 價的情況爲 2 個抗原)進行化學計量上的中和反應已爲極限，以抗原量以下之抗體量將抗原完全中和則爲不可能。換言之，使親和性變強之效果係存在著極限(非專利文獻 9)。中和抗體時，爲了使其中和效果持續一定期間，必須投與在該期間於生體內產生之抗原量以上的抗體量，僅靠上述之抗體藥物動力學提高、或親和性成熟化技術，對必要抗體投與量之降低而言尚存在極限。因此，爲了將以抗原量以下之抗體量中和抗原之效果持續一目標之期間，必須以一抗體中和複數個抗原。

作爲達成其之新方法，最近報導有依 pH 依存性地對抗原結合的抗體(專利文獻 1)。此文獻揭示了藉由對抗原結合分子導入組胺酸，在 pH 中性區域與 pH 酸性區域其性質會變化之 pH 依存性地對抗原結合的抗體。在血漿中之中性條件下對抗原強力地結合，在內體(endosome)內之酸性條件下由抗原解離之 pH 依存性地對抗原結合的抗體，在內體內可由抗原解離。pH 依存性地對抗原結合的抗體，在使抗原解離後，抗體藉由 FcRn 被回收到血漿中後可再度與抗原結合，因此能夠以一抗體對複數個抗原重複地結合。

又，抗原之在血漿中滯留性，相較於與 FcRn 結合而被回收的抗體係非常短。在血漿中滯留性長之抗體與如此之血漿中滯留性短的抗原結合時，抗體抗原複合體在血漿中滯留性會與抗體同樣地變長。因此，抗原藉由與抗體結合，血漿中滯留性傾向於變長，血漿中抗原濃度會上昇。如此情況時，即使抗體對抗原之親和性提高，亦無法促進抗原由血漿中消失。上述之 pH 依存性地對抗原結合的抗體，相較於通常之抗體，有被報導作爲促進抗原由血漿中消失之方法亦爲有效(專利文獻 1)。

如此 pH 依存性地對抗原結合的抗體因以一抗體對複數個抗原結合，相較於通常之抗體，能夠促進抗原由血漿中之消失，因此具有通常的抗體所無法達成之作用。藉由取代既存之抗體序列，可賦予對抗原之 pH 依存性的結合活性。另一方面，爲了新取得如此的抗體，在由免疫動物

取得抗體之方法或由人類抗體庫取得抗體之方法中，被認爲有如下述之限制。

對非人類動物誘發免疫之方法中，雖有可能可以得到pH 依存性的結合抗體，但也可能有難以在短期間得到對多種抗原之 pH 依存性地對抗原結合的抗體、或選擇性地得到對特定的抗原決定部位特異地結合的抗體。又，可由人類抗體庫中以 pH 依存性地對抗原之結合能力作爲指標來濃縮抗體。但是，一般而言(登錄於 Kabat 資料庫之)人類抗體之抗體可變區域部分中的組胺酸殘基出現頻率，已知在重鏈 CDR1 爲 5.9%、重鏈 CDR2 爲 1.4%、重鏈 CDR3 爲 1.6%、輕鏈 CDR1 爲 1.5%、輕鏈 CDR2 爲 0.5%、輕鏈 CDR3 爲 2.2%，並不高，於人類抗體庫中可具有 pH 依存性的抗原結合能力之序列被認爲非常少。因而，期望提供大量含有與抗原之結合部位中組胺酸出現頻率經提高之可具有 pH 依存性的對抗原之結合能力之序列的抗體庫。

另一方面，可認爲只要可在 pH 以外之血漿中與早期內體內之環境間賦予對於抗原的結合能力之對於不同要素之依存性，即可達成促進抗原由血漿中之消失等效果。

再者，本發明之先前技術文獻如以下所示。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

[專利文獻 1]WO2009125825

[非專利文獻]

[非專利文獻 1]Janice M Reichert, Clark J Rosensweig,

Laura B Faden & Matthew C Dewitz, Monoclonal antibody successes in the clinic, Nat. Biotechnol.(2005)23, 1073-1078

[非專利文獻 2]Pavlou AK, Belsey MJ., The therapeutic antibodies market to 2008, Eur J Pharm Biopharm. (2005)59(3), 389-396.

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

[非專利文獻 4]Hinton PR, Xiong JM, Johlfs MG, Tang MT, Keller S, Tsurushita N., An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life, J Immunol.(2006) 176(1), 346-356

[非專利文獻 5]Ghetie V, Popov S, Borvak J, Radu C, Matesoi D, Medesan C, Ober RJ, Ward ES., Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis, Nat. Biotechnol.(1997) 15(7), 637-640

[非專利文獻 6]Rajpal A, Beyaz N, Haber L, Cappuccilli G, Yee H, Bhatt RR, Takeuchi T, Lerner RA, Crea R., A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.(2005) 102(24), 8466-8471

[非專利文獻 7]Wu H, Pfarr DS, Johnson S, Brewah YA, Woods RM, Patel NK, White WI, Young JF, Kiener

PA. Development of Motavizumab, an Ultra-potent Antibody for the Prevention of Respiratory Syncytial Virus Infection in the Upper and Lower Respiratory Tract, J. Mol. Biol.(2007) 368, 652-665

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

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

【發明內容】

[發明所欲解決之課題]

本發明係鑑於如此之狀況而爲者，其目的在提供主要由隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原之結合活性會變化之至少一個胺基酸殘基係包含於抗原結合結構域(domain)中之彼此序列互異之複數個抗原結合分子所構成之分子庫、包含編碼前述抗原結合分子之複數個聚核苷酸分子的組成物、包含含有前述聚核苷酸分子之複數個載體之組成物、前述抗原結合分子之選擇方法、前述聚核苷酸分子之單離方法、前述抗原結合分子之製造方法、包含前述抗原結合分子之醫藥組成物。

[用以解決課題之手段]

本發明者等人，對於包含隨著生體內環境要素之相異，抗原結合分子對抗原之結合活性會變化之至少一個胺基酸殘基係包含於抗原結合結構域中之彼此序列互異之複數個抗原結合分子的分子庫進行努力研究。結果，本發明者等人，著眼於血漿中與早期內體內中之離子濃度、特別是鈣離子濃度的差異或 pH，發現了藉由使用具有鈣依存性或 pH 依存性對抗原之結合活性的抗原結合分子，可製造主要由促進抗原結合分子所致之抗原對細胞內之攝入、帶來血漿中之抗原濃度減少的抗原結合分子所構成之分子庫。

亦即本發明係關於主要由隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原之結合活性會變化之至少一個胺基酸殘基係包含於抗原結合結構域中之彼此序列互異之複數個抗原結合分子所構成之分子庫、包含編碼前述抗原結合分子之複數個聚核苷酸分子的組成物、包含含有前述聚核苷酸分子之複數個載體之組成物、前述抗原結合分子之選擇方法、前述聚核苷酸分子之單離方法、前述抗原結合分子之製造方法、包含前述抗原結合分子之醫藥組成物等。更具體而言係關於以下者。

本發明提供：

[1]一種分子庫，其係主要由彼此序列互異的複數個抗原結合分子所構成之分子庫，其特徵在於，前述抗原結合

分子中之抗原結合結構域，係包含隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原的結合活性會變化之至少一個胺基酸殘基、

[2]如[1]記載之分子庫，其中離子濃度爲鈣離子濃度、

[3]如[2]記載之分子庫，其中前述胺基酸殘基係包含於前述抗原結合分子之重鏈的抗原結合結構域中、

[4]如[3]記載之分子庫，其中重鏈之抗原結合結構域爲重鏈可變區域、

[5]如[4]記載之分子庫，其中前述胺基酸殘基係包含於重鏈可變區域之 CDR3 中、

[6]如[2]至[5]中任一項記載之分子庫，其中前述胺基酸殘基係包含於重鏈 CDR3 之以 Kabat 編號表示之 95 位、96 位、100a 位及/或 101 位中、

[7]如[2]至[6]中任一項記載之分子庫，其中前述胺基酸殘基以外之胺基酸序列係包含天然(naive)序列之胺基酸序列、

[8]如[3]至[7]中任一項記載之分子庫，其中前述抗原結合分子之輕鏈可變區域係包含天然序列之胺基酸序列、

[9]如[2]記載之分子庫，其中前述胺基酸殘基係包含於前述抗原結合分子之輕鏈之抗原結合結構域中、

[10]如[9]記載之分子庫，其中輕鏈之抗原結合結構域爲輕鏈可變區域、

[11]如[10]記載之分子庫，其中前述胺基酸殘基係包

含於輕鏈可變區域之 CDR1 中、

[12]如[11]記載之分子庫，其中前述胺基酸殘基係包含於 CDR1 之以 Kabat 編號表示之 30 位、31 位及/或 32 位中、

[13]如[10]至[12]中任一項記載之分子庫，其中前述胺基酸殘基係包含於輕鏈可變區域之 CDR2 中、

[14]如[13]記載之分子庫，其中前述胺基酸殘基係包含於輕鏈之 CDR2 之以 Kabat 編號表示之 50 位中、

[15]如[10]至[14]中任一項記載之分子庫，其中前述胺基酸殘基爲輕鏈之 CDR3、

[16]如[15]記載之分子庫，其中前述胺基酸殘基係包含於輕鏈之 CDR3 之以 Kabat 編號表示之 92 位中、

[17]如[2]或[9]至[16]中任一項記載之分子庫，其中前述抗原結合分子之輕鏈的框架(framework)係包含生殖細胞系列之框架序列、

[18]如[2]或[9]至[17]中任一項記載之分子庫，其中前述抗原結合分子之重鏈可變區域係包含天然序列之胺基酸序列、

[19]如[1]至[18]中任一項記載之分子庫，其中前述胺基酸殘基係形成鈣結合模式結構(motif)、

[20]如[19]記載之分子庫，其中鈣結合模式結構爲鈣黏素結構域、EF hand、C2 結構域、Gla 結構域、C 型凝集素、結構域、annexin、thrombospondin 3 型結構域及類 EGF 結構域、Vk5 之部分、序列編號 10、序列編號 11 之

任一者之鈣結合模式結構、

[21]如[2]至[20]中任一項記載之分子庫，其中前述胺基酸殘基爲具有金屬鉗合作用之胺基酸、

[22]如[21]記載之分子庫，其中具有金屬鉗合作用之胺基酸，係絲胺酸、蘇胺酸、天門冬醯胺、麩醯胺、天門冬胺酸或麩胺酸之任一者以上之胺基酸、

[23]如[1]記載之分子庫，其中離子濃度之條件爲pH、

[24]如[23]記載之分子庫，其中前述胺基酸殘基係包含於前述抗原結合分子之重鏈的抗原結合結構域中、

[25]如[24]記載之分子庫，其中重鏈之抗原結合結構域爲重鏈可變區域、

[26]如[25]記載之分子庫，其中前述胺基酸殘基其中前述胺基酸殘基係包含於重鏈可變區域之以 Kabat 編號表示之 27 位、31 位、32 位、33 位、35 位、50 位、52 位、53 位、55 位、57 位、58 位、59 位、61 位、62 位、95 位、96 位、97 位、98 位、99 位、100a 位、100b 位、100d 位、100f 位、100h 位、102 位或 107 位之任一者以上中、

[27]如[26]記載之分子庫，其中重鏈可變區域之以 Kabat 編號表示之 27 位、31 位、32 位、33 位、35 位、50 位、52 位、53 位、55 位、57 位、58 位、59 位、61 位、62 位、95 位、96 位、97 位、98 位、99 位、100a 位、100b 位、100d 位、100f 位、100h 位、102 位或 107 位之

任一者的胺基酸殘基以外之胺基酸序列係包含天然序列之胺基酸序列、

[28]如[23]至[27]中任一項記載之分子庫，其中前述抗原結合分子之輕鏈可變區域係包含生殖細胞系列之序列、

[29]如[23]記載之分子庫，其中前述胺基酸殘基係包含於前述抗原結合分子之輕鏈的抗原結合結構域中、

[30]如[29]記載之分子庫，其中輕鏈之抗原結合結構域爲輕鏈可變區域、

[31]如[30]記載之分子庫，其中前述胺基酸殘基係包含於輕鏈可變區域之以 Kabat 編號表示之 24 位、27 位、28 位、30 位、31 位、32 位、34 位、50 位、51 位、52 位、53 位、54 位、55 位、56 位、89 位、90 位、91 位、92 位、93 位、94 位或 95a 位之任一者以上中、

[32]如[30]或[31]記載之分子庫，其中前述胺基酸殘基係包含於輕鏈可變區域之 CDR1 中、

[33]如[32]記載之分子庫，其中前述胺基酸殘基係包含於輕鏈之 CDR1 之以 Kabat 編號表示之 24 位、27 位、28 位、30 位、31 位、32 位或 34 位之任一者以上中、

[34]如[30]至[33]中任一項記載之分子庫，其中前述胺基酸殘基係包含於輕鏈之 CDR2 中、

[35]如[34]記載之分子庫，其中前述胺基酸殘基係包含於輕鏈之 CDR2 之以 Kabat 編號表示之 50 位、51 位、52 位、53 位、54 位、55 位或 56 位之任一者以上中、

[36]如[30]至[35]中任一項記載之分子庫，其中前述胺基酸殘基係包含於輕鏈之CDR3中、

[37]如[36]記載之分子庫，其中前述胺基酸殘基係包含於輕鏈之CDR3之以Kabat編號表示之89位、90位、91位、92位、93、94位或95a位之任一者以上中、

[38]如[29]至[37]中任一項記載之分子庫，其中輕鏈之框架係包含生殖細胞系列之框架序列、

[39]如[29]至[38]中任一項記載之分子庫，其中重鏈可變區域爲天然序列、

[40]如[23]至[39]中任一項記載之分子庫，其中前述胺基酸殘基係側鏈之pKa爲4.0-8.0之胺基酸、

[41]如[23]至[40]中任一項記載之分子庫，其中前述胺基酸殘基爲麩胺酸、

[42]如[23]至[39]記載之分子庫，其中前述胺基酸殘基係側鏈之pKa爲5.5-7.0之胺基酸、

[43]如[23]至[40]或[42]中任一項記載之分子庫，其中前述胺基酸殘基爲組胺酸、

[44]一種分子庫，其係主要由包含如[1]至[43]中任一項記載之抗原結合分子之複數個融合多肽所構成之分子庫，其特徵在於，前述融合多肽係抗原結合分子之重鏈可變區域與病毒外殼蛋白質之至少一部分經融合者、

[45]如[44]記載之分子庫，其中前述病毒外殼蛋白質係選自由蛋白質pIII、主外殼蛋白質pVIII、pVII、pIX、Soc、Hoc、gpD、pv1及其變異體所構成群組、

[46]一種組成物，其係包含各自編碼如[1]至[43]記載之彼此序列互異的抗原結合分子或如請求項[44]或[45]記載之彼此序列互異的融合多肽之複數個聚核苷酸分子、

[47]一種組成物，其係包含：以連結爲能夠作用的狀態各自包含如[46]記載之複數個聚核苷酸分子之複數個載體、

[48]如[47]記載之組成物，其中載體爲可複製之表現載體、

[49]如[48]記載之組成物，其中可複製之表現載體係使選自由 lac Z 啓動子系、鹼性磷酸酯酶 pho A 啓動子(Ap)、噬菌體 λPL 啓動子(溫度感受性啓動子)、tac 啓動子、色胺酸啓動子、pBAD 啓動子及噬菌體 T7 啓動子所構成群組之啓動子區域在表現載體中與前述聚核苷酸連結爲能夠作用、

[50]如[48]或[49]記載之組成物，其中可複製之表現載體爲 M13、f1、fd、Pf3 噬菌體或其衍生物；或者 λ 型噬菌體或其衍生物、

[51]一種組成物，其係包含：各自包含如[47]至[50]中任一項記載之載體的複數個病毒、

[52]一種組成物，其係包含：：各自於其表面展現如[1]至[43]記載之彼此序列互異的抗原結合分子或如[44]或[45]記載之彼此序列互異的融合多肽之複數個病毒、

[53]一種分子庫，其係包含如[1]至[43]記載之彼此序列互異的抗原結合分子或如[44]或[45]記載之彼此序列互

異的融合多肽之分子庫，且其係具有 1 x 10^6 至 1 x 10^{14} 個之彼此相異之可變區域序列、

[54]如[53]記載之分子庫，其係具有 1 x 10^8 以上個之彼此相異之可變區域序列、

[55]一種分子庫之製造方法，其係主要由彼此序列互異的複數個抗原結合分子所構成之分子庫之製造方法，且其係包含製造以前述抗原結合分子中之抗原結合結構域係包含隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原的結合活性會變化之至少一個胺基酸殘基的方式所設計之複數個抗原結合分子、

[56]如[55]記載之製造方法，其中前述抗原結合分子爲如[2]至[43]中任一項記載之抗原結合分子、

[57]如[55]或[56]之製造方法，其中前述抗原結合分子之重鏈可變區域係與病毒外殼蛋白質之至少一部分融合、

[58]如[55]至[57]中任一項記載之製造方法，其中前述病毒外殼蛋白質係選自由蛋白質 pIII、主外殼蛋白質 pVIII、pVII、pIX、Soc、Hoc、gpD、pv1 及其變異體所構成群組、

[59]一種選擇抗原結合分子之方法，其係選擇隨著離子濃度之條件不同，對抗原之結合活性會變化之抗原結合分子之方法，且其係包含

a)製造主要由如[1]至[43]中任一項記載之彼此序列互異的抗原結合分子或如[44]或[45]記載之彼此序列互異的

融合多肽所構成之分子庫之步驟、

b)將前述分子庫在離子濃度相異之二個以上的條件下與抗原接觸之步驟、

c)由前述分子庫中區分隨著離子濃度之條件不同，對抗原的結合活性會變化之抗原結合分子的集團之步驟、

d)由於 c)所區分的集團中單離隨著離子濃度之條件不同，對抗原的結合活性會變化之抗原結合分子之步驟、

[60]一種單離聚核苷酸之方法，其係單離編碼隨著離子濃度之條件不同，對抗原的結合活性會變化之抗原結合分子的聚核苷酸之方法，且其係包含、

a)製造分子庫之步驟，該分子庫係包含以連結爲能夠作用之狀態各自包含各自編碼如申[1]至[43]中任一項記載之彼此序列互異的抗原結合分子或如[44]或[45]記載之彼此序列互異的融合多肽之複數個聚核苷酸的複數個可複製之表現載體、

b)於經導入前述分子庫所包含之各自的表現載體之複數個病毒表面，表現由前述聚核苷酸所編碼之前述彼此序列互異的抗原結合分子或融合多肽之步驟、

c)使前述複數個病毒在離子濃度相異之二個以上的條件下與抗原接觸之步驟、

d)由前述分子庫中區分隨著離子濃度之條件不同，對抗原的結合活性會變化之病毒的集團之步驟、

e)由於 d)所區分之病毒的集團中單離隨著離子濃度之條件不同，對抗原的結合活性會變化之病毒之步驟、

f)由經單離之病毒中單離聚核苷酸之步驟、

[61]如[60]記載之方法，其中追加地重複由前述 c)至d)的步驟至少 1 次、

[62]如[59]至[61]中任一項記載之方法，其中離子濃度爲鈣離子濃度、

[63]如[62]記載之方法，其係選擇在低鈣濃度之條件下對抗原的結合活性比在高鈣濃度之條件下的結合活性更低之抗原結合分子、

[64]如[63]記載之方法，其中低鈣濃度之條件爲 0.1μM 至 30μM、

[65]如[63]或[64]記載之方法，其中高鈣濃度之條件爲 100μM 至 10 mM、

[66]如[59]至[61]中任一項記載之方法，其中離子濃度之條件爲 pH、

[67]如[66]記載之方法，其係選擇在 pH 酸性區域條件下對抗原的結合活性比在 pH 中性區域條件下的結合活性更低之抗原結合分子、

[68]如[66]記載之方法，其中 pH 酸性區域條件爲 pH4.0 至 6.5、

[69]如[67]或[68]記載之方法，其中 pH 中性區域條件爲 pH6.7 至 10.0、

[70]一種抗原結合分子之製造方法，其係隨著離子濃度之條件不同，對抗原的結合活性會變化之抗原結合分子之製造方法，其係包含

a)製造分子庫之步驟，該分子庫係包含以連結爲能夠作用之狀態各自包含各自編碼如[1]至[43]中任一項記載之彼此序列互異的抗原結合分子或如[44]或[45]記載之彼此序列互異的融合多肽之複數個聚核苷酸的複數個可複製之表現載體、

b)於經導入前述分子庫所包含之各自的表現載體之複數個病毒表面，表現由前述聚核苷酸所編碼之前述彼此序列互異的抗原結合分子或融合多肽之步驟、

c)使前述複數個病毒在離子濃度相異之二個以上的條件下與抗原接觸之步驟、

d)由前述分子庫中區分隨著離子濃度之條件不同，對抗原的結合活性會變化之病毒的集團之步驟、

e)由於 d)所區分之病毒的集團中單離隨著離子濃度之條件不同，對抗原的結合活性會變化之病毒之步驟、

f)由經單離之病毒中單離聚核苷酸之步驟、

g)培養經導入以連結爲能夠作用之狀態插入經單離之聚核苷酸的載體之宿主細胞的步驟、

h)由於 g)所培養之培養液中回收抗原結合分子之步驟、

[71]一種抗原結合分子之製造方法，其係隨著離子濃度之條件不同，對抗原的結合活性會變化之抗原結合分子之製造方法，其係包含

a)製造分子庫之步驟，該分子庫係包含以連結爲能夠作用之狀態各自包含各自編碼如[1]至[43]中任一項所記載

之彼此序列互異的抗原結合分子或如[44]或[45]記載之彼此序列互異的融合多肽之複數個聚核苷酸的複數個可複製之表現載體、

b)於經導入前述分子庫所包含之各自的表現載體之複數個病毒表面，表現由前述聚核苷酸所編碼之前述彼此序列互異的抗原結合分子或融合多肽之步驟、

c)使前述複數個病毒在離子濃度相異之二個以上的條件下與抗原接觸之步驟、

d)由前述分子庫中區分隨著離子濃度之條件不同，對抗原的結合活性會變化之病毒的集團之步驟、

e)由於 d)所區分之病毒的集團中單離隨著離子濃度之條件不同，對抗原的結合活性會變化之病毒之步驟、

f)由經單離之病毒中單離聚核苷酸之步驟、

g)使經單離之聚核苷酸與編碼抗體恆定區域之聚核苷酸連結爲同一讀框(in-frame)之步驟、

h)培養經導入以連結爲能夠作用之狀態插入於 g)中經連結之聚核苷酸的載體之宿主細胞的步驟、

i)由於 h)所培養之培養液中回收抗原結合分子之步驟、

[72]如[70]或[71]記載之製造方法，其中追加地重複由前述 c)至 d)的步驟至少 1 次、

[73]如[70]至[72]中任一項記載之製造方法，其中離子濃度爲鈣離子濃度、

[74]如[73]記載之製造方法，其係選擇在低鈣濃度之

條件下對抗原的結合活性比在高鈣濃度之條件下的結合活性更低之抗原結合分子、

[75]如[74]記載之製造方法，其中低鈣濃度之條件爲0.1μM至30μM、

[76]如[74]或[75]記載之製造方法，其中高鈣濃度之條件爲100μM至10 mM、

[77]如[70]至[72]中任一項記載之製造方法，其中離子濃度之條件爲Ph之條件、

[78]如[77]記載之製造方法，其係選擇在pH酸性區域條件下對抗原的結合活性比在pH中性區域條件下的結合活性更低之抗原結合分子、

[79]如[78]記載之製造方法，其中pH酸性區域條件爲pH4.0至6.5、

[80]如[78]或[79]記載之製造方法，其中pH中性區域條件爲pH6.7至10.0、

[81]一種抗原結合分子，其係藉由如[70]至[80]中任一項記載之製造方法所製造、

[82]一種醫藥組成物，其係包含如[81]記載之抗原結合分子或其改變體醫藥組成物。

【實施方式】

藉由本發明之揭示，係提供主要由隨著離子濃度之條件不同，對抗原之結合活性會變化之彼此序列互異之複數個抗原結合分子所構成之分子庫。又，藉由本發明之揭

示，主要由隨著金屬離子濃度及/或氫離子濃度之條件不同，對抗原之結合活性會變化之彼此序列互異之複數個抗原結合分子所構成之分子庫之新穎且系統的製造方法。如此之分子庫，例如可作爲依照金屬離子濃度及/或氫離子濃度之條件所期望之活性，例如可作爲有用於選擇及/或篩選具有結合親和性及總結合力(avidity)之合成的抗原結合分子之殖株的組合分子庫來使用。

該等之分子庫，係有用於鑑定可與多種多樣之對象抗原的任一者相互作用之抗原結合分子之多肽序列。例如，含有作爲噬菌體展示(phage display)而表現之本發明之多樣化抗原結合分子的多肽之分子庫，特別有用於目標抗原結合分子之選擇及/或篩選，又，藉由本發明係提供用於其之高通量之有效率且可自動化之系統。依照本發明之方法，可提供對於對象抗原條件依存性地結合的抗原結合分子。進一步地，藉由本發明，係提供包含該抗原結合分子作爲有效成分之醫藥組成物。

定義

胺基酸

本說明書中，例如以如 Ala/A、Leu/L、Arg/R、Lys/K、Asn/N、Met/M、Asp/D、Phe/F、Cys/C、Pro/P、Gln/Q、Ser/S、Glu/E、Thr/T、Gly/G、Trp/W、His/H、Tyr/Y、Ile/I、Val/V 所表示的，胺基酸係以 1 字編碼或 3 字編碼、或其兩者來標記。

EU 編號及 Kabat 編號

依照本發明中所使用之方法，定位於抗體之 CDR 與 FR 的胺基酸位置係遵照 Kabat 所規定(Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institute of Health, Bethesda, Md., 1987 年及 1991 年)。本說明書中，抗原結合分子爲抗體或抗原結合片段時，可變區域之胺基酸係遵照 Kabat 編號，恆定區域之胺基酸係遵照根據 Kabat 之胺基酸位置的 EU 編號來表示。

胺基酸之改變

爲了改變抗原結合分子之胺基酸序列中的胺基酸，可適當地採用部位特異性突變異誘發法(Kunkel 等人(Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1985)82, 488-492))或 Overlap extension PCR 等之公知方法。又，作爲取代爲天然胺基酸以外之胺基酸的胺基酸改變方法，亦可採用複數個公知之方法(Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.(2006)35, 225-249、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.(2003)100(11), 6353-6357)。例如，亦適合使用含有使非天然胺基酸及與終止密碼子之 1 的 UAG 密碼子(琥珀(amber)密碼子)互補的琥珀抑制子 tRNA 經結合之 tRNA 的無細胞轉譯系統(Clover Direct (Protein Express))等。又，做爲表示胺基酸之改變的標記，可適當地使用在表示特定位置之數字前後使用改變前與改變後之胺基酸 1 字編碼的標記。例如，於抗體恆定區

域中所含之 Fc 區域加入胺基酸的取代時所用的 P238D 之改變，表示以 EU 編號表示之 238 位的 Pro 係取代爲 Asp。亦即，數字係表示以 EU 編號表示之胺基酸的位置，其之前所記載的胺基酸一字編碼係表示取代前之胺基酸、其後所記載之胺基酸 1 字編碼係表示取代後之胺基酸。

及/或

本說明書中，「及/或」之用語的意義，係包含「及」與「或」呈適當組合之所有組合。具體而言，例如「33 位、55 位、及/或 96 位之胺基酸被取代」係指包含以下之胺基酸的改變之變化；

(a)33 位、(b)55 位、(c)96 位、(d)33 位及 55 位、(e)33 位及 96 位、(f)55 位及 96 位、(g)33 位及 55 位及 96 位。

抗原結合分子

本說明書中，用語「抗原結合分子」係作爲表示包含抗原結合結構域之分子的最廣義的意義來使用，具體而言，只要該等係顯示對抗原之結合活性，則包含各種之分子型。例如，作爲抗原結合結構域與 FcRn 結合結構域結合之分子的例子，可列舉抗體。抗體可包含單一之單株抗體(包含激動劑及拮抗劑抗體)、人類抗體、人類化抗體、嵌合體抗體等。又，作爲抗體之片段來使用的情況時，可適合列舉抗原結合結構域及抗原結合片段(例如，Fab、F(ab')2、scFv 及 Fv)。本發明之抗原結合分子，亦可包含

使用既存之安定的 α/β 桶狀(barrel)蛋白質構造等之立體構造作爲支架(scaffold)，且僅有其一部分之構造爲了抗原結合結構域之構築而被分子庫化之支架分子。

本說明書中，「抗原結合結構域」只要與作爲目標的抗原結合，何種構造之結構域均可使用。如此之結構域之例子，可列舉例如：抗體之重鏈及輕鏈的可變區域、生體內存在之細胞膜蛋白之 Avimer 中所含之 35 胺基酸左右稱爲 A 結構域之模組(WO2004044011、WO2005040229)、包含表現於細胞膜之糖蛋白質的纖連蛋白(fibronectin)中與蛋白質結合的結構域之 10Fn3 結構域的 Adnectin (WO2002032925)、以構成由蛋白質 A(protein A)之 58 胺基酸所成之 3 個螺旋之束(bundle)之 IgG 結合結構域爲支架之 Affibody(WO1995001937)、具有包含 33 個胺基酸殘基之轉彎(turn)與 2 個逆並行螺旋及圈環(loop)之次單位重複堆積之構造的錨蛋白重複(ankyrin repeat: AR)的露出於分子表面的區域之 DARPins(Designed Ankyrin Repeat proteins)(WO2002020565)、支持嗜中性球明膠酶相關脂質運載蛋白(neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL))等之脂質運載蛋白分子中被高度保留的 8 個逆並行股於中央方向扭轉之桶狀構造的單側之 4 個圈環區域之 Anticalin 等(WO2003029462)、作爲八目鰻、盲鰻等無頷類之獲得免疫系統而不具有免疫球蛋白之構造的可變性淋巴球受體(variable lymphocyte receptor(VLR))之富含白胺酸殘基之重複(leucine-rich-repeat(LRR))模組進行重複堆積之

馬蹄形構造之內部的並行型片狀構造之凹陷區域(WO2008016854)。本發明之抗原結合結構域的適合例子，可列舉包含抗體之重鏈及輕鏈可變區域之抗原結合結構域。

本說明書中，「抗體」係指天然者或藉由部分或完全合成而製造之免疫球蛋白。抗體可由其天然存在之血漿或血清等天然資源或產生抗體之融合瘤細胞的培養上清液中單離、或藉由使用基因重組等手法部分或完全合成。抗體之例子可適合列舉免疫球蛋白之同型(isotype)及該等之同型的次類型(subclass)。人類之免疫球蛋白，已知有IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgM之 9 種類型(同型)。本發明之抗體可包含該等之同型當中的 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。作爲人類 IgG1、人類 IgG2、人類 IgG3、人類 IgG4 恆定區域，基因多型所致之複數異型(allotype)序列記載於 Sequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No. 91-3242，然本發明中，其任意者均可。特別是人類 IgG1 之序列，以EU 編號表示之 356-358 位織胺基酸序列可爲 DEL 亦可爲EEM。人類 IgK(Kappa)恆定區域與人類 IgL7(Lambda)恆定區域，基因多型所致之複數異型序列記載於 Sequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No. 91-3242，然本發明中，其任意者均可。製造具有所期望之結合活性之抗體之方法爲所屬技術領域中具有通常知識者所公知。

抗體可使用公知之手段作爲多株或單株抗體來取得。單株抗體可適合製造來自哺乳動物之單株抗體。來自哺乳動物之單株抗體，係包含藉由融合瘤所產生者、及藉由用基因步驟手法以含有抗體基因之表現載體轉形之宿主細胞所產生者等。

產生單株抗體之融合瘤，可藉由使用公知技術來製造。亦即，藉由致敏抗原，遵照通常之免疫方法來對哺乳動物誘發免疫。所得之免疫細胞係藉由通常之細胞融合法來與公知之親細胞融合。接著，藉由通常之篩選法，篩選單株之抗體產生細胞，藉此可選擇會產生對該致敏抗原之抗體的融合瘤。

以該致敏抗原誘發免疫之哺乳動物，雖不限定特定的動物，但較佳爲考慮與細胞融合所使用之親細胞的適合性來選擇。一般而言，係適合使用嚙齒類動物，例如小鼠、大鼠、倉鼠；或兔子、猿猴等。

遵照公知之方法，上述動物係藉由致敏抗原來誘發免疫。例如，作爲一般的方法，致敏抗原係藉由對哺乳動物之腹腔內或皮下來注射而投與，藉以實施免疫。具體而言，以 PBS(Phosphate-Buffered Saline)或生理食鹽水等以適當之稀釋倍率來稀釋的致敏抗原，係依期望與通常的佐劑、例如佛朗氏(Freund's)完全佐劑混合，而被乳化後，每 4 至 21 日對哺乳動物投與該致敏抗原數次。又，在致敏抗原之誘發免疫時可使用適當的載劑。特別是使用分子量小之部分胜肽作爲致敏抗原時，亦有時會期望將與白蛋

白、鑰孔笠貝血青素(keyhole limpet hemocyanin)等之載劑蛋白質結合之該致敏抗原胜肽誘發免疫。

又，產生對所期望之多肽的抗體之融合瘤，亦可使用DNA 免疫，如以下之方式來製造。DNA 免疫，係指在以能夠在免疫動物中表現編碼抗原蛋白質之基因的態樣所構築之載體 DNA 被投與之該免疫動物中，藉由使致敏抗原在該免疫動物之生體內表現，而給予免疫刺激之免疫方法。相較於對免疫動物投與蛋白質抗原之一般的免疫方法，DNA 免疫被期待有如下的優越性。

-抗原爲膜蛋白質時，可維持其構造而給予免疫刺激

-無純化免疫抗原之必要

作爲與前述免疫細胞融合之細胞，係使用哺乳動物之骨髓瘤細胞。骨髓瘤細胞較佳爲具備用以篩選之適當的選擇標記。選擇標記係指在特定之培養條件下可生存(或無法生存)的生物性質。選擇標記中，公知者爲次黃嘌呤-鳥嘌呤-磷酸核糖轉移酶缺損(以下省略爲 HGPRT 缺損)、或胸苷激酶缺損(以下省略爲 TK 缺損)等。具有 HGPRT 或 TK 缺損之細胞，係具有次黃嘌呤-胺喋呤-胸苷感受性(以下省略爲 HAT 感受性)。HAT 感受性之細胞在 HAT 選擇性培養基中無法進行 DNA 合成而死滅，但與正常細胞融合時，則可利用正常細胞之補救路徑(salvage pathway)來繼續 DNA 之合成，因此在 HAT 選擇性培養基中亦會增殖。

HGPRT 缺損或 TK 缺損之細胞，可分別以含有 6 硫鳥嘌呤、8 氮鳥嘌呤(以下省略爲 8AG)、或 5'溴去氧尿苷之

培養基來選擇。將該等之嘧啶類似物導入 DNA 中之正常的細胞會死滅。另一方面，不導入該等嘧啶類似物之缺損該等酵素之細胞，可在選擇性培養基中生存。此外，稱爲 G418 耐受性之選擇標記，因新黴素耐受性基因而賦予對 2-去氧鏈黴胺系抗生素(健他黴素類似體)之耐受性。細胞融合所適合之各種骨髓瘤細胞係爲公知。

作爲如此之骨髓瘤細胞，例如可適合使用 P3(P3x63Ag8.653) (J. Immunol.(1979) 123(4), 1548-1550)、P3x63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology(1978)81, 1-7)、NS-1(C. Eur. J. Immunol.(1976)6(7), 511-519)、MPC-11(Cell(1976) 8(3), 405-415)、SP2/0(Nature(1978) 276(5685), 269-270)、FO(J.Immunol. Methods(1980) 35(1-2), 1-21)、S194/5.XX0.BU.1 (J. Exp. Med.(1978) 148(1), 313-323)、R210(Nature(1979) 277(5692), 131-133)等。

基本而言係根據公知之方法，例如 Galfrè 與 Milstein 等之方法(Methods Enzymol.(1981)73, 3-46)等，進行前述免疫細胞與骨髓瘤細胞之細胞融合。

更具體而言，例如可在細胞融合促進劑之存在下，於通常之營養培養液中，實施前述細胞融合。融合促進劑係使用例如聚乙二醇(PEG)、仙台病毒(HVJ)等，爲了進一步提高融合效率，依期望而添加二甲亞碸等輔助劑來使用。

免疫細胞與骨髓瘤細胞之使用比例可任意設定。例如，相對於骨髓瘤細胞，免疫細胞較佳爲 1 至 10 倍。前述細胞融合所用之培養液，係使用例如適合前述骨髓瘤細

胞株之增殖的 RPMI1640 培養液、MEM 培養液、其他之此種細胞培養所用之通常的培養液，可進一步適宜添加胎牛血清(FCS)等之血清補液。

細胞融合係使指定量的前述免疫細胞與骨髓瘤細胞在前述培養液中充分混合，以通常 30 至 60%(w/v)之濃度添加預先加溫至 37℃左右的 PEG 溶液(例如平均分子量 1000 至 6000 左右)。藉由使混合液和緩地混合，形成所期望之融合細胞(融合瘤)。接著，逐次添加上述列舉之適當的培養液，藉由重複離心以去除上清液的操作，可去除對融合瘤之成長不佳之細胞融合劑等。

如此方式所得之融合瘤，可藉由通常之選擇性培養液、例如 HAT 培養液(含有次黃嘌呤、胺喋呤及胸苷之培養液)培養而選擇。使用上述 HAT 培養液之培養，可持續用以使所期望之融合瘤以外的細胞(非融合細胞)死滅所充分的時間(通常該充分的時間爲數日至數週)。接著，藉由通常之極限稀釋法，來實施產生所期望之抗體的融合瘤之篩選及單一選殖。

如此方式所得到之融合瘤，可藉由利用因應了細胞融合所用之骨髓瘤所具有之選擇標記的選擇性培養液來選擇。例如具有 HGPRT 或 TK 之缺損的細胞，可藉由以 HAT 培養液(含有次黃嘌呤、胺喋呤及胸苷之培養液)培養而選擇。亦即，將 HAT 感受性之骨髓瘤細胞使用於細胞融合時，成功地與正常細胞進行細胞融合之細胞可在 HAT 培養液中選擇性地增殖。使用了上述 HAT 培養液的培

養，係持續用以使所期望之融合瘤以外的細胞(非融合細胞)死滅所需之充分的時間。具體而言，一般來說，可藉由數日至數週之培養，來選擇所期望之融合瘤。接著，可藉由通常之極限稀釋法，來實施產生所期望之抗體之融合瘤的篩選及單一選殖。

所期望之抗體之篩選及單一選殖，可藉由基於公知之抗原抗體反應的篩選方法來適當地實施。如此之單株抗體，可藉由例如 FACS(fluorescence activated cell sorting)來篩選。FACS，係能夠以雷射光解析與螢光抗體接觸之細胞，並測定個別細胞所發出之螢光，藉以測定抗體對細胞表面之結合的系統。

或者，抗體對經固定化之抗原的結合活性可基於 ELISA 之原理做評估。例如，抗原係被固定化於 ELISA 盤之孔。使融合瘤之培養上清液與孔內之抗原接觸，而檢測與抗原結合之抗體。單株抗體來自小鼠時，與抗原結合之抗體可藉由抗小鼠免疫球蛋白抗體來檢測。藉由該等篩選而選擇之產生具有對抗原之結合能力的所期望之抗體之融合瘤，可藉由極限稀釋法等來選殖。產生以如此方式所製造之單株抗體的融合瘤，可在通常之培養液中進行繼代培養。又，該融合瘤可在液體氮中長期保存。

該融合瘤可遵照通常方法培養，且由其培養上清液中取得所期望之單株抗體。或者可將融合瘤對與其具有適合性之哺乳動物進行投與並使其增殖，由其腹水中取得單株抗體。前者之方法係適合得到高純度的抗體。

藉由從該融合瘤等之抗體產生細胞所選殖之抗體基因所編碼之抗體亦可適宜地利用。藉由將經選殖之抗體基因重組入適當之載體並導入宿主，藉由該基因所編碼之抗體會表現。用於抗體基因之單離、與對載體之導入、還有宿主細胞之轉形的方法，例如係已被 Vandamme 等人所確立(Eur.J. Biochem.(1990) 192(3), 767-775)。如下所述之重組抗體之製造方法亦爲公知。

例如，由產生目標抗體之融合瘤細胞中，取得編碼該抗體之可變區域(V 區域)的 cDNA。爲此，通常係首先由融合瘤中萃取全 RNA。用以由細胞萃取 mRNA 的方法，可利用例如如下之方法。

-胍超離心法(Biochemistry(1979) 18(24), 5294-5299)

-AGPC 法(Anal. Biochem.(1987) 162(1), 156-159)

經萃取之 mRNA，可使用 mRNA Purification Kit(GE Healthcare Bioscience)等來純化。或者如 QuickPrep mRNA Purification Kit(GE Healthcare Bioscience)等之用以由細胞直接萃取全 mRNA 之套組亦有市售。使用如此之套組，可由融合瘤取得 mRNA。可由所得之 mRNA 使用反轉錄酵素來合成編碼抗體 V 區域之 cDNA。CDNA 可藉由 AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit(生化學工業社)等來合成。又，爲了合成及放大 cDNA，可適當地利用使用了 SMART RACE cDNA 放大套組(Clontech)及 PCR 之 5'-RACE 法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85 (23), 8998-9002、Nucleic Acids Res. (1989) 17 (8),

2919-2932)。可進一步地在合成此 cDNA 之過程中，於 cDNA 之兩末端導入後述之適當的限制酵素位置。

由所得之 PCR 產物中純化作爲目標的 cDNA 片段，接著與載體 DNA 連結。如此地來製造重組載體，導入於大腸菌等，選擇菌落後，可由形成該菌落之大腸菌中調製所期望之重組載體。此外，關於該重組載體是否具有作爲目標之 cDNA 的鹼基序列，係藉由公知方法，例如二去氧核苷酸連鎖終止法等來確認。

爲了取得編碼可變區域之基因，簡便者爲利用使用了可變區域基因放大用之引子的 5'-RACE 法。首先以由融合瘤細胞萃取之 RNA 作爲模板來合成 cDNA，得到 5'-RACE cDNA 庫。5'-RACE cDNA 庫之合成可適合使用 SMART RACE cDNA 放大套組等市售之套組。

以所得之 5'-RACE cDNA 庫作爲模板，藉由 PCR 法來放大抗體基因。可基於公知之抗體基因序列來設計小鼠抗體基因放大用引子。該等引子，係隨著免疫球蛋白之次類型而不同的鹼基序列。因此，次類型較佳爲預先使用 Iso Strip 小鼠單株抗體同型決定(isotyping)套組(Roche Diagnostics)等之市售套組來決定。

具體而言，例如以取得編碼小鼠 IgG 之基因爲目的時，作爲重鏈可利用可放大編碼 γ1、γ2a、γ2b、γ3 之基因的引子；作爲輕鏈可利用可放大編碼 κ 鏈與 λ 鏈之基因的引子。爲了放大 IgG 之可變區域基因，一般 3'側之引子係利用黏著於相當於接近可變區域之恆定區域的部分之引

子。另一方面 5'側之引子係利用 5' RACE cDNA 庫製作套組所附屬之引子。

利用經如此放大之 PCR 產物，能夠再構成由重鏈與輕鏈組合而成的免疫球蛋白。以經過再構成之免疫球蛋白之對抗原的結合活性作爲指標，可篩選所期望之抗體。例如以取得對抗原之抗體爲目的時，抗體對抗原之結合，更佳爲具特異性。與抗原結合之抗體，可例如以如下方式來篩選；

(1)使含有以自融合瘤所得之 cDNA 編碼的 V 區域之抗體與抗原接觸之步驟、

(2)檢測抗原與抗體之結合的步驟、及

(3)選擇與抗原結合之抗體的步驟。

檢測抗體與抗原之結合的方法爲公知。具體而言，可藉由之前敘述過的 FACS 或 ELISA 等手法，來檢測抗體與抗原之結合。

得到編碼作爲目標之抗體的 V 區域之 cDNA 後，藉由認識插入於該 cDNA 之兩末端的限制酵素位置之限制酵素，來消化該 cDNA。較佳的限制酵素係認識而消化於構成抗體基因之鹼基序列中出現頻率低之鹼基序列。爲了進一步將 1 複本之消化片段以對載體正確的方向插入，較佳爲插入賦予黏性末端之限制酵素。藉由將編碼經上述方式消化之抗體的 V 區域之 cDNA 插入適當的表現載體，可取得抗體表現載體。此時，若編碼抗體恆定區域(C 區域)之基因、與編碼前述 V 區域之基因係融合爲同一讀框(in-

frame)，則可取得嵌合體抗體。此處，嵌合體抗體意指恆定區域與可變區域之來源相異。因此，除了小鼠-人類等之異種嵌合體抗體之外，人類-人類同種嵌合體抗體亦包含在本發明之嵌合體抗體中。藉由預先於具有恆定區域之表現載體中插入前述 V 區域基因，可構築嵌合體抗體表現載體。具體而言，例如，於保持有編碼所期望之抗體恆定區域(C 區域)之 DNA 的表現載體 5'側，可適當地配置消化前述 V 區域基因之限制酵素的限制酵素認識序列。藉由使以同樣組合之限制酵素消化之兩者融合爲同一讀框，來構築嵌合體抗體表現載體。

爲了製造所期望之抗體，抗體基因係與控制序列連結而成爲能夠作用，以接入表現載體。用以表現抗體之控制序列，係含有例如促進子(enhancer)或啓動子(promoter)。又，可於胺基末端附加適當的訊息序列，使表現的抗體分泌至細胞外。例如，作爲訊息序列可使用具有胺基酸序列 MGWSCIILFLVATATGVHS(序列編號：13)之胜肽，但此外亦可附加適合的訊息序列。經表現之多肽係在上述序列之羧基末端部分切斷，經切斷之多肽可作爲成熟多肽而分泌至細胞外。接著，藉由以此表現載體對適當之宿主細胞轉形，可取得表現編碼所期望之抗體的 DNA 之重組細胞。

爲了表現抗體基因，編碼抗體之重鏈(H 鏈)及輕鏈(L 鏈)的 DNA，係分別接入不同的表現載體。藉由接入有重鏈與輕鏈之載體，對相同宿主細胞同時轉形(co-transfect)，可表現具備重鏈與輕鏈之抗體分子。或可藉由使編碼重鏈

及輕鏈之 DNA 接入單一之表現載體，使宿主細胞轉形(參照 WO19994011523)。

用以藉由將經單離之抗體基因導入適當的宿主而製造抗體之宿主細胞與表現載體之多數組合已爲公知。該等表現系統，均可應用於單離本發明之抗原結合分子。使用真核細胞作爲宿主細胞時，可適當使用動物細胞、植物細胞、或真菌細胞。具體而言，作爲動物細胞可舉例如下之細胞。

(1)哺乳類細胞、：CHO(Chinese hamster ovary cell line)、COS(Monkey kidney cell line)、骨髓瘤(Sp2/O、NS0 等)、BHK(baby hamster kidney cell line)、HEK293 (human embryonic kidney cell line with sheared adenovirus (Ad)5 DNA)、PER.C6 cell(human embryonic retinal cell line transformed with the Adenovirus Type 5(Ad5)E1A and E1B genes)、Hela、Vero 等(Current Protocols in Protein Science(May, 2001, Unit 5.9, Table 5.9.1))

(2)兩生類細胞：非洲爪蟾卵母細胞等

(3)昆蟲細胞：sf9、sf21、Tn5 等

或者，作爲植物細胞，來自菸草(Nicotiana tabacum)等之菸草(Nicotiana)屬之細胞的抗體基因表現系統爲公知。植物細胞之轉形，可適當地利用經癒傷組織培養之細胞。

進一步地，作爲真菌細胞。可利用如下之細胞。

-酵母：啤酒酵母(Saccharomyces serevisiae)等之酵母菌

(Saccharomyces)屬、甲醇利用酵母(Pichia pastoris)等之Pichia屬

-絲狀菌：黑麴菌(Aspergillus niger)等之麴菌(Aspergillus)屬

又，利用了原核細胞之抗體基因的表現系統亦爲公知。例如，使用細菌細胞時，可適當利用大腸菌(E. coli)、枯草菌等之細菌細胞。藉由轉形而導入包含作爲目標之抗體基因之表現載體於該等細胞中。藉由將經轉形之細胞在in vitro培養，可由該轉形細胞之培養物中取得所期望之抗體。

重組抗體之產生，在上述宿主細胞之外，亦可利用基因轉殖動物。亦即可由經導入編碼所期望之抗體的基因之動物中得到該抗體。例如，可於編碼乳汁中固有而產生之蛋白質的基因內部插入爲同一讀框而作爲融合基因來構築抗體基因。作爲分泌於乳汁中之蛋白質，例如可利用山羊β酪蛋白等。包含經插入抗體基因之融合基因的DNA片段被注入山羊之胚，該經注入之胚係被導入雌之山羊。由自接受胚之山羊所產生之基因轉殖山羊(或其子孫)所產生的乳汁中，可作爲與乳汁蛋白質之融合蛋白質而取得所期望之抗體。又，爲了增加含有由基因轉殖山羊所產生之所期望之抗體的乳汁量，可對基因轉殖山羊投與激素(Bio/Technology(1994), 12(7), 699-702)。

當對人類投與本說明書中所記載之抗原結合分子時，作爲該分子中之抗原結合結構域，可適當地採用以使對人類之異種抗原性降低等爲目的，而來自經人爲改變之基因

重組型抗體的抗原結合結構域。基因重組型抗體係包含例如人類化(Humanized)抗體等。該等之改變抗體，可使用公知之方法適當地製造。

用於製造本說明書中所記載之抗原結合分子中的抗原結合結構域的抗體之可變區域，通常係以夾在 4 個框架區域(FR)當中之 3 個互補性決定區域(complementarity-determining region; CDR)所構成。CDR 係爲實質上決定抗體之結合特異性的區域。CDR 之胺基酸序列富有多樣性。另一方面，構成 FR 之胺基酸序列，在具有不同之結合特異性的抗體之間，亦常顯示高度的同一性。因此，一般而言，藉由CDR之移植，可將某抗體之結合特異性移植到其他抗體。

人類化抗體亦稱爲再構成(reshaped)人類抗體。具體而言，將人類以外之動物、例如小鼠抗體之 CDR 移植到人類抗體之人類化抗體等係爲公知。亦已知用以得到人類化抗體之一般的基因重組手法。具體而言，作爲用以將小鼠之抗體 CDR 移植至人類 FR 之方法，例如重疊·伸長(Overlap Extension)PCR 係爲公知。Overlap Extension PCR 中，係於用以合成人類抗體之 FR 的引子，附加編碼欲移植之小鼠抗體 CDR 的鹼基序列。準備各別 4 個 FR 之引子。一般而言，於將小鼠 CDR 對人類 FR 之移植當中，選擇與小鼠 FR 同一性高之人類 FR，係於 CDR 之功能維持上有利。亦即，一般而言，較佳爲利用由與鄰接於欲移植之小鼠 CDR 的 FR 胺基酸序列同一性高的胺基酸序列所構成之人類 FR。

又，所連結之鹼基序列，係設計爲互以同一讀框連接。藉由各引子而個別地合成人類 FR。結果，可得到於各 FR 附加有編碼小鼠 CDR 之 DNA 的產物。編碼各產物之小鼠 CDR 的鹼基序列，係設計爲互相重疊。接著，使以人類抗體基因爲模板而合成之產物所重疊的 CDR 部分互相黏著，進行互補鏈合成反應。藉由此反應，人類 FR 會透過小鼠 CDR 之序列而連結。

最終連結有 3 個 CDR 與 4 個 FR 之 V 區域基因，係藉由於其 5'末端與 3'末端黏著而附加適當的限制酵素認識序列之引子而放大其全長。藉由插入於表現載體中而使如上述方式得到之 DNA 與編碼人類抗體 C 區域之 DNA 融合爲同一讀框，可製成人類型抗體表現用載體。將該重組載體導入宿主以建立重組細胞後，培養該重組細胞，使編碼該人類化抗體之 DNA 表現，藉以於該培養細胞之培養物中產生該人類化抗體(EP239400、WO1996002576)。

定性或定量地測定如上述方式製造之人類化抗體之對抗原的結合活性並評估，藉以適當地選擇透過 CDR 連結時該 CDR 會形成良好的抗原結合部位之人類抗體 FR。亦可依照需要，取代 FR 之胺基酸殘基，使得再構成人類抗體之 CDR 形成適當的抗原結合部位。例如，可應用使用了小鼠 CDR 對人類 FR 之移植所用的 PCR 法，來於 FR 導入胺基酸序列之變異。具體而言，可於黏著於 FR 的引子中導入部分鹼基序列之變異。於藉由如此引子而合成之 FR 導入鹼基序列之變異。藉由以上述方法測定並評估經

取代胺基酸之變異型抗體對抗原之結合活性，可選擇具有所期望之性質之變異 FR 序列(Sato 等人(Cancer Res (1993) 53, 851-856)。

又，能夠以具有人類抗體基因之全部基因譜(repertoire)的基因轉殖動物(WO1993012227、WO1992003918、WO1994002602、WO1994025585、WO1996034096、WO1996033735參照)作爲免疫動物，藉由 DNA 免疫來取得所期望之人類抗體。

進一步地，亦已知使用人類抗體庫，藉由篩選(panning)來取得人類抗體之技術。例如，藉由噬菌體展示法，將人類抗體之 V 區域作爲單鏈抗體(scFv)表現於噬菌體之表面。可選擇表現與抗原結合之 scFv 的噬菌體。藉由解析經選擇之噬菌體的基因，可決定編碼與抗原結合之人類抗體的 V 區域之 DNA 序列。決定與抗原結合之 scFv 的 DNA 序列後，將該 V 區域序列與所期望之人類抗體 C 區域序列融合爲同一讀框後，藉由插入適當的表現載體，可製造表現載體。將該表現載體導入上述列舉之適合的表現細胞中，藉由表現編碼該人類抗體之基因，來取得該人類抗體。該等之方法係已公知(參照 WO1992001047、WO1992020791、WO1993006213、WO1993011236、WO1993019172、WO1995001438、WO1995015388)。

本說明書中之「抗原結合結構域」，係指與抗原之一部分或全部特異性結合且互補之區域。作爲抗原結合結構域之例子，可列舉具有抗體之抗原結合結構域的結構域。

作爲抗體之抗原結合結構域的例子，可列舉 CDR 或可變區域。抗體之抗原結合結構域爲 CDR 的情況時，可包含抗體中所含之 6 個 CDR 全部、亦可包含 1 個或 2 個以上之 CDR。抗體之結合區域包含 CDR 的情況時，只要具有對抗原之結合活性，所包含之 CDR 中可進行胺基酸之缺失、取代、附加及/或插入等，亦可使用之 CDR 之一部分。抗原之分子量大的情況時，抗體可僅與抗原之特定部分結合。該特定部分稱爲抗原決定部位(epitope)。抗原結合結構域可由一或複數個抗體之可變結構域來提供。較佳爲抗原結合結構域包含抗體輕鏈可變區域(VL)與抗體重鏈可變區域(VH)。作爲如此之抗原結合結構域的例子，可適合列舉「scFv(single chainFv)」、「單鏈抗體(single chain antibody)」、「Fv」、「scFv2(single chain Fv2)」、「Fab」、「雙鏈抗體(diabody)」、「線狀抗體」或「F(ab')2」等。

如本說明書中使用的「抗體可變區域」，係指包含互補性決定區域(CDR；亦即、CDR1、CDR2 及 CDR3)以及框架區域(FR)之胺基酸序列之抗體分子的輕鏈及重鏈部分。VH 係指重鏈之可變區域(Heavy chain variable region)。VL 係指輕鏈之可變區域(Light chain variable region)。依照本發明中所使用之方法，分配爲 CDR 與 FR 之胺基酸位置係遵照 Kabat 來規定(Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institute of Health, Bethesda, Md., 1987 年及 1991 年)。本說明書中，抗體或抗原結合片段之胺基酸編號亦以根據 Kabat 之胺基酸位置

的 Kabat 編號來表示。

如本說明書中使用的用語「互補性決定區域(CDR；亦即、CDR1、CDR2 及 CDR3)」係指有必要爲了抗原結合而存在之抗體可變區域的胺基酸殘基。各可變區域一般係包含標示爲 CDR1、CDR2 及 CDR3 之 3 個 CDR 區域。各互補性決定區域可包含由如 Kabat 記載之「互補性決定區域」的胺基酸殘基(亦即、輕鏈可變區域之殘基約 24～34(CDR1)、50～56(CDR2)、及 89～97(CDR3)以及重鏈可變區域之 31～35(CDR1)、50～65(CDR2)及 95～102(CDR3); Kabat 等人、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第 5 版、Public Health Service、National Institute of Health、Bethesda、MD.(1991))、及/或由「超可變圈環」之殘基(亦即、輕鏈可變區域之殘基約 26～32(CDR1)、50～52(CDR2)及 91～96(CDR3)以及重鏈可變區域之 26～32(CDR1)，53～55(CDR2)及 96～101(CDR3); Chothia 及 Lesk、J. Mol. Biol. (1987)196, 901-917)。在有的情況下，互補性決定區域可包含由以 Kabat 之記載所定義之 CDR 區域及超可變圈環之兩者的胺基酸。

用語「Fab」片段係包含輕鏈之可變及恆定區域與重鏈之可變區域及第 1 恆定區域(CH1)。F(ab')2 抗體片段係包含一對 Fab 片段，通常該等係藉由其間之絞鏈(hinge)區域中的半胱胺酸，於其羧基末端附近以共價鍵來連結。抗體片段之其他化學鍵結亦爲本發明所屬技術領域所公知。

用語「單鏈 Fv」或「scFv」抗體片段係包含抗體之

VH及VL區域，該等區域係形成單一之多肽鏈。通常，Fv多肽係於VH及VL區域之間進一步包含多肽連結子(linker)，此連結子可使得scFv對於抗原結合形成期望之構造。scFv之總論係記載於例如Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies (1994) Vol. 113, 269-315(Rosenburg and Moore編、Springer-Verlag, New York)等。

用語「雙鏈抗體(diabody)」係指具備2個抗原結合部位之小抗體片段，此抗體片段係包括在相同多肽鏈(VH及VL)內連結於輕鏈可變區域(VL)之重鏈可變區域(VH)。其係於相同鏈上之2個區域之間的對合，使用極短之連結子，將此區域與其他鏈之互補性區域強制地對合，形成2個抗原結合部位。雙鏈抗體，係於例如歐洲專利第404097號、WO1993011161等專利文獻或Holliger等人(Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90, 6444-6448)等非專利文獻中有詳細記載。

用語「線狀抗體」係指Zapata et al., Protein Eng. (1995) 8(10), 1057-1062中所記載之抗體。換言之，該等抗體係包含與互補性之輕鏈多肽一起形成一對抗原結合結構域之一對縱列(tandem)Fd區段(segment)(VH-CH1-VH-CH1)。線狀抗體可爲二重特異性或單一特異性。

抗原

本說明書中，「抗原」只要包含抗原結合結構域所結

合之抗原決定部位，其構造並不限定爲特定之構造。就另一意義上，抗原可爲無機物亦可爲有機物。作爲抗原可舉例如下述之分子；17-IA、4-1BB、4Dc、6-酮-PGF1a、8-異-PGF2a、8-側氧-dG、A1 腺苷受體、A33、ACE、ACE-2、活化素、活化素 A、活化素 AB、活化素 B、活化素 C、活化素 RIA、活化素 RIA ALK-2、活化素 RIB ALK-4、活化素 RIIA、活化素 RIIB、ADAM、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17/TACE、ADAM8、ADAM9、ADAMTS、ADAMTS4、ADAMTS5、位址素(addressin)、aFGF、ALCAM、ALK、ALK-1、ALK-7、α-1-抗胰蛋白酶、α-V/β-1 拮抗劑、ANG、Ang、APAF-1、APE、APJ、APP、APRIL、AR、ARC、ART、Artemin、抗 Id、ASPARTIC、心房性鈉利尿因子、av/b3 結合蛋白(integrin)、Axl、b2M、B7-1、B7-2、B7-H、B-淋巴球刺激因子(BlyS)、BACE、BACE-1、Bad、BAFF、BAFF-R、Bag-1、BAK、Bax、BCA-1、BCAM、Bcl、BCMA、BDNF、b-ECGF、bFGF、BID、Bik、BIM、BLC、BL-CAM、BLK、BMP、BMP-2 BMP-2a、BMP-3 成骨素(Osteogenin)、BMP-4 BMP-2b、BMP-5、BMP-6 Vgr-1、BMP-7(OP-1)、BMP-8(BMP-8a、OP-2)、BMPR、BMPR-IA(ALK-3)、BMPR-IB(ALK-6)、BRK-2、RPK-1、BMPR-II(BRK-3)、BMP、b-NGF、BOK、鈴蟾素、骨由來神經營養因子、BPDE、BPDE-DNA、BTC、補體因子 3(C3)、C3a、C4、C5、C5a、C10、CA125、CAD-8、抑鈣素、cAMP、癌胚胎抗原

(CEA)、癌相關抗原、細胞自溶酶 A、細胞自溶酶 B、細胞自溶酶 C/DPPI、細胞自溶酶 D、細胞自溶酶 E、細胞自溶酶 H、細胞自溶酶 L、細胞自溶酶 O、細胞自溶酶 S、細胞自溶酶 V、細胞自溶酶 X/Z/P、CBL、CCI、CCK2、CCL、CCL1、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL2、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、CCL3、CCL4、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9/10、CCR、CCR1、CCR10、CCR10、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CD1、CD2、CD3、CD3E、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD13、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD27L、CD28、CD29、CD30、CD30L、CD32、CD33(p67 蛋白質)、CD34、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD49a、CD52、CD54、CD55、CD56、CD61、CD64、CD66e、CD74、CD80(B7-1)、CD89、CD95、CD123、CD137、CD138、CD140a、CD146、CD147、CD148、CD152、CD164、CEACAM5、CFTR、cGMP、CINC、肉毒桿菌毒素、維耳西菌毒素、CKb8-1、CLC、CMV、CMV UL、CNTF、CNTN-1、COX、C-Ret、CRG-2、CT-1、CTACK、CTGF、CTLA-4、CX3CL1、CX3CR1、CXCL、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、

CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCR、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、細胞角質蛋白腫瘤相關抗原、DAN、DCC、DcR3、DC-SIGN、補體控制因子(Decay accelerating factor)、des(1-3)-IGF-I(腦 IGF-1)、Dhh、地谷新(digoxin)、DNAM-1、Dnase、Dpp、DPPIV/CD26、Dtk、ECAD、EDA、EDA-A1、EDA-A2、EDAR、EGF、EGFR(ErbB-1)、EMA、EMMPRIN、ENA、內皮素受體、Enkephalinase、eNOS、Eot、趨化激素(eotaxin)1、EpCAM、肝配蛋白(ephrin)B2/EphB4、EPO、ERCC、E-選擇素、ET-1、因子 IIa、因子 VII、因子 VIIIc、因子 IX、線維芽細胞活性化蛋白質(FAP)、Fas、FcR1、FEN-1、鐵蛋白、FGF、FGF-19、FGF-2、FGF3、FGF-8、FGFR、FGFR-3、纖維蛋白、FL、FLIP、Flt-3、Flt-4、卵胞刺激激素、趨化因子(fractalkine)、FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、FZD10、G250、Gas6、GCP-2、GCSF、GD2、GD3、GDF、GDF-1、GDF-3(Vgr-2)、GDF-5(BMP-14、CDMP-1)、GDF-6(BMP-13、CDMP-2)、GDF-7(BMP-12、CDMP-3)、GDF-8(肌肉生長抑制素)、GDF-9、GDF-15(MIC-1)、GDNF、GDNF、GFAP、GFRa-1、GFR-α1、GFR-α2、GFR-α3、GITR、升糖素、Glut4、糖蛋白質 IIb/IIIa(GPIIb/IIIa)、GM-CSF、gp130、gp72、GRO、成長激素放出因子、半抗原(NP-cap 或 NIP-cap)、HB-EGF、HCC、HCMV gB 外膜糖蛋白質、HCMV gH

外膜糖蛋白質、HCMV UL、造血成長因子(HGF)、Hep B gp120、Heparanase、Her2、Her2/neu (ErbB-2)、Her3(ErbB-3)、Her4(ErbB-4)、單純皰疹病毒(HSV)gB 糖蛋白質、HSV gD 糖蛋白質、HGFA、高分子量黑色素瘤相關抗原(HMW-MAA)、HIV gp120、HIV IIIB gp 120 V3 圈環、HLA、HLA-DR、HM1.24、HMFG PEM、HRG、Hrk、人類心臟肌凝蛋白、人類巨細胞病毒(HCMV)、人類成長激素(HGH)、HVEM、I-309、IAP、ICAM、ICAM-1、ICAM-3、ICE、ICOS、IFNg、Ig、IgA 受體、IgE、IGF、IGF 結合蛋白質、IGF-1R、IGFBP、IGF-I、IGF-II、IL、IL-1、IL-1R、IL-2、IL-2R、IL-4、IL-4R、IL-5、IL-5R、IL-6、IL-6R、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-18R、IL-23、干擾素(INF)-α、INF-β、INF-γ、抑制素、iNOS、胰島素 A 鏈、胰島素 B 鏈、胰島素樣增殖因子 1、結合蛋白 α2、結合蛋白 α3、結合蛋白 α4、結合蛋白 α4/β1、結合蛋白 α4/β7、結合蛋白 α5(αV)、結合蛋白 α5/β1、結合蛋白 α5/β3、結合蛋白 α6、結合蛋白 β1、結合蛋白 β2、干擾素 γ、IP-10、I-TAC、JE、血管舒緩素(kallikrein)2、血管舒緩素 5、血管舒緩素 6、血管舒緩素 11、血管舒緩素 12、血管舒緩素 14、血管舒緩素 15、血管舒緩素 L1、血管舒緩素 L2、血管舒緩素 L3、血管舒緩素 L4、KC、KDR、角質細胞增殖因子(KGF)、基膜素 5、LAMP、LAP、LAP(TGF-1)、潛在的 TGF-1、潛在的 TGF-1 bp1、LBP、LDGF、LECT2、Lefty、路易士-Y 抗原、路易士-

Y 相關抗原、LFA-1、LFA-3、Lfo、LIF、LIGHT、脂蛋白質、LIX、LKN、Lptn、L-選擇素、LT-a、LT-b、LTB4、LTBP-1、肺表面、黃體形成激素、淋巴毒素 β 受體、Mac-1、MAdCAM、MAG、MAP2、MARC、MCAM、MCAM、MCK-2、MCP、M-CSF、MDC、Mer、METALLOPROTEASES、MGDF 受體、MGMT、MHC(HLA-DR)、MIF、MIG、MIP、MIP-1-α、MK、MMAC1、MMP、MMP-1、MMP-10、MMP-11、MMP-12、MMP-13、MMP-14、MMP-15、MMP-2、MMP-24、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、MPIF、Mpo、MSK、MSP、黏液素(Muc1)、MUC18、抗穆氏管激素、Mug、MuSK、NAIP、NAP、NCAD、N-鈣黏素、NCA 90、NCAM、NCAM、腦啡肽酶(Neprilysin)、神經營養因子-3、-4、或-6、Neurturin、神經成長因子(NGF)、NGFR、NGF-β、nNOS、NO、NOS、Npn、NRG-3、NT、NTN、OB、OGG1、OPG、OPN、OSM、OX40L、OX40R、p150、p95、PADPr、副甲狀腺激素、PARC、PARP、PBR、PBSF、PCAD、P-鈣黏素、PCNA、PDGF、PDGF、PDK-1、PECAM、PEM、PF4、PGE、PGF、PGI2、PGJ2、PIN、PLA2、胎盤性鹼性磷酸酶(PLAP)、PlGF、PLP、PP14、前胰島素、前鬆弛素、蛋白質 C、PS、PSA、PSCA、前列腺特異性膜抗原(PSMA)、PTEN、PTHrp、Ptk、PTN、R51、RANK、RANKL、RANTES、RANTES、鬆弛素 A 鏈、鬆弛素 B 鏈、腎活素、呼吸器多核體病毒(RSV)F、RSV Fgp、Ret、類風濕因子、RLIP76、RPA2、

RSK、S100、SCF/KL、SDF-1、SERINE、血清白蛋白、sFRP-3、Shh、SIGIRR、SK-1、SLAM、SLPI、SMAC、SMDF、SMOH、SOD、SPARC、Stat、STEAP、STEAP-II、TACE、TACI、TAG-72(腫瘤相關糖蛋白質-72)、TARC、TCA-3、T細胞受體(例如，T細胞受體α/β)、TdT、TECK、TEM1、TEM5、TEM7、TEM8、TERT、睪丸PLAP樣鹼性磷酸酶、TfR、TGF、TGF-α、TGF-β、TGF-β Pan Specific、TGF-βRI(ALK-5)、TGF-βRII、TGF-βRIIb、TGF-βRIII、TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3、TGF-β4、TGF-β5、凝血酶、胸腺Ck-1、甲狀腺刺激激素、Tie、TIMP、TIQ、組織因子、TMEFF2、Tmpo、TMPRSS2、TNF、TNF-α、TNF-αβ、TNF-β2、TNFc、TNF-RI、TNF-RII、TNFRSF10A(TRAIL R1 Apo-2、DR4)、TNFRSF10B(TRAIL R2 DR5、KILLER、TRICK-2A、TRICK-B)、TNFRSF10C(TRAIL R3 DcR1、LIT、TRID)、TNFRSF10D(TRAIL R4 DcR2、TRUNDD)、TNFRSF11A(RANK ODF R、TRANCER)、TNFRSF11B(OPG OCIF、TR1)、TNFRSF12 (TWEAK R FN14)、TNFRSF13B (TACI)、TNFRSF13C(BAFF R)、TNFRSF14 (HVEM ATAR、HveA、LIGHT R、TR2)、TNFRSF16(NGFR p75NTR)、TNFRSF17(BCMA)、TNFRSF18(GITR AITR)、TNFRSF19 (TROY TAJ、TRADE)、TNFRSF19L(RELT)、TNFRSF1A (TNF RI CD120a、p55-60)、TNFRSF1B(TNF RII CD120b、p75-80)、TNFRSF26(TNFRH3)、TNFRSF3(LTbR TNF RIII、TNFC R)、TNFRSF4(OX40 ACT35、TXGP1 R)、

TNFRSF5(CD40 p50)、TNFRSF6(Fas Apo-1、APT1、CD95)、TNFRSF6B(DcR3 M68、TR6)、TNFRSF7 (CD27)、TNFRSF8 (CD30)、TNFRSF9(4-1BB CD137、ILA)、TNFRSF21(DR6)、TNFRSF22 (DcTRAIL R2 TNFRH2)、TNFRST23(DcTRAIL R1 TNFRH1)、TNFRSF25(DR3 Apo-3、LARD、TR-3、TRAMP、WSL-1)、TNFSF10(TRAIL Apo-2 配位子、TL2)、TNFSF11 (TRANCE/RANK 配位子 ODF、OPG 配位子)、TNFSF12 (TWEAK Apo-3 配位子、DR3 配位子)、TNFSF13(APRIL TALL2)、TNFSF13B(BAFF BLYS、TALL1、THANK、TNFSF20)、TNFSF14 (LIGHT HVEM 配位子、LTg)、TNFSF15(TL1A/VEGI)、TNFSF18(GITR 配位子 AITR 配位子、TL6)、TNFSF1A (TNF-a 連接蛋白(Conectin)、DIF、TNFSF2)、TNFSF1B (TNF-b LTa、TNFSF1)、TNFSF3(LTb TNFC、p33)、TNFSF4(OX40 配位子 gp34、TXGP1)、TNFSF5(CD40 配位子 CD154、gp39、HIGM1、IMD3、TRAP)、TNFSF6(Fas 配位子 Apo-1 配位子、APT1 配位子)、TNFSF7(CD27 配位子 CD70)、TNFSF8(CD30 配位子 CD153)、TNFSF9(4-1BB 配位子 CD137 配位子)、TP-1、t-PA、Tpo、TRAIL、TRAIL R、TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRANCE、運鐵蛋白受體、TRF、Trk、TROP-2、TSG、TSLP、腫瘤相關抗原 CA125、腫瘤相關抗原表現路易士 Y 相關碳水化物、TWEAK、TXB2、Ung、uPAR、uPAR-1、尿激酶、VCAM、VCAM-1、VECAD、VE-Cadherin、VE-cadherin-2、VEFGR-1(flt-1)、VEGF、VEGFR、VEGFR-3(flt-4)、VEGI、VIM、病毒

抗原、VLA、VLA-1、VLA-4、VNR結合蛋白、溫韋伯氏因子、WIF-1、WNT1、WNT2、WNT2B/13、WNT3、WNT3A、WNT4、WNT5A、WNT5B、WNT6、WNT7A、WNT7B、WNT8A、WNT8B、WNT9A、WNT9A、WNT9B、WNT10A、WNT10B、WNT11、WNT16、XCL1、XCL2、XCR1、XCR1、XEDAR、XIAP、XPD、HMGB1、IgA、Aβ、CD81, CD97, CD98, DDR1, DKK1, EREG、Hsp90, IL-17/IL-17R、IL-20/IL-20R、氧化LDL, PCSK9, prekallikrein , RON, TMEM16F、SOD1, Chromogranin A, Chromogranin B、tau, VAP1、高分子激肽原、IL-31、IL-31R、Nav1.1、Nav1.2、Nav1.3、Nav1.4、Nav1.5、Nav1.6、Nav1.7、Nav1.8、Nav1.9、EPCR、C1, C1q, C1r, C1s, C2, C2a, C2b, C3, C3a, C3b, C4, C4a, C4b, C5, C5a, C5b, C6, C7, C8, C9、factor B, factor D, factor H, properdin、sclerostin、fibrinogen, fibrin, prothrombin, thrombin, 組織因子, factor V, factor Va, factor VII, factor VIIa, factor VIII, factor VIIIa, factor IX, factor IXa, factor X, factor Xa, factor XI, factor XIa, factor XII, factor XIIa, factor XIII, factor XIIIa, TFPI, antithrombin III, EPCR, 凝血調節素、TAPI, tPA, plasminogen, plasmin, PAI-1, PAI-2、GPC3、Syndecan-1、Syndecan-2、Syndecan-3、Syndecan-4、LPA、S1P、Acetylcholine receptor、AdipoR1、AdipoR2、ADP ribosyl cyclase-1、alpha-4/beta-7 integrin、alpha-5/beta-1 integrin、alpha-v/beta-6

integrin、alphavbetal integrin、Angiopoietin ligand-2、Angptl2、Anthrax、Cadherin、Carbonic anhydrase-IX、CD105、CD155、CD158a、CD37、CD49b、CD51、CD70、CD72、Claudin 18、Clostridium difficile toxin、CS1、Delta-like protein ligand 4、DHICA oxidase、Dickkopf-1 ligand、Dipeptidyl peptidase IV、EPOR、F protein of RSV、Factor Ia、FasL、Folate receptor alpha、Glucagon receptor、Glucagon-like peptide 1 receptor、Glutamate carboxypeptidase II、GMCSFR、Hepatitis C virus E2 glycoprotein、Hepcidin、IL-17 receptor、IL-22 receptor、IL-23 receptor、IL-3 receptor、Kit tyrosine kinase、Leucine Rich Alpha-2-Glycoprotein 1(LRG1)、Lysosphingolipid receptor、Membrane glycoprotein OX2、Mesothelin、MET、MICA、MUC-16、Myelin associated glycoprotein、Neuropilin-1、Neuropilin-2、Nogo receptor、PLXNA1、PLXNA2、PLXNA3、PLXNA4A、PLXNA4B、PLXNB1、PLXNB2、PLXNB3、PLXNC1、PLXND1、Programmed cell death ligand 1、Proprotein convertase PC9、P-selectin glycoprotein ligand-1、RAGE、Reticulon 4、RF、RON-8、SEMA3A、SEMA3B、SEMA3C、SEMA3D、SEMA3E、SEMA3F、SEMA3G、SEMA4A、SEMA4B、SEMA4C、SEMA4D、SEMA4F、SEMA4G、SEMA5A、SEMA5B、SEMA6A、SEMA6B、SEMA6C、SEMA6D、SEMA7A、Shiga like toxin II、Sphingosine-1-phosphate

receptor-1、ST2、Staphylococcal lipoteichoic acid、Tenascin、TG2、Thymic stromal lymphoprotein receptor、TNF superfamily receptor 12A、Transmembrane glycoprotein NMB、TREM-1、TREM-2、Trophoblast glycoprotein、TSH receptor、TTR、Tubulin、ULBP2 以及激素及成長因子之受體。其他，亦可舉例前述受體當中，於生體體液中不停留於細胞而以可溶型存在的分子。

意指存在於抗原中之抗原決定基的抗原決定部位，係意指本說明書所揭示之抗原結合分子中的抗原結合結構域所結合之抗原上的部位。因而，例如抗原決定部位可由其構造來定義。又，藉由認識該抗原決定部位之抗原結合分子中對抗原的結合活性亦可定義該抗原決定部位。抗原爲胜肽或多肽時，藉由構成抗原決定部位之胺基酸殘基亦可特定抗原決定部位。又，抗原決定部位爲糖鏈時，亦可藉由特定之糖鏈構造來特定抗原決定部位。

直線狀抗原決定部位，係包含認識胺基酸一次序列之抗原決定部位的抗原決定部位。直線狀抗原決定部位，典型而言，於固有序列中係包含至少 3 個及最普通爲至少 5、例如約 8 個至約 10 個、6 至 20 個之胺基酸。

立體構造抗原決定部位，與直線狀抗原決定部位相對地，包含抗原決定部位之胺基酸一次序列，並非爲被認識之抗原決定部位之單一規定成分的抗原決定部位(例如，胺基酸之一次序列並非一定係被規定抗原決定部位之抗體所認識之抗原決定部位)。立體構造抗原決定部位，亦可

能包含相對於直線狀抗原決定部位之數目更加多之數目的胺基酸。關於立體構造抗原決定部位之認識而言，抗體係認識胜肽或蛋白質之三次元構造。例如，蛋白質分子摺疊而形成三次元構造時，形成立體構造抗原決定部位之有的胺基酸及/或多肽主鏈係成爲並列，可使抗體認識抗原決定部位。決定抗原決定部位之立體構造的方法，雖包含例如 X 射線結晶學、二次元核磁共振分光學以及部位特異性自旋標示及電磁常磁性共振分光學，但不限定於該等。參照例如 Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology(1996)、第 66 卷、Morris(編)。

基因重組手法

用語「密碼子組」，意指用以編碼所期望之胺基酸之一組相異核苷酸三字密碼序列。一組寡核苷酸，係包含表示由密碼子組提供之核苷酸三字密碼的所有可能之組合的序列，且爲編碼所期望之胺基酸群的序列。如此之一組寡核苷酸，可藉由例如固相法來合成。標準的密碼子指定形式爲 IUB 編碼之形式，此編碼爲本技術領域所公知。密碼子組，一般以 3 個大寫字母，例如 NNK、NNS、DVK、DVD 等來表示。

IUB 編碼

G 鳥嘌呤

A 腺嘌呤

T 胸腺嘧啶

C 胞嘧啶

R(A 或 G)

Y(C 或 T)

M(A 或 C)

K(G 或 T)

S(C 或 G)

W(A 或 T)

H(A 或 C 或 T)

B(C 或 G 或 T)

V(A 或 C 或 G)

D(A 或 G 或 T)

N(A 或 C 或 G 或 T)

例如，密碼子組 DVK 中，D 爲核苷酸 A 或 G 或 T、V 爲 A 或 G 或 C、K 爲 G 或 T。此密碼子組係表示 18 個相異之密碼子，可編碼胺基酸 Ala、Trp、Tyr、Lys、Thr、Asn、Lys、Ser、Arg、Asp、Glu、Gly 及 Cys。

於特定之位置具有「簡併(degenerate)」核苷酸之寡核苷酸的設計方法在本發明所屬技術領域中爲公知。(例如，Garrard and Henner, Gene(1993)128, 103-109 等)。具有如此之某種密碼子組的寡核苷酸組，可使用市售之核酸合成劑(可由 Applied Biosystems, Foster City, CA 等獲得)來合成，或以市售品來獲得(例如，Life Technologies, Rockville, MD)。因此，具有特定之密碼子組的合成寡核

苷酸組，一般係包含相異序列之複數個寡核苷酸。又，作爲本發明之非限定的態樣，亦可包含例如有用於選殖之限制酵素部位。

「細胞」、「細胞系」及「細胞培養」，在本說明書中係作爲相同意義使用，此一稱呼可包含細胞系之全部子孫。如此地，例如「轉形體」及「轉形細胞」之用語，係包含與繼代數無關且來自該等之一次對象細胞及培養物。又，亦理解藉由故意或偶發的突變異，或有並非全部子孫中的 DNA 內容均正確地相同的情況。亦可包含具有如以當初之轉形細胞篩選者之實質相同功能或生物學的活性的變異體子孫。意圖以相異的稱呼來記載時，由該記載之前後關係即可明白如此之意圖。

述及編碼序列之表現時的用語「控制序列」，亦指用以表現於特定宿主生物中連結爲能夠作用之編碼序列所必要之 DNA 鹼基序列。例如原核生物中適合的控制序列，係包含啓動子、依情況之操作子序列、核糖體結合部位、及可能尚未充分理解之其他序列。真核細胞中爲了表現編碼序列，利用啓動子、聚腺苷酸化訊息及促進子者爲公知。

關於核酸之「連結爲能夠作用」意指該核酸與其他核酸序列處於功能上的關係。例如，前序列(presequence)或分泌前導(secretory leader)之 DNA，作爲某多肽分泌相關之前驅物蛋白質而表現時，係與該多肽之 DNA 結合爲能夠作動。啓動子或促進子當對有的編碼序列之轉錄有影響

時係與該序列連結爲能夠作用。或者，核糖體結合部當其位於轉譯容易的位置時，係與編碼序列連結爲能夠作用。通常、「連結爲能夠作用」意味著所結合之 DNA 序列係連續的，且分泌前導的情況時係連續地在讀取框內。但是，促進子並無連續的必要。連結係藉由在適當之限制部位接合(ligation)而達成。如此部位不存在時，合成寡核苷酸接頭(adaptor)或連結子係遵照以往的習慣來使用。又藉由前述之 Overlap Extension PCR 手法亦可製造經連結之核酸。

「接合」係爲 2 個核酸片段之間形成磷酸二酯鍵之方法。爲了接合 2 個片段，片段之末端必須互相適合。依情況不同，此末端在核酸內切酶消化後立即具有適合性。但是，爲了使適合接合，首先在核酸內切酶消化之後一般所形成之黏性末端必須變爲平滑末端。爲了成爲平滑末端，DNA 在適當之緩衝液中於 15℃處理至少 15 分鐘，在 4 個去氧核糖核苷酸三磷酸之存在下以 DNA 聚合酶 I 或 T4DNA 聚合酶之克列諾(Klenow)片段的約 10 單位處理。接著，將 DNA 以酚氯仿萃取與乙醇沈澱、或二氧化矽純化來純化。欲連結之 DNA 片段係以與溶液等莫耳量添加。於此溶液中添加 ATP、連接酶緩衝液，DNA 每 0.5 μg 含有約 10 單位之如 T4DNA 連接酶之連接酶。將 DNA 與載體連結的情況時，載體係藉由適當之限制核酸內切酶的消化作用，首先成爲線狀。將成爲線狀之片段接著以細菌之鹼性磷酸酶或胎牛腸管之磷酸酶處理，藉以預防接合步

驟之間該片段的自我接合。

用語「外殼蛋白質」係指蛋白質當中，至少其一部分存在於病毒粒子表面者。由功能上的觀點而言，外殼蛋白質係病毒於宿主細胞之構築過程中，與病毒粒子結合之任意蛋白質，其係維持與其結合直到病毒感染其他宿主細胞爲止。外殼蛋白質可爲主要之外殼蛋白質、亦可爲次要之外殼蛋白質。次要之外殼蛋白質，通常爲存在於病毒外殼之外殼蛋白質，較佳爲每 10 億存在至少約 5 個、更佳爲至少約 7 個、又更佳爲至少約 10 個或其以上之蛋白質複本(copy)。主要之外殼蛋白質，每 10 億可存在數十、數百或數千個複本。主要之外殼蛋白質的例子，可列舉纖維狀噬菌體之 p8 蛋白質。

特定之檢定中，某化學無機體、有機體、生物等物體之「檢測極限」，係指該檢定中檢測出比背景水準高之其物體最小限度的濃度。例如，噬菌體 ELISA 中，展現出特定抗原結合片段之特定噬菌體的「檢測極限」，意指特定噬菌體所生產之相較於由未展現其抗原結合片段之對照噬菌體所產生者更多之 ELISA 訊息的噬菌體濃度。

「噬菌體展示」係爲將變異體多肽作爲與噬菌體、例如與纖維狀噬菌體之粒子表面的外殼蛋白質之至少一部分融合之蛋白質而展現的手法。噬菌體展示之用處，係可由隨機化蛋白質變異體之大型分子庫中迅速且有效率地篩選與對象抗原以高親和性結合之序列。噬菌體上之胜肽及蛋白質分子庫的展現，以往即利用在用以篩選達數百

萬之多肽的特異性結合特性。多價噬菌體展示方法，以往即利用在用以透過與纖維狀噬菌體之基因 III 或基因 VIII 的融合以展現小的隨機胜肽及小蛋白質(Wells 及 Lowman(Curr.Opin.Struct.Biol.(1992)3, 355-362)與其中之引用文獻)。一價之噬菌體展示中，蛋白質或胜肽之分子庫係與基因 III 或其一部分融合，噬菌體粒子係在野生型基因 III 蛋白質之存在下以低水準表現，以展現融合蛋白質之 1 個或 0 個複本。總結合力效果相較於多價噬菌體係有降低，因此篩選係根據內在性之配位子親和性而使用噬粒載體，此載體係使 DNA 操作單純化(Lowman 及 Wells、Methods: A Companion to Methods in Enzymology(1991)3, 205-216)。

「噬粒」係具有細菌之複製起點、例如 Col E1 及噬菌體之基因間區域的複本之質體載體。噬粒亦可適當使用任何公知之噬菌體、例如纖維狀噬菌體及 λ 型噬菌體。質體通常亦包含抗生素耐受性之選擇標記。經選殖於該等載體之 DNA 片段，可作爲質體來增殖。經導入該等載體之細胞具備用以生產噬菌體粒子所必要之所有基因時，質體之複製樣式係變爲滾圓(rolling circle)複製，而生成質體 DNA 之 1 條鏈的複本與包裝之噬菌體粒子。噬粒可形成感染性或非感染性噬菌體粒子。此用語係作爲使異種多肽展現於噬菌體粒子表面的方式之基因融合，而包括與此異種多肽基因結合之噬菌體外殼蛋白質基因、或包含其片段之噬粒。

用語「噬菌體載體」，意指含有異種基因而可複製之噬菌體的雙鏈複製型。噬菌體載體，係具有可複製噬菌體及形成噬菌體粒子之噬菌體複製起點。噬菌體較佳爲纖維狀噬菌體、例如 M13、f1、fd、Pf3 噬菌體或其衍生物、或 λ 型噬菌體、例如 λ、21、phi80、phi81、82、424、434、其他或其衍生物。

「寡核苷酸」，係爲藉由公知方法(例如利用固相手法、例如 EP266032 所記載之手法的磷酸三酯、亞磷酸鹽、或亞磷胺(phosphoramidite)化學法、或者透過 Froeshler 等人(Nucl. Acids. Res. (1986)14, 5399-5407)記載之去氧核苷酸 H-膦酸鹽中間體之方法)所化學合成之短的、單鏈或雙鏈之聚去氧核苷酸。其他方法包括以下記載之聚合酶連鎖反應及其他之自動引子(autoprimer)法、及固體載劑上之寡核苷酸合成。該等方法均由 Engels 等人(Agnew. Chem. Int. Ed. Engl. (1989)28, 716-734)所記載。若基因之全部的核酸序列爲公知，或若可利用與編碼鏈互補的核酸序列，可使用該等方法。或者，若對象胺基酸序列爲公知，則可使用各胺基酸殘基之公知且較佳之編碼殘基，適當推測可能的核酸序列。寡核苷酸能夠以聚丙烯醯胺凝膠或分子大小管柱，或藉由沈澱法來純化。

用語「融合蛋白質」及「融合多肽」，係指具有以共價鍵相互之結合 2 個部分的多肽，各部分爲具有相異特性之多肽。此特性可爲例如 in vitro 或 in vivo 活性等之生物學性質。又，此特性亦可爲單一之化學或物理性質，例

如與對象抗原之結合、反應之觸媒等。此 2 個部分可藉由單一胜肽鍵直接結合、或透過含有 1 個或複數個胺基酸殘基之胜肽連結子來結合。通常，此 2 個部分與連結子係存在於相同之讀取框中。較佳爲多肽之 2 個部分係由異種或相異之多肽所得到。

用語「異種 DNA」，係指導入宿主細胞之任意 DNA。DNA 可來自包含基因體 DNA、cDNA、合成 DNA 及該等之融合或組合之各種起源。DNA 可包含來自與宿主或受體細胞相同之細胞或細胞型的 DNA、或來自不同細胞型、例如來自哺乳類或植物之 DNA。DNA 可包含任意選擇之標記或選擇基因，例如抗生素耐受性基因、耐熱性基因、其他。

如本說明書中所使用的，用語「非常多樣之位置」意指比較公知且/或天然抗體或抗原結合片段之胺基酸序列時，具有於其位置展現之幾個不同胺基酸的輕鏈及重鏈可變區域上之胺基酸位置。非常多樣之位置一般係存在於 CDR 區域。於其一態樣中，決定公知且/或天然抗體之非常多樣之位置時，Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institute of Health Bethesda Md.)(1987 年及 1991 年)所提供之資料爲有效。又，網際網路上之複數個資料庫(http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/ 、 http://www.bioinf.org.uk/abs/index.html)中提供了經收集之多數人類輕鏈及重鏈序列與其配置，該等序列與其配置資訊係有用於本發明中非常多樣之位置的決定。依照本發明，胺基酸在某位置具有較佳爲約 2 至約

20、較佳爲約 3 至約 19、較佳爲約 4 至約 18、較佳爲 5 至 17、較佳爲 6 至 16、較佳爲 7 至 15、較佳爲 8 至 14、較佳爲 9 至 13、較佳爲 10 至 12 個之可能的不同胺基酸殘基之多樣性時，可說該位置係非常地多樣。在數個實施形態中，一胺基酸位置可具有較佳爲至少約 2、較佳爲至少約 4、較佳爲至少約 6、較佳爲至少約 8、較佳爲約 10、較佳爲約 12 之可能的不同胺基酸殘基之多樣性。本說明書中，將如此之胺基酸殘基亦稱爲柔性殘基(flexible residue)。用語「非隨機密碼子組」，意指編碼部分地、較佳爲完全地滿足用以選擇本說明書中記載之胺基酸的基準所選擇之胺基酸的密碼子組。又，如本說明書中所使用的，用語「隨機密碼子組」意指編碼 20 個胺基酸(Ala/A、Leu/L、Arg/R、Lys/K、Asn/N、Met/M、Asp/D、Phe/F、Cys/C、Pro/P、Gln/Q、Ser/S、Glu/E、Thr/T、Gly/G、Trp/W、His/H、Tyr/Y、Ile/I、Val/V)當中任意之胺基酸的密碼子所組合的密碼子組。

分子庫

依照其一態樣，本發明係提供隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原之結合活性會變化之至少一個胺基酸殘基係包含於主要由抗原結合結構域中之彼此序列互異之複數個抗原結合分子所構成之分子庫。離子濃度之例子，可適當列舉金屬離子濃度或氫離子濃度。

本說明書中，「分子庫」意指包含複數個抗原結合分

子或抗原結合分子之複數個融合多肽、或編碼該等序列之核酸、聚核苷酸。包含分子庫中所含之複數個抗原結合分子或抗原結合分子之複數個融合多肽之序列非爲單一序列，而爲包含彼此序列互異之抗原結合分子或抗原結合分子的融合多肽。

本說明書中，「金屬離子」意指氫以外之鹼金屬及銅族等之第 I 族、鹼土類金屬及鋅族等之第 II 族、硼以外之第 III 族、碳與矽以外之第 IV 族、鐵族及鉑族等之第 VIII 族、V、VI 及 VII 族之各 A 亞族所屬之元素、與銻、鉍、釙等金屬元素之離子。金屬原子具有放出原子價電子而成爲陽離子之性質，此稱爲離子化傾向。離子化傾向大之金屬，富有化學活性。

本發明中適合的金屬離子例子可列舉鈣離子。鈣離子係與多數生命現象之調節相關，鈣離子與骨格肌、平滑肌及心肌等之肌肉的收縮、白血球之運動及吞噬作用等的活性化、血小板之變形及分泌等的活性化、淋巴球之活性化、組織胺之分泌等之肥胖細胞的活性化、透過兒茶酚胺 α 受體或乙醯膽鹼受體之細胞應答、胞吐作用、由神經元終端放出傳導物質、神經元之軸突流動等相關。作爲細胞內之鈣離子受體，已知有具有複數個鈣離子結合部位，分子進化上被認爲來自共通的起源之肌鈣蛋白 C、調鈣素、微小白蛋白、肌凝蛋白輕鏈等，其結合模式結構(motif)亦多爲已知。例如，鈣黏素結構域、調鈣素中所含之 EF hand、Protein kinase C 中所含之 C2 結構域、血液凝固蛋

白質 FactorIX 中所含之 Gla 結構域、去唾液酸糖蛋白質受體或甘露糖結合受體中所含之 C 型凝集素、LDL 受體中所含之 A 結構域、annexin、thrombospondin 3 型結構域及類 EGF 結構域已充分爲人所知。

本發明中，金屬離子爲鈣離子時，作爲鈣離子濃度之條件可列舉低鈣離子濃度之條件與高鈣離子濃度之條件。隨著鈣離子濃度之條件不同，結合活性會變化，意指隨著低鈣離子濃度與高鈣離子濃度之條件的不同，抗原結合分子對抗原之結合活性會變化。例如，可列舉高鈣離子濃度之條件下抗原結合分子對抗原之結合活性比低鈣離子濃度之條件下抗原結合分子對抗原之結合活性高的情況。又，亦可列舉低鈣離子濃度之條件下抗原結合分子對抗原之結合活性比高鈣離子濃度之條件下抗原結合分子對抗原之結合活性高的情況。

本說明書中，高鈣離子濃度雖非以單一定義之數值來限定，較適合可爲由 100μM 至 10 mM 之間選擇的濃度。又，其他態樣中，亦可爲由 200μM 至 5 mM 之間選擇的濃度。又，不同態樣中，亦可爲由 500μM 至 2.5 mM 之間選擇的濃度，其他態樣中，亦可爲由 200μM 至 2 mM 之間選擇的濃度。再者亦可爲由 400μM 至 1.5 mM 之間選擇的濃度。特別適合可列舉接近於生體內之血漿中(血中)的鈣離子濃度之由 500μM 至 2.5 mM 之間所選擇的濃度。

本說明書中，低鈣離子濃度雖非以單一定義之數值來限定，較適合可爲由 0.1μM 至 30μM 之間選擇的濃度。

又，其他態樣中，可爲由 0.2μM 至 20μM 之間選擇的濃度。又，不同態樣中，亦可爲由 0.5μM 至 10μM 之間選擇的濃度，其他態樣中，亦可爲由 1μM 至 5μM 之間選擇的濃度。再者亦可爲由 2μM 至 4μM 之間選擇的濃度。特別適合可列舉接近於生體內之於早期內體內的離子化鈣濃度之由 1μM 至 5μM 之間所選擇的濃度。

本發明中，抗原結合分子在低鈣離子濃度條件下之對抗原的結合活性比在高鈣離子濃度條件下之對抗原的結合活性低，意指抗原結合分子在由 0.1 μM 至 30μM 之間所選擇的鈣離子濃度下對抗原之結合活性，比在由 100μM 至 10 mM 之間所選擇的鈣離子濃度下對抗原之結合活性更弱。較佳爲意指抗原結合分子在由 0.5μM 至 10μM 之間所選擇的鈣離子濃度下對抗原的結合活性，比在由 200μM 至 5 mM 之間所選擇的鈣離子濃度下對抗原的結合活性更弱；特佳爲意指於生體內之於早期內體內的鈣離子濃度之抗原結合活性，比生體內之血漿中的鈣離子濃度之抗原結合活性更弱，具體而言，意指抗原結合分子在由 1μM 至 5μM 之間所選擇的鈣離子濃度下對抗原的結合活性，比在由 500μM 至 2.5 mM 之間所選擇的鈣離子濃度下對抗原的結合活性更弱。

隨著金屬離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原之結合活性是否變化，可藉由使用公知之測定方法來決定。例如，爲了確認於高鈣離子濃度之條件下抗原結合分子對抗原之結合活性，比在低鈣離子濃度之條件下抗原結

合分子對抗原之結合活性變得更高，係比較在低鈣離子濃度及高鈣離子濃度之條件下抗原結合分子對抗原之結合活性。

進一步地，本發明中，「抗原結合分子在低鈣離子濃度條件下之對抗原的結合活性比在高鈣離子濃度條件下之對抗原的結合活性低」之表述方式，亦可表述爲抗原結合分子在高鈣離子濃度條件下之對抗原的結合活性比在低鈣離子濃度條件下之對抗原的結合活性高。再者本發明中，「在低鈣離子濃度條件下之抗原結合活性比在高鈣離子濃度條件下對抗原的結合活性低」，亦有記載爲「在低鈣離子濃度條件下之抗原結合能力比在高鈣離子濃度條件下對抗原的結合能力弱」者，又，亦有將「使在低鈣離子濃度條件下之抗原結合活性變得比在高鈣離子濃度條件下對抗原的結合活性更低」記載爲「使在低鈣離子濃度條件下之抗原結合能力變得比在高鈣離子濃度條件下對抗原的結合能力更弱」。

測定對抗原之結合活性時，鈣離子濃度以外之條件，可由所屬技術領域中具有通常知識者適當選擇，並無特殊限定。例如能夠於 HEPES 緩衝液、37℃之條件來測定。例如能夠使用 Biacore(GE Healthcare)等來測定。抗原結合分子與抗原之結合活性的測定，當抗原爲可溶型抗原時，可將抗原結合分子加入經固定化之晶片，將抗原作爲待分析物(analyte)而流動，藉此評估對可溶型抗原之結合活性，當抗原爲膜型抗原時，可將抗原加入經固定化之晶

片，將抗原結合分子作爲待分析物而流動，藉以評估對膜型抗原之結合活性。

本發明之抗原結合分子中，在低鈣離子濃度條件下對抗原的結合活性比在高鈣離子濃度條件下對抗原的結合活性低時，在低鈣離子濃度條件下對抗原的結合活性與在高鈣離子濃度條件下對抗原的結合活性之比並無特殊限定，但較佳爲在低鈣離子濃度條件下對抗原之 KD(Dissociation constant：解離常數)與在高鈣離子濃度條件下之 KD 的比即 KD(Ca 3μM)/KD(Ca 2 mM)之值爲 2 以上、更佳爲 KD(Ca 3μM)/KD(Ca 2 mM)之值爲 10 以上、又更佳爲 KD(Ca 3μM)/KD(Ca 2 mM)之值爲 40 以上。KD(Ca 3μM)/KD(Ca 2 mM)之值的上限並無特殊限定，只要在所屬技術領域中具有通常知識者之技術上能夠製造，則 400、1000、10000 等任何值均可。又，KD(Ca 3μM)/KD(Ca 1.2 mM)之值亦可特定。亦即，KD(Ca 3μM)/KD(Ca 1.2 mM)之值爲 2 以上、更佳爲 KD(Ca 3μM)/KD(Ca 1.2 mM)之值爲 10 以上、又更佳爲 KD(Ca 3μM)/KD(Ca 1.2 mM)之值爲 40 以上。KD(Ca 3μM)/KD(Ca 1.2 mM)之值的上限並無特殊限定，只要在所屬技術領域中具有通常知識者之技術上能夠製造，則 400、1000、10000 等任何值均可。

作爲對抗原之結合活性的值，抗原爲可溶型抗原時可使用 KD(解離常數)，抗原爲膜型抗原時可使用表觀 KD(Apparent dissociation constant：表觀解離常數)。KD(解離常數)、及表觀 KD(表觀解離常數)，可藉由所屬技術領

域中具有通常知識者所公知之方法來測定，例如可使用Biacore(GE healthcare)、斯克加圖(scatchard plot)、流式細胞儀(flow cytometer)等。

又，做爲顯示本發明之抗原結合分子在低鈣濃度條件下對抗原的結合活性與在高鈣濃度條件下對抗原的結合活性之比的其他指標，亦可適合地使用例如解離速度常數之kd(Dissociation rate constant：解離速度常數)。使用 kd(解離速度常數)作爲顯示結合活性之比的指標來取代KD(解離常數)時，在低鈣濃度條件下對抗原之 kd(解離速度常數)與在高鈣濃度條件下之 kd(解離速度常數)的比即kd(低鈣濃度條件下)/kd(高鈣濃度條件下)之值，較佳爲 2以上、更佳爲 5 以上、又更佳爲 10 以上、又更佳爲 30 以上。kd(低鈣濃度條件下)/kd(高鈣濃度條件下)之值的上限雖無特殊限定，只要在所屬技術領域中具有通常知識者之技術常識上能夠製造，則 50、100、200 等任何值均可。

作爲抗原結合活性之值，抗原爲可溶型抗原時可使用kd(解離速度常數)、抗原爲膜型抗原時可使用表觀kd(Apparent dissociation rate constant：表觀解離速度常數)。kd(解離速度常數)、及表觀 kd(表觀解離速度常數)，可藉由所屬技術領域中具有通常知識者所公知之方法來測定，例如可使用 Biacore(GE healthcare)、流式細胞儀等。再者本發明中，測定不同鈣離子濃度中抗原結合分子對抗原之結合活性時，鈣濃度以外之條件較佳爲相同。

本發明中，質子亦即氫原子之原子核的濃度條件，亦

視爲與氫指數(pH)之條件相同意義。水溶液中之氫離子的活動量以 $a_{H}+$表示時，pH 則定義爲 $-\log 10 a_{H}+$。若水溶液中之離子強度爲(例如比 10^{-3})低時，$a_{H}+$大致等於氫離子強度。例如 25℃、1 氣壓中之水的離子積爲 $Kw=a_{H}+a_{OH}=10^{-14}$，因此在純水中爲 $a_{H}+=a_{OH}=10^{-7}$。此時之 pH=7 爲中性、pH 比 7 小之水溶液爲酸性、pH 比 7 大之水溶液爲鹼性。

本發明中，使用 pH 之條件作爲氫離子濃度之條件時，作爲 pH 之條件可列舉 pH 酸性區域之條件與 pH 中性區域之條件。隨著 pH 之條件不同而結合活性會變化，意指隨著 pH 酸性區域與 pH 中性區域之條件不同，抗原結合分子對抗原之結合活性會變化。例如，可列舉 pH 中性區域之條件下抗原結合分子對抗原的結合活性比 pH 酸性區域之條件下抗原結合分子對抗原的結合活性更高的情況。又，亦可列舉 pH 酸性區域之條件下抗原結合分子對抗原的結合活性比 pH 中性區域之條件下抗原結合分子對抗原的結合活性更高的情況。

本說明書中，pH 中性區域雖非特別以單一定義之數值來限定，較適合可由 pH6.7 至 pH10.0 之間來選擇。又，其他態樣中，可由 pH6.7 至 pH9.5 之間來選擇。又，不同態樣中，可由 pH7.0 至 pH9.0 之間來選擇，其他態樣中，可由 pH7.0 至 pH8.0 之間來選擇。特別適合可列舉接近於生體內之血漿中(血中)的 pH 之 pH7.4。

本說明書中，pH 酸性區域雖非特別以單一定義之數值來限定，較適合可由 pH4.0 至 pH6.5 之間來選擇。又，

其他態樣中，可由 pH4.5 至 pH6.5 之間來選擇。又，不同態樣中，可由 pH5.0 至 pH6.5 之間來選擇，其他態樣中，可由 pH5.5 至 pH6.5 之間來選擇。特別適合可列舉接近於生體內之於早期內體內的 pH 之 pH5.8。

本發明中，抗原結合分子在 pH 酸性區域條件下對抗原的結合活性比在 pH 中性區域條件下對抗原的結合活性低，意指抗原結合分子於由 pH4.0 至 pH6.5 之間選擇之 pH 中對抗原的結合活性，比由 pH6.7 至 pH10.0 之間選擇之 pH 中對抗原的結合活性更弱。較佳爲意指抗原結合分子於由 pH4.5 至 pH6.5 之間選擇之 pH 中對抗原的結合活性，比由 pH6.7 至 pH9.5 之間選擇之 pH 中對抗原的結合活性更弱；更佳爲意指抗原結合分子於由 pH5.0 至 pH6.5 之間選擇之 pH 中對抗原的結合活性，比由 pH7.0 至 pH9.0 之間選擇之 pH 中對抗原的結合活性更弱。又，又更佳爲意指抗原結合分子於由 pH5.5 至 pH6.5 之間選擇之 pH 中對抗原的結合活性，比由 pH7.0 至 pH8.0 之間選擇之 pH 中對抗原的結合活性更弱。特佳爲意指於生體內之於早期內體內的 pH 中之抗原結合活性，比於生體內之於血漿中的 pH 中之抗原結合活性更弱，具體而言，意指抗原結合分子於 pH5.8 時對抗原的結合活性，比於 pH7.4 時對抗原的結合活性更弱。

隨著 pH 條件不同，抗原結合分子對抗原之結合活性是否變化，係根據例如前述之不同 pH 條件下之結合活性的測定方法來實施。例如，爲了確認於 pH 中性區域之條

件下抗原結合分子對抗原之結合活性，比於 pH 酸性區域之條件下抗原結合分子對抗原的結合活性變得更高，係比較於 pH 酸性區域及 pH 中性區域之條件下抗原結合分子對抗原之結合活性。

進一步地，本發明中，「抗原結合分子在 pH 酸性區域之條件下對抗原的結合活性比在 pH 中性區域之條件下對抗原的結合活性低」之表述方式，亦可表述爲抗原結合分子在 pH 中性區域之條件下對抗原的結合活性比在 pH 酸性區域之條件下對抗原的結合活性更高。再者，本發明中，「在 pH 酸性區域之條件下之抗原結合活性比在 pH 中性區域之條件下對抗原的結合活性低」，亦有記載爲「在 pH 酸性區域之條件下的抗原結合能力比在 pH 中性區域之條件下對抗原的結合能力更弱」者、又，亦有將「使在 pH 酸性區域之條件下的抗原結合活性變得比在 pH 中性區域之條件下對抗原的結合活性更低」記載爲「使在 pH 酸性區域之條件下的抗原結合能力變得比在 pH 中性區域之條件下對抗原的結合能力更弱」。

如前所述，隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原的結合活性會變化之胺基酸殘基的例子，例如金屬離子爲鈣離子的情況時，只要是形成鈣結合模式結構(motif)的胺基酸，則其種類無限制。鈣結合模式結構，爲所屬技術領域中具有通常知識者所廣爲周知，且有詳細記載(例如 Springer 等人(Cell(2000)102, 275-277)、Kawasaki 及 Kretsinger(Protein Prof.(1995)2, 305-490)、

Moncrief 等人(J. Mol. Evol. (1990)30, 522-562)、Chauvaux 等人(Biochem. J. (1990)265, 261-265)、Bairoch 及 Cox (FEBS Lett. (1990)269, 454-456)、Davis(New Biol. (1990) 2, 410-419)、Schaefer 等人(Genomics (1995)25, 638～643)、Economou 等人(EMBO J. (1990)9, 349-354)、Wurzburg 等人(Structure. (2006)14, 6, 1049-1058))。亦即，ASGPR, CD23、MBR、DC-SIGN 等之 C 型凝集素等的任意公知鈣結合模式結構，可包含於本發明之抗原結合分子中。上述之外，作爲如此之鈣結合模式結構的適當例子，如後所述，亦可列舉存在於具有 Vk5-2 等之生殖細胞系列序列之抗體輕鏈可變區的 Vk5 之部分所含有的鈣結合模式結構。

又，作爲隨著鈣離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原之結合活性會變化之胺基酸殘基的例子，亦可適合使用具有金屬鉗合作用之胺基酸。作爲具有金屬鉗合作用之胺基酸例子，可適合列舉例如絲胺酸(Ser(S))、蘇胺酸(Thr(T))、天門冬醯胺(Asn(N))、麩醯胺(Gln(Q))、天門冬胺酸(Asp(D))及麩胺酸(Glu(E))等。

前述之胺基酸殘基被包含的抗原結合結構域之位置並不限定特定的位置，只要隨著鈣離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原之結合活性會變化，則可爲形成抗原結合結構域之重鏈可變區域或輕鏈可變區域中之任意位置。亦即，於本發明之一態樣中，係提供主要由隨著鈣離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原的結合活性會變化之

胺基酸殘基係包含於重鏈之抗原結合結構域中之彼此序列互異的抗原結合分子所構成的分子庫。又，其他態樣中，係提供主要由該胺基酸殘基係包含於重鏈之 CDR3 中之彼此序列互異的抗原結合分子所構成之分子庫。其他態樣中，係提供主要由該胺基酸殘基係包含於重鏈 CDR3 中之以 Kabat 編號表示的 95 位、96 位、100a 位及/或 101 位中之彼此序列互異的抗原結合分子所構成之分子庫。

又，本發明之其一態樣中，係提供主要由隨著鈣離子濃度之條件不同抗原結合分子對抗原的結合活性會變化之胺基酸殘基係包含於輕鏈之抗原結合結構域中之彼此序列互異的抗原結合分子所構成之分子庫。又，其他態樣中，係提供主要由該胺基酸殘基係包含於輕鏈之 CDR1 中之彼此序列互異的抗原結合分子所構成之分子庫。再其他態樣中，係提供主要由該胺基酸殘基係包含於輕鏈之 CDR1 之以 Kabat 編號表示之 30 位、31 位及/或 32 位中之彼此序列互異的抗原結合分子所構成之分子庫。

又，其他態樣中，係提供主要由該胺基酸殘基係包含於輕鏈之 CDR2 中之彼此序列互異的抗原結合分子所構成之分子庫。再其他態樣中，係提供主要由該胺基酸殘基係包含於輕鏈之 CDR2 之以 Kabat 編號表示之 50 位中之彼此序列互異的抗原結合分子所構成之分子庫。

進一步其他態樣中，係提供主要由該胺基酸殘基係包含於輕鏈之 CDR3 中之彼此序列互異的抗原結合分子所構成之分子庫。再其他態樣中，係提供主要由該胺基酸殘基

係包含於輕鏈之 CDR3 之以 Kabat 編號表示之 92 位中之彼此序列互異的抗原結合分子所構成之分子庫。

又，作爲本發明的又一不同態樣，係提供主要由該胺基酸殘基係包含於前述記載之輕鏈之由 CDR1、CDR2 及 CDR3 中選擇之 2 個或 3 個 CDR 中之彼此序列互異的抗原結合分子所構成之分子庫。進一步地，亦提供主要由該胺基酸殘基係包含於輕鏈之以 Kabat 編號表示之 30 位、31 位、32 位、50 位及/或 92 位的任一者以上之彼此序列互異的抗原結合分子所構成之分子庫。

於特別適合的實施形態中，抗原結合分子之輕鏈及/或重鏈可變區域之框架序列，較佳係具有人類之生殖細胞系框架序列。因此，於本發明之其一態樣中，框架序列若完全地爲人類序列，則對人類投與(例如疾病治療)時，可認爲本發明之抗原結合分子幾乎或完全不引起免疫原性反應。由上述意義來看，本發明之「包含生殖細胞系列之序列」意指本發明之框架序列的一部分係與任一之人類生殖細胞系框架序列的一部分相同。例如，當本發明之抗原結合分子之重鏈 FR2 序列爲組合複數之不同人類生殖細胞系框架序列之重鏈 FR2 序列而得的序列的情況時，亦爲本發明之「包含生殖細胞系列之序列」的抗原結合分子。

作爲框架之例子，可適當地列舉例如 V-Base (http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/)等網站中所包含之現在已知的完全人類型之框架區域序列。該等之框架區域的序列可作爲本發明之抗原結合分子中所含之生殖細胞系列的

序列來適當地使用。生殖細胞系列之序列可基於其類似性來分類(Tomlinson 等人(J. Mol. Biol. (1992)227, 776-798)Williams 及 Winter(Eur. J. Immunol. (1993)23, 1456-1461)及 Cox 等人(Nat. Genetics(1994)7, 162-168))。可由分類爲分爲 7 個亞群(subgroup)之 Vκ10 之亞群的 Vλ、分類爲 7 個亞群之 VH 中適當選擇適合的生殖細胞系列之序列。

完全人類型之 VH 序列，雖不僅限定於下述，但可適當列舉例如 VH1 亞群(例如 VH1-2、VH1-3、VH1-8、VH1-18、VH1-24、VH1-45、VH1-46、VH1-58、VH1-69)、VH2 亞群(例如 VH2-5、VH2-26、VH2-70)、VH3 亞群(VH3-7、VH3-9、VH3-11、VH3-13、VH3-15、VH3-16、VH3-20、VH3-21、VH3-23、VH3-30、VH3-33、VH3-35、VH3-38、VH3-43、VH3-48、VH3-49、VH3-53、VH3-64、VH3-66、VH3-72、VH3-73、VH3-74)、VH4 亞群(VH4-4、VH4-28、VH4-31、VH4-34、VH4-39、VH4-59、VH4-61)、VH5 亞群(VH5-51)、VH6 亞群(VH6-1)、VH7 亞群(VH7-4、VH7-81)之 VH 序列等。該等亦記載於公知文獻(Matsuda 等人(J. Exp. Med. (1998)188, 1973-1975))等，所屬技術領域中具有通常知識者基於該等序列資訊，可適當地設計本發明之抗原結合分子。該等以外之完全人類型之框架或框架的準區域亦可適合地使用。

完全人類型之 VK 序列，雖不僅限定於下述，但可適當列舉例如分類爲 Vk1 亞群之 A20、A30、L1、L4、L5、

L8、L9、L11、L12、L14、L15、L18、L19、L22、L23、L24、O2、O4、O8、O12、O14、O18；分類爲 Vk2 亞群之 A1、A2、A3、A5、A7、A17、A18、A19、A23、O1、O11；分類爲 Vk3 亞群之 A11、A27、L2、L6、L10、L16、L20、L25；分類爲 Vk4 亞群之 B3；分類爲 Vk5 亞群之 B2(本說明書中亦稱爲 Vk5-2)；分類爲 VK6 亞群之 A10、A14、A26 等(Kawasaki 等人(Eur. J. Immunol. (2001)31, 1017-1028)、Schable 及 Zachau (Biol. Chem. Hoppe Seyler (1993)374, 1001-1022)及 Brensing-Kuppers 等人(Gene (1997)191, 173-181))。

完全人類型之 VL 序列，雖不僅限定於下述，但可適當列舉例如分類 VL1 亞群之 V1-2、V1-3、V1-4、V1-5、V1-7、V1-9、V1-11、V1-13、V1-16、V1-17、V1-18、V1-19、V1-20、V1-22；分類爲 VL2 亞群之 V2-1、V2-6、V2-7、V2-8、V2-11、V2-13、V2-14、V2-15、V2-17、V2-19；分類爲 VL3 亞群之 V3-2、V3-3、V3-4；分類爲 VL4 亞群之 V4-1、V4-2、V4-3、V4-4、V4-6；分類爲 VL5 亞群之 V5-1、V5-2、V5-4、V5-6 等(Kawasaki 等人(Genome Res. (1997)7, 250-261))。

通常該等框架序列係藉由一個或以上之胺基酸殘基的相異而互相不同。該等之框架序列可與本發明之「隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原的結合活性會變化之至少一個胺基酸殘基」一起使用。本發明之可與「隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原的結合活性

會變化之至少一個胺基酸殘基」一起使用之完全人類型之框架的例子，不僅限定於此，其他亦可列舉 KOL、NEWM、REI、EU、TUR、TEI、LAY、POM 等(例如，Kabat 等人(1991)及 Wu 等人(J. Exp. Med. (1970)132, 211-250))。

本發明雖不被特定的理論所拘束，但使用生殖細胞系之序列，期待於絕大多數之個人上排除有害的免疫反應，其一理由可認爲係如下所述。通常之免疫反應中所產生之親和性成熟步驟的結果，於免疫球蛋白之可變區域會頻繁地產生體細胞之突變。該等之突變主要而言，其序列係產生於超可變之 CDR 周邊，但對框架區域之殘基亦會產生影響。該等之框架的突變不存在於生殖細胞系之基因，且亦可認爲成爲患者之免疫原性的可能性少。另一方面，通常之人類集團，係接觸於大多數由生殖細胞系之基因所表現的框架序列，免疫寬容的結果，可預測該等生殖細胞系之框架在患者中爲免疫原性低、或爲非免疫原性。爲了使免疫寬容之可能性達到最大，可由編碼化可變區域之基因所普遍存在的功能性生殖細胞系基因之集合中選擇。

爲了製造本發明之「隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原的結合活性會變化之至少一個胺基酸殘基」係包含於前述框架序列之抗原結合分子，可適當採用部位特異性變異誘發法(Kunkel 等人(Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985)82, 488-492))或 Overlap extension PCR 等公知之方法。

例如，藉由組合作爲預先包含「隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原的結合活性會變化之至少一個胺基酸殘基」之框架序列而選擇之輕鏈可變區域、與作爲隨機化可變區域序列分子庫而製造之重鏈可變區域，可製造本發明之包含複數個彼此序列互異的抗原結合分子之分子庫。作爲如此非限定的例子，當離子濃度爲鈣離子濃度時，可適當列舉例如組合序列編號：1(Vk5-2)所記載之輕鏈可變區域序列與作爲隨機化可變區域序列分子庫而製造之重鏈可變區域之分子庫。包含存在於具有上述之 Vk5-2 等生殖細胞系列之序列的抗體之輕鏈可變區域的 Vk5 結構域之輕鏈可變區域序列的較佳例子，除了序列編號：1(Vk5-2)記載之輕鏈可變區域序列，其他亦可適當使用後述之以序列編號：2 表示之 Vk5-2 變異型(variant)1 或以序列編號：3 表示之 Vk5-2 變異型 2 等。包含該等分子中所含的「隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原的結合活性會變化之至少一個胺基酸殘基」之 Vk5-2 的部分，可作爲含有本發明之鈣結合模式結構之結構域來使用。本發明之非限定的其一態樣中，形成鈣結合模式結構之至少一個胺基酸可作爲本發明之「隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原的結合活性會變化之至少一個胺基酸殘基」來使用。

又，亦可於作爲前述之「隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原的結合活性會變化之至少一個胺基酸殘基」所預先被包含之框架序列而選擇之輕鏈可變區域序

列中，設計爲含有多樣之胺基酸來作爲該胺基酸殘基以外之殘基。本發明中如此之殘基係被稱爲柔性殘基。本發明之抗原結合分子對抗原的結合活性，只要係隨著離子濃度條件而變化，則該柔性殘基之數目及位置並不限定爲特定之態樣。亦即，於重鏈及/或輕鏈之 CDR 序列及/或 FR 序列中可含有一個或其以上之柔性殘基。例如，離子濃度爲鈣離子濃度時，作爲於序列編號：1(Vk5-2)所記載之輕鏈可變區域序列中所導入的柔性殘基之非限定的例子，可列舉表 13、表 14、表 17 或表 18 所記載之胺基酸殘基。

又，藉由組合經導入前述之「隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原的結合活性會變化之至少一個胺基酸殘基」之輕鏈可變區域與作爲隨機化可變區域序列分子庫而製造之重鏈可變區域，亦可製造本發明之包含複數個彼此序列互異的抗原結合分子的分子庫。作爲如此之非限定的例子，於離子濃度爲鈣離子濃度時，可適當列舉組合例如序列編號：6(Vk1)、序列編號：7(Vk2)、序列編號：8(Vk3)、序列編號：9(Vk4)等之生殖細胞系列的特定殘基經取代爲「鈣隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原的結合活性會變化之至少一個胺基酸殘基」之輕鏈可變區域序列與作爲隨機化可變區域序列分子庫而製造之重鏈可變區域而得之分子庫。作爲該胺基酸殘基之非限定的例子，可舉例輕鏈之 CDR1 中所含之胺基酸殘基。其他，作爲該胺基酸殘基之非限定的例子，亦可舉例輕鏈之 CDR2 中所含之胺基酸殘基。又，作爲該胺基酸殘基之非

限定的別的例子，亦可舉例輕鏈之 CDR3 中所含之胺基酸殘基。

如前所述，該胺基酸殘基係包含於輕鏈之 CDR1 中的胺基酸殘基之非限定的例子，可列舉輕鏈可變區域之 CDR1 中以 Kabat 編號表示之 30 位、31 位、及/或 32 位之胺基酸殘基。又，該胺基酸殘基係包含於輕鏈之 CDR2 中的胺基酸殘基之非限定的例子，可列舉輕鏈可變區域之 CDR2 中以 Kabat 編號表示之 50 位之胺基酸殘基。進一步地，該胺基酸殘基係包含於輕鏈之 CDR3 中的胺基酸殘基之非限定的例子，可列舉輕鏈可變區域之 CDR3 中以 Kabat 編號表示之 92 位之胺基酸殘基。又，該等之胺基酸殘基只要係形成鈣結合模式結構，及/或隨著鈣離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原之結合活性會變化，則可單獨含有該等胺基酸殘基、亦可組合含有二個以上之該等胺基酸。又，已知有具有複數個鈣離子結合部位，且認爲係由分子進化上共通之起源而由來的肌鈣蛋白 C、調鈣素、微小白蛋白、肌凝蛋白輕鏈等，亦可以含有其結合模式結構的方式來設計輕鏈 CDR1、CDR2 及/或 CDR3。例如，可以上述目的適當地使用鈣黏素結構域、調鈣素所含有之 EF hand、Protein kinase C 所含有之 C2 結構域、血液凝固蛋白質 FactorIX 所含有之 Gla 結構域、去唾液酸糖蛋白質受體或甘露糖結合受體所含有之 C 型凝集素、LDL 受體所含有之 A 結構域、annexin、thrombospondin 3 型結構域及類 EGF 結構域。

組合經導入前述之「隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原的結合活性會變化之至少一個胺基酸殘基」之輕鏈可變區域與作爲隨機化可變區域序列分子庫而製造之重鏈可變區域的情況時，亦與前述同樣地，亦能夠以柔性殘基係包含於該輕鏈可變區域序列中的方式來設計。本發明之抗原結合分子對抗原的結合活性，只要係隨著離子濃度條件不同而會變化，則該柔性殘基之數目及位置並不限定於特定之態樣。亦即，可於重鏈及/或輕鏈之CDR序列及/或FR序列中包含一個或其以上之柔性殘基。例如，離子濃度爲鈣離子濃度時，作爲被導入輕鏈可變區域序列之柔性殘基的非限定之例子。可列舉表13、表14、表17或表18所記載之胺基酸殘基。

所組合之重鏈可變區域的例子。可適當地列舉隨機化可變區域分子庫。隨機化可變區域分子庫之製造方法係適當組合公知之方法。本發明之非限定的其一態樣中，基於經特定之抗原誘發免疫之動物、感染症患者或接種疫苗使血中抗體價上昇之人類、癌患者、來自自體免疫疾病之淋巴球之抗體基因所構築之免疫分子庫，可適當地使用作爲隨機化可變區域分子庫。

又，本發明之非限定的其一態樣中，基因體DNA中之V基因或經再構築之有功能性之V基因的CDR序列，經包含編碼適當長度之密碼子組之序列的合成寡核苷酸組取代之合成分子庫，亦可適當地使用作爲隨機化可變區域分子庫。此時，由觀察到重鏈CDR3之基因序列的多樣性

來看，亦可僅取代 CDR3 之序列。抗原結合分子之可變區域中產生出胺基酸之多樣性的基準，係爲使露出於抗原結合分子表面之位置的胺基酸殘基具有多樣性。露出於表面的位置，雖指根據抗原結合分子之構造、構造集團、及/或經模式化之構造，而判斷爲可露出於表面、且/或可與抗原接觸之位置，但一般而言爲其 CDR。較佳爲，露出於表面之位置，係使用如 InsightII 程式(Accelrys)之電腦程式，使用來自抗原結合分子之 3 次元模式的座標來決定。露出於表面之位置，可使用本技術領域公知之演算法(例如，Lee 及 Richards(J. Mol. Biol. (1971)55, 379-400)、Connolly(J. Appl. Cryst. (1983)16, 548-558))來決定。露出於表面之位置決定，可使用由適合蛋白質結構模擬(protein modeling)之軟體及抗體所得之三次元構造資訊來進行。作爲用於如此目的而可利用之軟體，可適當列舉 SYBYL 生體高分子模擬軟體(Tripos Associates)。一般而言，又較佳爲，演算法必須有使用者之輸入大小參數時，計算時使用的探針「大小」係設定爲半徑約 1.4 埃以下。進一步地，使用了個人電腦用軟體之露出於表面之區域及面積之決定法，係記載於 Pacios(Comput. Chem. (1994) 18(4), 377-386 及 J. Mol. Model. (1995)1, 46-53)。

進一步地，本發明之非限定的其一態樣中，由來自健康人之淋巴球的抗體基因所構築，且其基因譜中不含偏差(bias)之抗體序列之天然序列所構成的天然分子庫，亦可特別適合作爲隨機化可變區域分子庫來使用(Gejima 等人

(Human Antibodies(2002)11, 121-129)及 Cardoso 等人(Scand. J. Immunol. (2000)51, 337-344))。包含本發明中記載之天然序列之胺基酸序列，意指由如此之天然分子庫中取得的胺基酸序列。

本發明之其一態樣中，藉由組合作爲預先包含「隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原的結合活性會變化之至少一個胺基酸殘基」之框架序列而被選擇之重鏈可變區域、與作爲隨機化可變區域序列分子庫而被製造之輕鏈可變區域，可製造本發明之包含複數個彼此序列互異的抗原結合分子之分子庫。作爲如此之非限定的例子，離子濃度爲鈣離子濃度時，可適當地列舉例如，將序列編號：10(6RL#9H-IgG1)或序列編號：11(6KC4-1#85H-IgG1)所記載之重鏈可變區域序列與作爲隨機化可變區域序列分子庫而被製造之輕鏈可變區域組合之分子庫。又，亦可由具有生殖細胞系列之序列的輕鏈可變區域中適當選擇藉以製造，來取代作爲隨機化可變區域序列分子庫而被製造之輕鏈可變區域。可適當地列舉例如，將序列編號：10(6RL#9H-IgG1)或序列編號：11(6KC4-1#85H-IgG1)記載之重鏈可變區域序列與具有生殖細胞系列之序列的輕鏈可變區域組合之分子庫。

又，亦能夠以於作爲預先包含前述之「隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原的結合活性會變化之至少一個胺基酸殘基」之框架序列而被選擇之重鏈可變區域的序列中包含有柔性殘基的方式來設計。本發明之抗原結

合分子對抗原的結合活性，只要係隨著離子濃度之條件不同而變化，則該柔性殘基之數目及位置並不限定爲特定之態樣。亦即，可於重鏈及/或輕鏈之 CDR 序列及/或 FR 序列中包含一個或其以上之柔性殘基。例如，離子濃度爲鈣離子濃度時，作爲導入於序列編號：10(6RL#9H-IgG1)所記載之重鏈可變區域序列的柔性殘基之非限定的例子，除了重鏈 CDR1 及 CDR2 之全部胺基酸殘基之外，可列舉重鏈 CDR3 之 95 位、96 位及/或 100a 位以外之 CDR3 的胺基酸殘基。或者，作爲導入於序列編號：11(6KC4-1#85H-IgG1)所記載之重鏈可變區域序列之柔性殘基之非限定的例子，除了重鏈 CDR1 及 CDR2 之全部胺基酸殘基之外，亦可列舉重鏈 CDR3 之 95 位及/或 101 位以外之 CDR3 的胺基酸殘基。

又，藉由組合經導入前述之「隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原的結合活性會變化之至少一個胺基酸殘基」的重鏈可變區域與作爲隨機化可變區域序列分子庫而被製造之輕鏈可變區域或具有生殖細胞系列之序列的輕鏈可變區域，亦可製造本發明之包含複數個彼此序列互異的抗原結合分子之分子庫。作爲如此之非限定的例子，離子濃度爲鈣離子濃度時，可適當地列舉例如，組合重鏈可變區域之特定殘基經取代爲「鈣隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原的結合活性會變化之至少一個胺基酸殘基」之重鏈可變區域序列與作爲隨機化可變區域序列分子庫而被製造之輕鏈可變區域或具有生殖細胞系

列之序列的輕鏈可變區域之分子庫。作爲該胺基酸殘基之非限定的例子，可舉例重鏈之 CDR1 中所含之胺基酸殘基。其他，作爲該胺基酸殘基之非限定的例子，可舉例重鏈之 CDR2 中所含之胺基酸殘基。又，作爲該胺基酸殘基之非限定的別的例子，亦可舉例重鏈之 CDR3 中所含之胺基酸殘基。作爲該胺基酸殘基係包含於重鏈之 CDR3 中之胺基酸殘基的非限定的例子，可列舉重鏈可變區域之 CDR3 中之以 Kabat 編號表示之 95 位、96 位、100a 位及/或 101 位之胺基酸。又，該等之胺基酸殘基，只要係形成鈣結合模式結構，及/或隨著鈣離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原之結合活性會變化，則可單獨包含該等胺基酸殘基、亦可包含該等胺基酸之二個以上的組合。

組合經導入前述之「隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原的結合活性會變化之至少一個胺基酸殘基」的重鏈可變區域與作爲隨機化可變區域序列分子庫而被製造之輕鏈可變區域或具有生殖細胞系列之序列的輕鏈可變區域的情況時，亦與前述同樣地能夠以柔性殘基包含於該重鏈可變區域之序列中的方式來設計。本發明之抗原結合分子對抗原的結合活性，只要係隨著離子濃度之條件不同而變化，該柔性殘基之數目及位置並不限定爲特定之態樣。亦即，可於重鏈之 CDR 序列及/或 FR 序列中包含一個或其以上之柔性殘基。又，作爲「隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原的結合活性會變化之胺基酸殘基」以外之重鏈可變區域之 CDR1、CDR2 及/或 CDR3

的胺基酸序列，亦可適當地使用隨機化可變區域分子庫。使用生殖細胞系列之序列作爲輕鏈可變區域時，可列舉例如，序列編號：6(Vk1)、序列編號：7(Vk2)、序列編號：8(Vk3)、序列編號：9(Vk4)等之生殖細胞系列的序列作爲非限定的例子。

前述之隨著鈣離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原的結合活性會變化之胺基酸殘基，只要係形成鈣結合模式結構，任意之胺基酸殘基均可適合地使用，但作爲如此的胺基酸殘基，具體而言可列舉具有電子供與性之胺基酸。作爲如此之具有電子供與性之胺基酸，較佳可舉例絲胺酸、蘇胺酸、天門冬醯胺、麩醯胺、天門冬胺酸或麩胺酸。

作爲本發明之其一態樣，藉由組合經導入「氫隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原的結合活性會變化之至少一個胺基酸殘基」之輕鏈可變區域與作爲隨機化可變區域序列分子庫而被製造之重鏈可變區域，亦可製造本發明之包含複數個彼此序列互異的抗原結合分子之分子庫。

作爲該胺基酸殘基之非限定的例子，可舉例輕鏈之CDR1 所包含之胺基酸殘基。其他，作爲該胺基酸殘基之非限定的例子，可舉例輕鏈之 CDR2 所包含之胺基酸殘基。又，作爲該胺基酸殘基之非限定的別的例子，亦可舉例輕鏈之 CDR3 所包含之胺基酸殘基。

如前所述，該胺基酸殘基係包含於輕鏈之 CDR1 中之

胺基酸殘基之非限定的例子，可列舉輕鏈可變區域之CDR1中之以Kabat編號表示之24位、27位、28位、30位、31位、32位及/或34位之胺基酸殘基。又，該胺基酸殘基係包含於輕鏈之CDR2中之胺基酸殘基之非限定的例子，可列舉輕鏈可變區域之CDR2中之以Kabat編號表示之50位、51位、52位、53位、54位、55位及/或56位之胺基酸殘基。進一步地，該胺基酸殘基係包含於輕鏈之CDR3中之胺基酸殘基之非限定的例子，可列舉輕鏈可變區域之CDR3中之以Kabat編號表示之89位、90位、91位、92位、93位、94及/或95a位之胺基酸殘基。又，該等之胺基酸殘基，只要係隨著氫離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原之結合活性會變化，則可單獨包含該等胺基酸殘基、亦可包含該等胺基酸之二個以上的組合。

組合經導入前述之「氫隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原的結合活性會變化之至少一個胺基酸殘基」的輕鏈可變區域與作爲隨機化可變區域序列分子庫而被製造之重鏈可變區域的情況時，與前述同樣地，亦能夠以柔性殘基包含於該輕鏈可變區域之序列中的方式來設計。本發明之抗原結合分子對抗原的結合活性，只要係隨著氫離子濃度之條件不同而變化，擇該柔性殘基之數目及位置並不限定爲特定之態樣。亦即，可於重鏈及/或輕鏈之CDR序列及/或FR序列中包含一個或其以上之柔性殘基。例如，作爲經導入於輕鏈可變區域序列之柔性殘基的

非限定的例子，可列舉表 4 或表 5 記載之胺基酸殘基。又，作爲隨著氫離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原之結合活性會變化之胺基酸殘基或柔性殘基以外之輕鏈可變區域的胺基酸序列，以非限定的例子而言可適合使用Vk1(序列編號：6)、Vk2(序列編號：7)、Vk3(序列編號：8)、Vk4(序列編號：9)等之生殖細胞系列之序列。

所組合之重鏈可變區域的例子，可適當地列舉隨機化可變區域分子庫。隨機化可變區域分子庫之製造方法可適當地組合公知之方法。本發明之非限定的其一態樣中，基於經特定抗原誘發免疫之動物、感染症患者或經疫苗接種而使血中抗體價上昇的人類、癌患者、來自自體免疫疾病之淋巴球的抗體基因所構築之免疫分子庫，亦可適合作爲隨機化可變區域分子庫來使用。

又，本發明之非限定的其一態樣中，與前述同樣地，基因體 DNA 中之 V 基因或經再構築之有功能性之 V 基因的 CDR 序列，經包含編碼適當長度之密碼子組之序列的合成寡核苷酸組取代之合成分子庫，亦可適當地使用作爲隨機化可變區域分子庫。

進一步地，本發明之非限定的其一態樣中，由來自健康人之淋巴球的抗體基因所構築，且其基因譜中不含偏差(bias)之抗體序列之天然序列所構成的天然分子庫，亦可特別適合作爲隨機化可變區域分子庫來使用(Gejima 等人(Human Antibodies(2002)11, 121-129)及 Cardoso 等人(Scand. J. Immunol. (2000)51, 337-344))。

作為本發明之別的態樣，藉由組合經導入「氫隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原的結合活性會變化之至少一個胺基酸殘基」之重鏈可變區域與作為隨機化可變區域序列分子庫而被製造之輕鏈可變區域或具有生殖細胞系列之序列的輕鏈可變區域，亦可製造本發明之包含複數個彼此序列互異的抗原結合分子之分子庫。作為如此之非限定的例子，可適當列舉例如，將重鏈可變區域之特定殘基經「氫隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原的結合活性會變化之至少一個胺基酸殘基」取代之重鏈可變區域序列與作為隨機化可變區域序列分子庫而被製造之輕鏈可變區域或具有生殖細胞系列之序列的輕鏈可變區域組合之分子庫。作為該胺基酸殘基之非限定的例子，可舉例重鏈之 CDR1 中所含之胺基酸殘基。其他，作為該胺基酸殘基之非限定的例子，可舉例重鏈之 CDR2 中所含之胺基酸殘基。又，作為該胺基酸殘基之非限定的別的例子，亦可舉例重鏈之 CDR3 中所含之胺基酸殘基。

作為該胺基酸殘基係包含於重鏈之 CDR1 中之胺基酸殘基之非限定的例子，可列舉重鏈可變區域之 CDR1 中之以 Kabat 編號表示之 27 位、31 位、32 位、33 位及/或 35 位之胺基酸。作為包含於重鏈之 CDR2 中之胺基酸殘基之非限定的例子，可列舉重鏈可變區域之 CDR2 中之以 Kabat 編號表示之 50 位、52 位、53 位、55 位、57 位、58 位、59 位、61 位及/或 62 位之胺基酸。作為包含於重鏈之 CDR3 中之胺基酸殘基之非限定的例子，可列舉重鏈可

變區域之 CDR3 中之以 Kabat 編號表示之 95 位、96 位、97 位、98 位、99 位、100a 位、100b 位、100d 位、100f 位、100h 位、102 位及/或 107 位之胺基酸。又，該等之胺基酸殘基，只要係隨著氫離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原之結合活性會變化，則可單獨包含該等胺基酸殘基、亦可包含該等胺基酸之二個以上的組合。

組合經導入前述之「氫隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原的結合活性會變化之至少一個胺基酸殘基」的重鏈可變區域與作爲隨機化可變區域序列分子庫而被製造之輕鏈可變區域或具有生殖細胞系列之序列的輕鏈可變區域的情況時，亦與前述同樣地，亦能夠以柔性殘基包含於該重鏈可變區域之序列中的方式來設計。本發明之抗原結合分子對抗原的結合活性，只要係隨著氫離子濃度之條件不同而變化，則該柔性殘基之數目及位置並不限定爲特定之態樣。亦即、可於重鏈之 CDR 序列及/或 FR 序列中包含一個或其以上之柔性殘基。又，作爲「隨著氫離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原之結合活性會變化的胺基酸殘基」以外之重鏈可變區域之 CDR1、CDR2 及/或 CDR3 的胺基酸序列，亦可適當地使用隨機化可變區域分子庫。又，使用生殖細胞系列之序列作爲輕鏈可變區域時，可列舉例如，序列編號：6(Vk1)、序列編號：7(Vk2)、序列編號：8(Vk3)、序列編號：9(Vk4)等之生殖細胞系列的序列作爲非限定的例子。

作爲前述之隨著氫離子濃度之條件不同，抗原結合

分子對抗原之結合活性會變化的胺基酸殘基，任意之胺基酸殘基均可適合使用，作爲如此之胺基酸殘基，具體而言可列舉側鏈之 pKa 爲 4.0-8.0 的胺基酸。作爲如此之具有電子供與性的胺基酸，除了組胺酸或麩胺酸等天然胺基酸外，可適當舉例組胺酸類似物(US20090035836)或 m-NO2-Tyr (pKa 7.45)、3,5-Br2-Tyr (pKa 7.21)或 3,5-I2-Tyr (pKa 7.38)等非天然之胺基酸(Bioorg. Med. Chem. (2003) 11(17), 3761-2768。又，該胺基酸殘基之特別適合的例子，可列舉側鏈之 pKa 爲 5.5-7.0 之胺基酸。作爲如此之具有電子供與性的胺基酸，，可適當舉例組胺酸。

爲了改變抗原結合結構域之胺基酸，可適當採用部位特異性變異誘發法(Kunkel 等人(Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82, 488-492))或 Overlap extension PCR 等之公知方法。又，作爲取代爲天然胺基酸以外之胺基酸的胺基酸改變方法，亦可採用複數個公知方法(Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. (2006)35, 225-249、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003)100(11), 6353-6357)。例如，亦適合使用含有使非天然胺基酸及與終止密碼子之 1 的 UAG 密碼子(琥珀(amber)密碼子)互補的琥珀抑制子 tRNA 經結合之 tRNA 的無細胞轉譯系統(Clover Direct(Protein Express))等。

所組合之輕鏈可變區域的之例子，可適當列舉隨機化可變區域分子庫。隨機化可變區域分子庫之製造方法係適當地組合公知的方法。本發明之非限定的其一態樣中，基

於經特定抗原誘發免疫之動物、感染症患者或經疫苗接種而使血中抗體價上昇的人類、癌患者、來自自體免疫疾病之淋巴球的抗體基因所構築之免疫分子庫，亦可適合作爲隨機化可變區域分子庫來使用。

又，本發明之非限定的其一態樣中，基因體 DNA 中之 V 基因或經再構築之有功能性之 V 基因的 CDR 序列，經包含編碼適當長度之密碼子組之序列的合成寡核苷酸組取代之合成分子庫，亦可適當地使用作爲隨機化可變區域分子庫。此時，由觀察到重鏈 CDR3 之基因序列的多樣性來看，亦可僅取代 CDR3 之序列。抗原結合分子之可變區域中產生出胺基酸之多樣性的基準，係爲使露出於抗原結合分子表面之位置的胺基酸殘基具有多樣性。露出於表面的位置，雖指根據抗原結合分子之構造、構造集團、及/或經模式化之構造，而判斷爲可露出於表面、且/或可與抗原接觸之位置，但一般而言爲其 CDR。較佳爲，露出於表面之位置，係使用如 InsightII 程式(Accelrys)之電腦程式，使用來自抗原結合分子之 3 次元模式的座標來決定。露出於表面之位置，可使用本技術領域公知之演算法(例如，Lee 及 Richards(J. Mol. Biol. (1971)55, 379-400)、Connolly(J. Appl. Cryst. (1983) 16, 548-558))來決定。露出於表面之位置決定，可使用由適合蛋白質結構模擬之軟體及抗體所得之三次元構造資訊來進行。作爲用於如此目的而可利用之軟體，可適當列舉 SYBYL 生體高分子模擬軟體(Tripos Associates)。一般而言，又較佳爲，演算法

必須有使用者之輸入大小參數時，計算時使用的探針的「大小」係設定爲半徑約 1.4 埃以下。進一步地，使用了個人電腦用軟體之露出於表面之區域及面積之決定法，係記載於 Pacios(Comput. Chem. (1994)18(4), 377-386 及 J. Mol. Model.(1995)1, 46-53)。

進一步地，本發明之非限定的其一態樣中，由來自健康人之淋巴球的抗體基因所構築，且其基因譜中不含偏差(bias)之抗體序列之天然序列所構成的天然分子庫，亦可特別適合作爲隨機化可變區域分子庫來使用(Gejima 等人(Human Antibodies(2002)11, 121-129)及 Cardoso 等人(Scand. J. Immunol. (2000)51, 337-344))。

隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原之結合活性會變化之胺基酸殘基以外的胺基酸，只要本發明之抗原結合分子會與抗原結合，可使用任意之胺基酸，較適合的例子可適當地應用 J. D. Marks 等人(J. Mol. Biol. (1991)222, 581-597)等之公知的抗體噬菌體展示分子庫技術。亦即，隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原之結合活性會變化之胺基酸殘基以外的胺基酸序列，係採用上述之抗體噬菌體庫。

本發明之彼此序列互異的複數個抗原結合分子之記載中「彼此序列互異的」之用語，意指分子庫中各抗原結合分子之序列互相不同。亦即，分子庫中互相不同之序列的數目，係反映分子庫中之序列不同的獨立殖株(clone)數目，有時亦稱爲「分子庫大小(library size)」。通常之噬

菌體展示分子庫中爲 10^6 至 10^{12}、藉由應用核糖體展示法等公知之技術，可使分子庫大小擴大爲 10^{14}。但是，噬菌體庫之篩選選擇時所使用之噬菌體粒子的實際數目，通常係比分子庫大小大 10 至 10,000 倍。此過量之倍數，亦稱爲「分子庫當量數」，表示具有同樣胺基酸序列之各殖株可存在 10 至 10,000 個。因而本發明中之「彼此序列互異的」之用語，意指除了分子庫當量數以外之分子庫中的各抗原結合分子之序列互相不同、更具體而言，係指彼此序列互異的抗原結合分子存在有 10^6 至 10^{14} 分子、較佳爲 10^7 至 10^{12} 分子、更佳爲 10^8 至 10^{11}、特佳爲 10^8 至 10^{10} 個。

又，本發明之主要由複數個抗原結合分子所構成之分子庫的記載中之「複數個」之用語，例如在本發明之抗原結合分子、融合多肽、聚核苷酸分子、載體或病毒，通常係指其物質之 2 個以上種類的集合。例如，若某 2 個以上之物質在關於特定生物性質上互相不同，則表示其物質存在有 2 種以上。作爲例子，可列舉於胺基酸序列中之特定胺基酸位置觀察到的變異體胺基酸。例如，柔性殘基以外、或露出於表面之非常多樣的胺基酸位置之特定變異體胺基酸以外係實質相同、較佳爲具有同一序列之本發明的 2 個以上抗原結合分子的情況時，則本發明之抗原結合分子係存在複數個。在其他實施例中，若除了編碼柔性殘基之鹼基以外、或編碼露出於表面之非常多樣的胺基酸位置之特定的變異體胺基酸之鹼基以外係實質相同，較佳係具

有同一序列之本發明的 2 個以上之聚核苷酸分子的話，則本發明之聚核苷酸分子係存在複數個。

進一步，本發明之主要由複數個抗原結合分子所構成之分子庫之記載中之「主要由...構成」之用語，係反映分子庫中之序列不同的獨立殖株數目中，隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原之結合活性不同之抗原結合分子的數目。具體而言，較佳顯示如此之結合活性的抗原結合分子於分子庫中至少存在有 10^4 分子。又，更佳本發明係提供顯示如此之結合活性的抗原結合分子至少存在有 10^5 分子的分子庫。又更佳本發明係提供顯示如此之結合活性的抗原結合分子至少存在有 10^6 分子的分子庫。特佳本發明係提供顯示如此之結合活性的抗原結合分子至少存在有 10^7 分子的分子庫。又，較佳本發明係提供顯示如此之結合活性的抗原結合分子至少存在有 10^8 分子的分子庫。於別的表述中，分子庫中之序列相異之獨立殖株之數目中，亦可適合地表述作爲隨著離子濃度之條件不同抗原結合分子對抗原之結合活性會不同之抗原結合分子的比例。具體而言，本發明係提供含有顯示如此之結合活性的抗原結合分子在分子庫中之序列不同之獨立殖株的數目之 0.1%至 80%、較佳爲 0.5%至 60%、更佳爲 1%至 40%、又更佳爲 2%至 20%、特佳爲 4%至 10%之分子庫。融合多肽、聚核苷酸分子或載體的情況時，亦與上述同樣地，能夠以分子數目或分子全體中之比例來表述。又，病毒的情況時，亦與上述同樣地，能夠以病毒個體數目數或個體全

體中之比例來表述。

包含抗原結合分子之融合多肽

本發明之其一實施形態中，可製造本發明之抗原結合分子與異種多肽之融合分子。在一實施形態中，融合多肽可與病毒外殼蛋白質，例如由 pIII、pVIII、pVII、pIX、Soc、Hoc、gpD、pVI 及其變異體所構成群組中選擇之病毒外殼蛋白質的至少一部分融合。

在一實施形態中，本發明之抗原結合分子可爲 ScFv、Fab 片段、F(ab)2 或 F(ab')2，因此在其他之一實施形態中，係提供主要由該等之抗原結合分子與異種多肽的融合分子，且爲彼此序列互異的複數個融合分子所構成之分子庫。具體而言，係提供該等之抗原結合分子與病毒外殼蛋白質，例如與由 pIII、pVIII、pVII、pIX、Soc、Hoc、gpD、pVI 及其變異體所構成之群組中選擇之病毒外殼蛋白質的至少一部分融合之融合蛋白質，且主要由彼此序列互異的複數個融合分子所構成之分子庫。本發明之抗原結合分子可進一步包含二聚體化結構域。在一實施形態中，前述二聚體化結構域可存在於抗體之重鏈或輕鏈之可變區域與病毒外殼蛋白質的至少一部分之間。此二聚體化結構域中可包含二聚體化序列之至少 1 個、及/或包含 1 個或複數之半胱胺酸殘基之序列。此二聚體化結構域較佳可爲與重鏈可變區域或恆定區域之 C 末端連結。二聚體化結構域係隨著前述抗體可變區域被作爲與病毒之外殼蛋白

質成分的融合蛋白質成分而製造(二聚體化結構域之後不具有琥珀終止密碼子)與否，或者前述抗體可變區域主要不含有病毒外殼蛋白質成分來製造(例如，二聚體化結構域之後具有琥珀終止密碼子)與否，而可採取各種構造。當前述抗體可變區域主要係作爲與病毒之外殼蛋白質成分的融合蛋白質而被製造時，係藉由 1 個或複數之雙硫鍵及/或單一之二聚體化序列來進行二價展現。當本發明之抗原結合分子主要爲不與病毒之外殼蛋白質成分融合而被製造之抗體可變區域(例如，具有琥珀終止密碼子)的情況時，較佳爲具有含有半胱胺酸殘基與二聚體化序列之兩者的二聚體化結構域。在一實施形態中，F(ab)2 之重鏈，係藉由不含絞鏈區域之二聚體化結構域而被二聚體化。此二聚體化結構域中，可包含例如公知之 GCN4 序列：GRMKQLEDKVEELLSKNYHLENEVARLKKLVGERG(序列編號：12)等的白胺酸拉鍊序列。

編碼抗原結合分子之聚核苷酸

用以製造編碼抗原結合分子之聚核苷酸之寡核苷酸或引子組，可使用標準之方法來合成。例如，可藉由固相法來合成包含由密碼子組提供之核苷酸三字密碼之所有可能的組合，且包含編碼所期望之胺基酸群之序列的一組寡核苷酸。因此，具有特定之密碼子組的合成寡核苷酸組，一般而言係包含不同序列之複數個寡核苷酸，此相異係來自序列全體中之密碼子組。具有在某位置被選擇之「簡併」

核苷酸之寡核苷酸的合成，爲所屬技術領域中公知。具有如此之某種密碼子組的核苷酸組，可使用市售之核酸合成劑(Applied Biosystems)來合成、或爲可獲得其市售品(例如，Life Technologies)。如本發明中所使用之寡核苷酸係具有可對可變結構域核酸模板雜交之序列，亦可包含可用於選殖之限制酵素部位。

分子庫可藉由使用上游及下游之寡核苷酸組來生成。各寡核苷酸組係具有具備藉由於寡核苷酸序列內提供之密碼子組而確立的不同序列之複數個寡核苷酸。上游及下游之寡核苷酸組，能夠與可變結構域模板核酸序列一起使用於製造 PCR 產物之「分子庫」。PCR 產物係能夠使用經確立之分子生物學的手法，與其他之相關、或無關之核酸序列，例如編碼病毒之外殼蛋白質構成成分及二聚體化結構域之核酸序列融合，因此如此之寡核苷酸組亦有時稱爲「核酸匣(nucleic acid cassette)」。

PCR 引子序列，係包含爲了露出於抗原結合分子之表面且非常多樣之柔性殘基所設計之 1 個或複數個密碼子組。如前所述，密碼子組係用於編碼所期望之變異體胺基酸之一組不同的核苷酸三字密碼序列。又，寡核苷酸組之序列的長度係用以與模板核酸雜交所充分的長度，又，雖非必須，但可包含限制部位。DNA 模板係由來自噬菌體 M13 載體之載體、或包含 Viera 等人(Meth. Enzymol. (1987) 153, 3)所記載之單鏈噬菌體之複製起點的載體所生成。如此地，欲進行突變的 DNA，係爲了生成單鏈模板而插入該

等載體之一。單鏈模板之生產，係記載於 Sambrook 等之教科書。

又，於本發明之非限定的一實施態樣中記載之將經選擇之胺基酸導入抗原結合分子之方法，在本技術領域已被確立，其中數個係記載於本說明書中。例如，可使用 Kunkel 等人(Methods Enzymol. (1987)154, 367-382)之 Kunkel 方法，可藉由導入於露出於至少 1 個抗原結合分子之表面及/或「隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原的結合活性會變化之至少一個胺基酸殘基」或非常多樣之柔性殘基，來製造分子庫。例如，藉由經導入本發明之「隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原的結合活性會變化之至少一個胺基酸殘基」之輕鏈可變區域與作爲隨機化可變區域序列分子庫而被製造之重鏈可變區域的組合，在製造本發明之包含複數個彼此序列互異的抗原結合分子之分子庫時，可適當採用如此方法。作爲如此之非限定的例子，金屬離子爲鈣離子時，可列舉製造例如序列編號：6(Vk1)、序列編號：7(Vk2)、序列編號：8(Vk3)、序列編號：9(Vk4)等之生殖細胞系列的特定殘基被取代爲「鈣隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原的結合活性會變化之至少一個胺基酸殘基」之輕鏈可變區域序列，可於如此之輕鏈可變區域的製造中採用如此之方法。

此時，作爲用以製造核酸匣之模板，可使用寡核苷酸組，作爲使用可變區域之核酸模板(template)序列的 PCR

反應之引子。可變區域之模板序列，係包含對象核酸序列(亦即、編碼作爲取代之對象之胺基酸的核酸序列)之免疫球蛋白的輕鏈或重鏈的任何部分均可適合使用。以前述例子來說，可使用序列編號：6(Vk1)、序列編號：7(Vk2)、序列編號：8(Vk3)、序列編號：9(Vk4)等之生殖細胞系列的可變區域作爲模板序列。可變區域之模板序列，至少包含可變區域之一部分、且包含至少 1 個 CDR。隨情況不同，可變區域之模板序列係包含複數個 CDR。可變區域之模板序列的上游部及下游部，可作爲上游區域之寡核苷酸組及下游區域之寡核苷酸組的構成部分之雜交的對象。上游之引子組的第 1 寡核苷酸可與第 1 核酸鏈雜交、下游之引子組的第 2 寡核苷酸可與第 2 核酸鏈雜交。寡核苷酸引子係包含 1 個或複數個密碼子組，可設計爲與可變區域之模板序列的一部分雜交。藉由使用該等寡核苷酸，於 PCR 後可將 2 個以上之密碼子組導入於 PCR 產物(亦即核酸匣)中。與編碼抗體可變區域之核酸序列區域雜交之寡核苷酸引子，可包含編碼作爲胺基酸取代之對象的 CDR 殘基之部分。

又，本發明之非限定的一實施態樣中記載之將經選擇之胺基酸導入抗原結合分子之方法，如本說明書中所記載的，亦可適當採用 Overlap Extension PCR 法(WO1993003151)。藉由導入露出於至少 1 個抗原結合分子之表面及/或「隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原的結合活性會變化之至少一個胺基酸殘基」或非常多樣之柔性殘基，

可製造分子庫。Overlap Extension PCR 法中所使用之上游區域及下游區域的寡核苷酸組中，可一起包含「隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原的結合活性會變化之至少一個胺基酸殘基」或非常多樣之柔性殘基、及用以與可變區域之模板序列雜交所充分長的框架序列。

例如，爲了製造本發明之非限定的一實施態樣中記載之編碼經導入「隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原的結合活性會變化之至少一個胺基酸殘基」之輕鏈可變區域的聚核苷酸分子，係製造編碼該胺基酸殘基之密碼子組及附加地編碼柔性殘基之密碼子組的寡核苷酸組。於該寡核苷酸組中，用以與可變區域之模板序列雜交所充分長的框架序列係與其上游或下游連結爲同一讀框。

例如，於輕鏈可變區域之 CDR2 及 CDR3 中導入該胺基酸殘基或附加的柔性殘基時，係製造編碼鄰接於 CDR2 之充分長度之 FR2 之胺基酸序列的寡核苷酸連結於寡核苷酸組之 5'末端、編碼鄰接於 CDR2 之 FR3 之胺基酸序列的寡核苷酸連結於 3'末端之引子。進一步地，亦製造編碼鄰接於 CDR3 之充分長度之 FR4 的胺基酸序列的寡核苷酸連結於與寡核苷酸組互補的寡核苷酸組之 5'末端、編碼鄰接於 CDR3 之 FR3 之胺基酸序列的寡核苷酸連結於 3'末端之互補引子。當包含編碼該引子之 FR3 的胺基酸之寡核苷酸與編碼該互補引子之 FR3 的胺基酸之寡核苷酸以能夠互相雜交之程度的長度重疊之序列時、藉由於模板序列不存在的條件下之 PCR 反應，可製造於 CDR2 及 CDR3 導入該胺

基酸殘基或附加的柔性殘基之輕鏈可變區域。不包含如此之重疊序列時，例如藉由將序列編號：6(Vk1)、序列編號：7(Vk2)、序列編號：8(Vk3)、序列編號：9(Vk4)等之生殖細胞系列的可變區域作爲模板序列的 PCR 反應，可同樣地製造於 CDR2 及 CDR3 導入該胺基酸殘基或附加的柔性殘基之輕鏈可變區域。

例如，於輕鏈可變區域之 CDR3 導入該胺基酸殘基或附加的柔性殘基，來製造包含 CDR1 及 CDR2 經隨機化之可變區域的分子庫時，藉由使用使編碼鄰接於 CDR3 之充分長度的 FR4 之胺基酸序列之寡核苷酸連結於與寡核苷酸組互補的寡核苷酸組之 5’末端、使編碼鄰接於 CDR3 之 FR3 的胺基酸序列之寡核苷酸連結於 3’末端的引子；與具有編碼 FR1 之核苷酸序列的引子，且以包含天然序列等經隨機化之可變區域之分子庫作爲模板序列的 PCR，可同樣地於 CDR2 導入該胺基酸殘基及附加的柔性殘基、製造編碼經隨機化之 CDR1 及 CDR2 之輕鏈可變區域的聚核苷酸之分子庫。於上述輕鏈中導入「隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原的結合活性會變化之至少一個胺基酸殘基」及/或柔性殘基之聚核苷酸分子庫的製造方法，在用以製造於重鏈導入該胺基酸殘基及附加的柔性殘基之聚核苷酸分子庫時亦可適當採用。

又，能夠以於寡核苷酸序列內包含限制部位的方式來合成上游區域及下游區域之寡核苷酸組。該等之限制部位，係使得核酸匣(亦即 PCR 反應生成物)容易插入具有進

一步抗體序列之表現載體。較佳爲，以在限制部位不導入外來核酸序列、或不去除原本之 CDR 或框架核酸序列下，使核酸匣之選殖變容易的方式來設計。

爲了表現構成被製造之本發明之抗原結合分子的輕鏈或重鏈序列之一部分或全部，可將核酸匣選殖於適當的載體。依據本發明詳述之方法，核酸匣係選殖於可生產與病毒外殼蛋白質之全部或一部分融合之輕鏈或重鏈序列之一部分或全部(亦即，形成融合蛋白質)的載體。如後所述，如此之載體，可爲以前述融合蛋白質展現於粒子或細胞表面的方式來設計之表現載體。爲了如此之目的，獲得了數種載體，該等係用於本發明之實施，然本說明書中較佳使用之載體爲噬粒載體。如所屬技術領域中具有通常知識者所公知的，噬粒載體中通常可含有包含啓動子、訊息序列等控制序列、表現型選擇基因、複製起點部位及其他必要構成成分之各種構成成分。

表現特定之變異體胺基酸的組合之非限定的實施形態中，核酸匣中，可編碼重鏈或輕鏈可變區域之全部或一部分。例如，以本發明之非限定的其一態樣之「隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原的結合活性會變化之至少一個胺基酸殘基」及/或柔性殘基係包含於重鏈之 CDR3 中的方式來設計時，在製造具有重鏈 CDR3 之序列多樣性的核酸匣後，可連結於編碼天然序列等之經隨機化之可變區域的核酸匣。如分子庫的情況，爲了製造包含該等之變異體胺基酸或變異體胺基酸之組合的抗原結合分

子，核酸匣可插入包含進一步之抗體序列、例如包含輕鏈及重鏈可變區域之可變或恆定區域的全部或一部分之表現載體。該等之進一步之抗原結合分子之序列係與其他核酸序列、例如編碼病毒外殼蛋白質構成成分之序列融合，結果，可生產融合蛋白質。

載體

本發明之非限定的其一態樣中，係包含含有編碼基因融合之核酸序列之可複製的表現載體，前述基因融合，係與病毒外殼蛋白質之全部或一部分融合，且編碼包含 1 個抗原結合分子之可變區域、或編碼包含 1 個抗原結合分子之可變區域與 1 個恆定區域之融合蛋白質。如前所述，亦包含多樣且可複製之表現載體的分子庫，該分子庫係包含編碼含有以多樣序列生成之彼此序列互異的複數個抗原結合分子之可變區域的複數個不同融合蛋白質之複數個基因融合。載體可包含各種構成成分，較佳爲以使抗原結合分子之可變區域可於不同載體之間移動的方式、及/或以不同形式展現融合蛋白質的方式來構築。

載體之例子可適合列舉噬菌體載體。噬菌體載體具有可形成噬菌體複製及噬菌體粒子之噬菌體複製起點。噬菌體較佳可列舉包含 M13、f1、fd、Pf3 噬菌體或其衍生物之纖維狀噬菌體；或包含 λ、21、phi80、phi81、82、424、434、其他、或其衍生物之 λ 型噬菌體作爲適合的例子。

病毒外殼蛋白質之例子，係包含感染性蛋白質 PIII、主外殼蛋白質 PVIII、pVII、pIX、Soc(T4)、Hoc(T4)、gpD(噬菌體 λ)、次要噬菌體外殼蛋白質 6(pVI)(纖維狀噬菌體(J. Immunol. Methods. (1999)231(1-2), 39-51)、M13 噬菌體主外殼蛋白質變異體(P8)(Protein Sci. (2000)9(4), 647-654))。融合蛋白質係展現於噬菌體表面，適當的噬菌體系係包含 M13KO7 輔助噬菌體(helper phage)、M13R408、M13-VCS 及 Phi X 174、pJuFo 噬菌體系(J. Virol. (2001) 75(15), 7107-7113)、超噬菌體(hyper phage)(Nat. Biotechnol. (2001) 19(1), 75-78)、KM13(Fold Des. (1998)3 (5), 321-328)。較佳之輔助噬菌體爲 M13KO7、較佳之外殼蛋白質爲 M13 噬菌體基因 III 外殼蛋白質。較佳之宿主爲大腸菌、及大腸菌之蛋白酶缺損株。例如 fth1 載體(Nucleic Acids Res. (2001) 29(10) e50)等載體，可有用於融合蛋白質之表現。

表現載體亦可包含與編碼抗原結合分子之重鏈可變區域或輕鏈可變區域或其片段的 DNA 融合之分泌訊息序列。此序列典型而言係位於編碼融合蛋白質之基因所鄰接之 5'側，因此係於融合蛋白質之胺基末端轉錄。但是，有的情況下，證明了訊息序列係在編碼欲分泌之蛋白質的基因之 5'以外之位置。此序列係以其橫切細菌細胞之內膜而結合的蛋白質作爲對象。編碼訊息序列之 DNA 可由編碼具有訊息序列之蛋白質的基因之任一者中作爲限制核酸內切酶片段而得到。原核生物之適當訊息序列，亦可使用例

如編碼 LamB 或 OmpF(Wong 等人(Gene(1983), 68(2), 193-203)、MalE、PhoA 之基因及其他基因。用以實施本發明之較佳原核生物訊息序列，爲 Chang 等人(Gene(1987) 55(2-3), 189-196)記載之大腸菌耐熱性腸毒素 II(STII)訊息序列、pelB 及 malE。

載體一般而言係包含啓動子，作爲促進融合蛋白質表現之控制序列。原核生物載體中一般使用的啓動子包含 lac Z 啓動子系、鹼性磷酸酶 pho A 啓動子(Ap)、噬菌體 λPL 啓動子(溫度感受性啓動子)、tac 啓動子(藉由 lac 抑制子所控制之混成 trp-lac 啓動子)、色胺酸啓動子、pBAD 啓動子及噬菌體 T7 啓動子。關於啓動子之總論，係記載於前述 Sambrook 等人之教科書。該等爲最一般使用之啓動子，但亦同樣地可使用其他適當之微生物啓動子。

又，載體可包含其他核酸序列、例如，gD 標籤、c-Myc 抗原決定部位、聚組胺酸標籤、螢光蛋白質(例如，GFP)或編碼有用於檢測或純化於噬菌體或細胞表面表現之融合蛋白質的 β-半乳糖苷酶蛋白質之序列。例如，藉由編碼 gD 標籤之核酸序列，可正或負地選擇表現融合蛋白質之細胞或病毒。在數個實施形態中，gD 標籤較佳爲與不與病毒外殼蛋白質之構成成分融合之抗原結合分子的可變區域融合。例如，編碼聚組胺酸標誌之核酸序列，有益於鑑定包含使用免疫組織化學手法而與特異的抗原結合之抗原結合分子的可變區域之融合蛋白質。抗原結合之檢測所有用的標籤，可與不與病毒外殼蛋白質構成成分融合之抗原

結合分子的可變區域、或與融合於病毒外殼蛋白質構成成分之抗原結合分子的可變區域融合。

實施本發明所用之載體的其他有用構成成分，可適合列舉表現型選擇基因。典型的表現型選擇基因，係編碼賦予宿主細胞抗生素耐受性之蛋白質的基因。作爲如此的例子，可適合使用安比西林耐受性基因(ampr)及四環黴素耐受性基因(tetr)等。

載體亦可包含含有獨特之限制部位及抑制性終止密碼子的核酸序列。獨特之限制部位係有用於在不同載體及表現系統之間使抗原結合分子的可變區域移動。特別是有用於生產細胞培養之全長的抗原結合分子或抗原結合片段。抑制性終止密碼子係有用於調節融合蛋白質之表現水準，使可溶型之抗原結合分子片段易於純化。例如，琥珀終止密碼子在可進行噬菌體展示之 supE 宿主中可轉譯爲 Gln，在非 supE 宿主中，其被解釋爲產生不與噬菌體外殼蛋白質融合之可溶型抗原結合分子之片段的終止密碼子。該等之合成序列，可與載體內之 1 個或複數個抗原結合分子之可變區域融合。

可適合使用可將編碼目標之抗原結合分子序列之核酸輕易地由載體取出而接入其他載體之載體。例如，爲了使編碼本發明之抗原結合分子或其可變區域之核酸序列的取出變得容易，可將適當的限制部位接入載體。通常爲了使有效率的切出及對新載體之接合變得容易，而在載體內選擇特別的限制序列。抗原結合分子或其可變區域，可作爲

其後外來之融合序列、例如具有不含病毒外殼蛋白質或其他序列標籤之構造的分子而由載體表現。

編碼抗原結合分子之可變區域或恆定區域的核酸(基因 1)與病毒之外殼蛋白質構成成分(基因 2)之間，可插入編碼終結或終止密碼子之 DNA。如此之終結密碼子係包含 UAG(琥珀)、UAA(赭石，ochre)及 UGA(蛋白石，opal)。(Davis 等人(Microbiology (1980), 237, 245-247, 374 Harper & Row, New York))。於野生型宿主細胞表現之終結或終止密碼子，係帶來基因 2 蛋白質所不結合之基因 1 蛋白質產物的合成。但是，藉由於抑制宿主細胞之增殖，會合成能夠檢測之量的融合蛋白質。如此之抑制宿主細胞爲公知，記載有大腸菌抑制基因株(Bullock 等人(BioTechniques(1987)5, 376-379))等。如此之終結密碼子，可插入編碼融合多肽之 mRNA 中。

抑制性密碼子可插入編碼抗原結合分子之可變或恆定區域的第 1 基因與編碼噬菌體外殼蛋白質之至少一部分的第 2 基因之間。或者，抑制性終結密碼子可藉由取代抗原結合分子可變區域之最後的胺基酸三字密碼或噬菌體外殼蛋白質之最初的胺基酸，以鄰接於融合部位而插入。抑制性終結密碼子可插入於二聚體化結構域之 C 末端或其之後。包含抑制性密碼子之質體在抑制子宿主細胞中複製時，係生產含有可檢測量之多肽及外殼蛋白質之融合多肽。質體在非抑制子宿主細胞中複製時，因爲經插入之抑制性三字密碼 UAG、UAA 或 UGA 中的轉譯終結，故抗原

結合分子之可變區域係實質上不與噬菌體外殼蛋白質融合地來合成。因而，在非抑制子細胞中表現之抗原結合分子的可變區域，因爲不含固定於宿主細胞膜之融合噬菌體外殼蛋白質，故合成後係由宿主細胞分泌。

抗原結合分子之輕鏈及/或重鏈之可變區域或恆定區域，可與在病毒粒子或細胞表面之 1 個或複數個合多肽能夠相互作用之胜肽序列進一步地融合。該等胜肽序列，在本說明書中稱爲「二聚體化結構域」。二聚體化結構域，可含有至少 1 個或複數之二聚體化序列、或含有半胱胺酸殘基之序列的至少 1 個、或其兩者。適當的二聚體化序列，每隔一定的間隔存在有疏水殘基，含有具有因各蛋白質之疏水殘基的相互作用而可形成二聚體之兩親媒性的 α 螺旋之蛋白質的該等。如此之蛋白質及蛋白質部分係包含例如白胺酸拉鍊(leucine zipper)區域。二聚體化結構域，亦可包含 1 個或複數個半胱胺酸殘基(例如，藉由於二聚體化結構域內含有抗體絞鏈序列而提供)。半胱胺酸殘基可進行因形成 1 個或複數個雙硫鍵所致之二聚體化。終止密碼子存在於二聚體化結構域之後方的一實施形態中，二聚體化結構域至少包含 1 個半胱胺酸殘基。二聚體化結構域較佳爲位於抗體可變或恆定結構域與病毒外殼蛋白質構成成分之間。

隨情況不同，載體係編碼包含融合於例如外殼蛋白質之重鏈及輕鏈之可變區域的單鏈形態之單一抗原結合分子之噬菌體多肽。該等情況時，載體可認爲係爲在某

種啓動子之控制下表現 1 個轉錄產物之「一作用子性(monocistronic)」。重鏈可變區域及輕鏈可變區域之間具有連結子胜肽，可舉例爲了促進編碼 VL 及 VH 結構域之一作用子性序列的表現而利用鹼性磷酸酶(AP)或 Tac 啓動子之載體。如此之作用子序列，於 5'末端係與大腸菌之 malE 或耐熱性腸毒素 II(STII)訊息序列連結、於 3'末端係與(例如，pIII 蛋白質等之)病毒外殼蛋白質的全部或一部分連結。於幾個實施形態中，載體於第 2 可變區域序列與病毒外殼蛋白質序列之間的其 3'末端可進一步包含如以編碼(例如白胺酸拉鍊等之)二聚體化結構域之序列編號：12 所示之序列。

其他情況時，重鏈及輕鏈之可變區域係作爲各別之多肽表現，如此之載體爲「二作用子性」，可表現各自的轉錄產物。該等載體中，適當之啓動子、例如 tac 或 PhoA 啓動子可利用於促進二作用子性 mRNA 之表現。例如，編碼輕鏈可變區域及恆定區域之第 1 作用子係於 5'末端連結大腸菌之 malE、pelB 或耐熱性腸毒素 II(STII)訊息序列、於 3'末端係連結編碼 gD 標籤之核酸序列。例如，編碼重鏈可變區域及恆定區域 CH1 之第 2 作用子，係於 5'末端連結大腸菌之 malE 或耐熱性腸毒素 II(STII)訊息序列、於 3'末端係連結病毒外殼蛋白質之全部或一部分。

生成二作用子性 mRNA，展現 F(ab')2-pIII 之載體中，例如，適當的啓動子、例如 tac 或 PhoA(AP)啓動子，於 5'末端係與大腸菌 malE 或耐熱性腸毒素 II(STII)訊息

序列連結而成爲能夠作用、於 3'末端係促進編碼與編碼 gD 標籤之核酸序列連結之輕鏈可變區域及恆定區域的第 1 作用子的表現。第 2 作用子係例如於 5'末端編碼與大腸菌之 malE 或耐熱性腸毒素 II(STII)訊息序列連結而成爲能夠作用之重鏈可變區域及恆定區域、於 3'末端係包含 IgG 絞鏈序列及白胺酸拉鍊序列、且進一步於其後方包含含有至少一部分病毒外殼蛋白質之二聚體化結構域。

融合多肽之展現

抗原結合分子之可變區域的融合多肽，能夠於細胞、病毒或噬粒粒子之表面以各種態樣展現。該等態樣中包含單鏈 Fv 片段(scFv)、F(ab)片段及該等片段之多價形態。多價形態較佳爲 ScFv、Fab 或 F(ab')之二聚體，該等在本說明書中分別稱爲(ScFv)2、F(ab)2 及 F(ab')2。多價形態展現較佳的理由之一，可認爲係藉由多價形態的展現，通常可鑑定低親和性殖株、或係在選擇過程中具有可更有效率地選擇稀有殖株之複數個抗原結合部位。

於噬菌體表面展現包含抗體片段之融合多肽的方法爲本技術領域中公知，例如記載於 WO1992001047 及本說明書。其他於 WO1992020791、WO1993006213、WO1993011236 及 1993019172 亦記載了相關方法，所屬技術領域中具有通常知識者可適當使用該等方法。其他公知文獻(H. R. Hoogenboom & G.Winter (1992)J. Mol. Biol. 227, 381-388、WO1993006213 及 WO1993011236)中，顯示了經人

工再配置之可變區域基因基因譜的抗體對於噬菌體表面展現之各種抗原之鑑定。

爲了以 scFv 態樣來展現而構築載體時，編碼抗原結合分子之輕鏈可變區域及重鏈可變區域之核酸序列係包含於此載體中。一般而言，編碼抗原結合分子之重鏈可變區域的核酸序列，係與病毒外殼蛋白質構成成分融合。編碼抗原結合分子之輕鏈可變區域的核酸序列，係藉由編碼胜肽連結子之核酸序列而連結於抗原結合分子之重鏈可變區域。胜肽連結子一般而言包含約 5 至 15 個胺基酸。任意地，例如編碼有用於純化或檢測之標誌之其他序列，可與編碼抗原結合分子之輕鏈可變區域或抗原結合分子之重鏈可變區域之任一者或兩者之核酸序列的 3'末端融合。

爲了以 F(ab)態樣來展現而構築載體時，編碼抗原結合分子之可變區域及抗原結合分子之恆定區域的核酸序列係包含於此載體中。編碼輕鏈可變區域之核酸，係與編碼輕鏈恆定區域之核酸序列融合。編碼抗原結合分子之重鏈可變區域的核酸序列，係與編碼重鏈恆定 CH1 區域之核酸序列融合。一般而言，編碼重鏈可變區域及恆定區域之核酸序列，係與編碼病毒外殼蛋白質之全部或一部分的核酸序列融合。重鏈可變區域及恆定區域較佳爲作爲與病毒外殼蛋白質之至少一部分的融合體來表現，輕鏈可變區域及恆定區域。係與重鏈病毒外殼融合蛋白質各自表現。重鏈及輕鏈互相結合，其結合可爲共價鍵或非共價鍵。任意地，例如編碼有用於純化或檢測之多肽標誌之其他序列，

可與編碼抗原結合分子之輕鏈恆定區域或抗原結合分子之重鏈恆定區域任一者或兩者的核酸序列 3'末端融合。

載體對宿主細胞之導入

如前述方式構築之載體，係爲了放大及/或表現而導入宿主細胞。載體可藉由包括電穿孔、磷酸鈣沈澱等之公知轉形法，以導入宿主細胞。載體爲如病毒之感染性粒子時，載體本身會入侵宿主細胞。藉由以經插入編碼融合蛋白質之聚核苷酸的可複製表現載體來轉染宿主細胞及以公知手法來生產噬菌體粒子，融合蛋白質會展現在噬菌體粒子表面。

可複製之表現載體，可使用各種方法來導入宿主細胞。在非限定的其一實施態樣中，載體可如 WO2000106717 所記載，使用電穿孔法導入細胞。細胞係在標準培養液中任意於 37℃培養約 6 至 48 小時(或至 600 nm 之 OD 成爲 0.6 至 0.8)，接著藉由將培養液離心分離(例如藉由傾析)由培養上清液中取出。在純化之初期階段中，較佳爲在緩衝液(例如 1.0 mM 之 HEPES(pH7.4))中使細胞沈澱物再懸濁。接著藉由再度的離心分離，由懸濁液取出上清液。所得之細胞沈澱物係再懸濁於例如稀釋爲 5-20%V/V 之甘油。藉由再度離心分離而由懸濁液中去除上清液藉以得到細胞沈澱物。基於將該細胞沈澱物再懸濁於水或稀釋之甘油中而得之菌體濃度的測定值，使用水或稀釋之甘油，將最終菌體濃度調製爲所期望之濃度。

例如，作爲較佳之受體細胞，可列舉電穿孔勝任之大腸菌株 SS320(Sidhu 等人(Methods Enzymol. (2000)328, 333-363))。在使生殖性游離副體(episome)(F'質體)或 XL1-BLUE 轉移至 MC1061 細胞所充分之條件下，使 MC1061 細胞與 XL1-BLUE 細胞交接而調製大腸菌株 SS320。對寄存於 ATCC(10801 University Boulevard, Manassas, Virginia)之大腸菌株 SS320 賦予寄存編號 98795。以此菌株使噬菌體複製成爲可能之任何 F'游離副體均可用於本發明。適當之游離副體可由寄存於 ATCC 之株獲得、或由市售品亦可獲得(TG1，CJ236、CSH18、DHF'、ER2738、JM101、JM103、JM105、JM107、JM109、JM110、KS1000、XL1-BLUE、71-18 等)。

以電穿孔使用更高 DNA 濃度(約 10 倍)時，轉形率會提高、對宿主細胞轉形之 DNA 量會增加。使用高菌體濃度亦會使效率提高(約 10 倍)。藉由轉移之 DNA 量的增加，可製造具有更大多樣性，且序列不同之獨立殖株數目大之分子庫。轉形細胞通常係藉由於含有抗生素之培養基上的增殖與否來選擇。

隨著條件不同，結合活性會變化之抗原結合分子的選擇方法及編碼該分子之聚核苷酸的單離方法

用以鑑定對抗原顯示所期望之結合活性之抗原結合分子的噬菌體展示之使用方法，亦包含施加各種改變之方法，於本技術領域已然確立。於非限定之其一態樣中，以

包含與編碼融合多肽之基因融合體連結爲能夠作用之轉錄調節要素的方式構築之可複製載體之分子庫，係對適當之宿主細胞轉形。培養經轉形之細胞，形成將前述融合多肽展現於噬菌體粒子表面之噬菌體粒子。之後，以在選擇過程中使結合之粒子集團相較於不與抗原結合之粒子增加爲目的，實施伴隨著以至少粒子集團之一部分與抗原結合的方式使重組體噬菌體粒子與對象抗原接觸之選擇、區分的「選擇結合分子」步驟。爲了以不同或相同反應條件將同一集團進一步篩選 1 次，係將區分之集團，例如對新鮮之 XL1-Blue 細胞等宿主細胞感染，藉以放大該集團。接著，實施將所得之抗原結合分子經放大的集團、在不同離子濃度之條件下與抗原接觸的步驟，以所期望之條件來篩選與抗原結合之抗原結合分子。又，可將在不同離子濃度之條件下與抗原接觸的步驟作爲前述選擇方法之最初步驟來實施、亦可將「選擇結合分子」步驟與選擇在離子濃度不同的條件下結合活性會變化之結合分子的步驟的組合作適當變更。又，前述之選擇及區分的步驟係不管實施幾次均可。在該等之離子濃度不同的條件下，與抗原結合之抗原結合分子，在對生體投與時，係有用於作爲具有將病因抗原迅速由生體去除之能力之治療藥。

本發明之包含隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原之結合活性會變化之胺基酸及/或柔性殘基之可變區域或其一部分的融合多肽，係表現於噬菌體、噬粒粒子或細胞之表面。接著可對於離子濃度不同的條件下之融

合多肽之集團中構成成員與抗原結合的能力進行選擇及/或區分。對融合多肽選擇、區分及篩選之方法，亦包含與如與 protein L 或噬菌體上展現之抗原結合分子或其片段結合的標誌抗體之抗原結合分子可變區域具有親和性之一般的蛋白質上的選擇、區分及篩選方法。如此方法可使用於使展現正確摺疊之抗原結合分子(包含該抗原結合分子之融合多肽)之片段之分子庫大小或分子庫當量數變豐富。

爲了進行前述之選擇、區分及篩選，可使用 2 個主要方法。第 1 方法爲固體載劑方法、盤篩選(plate screening)或固定化抗原篩選、第 2 方法爲溶液結合方法。

「固體載劑方法」中，抗原可與本技術領域公知之適當固體或半固體介質，例如洋菜糖珠、丙烯醯胺珠、玻璃珠、纖維素、各種丙烯酸共聚合物、甲基丙烯酸羥基烷基凝膠、聚丙烯酸及聚甲基丙烯酸共聚合物、尼龍、中性及離子性載劑等結合。抗原對介質之結合，可藉由 Methods in Enzymology(1976)44 記載之方法、或本技術領域公知之其他手段來達成。

抗原對介質結合後，在噬菌體粒子集團之至少 1 個次組(subset)與固定化抗原之結合所適合的條件下，使經固定化之抗原與表現融合多肽之分子庫接觸。通常，包含 pH、離子強度、溫度等之條件，係選擇模仿生理學條件之條件。與前述之固定化抗原結合的粒子(「結合體」)，係藉由水洗而與不與對象結合的粒子分離。洗淨條件可調節

爲使高親和性結合體以外之全部均被去除。結合體可藉由各種方法由經固定化之對象解離。該等方法包含例如使用過量抗原等之野生型配位子的競爭性解離、pH 及/或離子強度的變更、以及本技術領域公知之方法。結合體一般可藉由如 0.1 M之 HCl等酸或配位子的適當溶出材料而由親和性介質溶出。藉由使配位子濃度上昇而溶出，亦可使經展現之親和性更高的結合分子溶出。

藉由使經單離之結合體的病毒粒子(及、例如病毒粒子爲噬粒粒子的情況時依需要的輔助噬菌體)感染細胞，能夠以適當宿主細胞再放大結合體。如此方式得到之宿主細胞係在適合放大展現所期望之融合多肽之粒子的條件下培養。接著採取噬菌體粒子，將選擇步驟重複 1 次或複數次直到抗原之結合體佔相當比例爲止。選擇或篩選不管進行幾次均可。作爲選擇或篩選方法之一，亦可包含單離抗存在於 protein L 或被展現之多肽的多肽標籤之抗體、例如抗 gD 蛋白質或聚組胺酸標籤之抗體之與一般親和性蛋白質結合之結合體。

作爲本發明之其一態樣，可適當使用稱爲「溶液結合方法」之溶液相篩選法。爲了由隨機之分子庫中、或由以改善所期望之結合殖株或殖株群之結合活性爲目的之分子庫中得到經改善之結合體，可使用溶液結合方法。複數之多肽、例如展現於噬菌體或噬粒粒子(分子庫)上之多肽、與經標籤分子標誌之抗原或與標籤分子融合之抗原的接觸，係包含於此方法中。標籤可利用生物素或其

他特異性結合體。使用於第 1 溶液結合相中濃度階段性減低之經標誌抗原或經融合抗原，可變化溶液相之嚴格度(stringency)。再者爲了提高嚴格度，亦可適當實施與在第 1 溶液相中經最初標籤分子標誌之抗原或與標誌標籤分子融合之抗原結合之後，與具有不經標籤分子標誌之抗原或不與標誌標籤分子融合之高濃度抗原的第 2 溶液相追加地接觸。此時，通常於第 2 相中係使用不經標誌對象之 100 至 1000 倍量的標籤分子標誌之抗原或不與標誌標籤分子融合之抗原。第 1 溶液相之培養時間，至達到平衡爲止係爲 2、3 分鐘至 1、2 小時或其以上之範圍。結合速度快的結合體係有具有在該第 1 相中之結合時間短的性質之傾向，故可採用結合時間短之接觸條件。第 2 相培養時間及溫度，可爲了使嚴格度增高而變化。藉由如此變化培養條件，會產生對於由對象離開速度(解離速度)慢的結合體之選擇偏差。使展現於噬菌體/噬粒粒子上之複數個多肽與抗原接觸後，與經標籤分子標誌之抗原或與標誌標籤分子融合之抗原結合之噬菌體或噬粒粒子，會由不結合之噬菌體或噬粒粒子分離。以與經標籤分子標誌之抗原或與標誌標籤分子融合之抗原的結合成爲可能之範圍，使噬菌體或噬粒粒子與抗原接觸短時間(例如 2～5 分鐘)，藉以由溶液相單離噬菌體或噬粒粒子與抗原之混合物。經標籤分子標誌之抗原或與標誌標籤分子融合之抗原的初期濃度之範圍爲約 0.1 nM 至約 1000 nM。由該混合物溶出之粒子，可爲了接下來的篩選而增殖。於各次篩選中，較佳爲使用經標

籤分子標誌之抗原或與標誌標籤分子融合之低濃度抗原重複複數次篩選篩選。如後述實施例所記載，使用生物素作爲標誌標籤分子時，於溶液結合方法中可適當使用塗覆有鏈黴蛋白素(streptavidin)之磁珠等。

固體載劑方法與溶液結合方法之組合，可爲了單離具有所期望之特性的結合體，適當地單獨或組合來實施。對抗原重複選擇及篩選2次、3次或4次後，通常係爲了鑑定具有所期望之性質/特性之特異性結合體，實行由經選擇之集團篩選各個殖株。較佳爲，篩選之過程，可藉由能夠對分子庫進行高通量篩選之自動化系統來實行。

藉由對抗原之結合來鑑定結合體後，可由該結合體萃取核酸。經萃取之 DNA 接著係直接用於轉形大腸菌宿主細胞。或者，其編碼序列可藉由例如 PCR 使用適當的引子來放大後，藉由典型的定序方法決定其序列。接著爲了表現其編碼之抗原結合分子，編碼結合體之可變區域的DNA，可插入使用限制酵素消化之載體中。

爲了選擇、篩選會表現本發明之隨著離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原之結合活性會變化之抗原結合分子或其融合多肽的噬菌體粒子，藉由使經固定化之抗原與包含表現抗原結合分子或融合多肽之噬菌體粒子的分子庫接觸之條件變化，會區分對抗原的結合活性會變化之噬菌體粒子集團。

例如，作爲金屬離子之適合例子，著眼於鈣離子的情況時，作爲鈣離子濃度之條件可列舉低鈣離子濃度之條件

與高鈣離子濃度之條件。隨著鈣離子濃度之條件不同，結合活性會變化，意指隨著低鈣離子濃度與高鈣離子濃度之條件的不同，抗原結合分子對抗原之結合活性會變化。例如，可列舉高鈣離子濃度之條件下抗原結合分子對抗原之結合活性比低鈣離子濃度之條件下抗原結合分子對抗原之結合活性高的情況。又，亦可列舉低鈣離子濃度之條件下抗原結合分子對抗原之結合活性比高鈣離子濃度之條件下抗原結合分子對抗原之結合活性高的情況。

本說明書中，高鈣離子濃度雖非特別以單一定義之數值來限定，較適合可爲由 100μM 至 10mM 之間選擇的濃度。又，其他態樣中，亦可爲由 200μM 至 5mM 之間選擇的濃度。又，不同態樣中，亦可爲由 500μM 至 2.5mM 之間選擇的濃度，其他態樣中，亦可爲由 200μM 至 2mM 之間選擇的濃度。再者亦可爲由 400μM 至 1.5mM 之間選擇的濃度。特別適合可列舉接近於生體內之血漿中(血中)的鈣離子濃度之由 500μM 至 2.5mM 之間所選擇的濃度。

本說明書中，低鈣離子濃度雖非特別以單一定義之數值來限定，較適合可爲由 0.1μM 至 30μM 之間選擇的濃度。又，其他態樣中，可爲由 0.2μM 至 20μM 之間選擇的濃度。又，不同態樣中，亦可爲由 0.5μM 至 10μM 之間選擇的濃度，其他態樣中，亦可爲由 1μM 至 5μM 之間選擇的濃度。再者亦可爲由 2μM 至 4μM 之間選擇的濃度。特別適合可列舉接近於生體內之於早期內體內的離子化鈣濃度之由 1μM 至 5μM 之間所選擇的濃度。

本發明中，抗原結合分子在低鈣離子濃度條件下之對抗原的結合活性比在高鈣離子濃度條件下之對抗原的結合活性低，意指抗原結合分子在由 0.1μM 至 30μM 之間所選擇的鈣離子濃度下對抗原之結合活性，比在由 100μM 至 10mM 之間所選擇的鈣離子濃度下對抗原之結合活性更弱。較佳爲意指抗原結合分子在由 0.5μM 至 10μM 之間所選擇的鈣離子濃度下對抗原的結合活性，比在由 200μM 至 5mM 之間所選擇的鈣離子濃度下對抗原的結合活性更弱；特佳爲意指於生體內之於早期內體內的鈣離子濃度之抗原結合活性，比生體內之血漿中的鈣離子濃度之抗原結合活性更弱，具體而言，意指抗原結合分子在由 1μM 至 5μM 之間所選擇的鈣離子濃度下對抗原的結合活性，比在由 500μM 至 2.5mM 之間所選擇的鈣離子濃度下對抗原的結合活性更弱。

例如，爲了選擇、篩選表現抗原結合分子在高鈣離子濃度條件下之對抗原的結合活性比抗原結合分子在低鈣離子濃度條件下之對抗原的結合活性高之抗原結合分子或其融合多肽的噬菌體粒子，最初係在高鈣濃度條件下區分結合於經固定化之抗原之噬菌體粒子集團後，將其經區分之集團與抗原在低鈣濃度條件下經固定化之抗原與包含表現抗原結合分子或融合多肽之噬菌體粒子的分子庫接觸。不結合於在低鈣濃度條件下經固定化之抗原的噬菌體粒子係區分於上清液或其後之洗淨液。高鈣濃度及低鈣濃度之條件，可在上述記載之範圍內適當採用。於非限定之其一態

樣中，可基於在由 0.1μM 至 30μM 之間選擇之鈣離子濃度下對抗原的結合與在由 100μM 至 10mM 之間選擇之鈣離子濃度下對抗原的結合活性的不同來區分。又，在別的非限定態樣中可基於在由 0.5μM 至 10μM 之間選擇之鈣離子濃度下對抗原的結合與在由 200μM 至 5mM 之間選擇之鈣離子濃度下對抗原的結合活性的不同來區分。進一步在別的非限定態樣中，可基於在生體內之早期內體內的鈣離子濃度下對抗原的結合、與在生體內之血漿中的鈣離子濃度下對抗原的結合活性的不同、具體而言，可基於在由 1μM 至 5μM 之間選擇之鈣離子濃度下對抗原的結合、與在由 500μM 至 2.5mM 之間選擇之鈣離子濃度下對抗原的結合活性的不同來區分。

例如，作爲離子濃度之適合的例子，著眼於氫離子濃度的情況時，作爲氫離子濃度之條件可列舉 pH 酸性區域之條件與 pH 中性區域之條件。隨著 pH 之條件不同而結合活性會變化，意指隨著 pH 酸性區域與 pH 中性區域之條件不同，抗原結合分子對抗原之結合活性會變化。例如，可列舉 pH 中性區域之條件下抗原結合分子對抗原的結合活性比 pH 酸性區域之條件下抗原結合分子對抗原的結合活性更高的情況。又，亦可列舉 pH 酸性區域之條件下抗原結合分子對抗原的結合活性比 pH 中性區域之條件下抗原結合分子對抗原的結合活性更高的情況。

本說明書中，pH 中性區域雖非特別以單一定義之數值來限定，較適合可由 pH6.7 至 pH10.0 之間來選擇。

又，其他態樣中，可由 pH6.7 至 pH9.5 之間來選擇。又，不同態樣中，可由 pH7.0 至 pH9.0 之間來選擇，其他態樣中，可由 pH7.0 至 pH8.0 之間來選擇。特別適合可列舉接近於生體內之血漿中(血中)的 pH 之 pH7.4。

本說明書中，pH 酸性區域雖非特別以單一定義之數值來限定，較適合可由 pH4.0 至 pH6.5 之間來選擇。又，其他態樣中，可由 pH4.5 至 pH6.5 之間來選擇。又，不同態樣中，可由 pH5.0 至 pH6.5 之間來選擇，其他態樣中，可由 pH5.5 至 pH6.5 之間來選擇。特別適合可列舉接近於生體內之於早期內體內的離子化鈣濃度之 pH5.8。

本發明中，抗原結合分子在 pH 酸性區域條件下對抗原的結合活性比在 pH 中性區域條件下對抗原的結合活性低，意指抗原結合分子於由 pH4.0 至 pH6.5 之間選擇之 pH 中對抗原的結合活性，比由 pH6.7 至 pH10.0 之間選擇之 pH 中對抗原的結合活性更弱。較佳爲意指抗原結合分子於由 pH4.5 至 pH6.5 之間選擇之 pH 中對抗原的結合活性，比由 pH6.7 至 pH9.5 之間選擇之 pH 中對抗原的結合活性更弱；更佳爲意指抗原結合分子於由 pH5.0 至 pH6.5 之間選擇之 pH 中對抗原的結合活性，比由 pH7.0 至 pH9.0 之間選擇之 pH 中對抗原的結合活性更弱。又，又更佳爲意指抗原結合分子於由 pH5.5 至 pH6.5 之間選擇之 pH 中對抗原的結合活性，比由 pH7.0 至 pH8.0 之間選擇之 pH 中對抗原的結合活性更弱。較佳爲意指於生體內之於早期內體內的 pH 中之抗原結合活性，比於生體內之於

血漿中的 pH 中之抗原結合活性更弱，具體而言，意指抗原結合分子於 pH5.8 時對抗原的結合活性，比於 pH7.4 時對抗原的結合活性更弱。

隨著 pH 條件不同，抗原結合分子對抗原之結合活性是否變化，係根據例如前述之不同 pH 條件下之結合活性的測定方法來實施。例如，爲了確認於 pH 中性區域之條件下抗原結合分子對抗原之結合活性，比於 pH 酸性區域之條件下抗原結合分子對抗原的結合活性變得更高，係比較於 pH 酸性區域及 pH 中性區域之條件下抗原結合分子對抗原之結合活性。

例如，爲了選擇、篩選表現 pH 中性區域之條件下抗原結合分子對抗原的結合活性比 pH 酸性區域之條件下抗原結合分子對抗原的結合活性更高之抗原結合分子或其融合多肽的噬菌體粒子，最初係在 pH 中性區域條件下區分結合於經固定化之抗原之噬菌體粒子集團後，將其經區分之集團與抗原在 pH 酸性區域條件下經固定化之抗原與包含表現抗原結合分子或融合多肽之噬菌體粒子的分子庫接觸。不結合於在 pH 酸性區域條件下經固定化之抗原的噬菌體粒子係區分於上清液或其後之洗淨液。pH 中性區域及 pH 酸性區域之條件，可在上述記載之範圍內適當採用。於非限定之其一態樣中，可基於在 pH4.0 至 pH6.5 之間選擇之 pH 下對抗原的結合與在由 pH6.7 至 pH10.0 之間選擇之 pH 下對抗原的結合活性的不同來區分。又，在別的非限定之態樣中，可基於在 pH4.5 至 pH6.5 之間選擇之

pH 下對抗原的結合與在由 pH6.7 至 pH9.5 之間選擇之 pH 下對抗原的結合活性的不同來區分。進一步地，在別的非限定之態樣中，可基於在 pH5.0 至 pH6.5 之間選擇之 pH 下對抗原的結合與在由 pH7.0 至 pH9.0 之間選擇之 pH 下對抗原的結合活性的不同來區分。其他，可基於在 pH5.5 至 pH6.5 之間選擇之 pH 下對抗原的結合與在由 pH7.0 至 pH8.0 之間選擇之 pH 下對抗原的結合活性的不同來區分。進一步在別的非限定態樣中，可基於在生體內之早期內體內之 pH 下對抗原的結合與在生體內之血漿中的 pH 下對抗原的結合活性的不同、具體而言，在 pH5.8 下對抗原的結合與在 pH7.4 下對抗原的結合活性的不同來區分。

隨著條件不同，結合活性會變化之抗原結合分子的製造方法

本發明之非限定的其一態樣中，藉由如前述選擇之條件來單離編碼結合活性會變化之抗原結合分子分子的聚核苷酸後，該聚核苷酸係插入於適當之表現載體中。亦即，在得到編碼目標之抗原結合分子的可變區域之 cDNA 後，藉由認識插入於該 cDNA 之兩末端的限制酵素位置之限制酵素來消化該 cDNA。較佳的限制酵素係認識而消化於構成抗原結合分子基因之鹼基序列中出現頻率低之鹼基序列。爲了進一步將 1 複本之消化片段以對載體正確的方向插入，較佳爲插入賦予黏性末端之限制酵素。藉由將編碼經上述方式消化之抗原結合分子之可變區域之 cDNA 插入適當的表現載體，可取得本發明之抗原結合分子的表現載

體。此時，編碼抗體恆定區域(C 區域)之基因、與編碼前述可變區域之基因可融合爲同一讀框。

爲了製造所期望之抗原結合分子，編碼抗原結合分子之聚核苷酸係以與控制序列連結而成爲能夠作用的態樣以接入表現載體。控制序列，係含有例如促進子或啓動子。又，可於胺基末端附加適當的訊息序列，使表現的抗原結合分子分泌至細胞外。例如，作爲訊息序列可使用具有胺基酸序列 MGWSCIILFLVATATGVHS(序列編號：13)之胜肽，但此外亦可附加適合的訊息序列。經表現之多肽係在上述序列之羧基末端部分切斷，經切斷之多肽可作爲成熟多肽而分泌至細胞外。接著，藉由以此表現載體對適當之宿主細胞轉形，可取得表現編碼所期望之抗原結合分子之聚核苷酸的重組細胞。

爲了表現編碼抗原結合分子之聚核苷酸，編碼抗原結合分子之重鏈及輕鏈的聚核苷酸，係分別接入不同的表現載體。藉由接入有重鏈與輕鏈之載體，對相同宿主細胞同時轉形(co-transfect)，可表現具備重鏈與輕鏈之抗體分子。或可藉由使編碼重鏈及輕鏈之聚核苷酸接入單一之表現載體，使宿主細胞轉形(參照 WO19994011523)。

用以藉由將經單離之編碼抗原結合分子之聚核苷酸導入適當的宿主而製造抗原結合分子之宿主細胞與表現載體之多數組合已爲公知。該等表現系統，均可應用於單離本發明之抗原結合分子。使用真核細胞作爲宿主細胞時，可適當使用動物細胞、植物細胞、或真菌細胞。具體而言，

作為動物細胞可舉例如下之細胞。

(1)哺乳類細胞：CHO(Chinese hamster ovary cell line)、COS(Monkey kidney cell line)、骨髓瘤(Sp2/O、NS0等)、BHK(baby hamster kidney cell line)、HEK293(human embryonic kidney cell line with sheared adenovirus(Ad)5 DNA)、PER.C6 cell(human embryonic retinal cell line transformed with the Adenovirus Type 5(Ad5)E1A and E1B genes)、Hela、Vero、等(Current Protocols in Protein Science(May, 2001, Unit 5.9, Table 5.9.1))

(2)兩生類細胞：非洲爪蟾卵母細胞等

(3)昆蟲細胞：sf9、sf21、Tn5等

或者，作為植物細胞，來自菸草(Nicotiana tabacum)等之菸草(Nicotiana)屬之細胞的抗體基因表現系統為公知。植物細胞之轉形，可適當地利用經癒傷組織培養之細胞。

進一步地，作為真菌細胞。可利用如下之細胞。

-酵母：啤酒酵母(Saccharomyces serevisiae)等之酵母菌(Saccharomyces)屬、甲醇利用酵母(Pichia pastoris)等之Pichia屬

-絲狀菌：黑麴菌(Aspergillus niger)等之麴菌(Aspergillus)屬

又，利用了原核細胞之編碼抗原結合分子之聚核苷酸的表現系統亦為公知。例如，使用細菌細胞時，可適當利用大腸菌(E. coli)、枯草菌等之細菌細胞。藉由轉形而導入包含作為目標之編碼抗原結合分子之聚核苷酸的表現載

體於該等細胞中。藉由將經轉形之細胞在 in vitro 培養，可由該轉形細胞之培養物中取得所期望之抗原結合分子。

重組抗原結合分子之產生，在上述宿主細胞之外，亦可利用基因轉殖動物。亦即可由經導入編碼所期望之編碼抗原結合分子之聚核苷酸之動物中得到該抗原結合分子。例如，可於編碼乳汁中固有而產生之蛋白質的基因內部插入爲同一讀框而作爲融合基因來構築編碼抗原結合分子之聚核苷酸。作爲分泌於乳汁中之蛋白質，例如可利用山羊β酪蛋白等。包含經插入編碼抗原結合分子之聚核苷酸之融合基因的 DNA 片段被注入山羊之胚，該經注入之胚係被導入雌之山羊。由自接受胚之山羊所產生之基因轉殖山羊(或其子孫)所產生的乳汁中，可作爲與乳汁蛋白質之融合蛋白質而取得所期望之抗原結合分子。又，爲了增加含有由基因轉殖山羊所產生之所期望之抗原結合分子的乳汁量，可對基因轉殖山羊投與激素(Bio/Technology(1994), 12(7), 699-702)。

當對人類投與本說明書中所記載之抗原結合分子時，作爲該分子中之抗原結合結構域，可適當地採用以使對人類之異種抗原性降低等爲目的，而來自經人爲改變之基因重組型抗體的抗原結合結構域。基因重組型抗體係包含例如人類化(Humanized)抗體等。該等之改變抗原結合分子，可使用公知之方法適當地製造。

用於製造本說明書中所記載之抗原結合分子中的抗原結合結構域的抗原結合分子之可變區域，通常係以夾在 4 個框

架區域(FR)當中之 3 個互補性決定區域(complementarity-determining region; CDR)所構成。CDR 係爲實質上決定抗原結合分子之結合特異性的區域。CDR 之胺基酸序列富有多樣性。另一方面，構成 FR 之胺基酸序列，在具有不同之結合特異性的抗原結合分子之間，亦常顯示高度的同一性。因此，一般而言，藉由 CDR 之移植，可將某抗原結合分子之結合特異性移植到其他抗原結合分子。

人類化抗體亦稱爲再構成(reshaped)人類抗體。具體而言，將人類以外之動物、例如小鼠抗體之 CDR 移植到人類抗體之人類化抗體等係爲公知。亦已知用以得到人類化抗體之一般的基因重組手法。具體而言，作爲用以將小鼠之抗體 CDR 移植至人類 FR 之方法，例如 Overlap Extension PCR 係爲公知。Overlap Extension PCR 中，係於用以合成人類抗體之 FR 的引子，附加編碼欲移植之小鼠抗體 CDR 的鹼基序列。準備各別 4 個 FR 之引子。一般而言，於將小鼠 CDR 對人類 FR 之移植當中，選擇與小鼠 FR 同一性高之人類 FR，係於 CDR 之功能維持上有利。亦即，一般而言，較佳爲利用由與鄰接於欲移植之小鼠 CDR 的 FR 胺基酸序列同一性高的胺基酸序列所構成之人類 FR。

又，所連結之鹼基序列，係設計爲互以同一讀框連接。藉由各引子而個別地合成人類 FR。結果，可得到於各 FR 附加有編碼小鼠 CDR 之 DNA 的產物。編碼各產物之小鼠 CDR 的鹼基序列，係設計爲互相重疊。接著，使以人類抗體基因爲模板而合成之產物所重疊的 CDR 部分

互相黏著，進行互補鏈合成反應。藉由此反應，人類 FR 會透過小鼠 CDR 之序列而連結。

最終連結有 3 個 CDR 與 4 個 FR 之 V 區域基因，係藉由於其 5'末端與 3'末端黏著而附加適當的限制酵素認識序列之引子而放大其全長。藉由插入於表現載體中而使如上述方式得到之 DNA 與編碼人類抗體 C 區域之 DNA 融合爲同一讀框，可製成人類型抗體表現用載體。將該重組載體導入宿主以建立重組細胞後，培養該重組細胞，使編碼該人類化抗體之 DNA 表現，藉以於該培養細胞之培養物中產生該人類化抗體(EP239400、WO1996002576)。

定性或定量地測定如上述方式製造之人類化抗體之對抗原的結合活性並評估，藉以可適當地選擇透過 CDR 連結時該 CDR 會形成良好的抗原結合部位之人類抗體 FR。亦可依照需要，取代 FR 之胺基酸殘基，使得再構成人類抗體之 CDR 形成適當的抗原結合部位。例如，可應用使用了小鼠 CDR 對人類 FR 之移植所用的 PCR 法，來於 FR 導入胺基酸序列之變異。具體而言，可於黏著於 FR 的引子中導入部分鹼基序列之變異。於藉由如此引子而合成之 FR 導入鹼基序列之變異。藉由以上述方法測定並評估經取代胺基酸之變異型抗體對抗原之結合活性，可選擇具有所期望之性質之變異 FR 序列(Sato 等人(Cancer Res (1993)53, 851-856)。

於本發明之非限定的其一態樣中，單離編碼隨著如前述方式選擇之條件，其結合活性會變化之抗原結合分子之

聚核苷酸後，該聚核苷酸之改變體係插入適當的表現載體。作爲如此改變體之一，就隨機化可變區域分子庫而言，可適合列舉藉由使用以合成分子庫或非人類動物作爲起源而製造之免疫分子庫而篩選之本發明的編碼抗原結合分子之聚核苷酸序列經人類化的改變體。經人類化之抗原結合分子之改變體的製造方法，採用與前述人類化抗體之製造方法同樣的方法。

又，改變體的其他態樣，作爲隨機化可變區域分子庫，可適合列舉對經單離之聚核苷酸序列施以使用合成分子庫或天然分子庫藉以篩選之帶來本發明之抗原結合分子對抗原的結合親和性之增強(親和性成熟化)之改變的改變體。如此之改變體可藉由包括 CDR 之變異誘導(Yang 等人(J. Mol. Biol. (1995)254, 392-403))、鏈改組(chain shuffling)(Marks 等人(Bio/Technology (1992)10, 779-783))、E. coli 變異誘發株之使用(Low 等人(J. Mol. Biol. (1996)250, 359-368))、DNA 改組(Patten 等人(Curr. Opin. Biotechnol. (1997)8, 724-733))、噬菌體展示(Thompson 等人(J. Mol. Biol. (1996)256, 77-88))及有性 PCR(sexual PCR)(Clameri 等人(Nature(1998)391, 288-291))之各種親和性成熟化的公知順序來取得。

如前所述，藉由本發明之製造方法所製造之抗原結合分子，可列舉包含 FcRn(特別是人類 FcRn)結合結構域之抗原結合分子，但可使用各種改變體作爲 FcRn(特別是人類 FcRn)結合結構域。具有編碼如此之 FcRn(特別是人類

FcRn)結合結構域之改變體的聚核苷酸、與編碼藉由如前述方式選擇之條件條件其結合活性會變化之抗原結合分子分子之聚核苷酸連結爲同一讀框之重鏈的編碼抗原結合分子之聚核苷酸，亦可作爲本發明之改變體的其一態樣而適當地列舉。

本發明之非限定的其一態樣中，作爲 FcRn(特別是人類 FcRn)結合結構域，可適合列舉例如，以序列編號：14表示之 IgG1(於 N 末端附加 Ala 之 AAC82527.1)、以序列編號：15 表示之 IgG2(於 N 末端附加 Ala 之 AAB59393.1)、以序列編號：16 表示之 IgG3(CAA27268.1)、以序列編號：17 表示之 IgG4(於 N 末端附加 Ala 之 AAB59394.1)等之抗體恆定區域。IgG 分子之血漿中滯留性比較長(由血漿中消失慢)，係因爲已知爲 IgG 分子的補救受體之 FcRn 發揮功能所致。藉由胞飲作用而攝入內體之 IgG 分子，係結合於在內體內之酸性條件下表現於內體內的 FcRn。無法結合於 FcRn 之 IgG 分子係進入溶體，於該處分解，結合於 FcRn 之 IgG 分子會移動至細胞表面，於血漿中之中性條件下藉由自 FcRn 解離而再度回到血漿中。

於血漿中之高鈣濃度條件下對抗原強力結合、且在內體內之低鈣濃度條件下由抗原解離之本發明之「隨著鈣離子濃度之條件不同對抗原的結合活性會變化之抗原結合分子」在內體內可由抗原解離。於血漿中之高鈣濃度條件下對抗原強力結合、且在內體內之低鈣濃度條件下由抗原解離之本發明之「隨著鈣離子濃度之條件不同對抗原的結合

活性會變化之抗原結合分子」，在解離抗原之後藉由FcRn回收至血漿中時可再度與抗原結合。亦即，1分子之該抗原結合分子可與複數個抗原重複地結合。又，結合於抗原結合分子之抗原不會因在內體內解離而回收至血漿中，因此會促進抗原結合分子所致之抗原對細胞內之攝入，藉由抗原結合分子之投與會促進抗原的消失，可使血漿中之抗原濃度降低。

又，於血漿中之pH中性區域條件下對抗原強力結合、且在內體內之酸性條件下由抗原解離之本發明之「隨著pH條件不同對抗原的結合活性會變化之抗原結合分子」在內體內可由抗原解離。於血漿中之pH中性區域條件下對抗原強力結合、且在內體內之酸性條件下由抗原解離之本發明之「隨著pH條件不同對抗原的結合活性會變化之抗原結合分子」，在解離抗原之後藉由FcRn回收至血漿中時可再度與抗原結合。亦即，1分子之該抗原結合分子可與複數個抗原重複地結合。又，結合於抗原結合分子之抗原不會因在內體內解離而回收至血漿中，因此會促進抗原結合分子所致之抗原對細胞內之攝入，藉由抗原結合分子之投與會促進抗原的消失，可使血漿中之抗原濃度降低。

藉由對在血漿中之高鈣濃度條件下對抗原強力結合、且在內體內之低鈣濃度條件下由抗原解離之本發明之「隨著鈣離子濃度之條件不同對抗原的結合活性會變化之抗原結合分子」賦予在血漿中之高鈣濃度條件下對FcRn之結

合，會促進該抗原結合分子與抗原之複合體對細胞內之攝入。亦即，藉由該抗原結合分子之投與，會促進抗原由血漿中消失，可使血漿中之抗原濃度降低。

又，藉由對在血漿中之 pH 中性區域條件下對抗原強力結合、且在內體內之 pH 酸性條件下由抗原解離之本發明之「隨著 pH 條件不同對抗原的結合活性會變化之抗原結合分子」賦予在血漿中之 pH 中性區域條件下對 FcRn 之結合，會促進該抗原結合分子與抗原之複合體對細胞內之攝入。亦即，藉由該抗原結合分子之投與，會促進抗原由血漿中消失，可使血漿中之抗原濃度降低。

包含通常之 Fc 區域的抗體在血漿中之 pH 中性區域條件下不具有對 FcRn 之結合活性，因此通常之抗體及抗體-抗原複合體係藉由非特異性內吞作用被攝入於細胞中、且在內體內之 pH 酸性區域條件下與 FcRn 結合藉以輸送至細胞表面。FcRn 係將抗體由內體內輸送至細胞表面，因此可認爲 FcRn 之一部分亦存在於細胞表面，但在細胞表面之 pH 中性區域條件下，抗體由 FcRn 解離，因此抗體係被回收到血漿中。

考慮前述之包含 FcRn 結合結構域之 Fc 區域之抗體在生體內之動態時，於血漿中之高鈣濃度條件下對抗原強力結合、且在內體內之低鈣濃度條件下由抗原解離之本發明之「隨著鈣離子濃度之條件不同對抗原的結合活性會變化之抗原結合分子」在血漿中會與抗原結合，且在內體內結合的抗原會解離，因此抗原之消失速度可認爲會變得與非

特異性內吞作用所致之對細胞的攝入速度相等。抗原結合分子對抗原結合之鈣離子濃度依存性不充分時，不於內體內解離之抗原會被回收到血漿中，抗原結合分子對抗原結合之鈣離子濃度依存性充分時，抗原之消失速度之非特異性內吞作用所致之對細胞的攝入係變成速率決定步驟。

又，於血漿中之 pH 中性區域條件下對抗原強力結合、且在內體內之 pH 酸性條件下由抗原解離之本發明之「隨著 pH 條件不同對抗原的結合活性會變化之抗原結合分子」，在血漿中與抗原，且在內體內結合的抗原會解離，因此抗原之消失速度可認爲會變得與非特異性內吞作用所致之對細胞的攝入速度相等。抗原結合分子對抗原結合之 pH 依存性不充分時，不於內體內解離之抗原會被回收到血漿中，抗原結合分子對抗原結合之 pH 依存性充分時，抗原之消失速度之非特異性內吞作用所致之對細胞的攝入係變成速率決定步驟。

因而，藉由對包含 FcRn 結合結構域之抗原結合分子賦予 pH 中性區域中對 FcRn 之結合能力，藉合於存在細胞表面之 FcRn 的該抗原結合分子，係 FcRn 依存性地被攝入於細胞中。透過 FcRn 之對細胞的攝入速度，係比非特異性地內吞作用所致之對細胞之攝入速度快，因此藉由賦予對 pH 中性區域中之 FcRn 的結合能力，能夠使抗原由血漿中之消失速度變得更快。亦即，於 pH 中性區域具有對 FcRn 之結合能力的抗原結合分子，相較於包含通常之(血漿中之 pH 中性區域條件下不具有對 FcRn 之結合活性

之)Fc 區域的抗原結合分子會更快地將抗原送入細胞內，於內體內解離抗原，再度回收至細胞表面或血漿中，於該處再度與抗原結合，或透過 FcRn 被攝入細胞內。藉由提高 pH 中性區域中對 FcRn 之結合能力，可使此循環之循環速度增快，因此使抗原由血漿中消失之速度會增快。進一步地，藉由使抗原結合分子在 pH 酸性區域之抗原結合活性變得比在 pH 中性區域的抗原結合活性更低，可更提高其效率。又，可認爲藉由使 1 分子之抗原結合分子之此循環數增多，可藉由 1 分子之抗原結合分子而結合之抗原數亦增多。

本發明之抗原結合分子，因爲係由抗原結合結構域與 FcRn(特別是人類 FcRn)結合結構域所構成，FcRn 結合結構域對與抗原結合不會帶來影響，又，由上述機制來考慮，與抗原種類無關地，可認爲藉由使抗原結合分子在低鈣離子濃度條件下之抗原結合活性(結合能力)變得比高鈣離子濃度條件下之抗原結合活性低、及/或使於血漿中之 pH 中性區域中對 FcRn 之結合活性增大，可促進抗原結合分子所致之抗原對細胞內之攝入，使抗原之消失速度增快。

又，本發明之抗原結合分子，因爲係由抗原結合結構域與 FcRn 結合結構域所構成，FcRn 結合結構域對與抗原結合不會帶來影響，又，由上述機制來考慮，與抗原種類無關地，可認爲藉由使抗原結合分子在 pH 酸性區域之條件下的抗原結合活性(結合能力)變得比 pH 中性區域之條

件下的抗原結合活性低、及/或使於血漿中之 pH 中性區域中對 FcRn 之結合活性增大，可促進抗原結合分子所致之抗原對細胞內之攝入，使抗原之消失速度增快。

抗體恆定區域等之 FcRn 結合結構域對 FcRn 的結合活性，如前述結合活性之項目中敘述過的，可藉由所屬技術領域中具有通常知識者所公知之方法來測定，對於 pH 以外之條件，可由所屬技術領域中具有通常知識者適當地決定。抗原結合分子之抗原結合活性與人類 FcRn 結合活性，能夠以 KD(Dissociation constant：解離常數)、表觀 KD(Apparent dissociation constant：表觀解離常數)、解離速度之 kd(Dissociation rate：解離速度)、或表觀 kd(Apparent dissociation：表觀解離速度)等來評估。該等可藉由所屬技術領域中具有通常知識者公知之方法來測定。例如可使用 Biacore(GE healthcare)、斯克加圖、流式細胞儀等。

測定抗體恆定區域等之 FcRn 結合結構域對人類 FcRn 的結合活性時之 pH 以外的條件可由所屬技術領域中具有通常知識者適當地選擇，並無特殊限定。例如，可於如 WO2009125825 記載之 MES 緩衝液、37℃之條件下測定。又，抗體恆定區域等之 FcRn 結合結構域對人類 FcRn 的結合活性之測定可藉由所屬技術領域中具有通常知識者公知之方法來進行，例如，可使用 Biacore(GE Healthcare)等來測定。抗體恆定區域等之 FcRn 結合結構域與人類 FcRn 之結合活性的測定，可藉由將 FcRn 結合結構域或包含 FcRn 結合結構域之本發明之抗原結合分子加入經固定化

之晶片，分別將人類 FcRn 或包含 FcRn 結合結構域或 FcRn 結合結構域之本發明之抗原結合分子作爲待分析物(analyte)而流動來評估。

抗體恆定區域等之 FcRn 結合結構域或包含 FcRn 結合結構域之抗原結合分子與 FcRn 之具有結合活性的條件之 pH 中性區域，通常意指 pH6.7～pH10.0。pH 中性區域較佳爲藉由 pH7.0～pH8.0 之任意 pH 值所示範圍；更佳爲由 pH7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、及 8.0 中選擇；特佳爲接近體內(in vivo)之血漿中(血中)之 pH 的 pH7.4。於 pH7.4 下人類 FcRn 結合結構域與人類 FcRn 之結合親和性低因而難以評估其結合親和性的情況時，可使用 pH7.0 來取代 pH7.4。本發明中，人類 FcRn 結合結構域或包含人類 FcRn 結合結構域之抗原結合分子與 FcRn 之具有結合活性的條件之 pH 酸性區域，通常意指 pH4.0～pH6.5。較佳爲意指 pH5.5～pH6.5；特佳爲意指接近體內(in vivo)之早期內體內之 pH 的 pH5.8～pH6.0。關於測定條件所使用之溫度，人類 FcRn 結合結構域或包含人類 FcRn 結合結構域之抗原結合分子與人類 FcRn 之結合親和性，可在 10℃～50℃之任意溫度評估。較佳爲，爲了決定人類 FcRn 結合結構域或包含人類 FcRn 結合結構域之抗原結合分子與人類 FcRn 之結合親和性，而使用 15℃～40℃之溫度。更佳爲，如 20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、及 35℃之任一者之由 20℃至 35℃的任意溫度亦同樣可使用於決定人類 FcRn 結

合結構域或包含人類 FcRn 結合結構域之抗原結合分子與人類 FcRn 之結合親和性。25℃之溫度爲本發明之態樣的非限定的一例。

依照 The Journal of Immunology (2009)182: 7663-7671，天然型人類 IgG1 之人類 FcRn 結合活性，在 pH 酸性區域(pH6.0)爲 KD 1.7μM，在 pH 中性區域中，幾乎無法檢測活性。因而，在較佳態樣中，可篩選包含 pH 酸性區域中人類 FcRn 結合活性爲 KD 20μM 或比其強，pH 中性區域中人類 FcRn 結合活性係與天然型人類 IgG 同等或比其強之抗原結合分子之在 pH 酸性區域及 pH 中性區域具有人類 FcRn 結合活性之本發明之抗原結合分子。在更佳態樣中，可篩選 pH 酸性區域中人類 FcRn 結合活性爲 KD 2.0μM 或比其強，pH 中性區域中人類 FcRn 結合活性爲 KD 40μM 或比其強之抗原結合分子。在又更佳態樣中，可篩選 pH 酸性區域中人類 FcRn 結合活性爲 KD 0.5μM 或比其強，pH 中性區域中人類 FcRn 結合活性爲 KD 15μM 或比其強之抗原結合分子。上述 KD 值係藉由 The Journal of Immunology(2009)182: 7663-7671 記載之方法(將抗原結合分子固定於晶片，將人類 FcRn 作爲待分析物流動)來決定。

本發明中，較佳爲在 pH 酸性區域及 pH 中性區域中具有人類 FcRn 結合活性之 FcRn 結合結構域。該結構域只要係預先於 pH 酸性區域及 pH 中性區域具有人類 FcRn 結合活性之 FcRn 結合結構域，則可直接使用。該結構域在

pH 酸性區域及/或 pH 中性區域不具有人類 FcRn 結合活性或者爲弱的情況時，藉由改變抗原結合分子中之胺基酸，可取得具有對所期望之人類 FcRn 之結合活性之 FcRn 結合結構域，藉由改變人類 FcRn 結合結構域中之胺基酸亦可適合地取得具有 pH 酸性區域及/或 pH 中性區域中具有對所期望之人類 FcRn 之結合活性的 FcRn 結合結構域。又，藉由預先改變於 pH 酸性區域及/或 pH 中性區域中具有人類 FcRn 結合活性之 FcRn 結合結構域中的胺基酸，亦可取得具有對所期望之人類 FcRn 之結合活性的 FcRn 結合結構域。帶來如此之所期望之結合活性的人類 FcRn 結合結構域之胺基酸改變，可藉由比較胺基酸改變前與改變後在 pH 酸性區域及/或 pH 中性區域中之人類 FcRn 結合活性來發現。所屬技術領域中具有通常知識者可使用公知手法適當地實施胺基酸的改變。

本發明中，FcRn 結合結構域之「胺基酸之改變」或「胺基酸改變」，係包括改變爲與起始 FcRn 結合結構域之胺基酸序列不同的胺基酸序列。起始 FcRn 結合結構域之修飾改變體只要在 pH 酸性區域及/或中性區域中可與人類 FcRn 結合(因此，起始 FcRn 結合結構域不一定非得在 pH 酸性區域及/或中性區域條件下對人類 FcRn 具有結合活性)，則任意 FcRn 結合結構域均可使用作爲起始結構域。起始 FcRn 結合結構域之例子可適合列舉 IgG 抗體之恆定區域、亦即由序列編號：14 至 17 之任一者表示之天然型之恆定區域。又，將已施加改變之 FcRn 結合結構域

作為起始 FcRn 結合結構域而施加進一步改變的改變 FcRn 結合結構域亦可適合作為本發明之改變 FcRn 結合結構域來使用。起始 FcRn 結合結構域，可意指多肽本身、包含起始 FcRn 結合結構域之組成物、或編碼起始 FcRn 結合結構域之胺基酸序列。起始 FcRn 結合結構域中可包含於抗體項目中已概說過之藉由重組所產生之公知 IgG 抗體的 FcRn 結合結構域。起始 FcRn 結合結構域之起源雖無限定，但可由非人類動物之任意生物或由人類中取得。較佳任意生物可適合列舉由小鼠、大鼠、天竺鼠、倉鼠、沙鼠、貓、兔子、狗、山羊、羊、牛、馬、駱駝、及非人類靈長類中選擇的生物。在別的態樣中，起始 FcRn 結合結構域亦可由食蟹獼猴、猓猿、恆河猴、黑猩猩、或人類中取得。較佳起始 Fc 區域為由人類 IgG1 中取得，但 IgG 並非限定為特定類型。此係意味著可將人類 IgG1、IgG2、IgG3、或 IgG4 之 Fc 區域作為起始 Fc 區域來適當使用。作為人類 IgG1、人類 IgG2、人類 IgG3、人類 IgG4 Fc 區域者，Sequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No.91-3242 中記載了基因多形所致複數的異型序列，本發明中亦可為其任意者。特別是作為人類 IgG1 之序列者，EU 編號 356-358 號之胺基酸序列可為 DEL 亦可為 EEM。同樣地，本說明書中，意味著可將前述任意生物中之 IgG 的任意類型或次類型之 FcRn 結合結構域較佳作為起始 FcRn 結合結構域來使用。天然存在之 IgG 變異型或經操作之型的例子，雖記載於公知文獻

(Curr. Opin. Biotechnol. (2009)20(6), 685-91、Curr. Opin. Immunol. (2008) 20(4), 460-470、Protein Eng. Des. Sel. (2010)23(4), 195-202、WO2009086320、WO2008092117、WO2007041635、及 WO2006105338)，但不限定於該等。

爲了對包含 FcRn(特別是人類 FcRn)結合結構域之抗原結合分子賦予 pH 中性區域中之對 FcRn(特別是人類 FcRn)之結合能力，可於與 FcRn 之結合相關的 FcRn 結合結構域中之胺基酸中添加適當變異。使用抗體 IgG 分子之恆定區域作爲 FcRn 結合結構域的情況時，可列舉例如，EU 編號表示之 221 位～225 位、227 位、228 位、230 位、232 位、233～241 位、243～252 位、254～260 位、262～272 位、274 位、276 位、278～289 位、291～312 位、315～320 位、324 位、325 位、327～339 位、341 位、343 位、345 位、360 位、362 位、370 位、375～378 位、380 位、382 位、385～387 位、389 位、396 位、414 位、416 位、423 位、424 位、426～438 位、440 位及 442 位之位置的胺基酸改變爲與天然型 IgG 恆定區域相當之胺基酸所不同的恆定區域。更具體而言，可列舉例如 EU 編號表示之 256 位胺基酸爲 Pro、280 位胺基酸爲 Lys、339 位胺基酸爲 Thr、385 位胺基酸爲 His、428 位胺基酸爲 Leu、及/或 434 位胺基酸爲 Trp、Tyr、Phe、Ala 或 His 之任一者的恆定區域改變體。藉由使用該等改變體，可使 IgG 型免疫球蛋白之 Fc 區域在 pH 中性區域中對人類 FcRn 的結合活性增強。

又，亦可適當使用能夠使 pH 酸性區域中對人類 FcRn 之結合變得比天然型 IgG 之恆定區域強之改變體。該等改變體當中，可適當選擇即使於 pH 中性區域亦可使對人類 FcRn 之結合增強的改變體，可使用於本發明。作爲如此之例子，可列舉恆定區域中以 EU 編號表示之胺基酸改變爲與天然型 IgG 恆定區域相當之胺基酸所不同的恆定區域。作爲如此之胺基酸的改變例，可適合使用包含表 1 所列舉之胺基酸之恆定區域的改變體。

[表1]

位置	胺基酸改變
221	Y, K
222	Y
223	E, K
224	Y, E
225	E, K, W
227	K, E, G
228	Y, K, G
230	E, G
232	K
233	R, S, M, T, W, Y, G
234	H, R, E, I, V, F, D, Y, G
235	Y, V, N, S, T, Q, D
236	I, V, K, P, E, Q, H, W, Y, D, T, M, A, F, S, N, R
237	I, W, S, T, E, R, N, Q, K, H, D, P, L, M
238	A, L, D, S, T, H, W, V, I, G, M, F, E, K
239	M, R, T, G, V, E, D, L, A
240	I, M, T
241	E, W, L
243	E, W
244	L
245	R
246	Y, H
247	D
248	Y
249	P, Q, Y, H
250	I, E, Q
251	T, D
252	Y, W, Q
254	H
255	E, Y, H
256	A
257	A, I, M, N, S, V, T, L, Y, C
258	D, Y, H, A
259	I, F, N
260	S, D, E, H, Y
262	L, E
263	I
264	F, A, I, T, N, S, D
265	R, P, G, A
266	I
267	K, E, A
268	E, M
269	M, W, K, P, I, S, G, V, F, Y, A
270	K, S, I, A
271	A, V, S, Y, I, T
272	A, L, R, I, D, H, V, W, Y, P, T
274	M, F, G, E, I, T, N
276	D, F, H, R, L, V, W, A
278	R, S, V, M, N, I, L, D
279	A, D, G, H, M, N, Q, R, S, T, W, Y, C, I
281	D, Y
282	G, K, E, Y
283	A, D, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, W, Y
284	T, L, Q, E
285	N, Y, W, Q, K, E, D, Y
286	F, L, Y, E, P, D, K, A
287	S, H
288	N, P, Y, H, D, I, V, C, E, G, L, Q, R
289	H
291	Q, H
292	Y, E, D
293	V
294	I, K, G
295	V, T
296	E, I, L
298	F, E, T, H

位置	胺基酸改變
299	W, F, H, Y
300	K, A, G, V, M, Q, N, E
301	E
302	I
303	Y, E, A
304	N, T
305	A, H
306	Y
307	A, E, M, G, Q, H
308	A, R, F, C, Y, W, N, H
311	A, I, K, L, M, V, W, T, H
312	A, P, H
315	T, H
316	K
317	A, P, H
318	N, T, R, L, Y
319	L, I, W, H, M, V, A
320	L, W, H, N
324	T, D
325	F, M, D
326	A
327	D, K, M, Y, H, L
328	G, A, W, R, F
329	K, R, W
330	G, W, V, P, H, F
331	L, F, Y
332	F, H, K, L, M, R, S, W, T, Q, E, Y, D, N, V
333	L, F, M, A
334	A
335	H, F, N, V, M, W, I, S, P, L
336	E, K
337	A
338	A
339	N, W
341	P
343	E, H, K, Q, R, T, Y
360	H, A
362	A
375	R
376	A, G, I, M, P, T, V
377	K
378	Q, D, N, W
380	A, N, S, T, Q, R, H
382	A, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y
385	N, E
386	H
387	H, Q
414	A
423	N
424	A
426	H, L, V, R
427	N
428	F
429	Q
430	A, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, Y
431	H, K
432	H
433	P
434	G, T, M, S,
435	K
436	I, L, T
437	H
438	K, L, T, W
440	K
442	K

作爲特佳之胺基酸的改變，可列舉例如以 EU 編號 237 位、238 位、239 位、248 位、250 位、252 位、254 位、255 位、256 位、257 位、258 位、265 位、270 位、286 位、289 位、297 位、298 位、303 位、305 位、307 位、308 位、309 位、311 位、312 位、314 位、315 位、317 位、325 位、332 位、334 位、360 位、376 位、380 位、382 位、384 位、385 位、386 位、387 位、389 位、424 位、428 位、433 位、434 位及 436 位表示之胺基酸取代爲與天然型 IgG 恆定區域相當之胺基酸所不同的胺基酸之改變。藉由將由該等胺基酸中選擇之至少 1 個胺基酸改變爲其他胺基酸，可使 FcRn 結合結構域在 pH 中性區域中對人類 FcRn 的結合活性增高。

作爲特佳之改變，可適合列舉例如，天然型 IgG 之恆定區域之以 EU 編號表示之

237 位胺基酸爲 Met、

238 位胺基酸爲 Ala、

239 位胺基酸爲 Lys、

248 位胺基酸爲 Ile、

250 位胺基酸爲 Ala、Phe、Ile、Met、Gln、Ser、Val、Trp、或 Tyr 之任一者、

252 位胺基酸爲 Phe、Trp、或 Tyr 之任一者、

254 位胺基酸爲 Thr、

255 位胺基酸爲 Glu、

256 位胺基酸爲 Asp、Glu、或 Gln 之任一者、

257 位胺基酸爲 Ala、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr、或 Val之任一者、

258位胺基酸爲 His、

265位胺基酸爲 Ala、

270位胺基酸爲 Phe、

286位胺基酸爲 Ala或 Glu之任一者、

289位胺基酸爲 His、

297位胺基酸爲 Ala、

298位胺基酸爲 Gly、

303位胺基酸爲 Ala、

305位胺基酸爲 Ala、

307 位胺基酸爲 Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、Trp、或 Tyr之任一者、

308位胺基酸爲 Ala、Phe、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、或 Thr之任一者、

309位胺基酸爲 Ala、Asp、Glu、Pro、或 Arg之任一者、

311位胺基酸爲 Ala、His、或 Ile之任一者、

312位胺基酸爲 Ala或 His之任一者、

314位胺基酸爲 Lys或 Arg之任一者、

315位胺基酸爲 Ala或 His之任一者、

317位胺基酸爲 Ala、

325位胺基酸爲 Gly、

332位胺基酸爲 Val、

334 位胺基酸爲 Leu、

360 位胺基酸爲 His、

376 位胺基酸爲 Ala、

380 位胺基酸爲 Ala、

382 位胺基酸爲 Ala、

384 位胺基酸爲 Ala、

385 位胺基酸爲 Asp 或 His 之任一者、

386 位胺基酸爲 Pro、

387 位胺基酸爲 Glu、

389 位胺基酸爲 Ala 或 Ser 之任一者、

424 位胺基酸爲 Ala、

428 位胺基酸爲 Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、Trp、或 Tyr 之任一者、

433 位胺基酸爲 Lys、

434 位胺基酸爲 Ala、Phe、His、Ser、Trp、或 Tyr 之任一者、及

436 位胺基酸爲 His

之改變。又，被改變之胺基酸數目並無特殊限定，可僅改變 1 處之胺基酸、亦可改變 2 處以上之胺基酸。2 處以上胺基酸之改變的組合，可列舉例如表 2 記載之組合。

[表2-1]

變異體	KD (M)	胺基酸改變部位
F1	8.10E-07	N434W
F2	3.20E-06	M252Y/S254T/T256E
F3	2.50E-06	N434Y
F4	5.80E-06	N434S
F5	6.80E-06	N434A
F7	5.60E-06	M252Y
F8	4.20E-06	M252W
F9	1.40E-07	M252Y/S254T/T256E/N434Y
F10	6.90E-08	M252Y/S254T/T256E/N434W
F11	3.10E-07	M252Y/N434Y
F12	1.70E-07	M252Y/N434W
F13	3.20E-07	M252W/N434Y
F14	1.80E-07	M252W/N434W
F19	4.60E-07	P257L/N434Y
F20	4.60E-07	V308F/N434Y
F21	3.00E-08	M252Y/V308P/N434Y
F22	2.00E-06	M428L/N434S
F25	9.20E-09	M252Y/S254T/T256E/V308P/N434W
F26	1.00E-06	I332V
F27	7.40E-06	G237M
F29	1.40E-06	I332V/N434Y
F31	2.80E-06	G237M/V308F
F32	8.00E-07	S254T/N434W
F33	2.30E-06	S254T/N434Y
F34	2.80E-07	T256E/N434W
F35	8.40E-07	T256E/N434Y
F36	3.60E-07	S254T/T256E/N434W
F37	1.10E-06	S254T/T256E/N434Y
F38	1.00E-07	M252Y/S254T/N434W
F39	3.00E-07	M252Y/S254T/N434Y
F40	8.20E-08	M252Y/T256E/N434W
F41	1.50E-07	M252Y/T256E/N434Y
F42	1.00E-06	M252Y/S254T/T256E/N434A
F43	1.70E-06	M252Y/N434A
F44	1.10E-06	M252W/N434A
F47	2.40E-07	M252Y/T256Q/N434W
F48	3.20E-07	M252Y/T256Q/N434Y
F49	5.10E-07	M252F/T256D/N434W
F50	1.20E-06	M252F/T256D/N434Y
F51	8.10E-06	N434F/Y436H
F52	3.10E-06	H433K/N434F/Y436H
F53	1.00E-06	I332V/N434W
F54	8.40E-08	V308P/N434W
F56	9.40E-07	I332V/M428L/N434Y
F57	1.10E-05	G385D/Q386P/N389S
F58	7.70E-07	G385D/Q386P/N389S/N434W
F59	2.40E-06	G385D/Q386P/N389S/N434Y

[表2-2]

F60	1.10E-05	G385H
F61	9.70E-07	G385H/N434W
F62	1.90E-06	G385H/N434Y
F63	2.50E-06	N434F
F64	5.30E-06	N434H
F65	2.90E-07	M252Y/S254T/T256E/N434F
F66	4.30E-07	M252Y/S254T/T256E/N434H
F67	6.30E-07	M252Y/N434F
F68	9.30E-07	M252Y/N434H
F69	5.10E-07	M428L/N434W
F70	1.50E-06	M428L/N434Y
F71	8.30E-08	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434W
F72	2.00E-07	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434Y
F73	1.70E-07	M252Y/M428L/N434W
F74	4.60E-07	M252Y/M428L/N434Y
F75	1.40E-06	M252Y/M428L/N434A
F76	1.00E-06	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434A
F77	9.90E-07	T256E/M428L/N434Y
F78	7.80E-07	S254T/M428L/N434W
F79	5.90E-06	S254T/T256E/N434A
F80	2.70E-06	M252Y/T256Q/N434A
F81	1.60E-06	M252Y/T256E/N434A
F82	1.10E-06	T256Q/N434W
F83	2.60E-06	T256Q/N434Y
F84	2.80E-07	M252W/T256Q/N434W
F85	5.50E-07	M252W/T256Q/N434Y
F86	1.50E-06	S254T/T256Q/N434W
F87	4.30E-06	S254T/T256Q/N434Y
F88	1.90E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434W
F89	3.60E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434Y
F90	1.90E-08	M252Y/T256E/V308P/N434W
F91	4.80E-08	M252Y/V308P/M428L/N434Y
F92	1.10E-08	M252Y/S254T/T256E/V308P/M428L/N434W
F93	7.40E-07	M252W/M428L/N434W
F94	3.70E-07	P257L/M428L/N434Y
F95	2.60E-07	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434F
F99	6.20E-07	M252Y/T256E/N434H
F101	1.10E-07	M252W/T256Q/P257L/N434Y
F103	4.40E-08	P238A/M252Y/V308P/N434Y
F104	3.70E-08	M252Y/D265A/V308P/N434Y
F105	7.50E-08	M252Y/T307A/V308P/N434Y
F106	3.70E-08	M252Y/V303A/V308P/N434Y
F107	3.40E-08	M252Y/V308P/D376A/N434Y
F108	4.10E-08	M252Y/V305A/V308P/N434Y
F109	3.20E-08	M252Y/V308P/Q311A/N434Y
F111	3.20E-08	M252Y/V308P/K317A/N434Y
F112	6.40E-08	M252Y/V308P/E380A/N434Y
F113	3.20E-08	M252Y/V308P/E382A/N434Y

[表2-3]

F114	3.80E-08	M252Y/V308P/S424A/N434Y
F115	6.60E-06	T307A/N434A
F116	8.70E-06	E380A/N434A
F118	1.40E-05	M428L
F119	5.40E-06	T250Q/M428L
F120	6.30E-08	P257L/V308P/M428L/N434Y
F121	1.50E-08	M252Y/T256E/V308P/M428L/N434W
F122	1.20E-07	M252Y/T256E/M428L/N434W
F123	3.00E-08	M252Y/T256E/V308P/N434Y
F124	2.90E-07	M252Y/T256E/M428L/N434Y
F125	2.40E-08	M252Y/S254T/T256E/V308P/M428L/N434Y
F128	1.70E-07	P257L/M428L/N434W
F129	2.20E-07	P257A/M428L/N434Y
F131	3.00E-06	P257G/M428L/N434Y
F132	2.10E-07	P257I/M428L/N434Y
F133	4.10E-07	P257M/M428L/N434Y
F134	2.70E-07	P257N/M428L/N434Y
F135	7.50E-07	P257S/M428L/N434Y
F136	3.80E-07	P257T/M428L/N434Y
F137	4.60E-07	P257V/M428L/N434Y
F139	1.50E-08	M252W/V308P/N434W
F140	3.60E-08	S239K/M252Y/V308P/N434Y
F141	3.50E-08	M252Y/S298G/V308P/N434Y
F142	3.70E-08	M252Y/D270F/V308P/N434Y
F143	2.00E-07	M252Y/V308A/N434Y
F145	5.30E-08	M252Y/V308F/N434Y
F147	2.40E-07	M252Y/V308I/N434Y
F149	1.90E-07	M252Y/V308L/N434Y
F150	2.00E-07	M252Y/V308M/N434Y
F152	2.70E-07	M252Y/V308Q/N434Y
F154	1.80E-07	M252Y/V308T/N434Y
F157	1.50E-07	P257A/V308P/M428L/N434Y
F158	5.90E-08	P257T/V308P/M428L/N434Y
F159	4.40E-08	P257V/V308P/M428L/N434Y
F160	8.50E-07	M252W/M428I/N434Y
F162	1.60E-07	M252W/M428Y/N434Y
F163	4.20E-07	M252W/M428F/N434Y
F164	3.70E-07	P238A/M252W/N434Y
F165	2.90E-07	M252W/D265A/N434Y
F166	1.50E-07	M252W/T307Q/N434Y
F167	2.90E-07	M252W/V303A/N434Y
F168	3.20E-07	M252W/D376A/N434Y
F169	2.90E-07	M252W/V305A/N434Y
F170	1.70E-07	M252W/Q311A/N434Y
F171	1.90E-07	M252W/D312A/N434Y
F172	2.20E-07	M252W/K317A/N434Y
F173	7.70E-07	M252W/E380A/N434Y
F174	3.40E-07	M252W/E382A/N434Y

[表2-4]

F175	2.70E-07	M252W/S424A/N434Y
F176	2.90E-07	S239K/M252W/N434Y
F177	2.80E-07	M252W/S298G/N434Y
F178	2.70E-07	M252W/D270F/N434Y
F179	3.10E-07	M252W/N325G/N434Y
F182	6.60E-08	P257A/M428L/N434W
F183	2.20E-07	P257T/M428L/N434W
F184	2.70E-07	P257V/M428L/N434W
F185	2.60E-07	M252W/I332V/N434Y
F188	3.00E-06	P257I/Q311I
F189	1.90E-07	M252Y/T307A/N434Y
F190	1.10E-07	M252Y/T307Q/N434Y
F191	1.60E-07	P257L/T307A/M428L/N434Y
F192	1.10E-07	P257A/T307A/M428L/N434Y
F193	8.50E-08	P257T/T307A/M428L/N434Y
F194	1.20E-07	P257V/T307A/M428L/N434Y
F195	5.60E-08	P257L/T307Q/M428L/N434Y
F196	3.50E-08	P257A/T307Q/M428L/N434Y
F197	3.30E-08	P257T/T307Q/M428L/N434Y
F198	4.80E-08	P257V/T307Q/M428L/N434Y
F201	2.10E-07	M252Y/T307D/N434Y
F203	2.40E-07	M252Y/T307F/N434Y
F204	2.10E-07	M252Y/T307G/N434Y
F205	2.00E-07	M252Y/T307H/N434Y
F206	2.30E-07	M252Y/T307I/N434Y
F207	9.40E-07	M252Y/T307K/N434Y
F208	3.90E-07	M252Y/T307L/N434Y
F209	1.30E-07	M252Y/T307M/N434Y
F210	2.90E-07	M252Y/T307N/N434Y
F211	2.40E-07	M252Y/T307P/N434Y
F212	6.80E-07	M252Y/T307R/N434Y
F213	2.30E-07	M252Y/T307S/N434Y
F214	1.70E-07	M252Y/T307V/N434Y
F215	9.60E-08	M252Y/T307W/N434Y
F216	2.30E-07	M252Y/T307Y/N434Y
F217	2.30E-07	M252Y/K334L/N434Y
F218	2.60E-07	M252Y/G385H/N434Y
F219	2.50E-07	M252Y/T289H/N434Y
F220	2.50E-07	M252Y/Q311H/N434Y
F221	3.10E-07	M252Y/D312H/N434Y
F222	3.40E-07	M252Y/N315H/N434Y
F223	2.70E-07	M252Y/K360H/N434Y
F225	1.50E-06	M252Y/L314R/N434Y
F226	5.40E-07	M252Y/L314K/N434Y
F227	1.20E-07	M252Y/N286E/N434Y
F228	2.30E-07	M252Y/L309E/N434Y
F229	5.10E-07	M252Y/R255E/N434Y
F230	2.50E-07	M252Y/P387E/N434Y

[表2-5]

F236	8.90E-07	K248I/M428L/N434Y
F237	2.30E-07	M252Y/M428A/N434Y
F238	7.40E-07	M252Y/M428D/N434Y
F240	7.20E-07	M252Y/M428F/N434Y
F241	1.50E-06	M252Y/M428G/N434Y
F242	8.50E-07	M252Y/M428H/N434Y
F243	1.80E-07	M252Y/M428I/N434Y
F244	1.30E-06	M252Y/M428K/N434Y
F245	4.70E-07	M252Y/M428N/N434Y
F246	1.10E-06	M252Y/M428P/N434Y
F247	4.40E-07	M252Y/M428Q/N434Y
F249	6.40E-07	M252Y/M428S/N434Y
F250	2.90E-07	M252Y/M428T/N434Y
F251	1.90E-07	M252Y/M428V/N434Y
F252	1.00E-06	M252Y/M428W/N434Y
F253	7.10E-07	M252Y/M428Y/N434Y
F254	7.50E-08	M252W/T307Q/M428Y/N434Y
F255	1.10E-07	M252W/Q311A/M428Y/N434Y
F256	5.40E-08	M252W/T307Q/Q311A/M428Y/N434Y
F257	5.00E-07	M252Y/T307A/M428Y/N434Y
F258	3.20E-07	M252Y/T307Q/M428Y/N434Y
F259	2.80E-07	M252Y/D270F/N434Y
F260	1.30E-07	M252Y/T307A/Q311A/N434Y
F261	8.40E-08	M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F262	1.90E-07	M252Y/T307A/Q311H/N434Y
F263	1.10E-07	M252Y/T307Q/Q311H/N434Y
F264	2.80E-07	M252Y/E382A/N434Y
F265	6.80E-07	M252Y/E382A/M428Y/N434Y
F266	4.70E-07	M252Y/T307A/E382A/M428Y/N434Y
F267	3.20E-07	M252Y/T307Q/E382A/M428Y/N434Y
F268	6.30E-07	P238A/M252Y/M428F/N434Y
F269	5.20E-07	M252Y/V305A/M428F/N434Y
F270	6.60E-07	M252Y/N325G/M428F/N434Y
F271	6.90E-07	M252Y/D376A/M428F/N434Y
F272	6.80E-07	M252Y/E380A/M428F/N434Y
F273	6.50E-07	M252Y/E382A/M428F/N434Y
F274	7.60E-07	M252Y/E380A/E382A/M428F/N434Y
F275	4.20E-08	S239K/M252Y/V308P/E382A/N434Y
F276	4.10E-08	M252Y/D270F/V308P/E382A/N434Y
F277	1.30E-07	S239K/M252Y/V308P/M428Y/N434Y
F278	3.00E-08	M252Y/T307Q/V308P/E382A/N434Y
F279	6.10E-08	M252Y/V308P/Q311H/E382A/N434Y
F280	4.10E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/N434Y
F281	9.20E-08	M252Y/V308P/E382A/M428F/N434Y
F282	2.90E-08	M252Y/V308P/E382A/M428L/N434Y
F283	1.00E-07	M252Y/V308P/E382A/M428Y/N434Y
F284	1.00E-07	M252Y/V308P/M428Y/N434Y
F285	9.90E-08	M252Y/V308P/M428F/N434Y

[表2-6]

F286	1.20E-07	S239K/M252Y/V308P/E382A/M428Y/N434Y
F287	1.00E-07	M252Y/V308P/E380A/E382A/M428F/N434Y
F288	1.90E-07	M252Y/T256E/E382A/N434Y
F289	4.80E-07	M252Y/T256E/M428Y/N434Y
F290	4.60E-07	M252Y/T256E/E382A/M428Y/N434Y
F292	2.30E-08	S239K/M252Y/V308P/E382A/M428I/N434Y
F293	5.30E-08	M252Y/V308P/E380A/E382A/M428I/N434Y
F294	1.10E-07	S239K/M252Y/V308P/M428F/N434Y
F295	6.80E-07	S239K/M252Y/E380A/E382A/M428F/N434Y
F296	4.90E-07	M252Y/Q311A/M428Y/N434Y
F297	5.10E-07	M252Y/D312A/M428Y/N434Y
F298	4.80E-07	M252Y/Q311A/D312A/M428Y/N434Y
F299	9.40E-08	S239K/M252Y/V308P/Q311A/M428Y/N434Y
F300	8.30E-08	S239K/M252Y/V308P/D312A/M428Y/N434Y
F301	7.20E-08	S239K/M252Y/V308P/Q311A/D312A/M428Y/N434Y
F302	1.90E-07	M252Y/T256E/T307P/N434Y
F303	6.70E-07	M252Y/T307P/M428Y/N434Y
F304	1.60E-08	M252W/V308P/M428Y/N434Y
F305	2.70E-08	M252Y/T256E/V308P/E382A/N434Y
F306	3.60E-08	M252W/V308P/E382A/N434Y
F307	3.60E-08	S239K/M252W/V308P/E382A/N434Y
F308	1.90E-08	S239K/M252W/V308P/E382A/M428Y/N434Y
F310	9.40E-08	S239K/M252W/V308P/E382A/M428I/N434Y
F311	2.80E-08	S239K/M252W/V308P/M428F/N434Y
F312	4.50E-07	S239K/M252W/E380A/E382A/M428F/N434Y
F313	6.50E-07	S239K/M252Y/T307P/M428Y/N434Y
F314	3.20E-07	M252Y/T256E/Q311A/D312A/M428Y/N434Y
F315	6.80E-07	S239K/M252Y/M428Y/N434Y
F316	7.00E-07	S239K/M252Y/D270F/M428Y/N434Y
F317	1.10E-07	S239K/M252Y/D270F/V308P/M428Y/N434Y
F318	1.80E-08	S239K/M252Y/V308P/M428I/N434Y
F320	2.00E-08	S239K/M252Y/V308P/N325G/E382A/M428I/N434Y
F321	3.20E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/N325G/N434Y
F322	9.20E-08	S239K/M252Y/D270F/T307P/V308P/N434Y
F323	2.70E-08	S239K/M252Y/T256E/D270F/V308P/N434Y
F324	2.80E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/V308P/N434Y
F325	2.10E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F326	7.50E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/Q311A/N434Y
F327	6.50E-08	S239K/M252Y/T256E/D270F/T307Q/Q311A/N434Y
F328	1.90E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/M428I/N434Y
F329	1.20E-08	S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/N434Y
F330	3.60E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/L309E/N434Y
F331	3.00E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/P387E/N434Y
F333	7.40E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/L309E/Q311A/N434Y
F334	1.90E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/N325G/M428I/N434Y
F335	1.50E-08	S239K/M252Y/T256E/D270F/V308P/M428I/N434Y
F336	1.40E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y
F337	5.60E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/Q311A/M428I/N434Y

[表2-7]

F338	7.70E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/M428I/N434Y
F339	1.90E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/L309E/M428I/N434Y
F343	3.20E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/M428L/N434Y
F344	3.00E-08	S239K/M252Y/V308P/M428L/N434Y
F349	1.50E-07	S239K/M252Y/V308P/L309P/M428L/N434Y
F350	1.70E-07	S239K/M252Y/V308P/L309R/M428L/N434Y
F352	6.00E-07	S239K/M252Y/L309P/M428L/N434Y
F353	1.10E-06	S239K/M252Y/L309R/M428L/N434Y
F354	2.80E-08	S239K/M252Y/T307Q/V308P/M428L/N434Y
F356	3.40E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/L309E/P387E/N434Y
F357	1.60E-08	S239K/M252Y/T256E/D270F/V308P/N325G/M428I/N434Y
F358	1.00E-07	S239K/M252Y/T307Q/N434Y
F359	4.20E-07	P257V/T307Q/M428I/N434Y
F360	1.30E-06	P257V/T307Q/M428V/N434Y
F362	5.40E-08	P257V/T307Q/N325G/M428L/N434Y
F363	4.10E-08	P257V/T307Q/Q311A/M428L/N434Y
F364	3.50E-08	P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428L/N434Y
F365	5.10E-08	P257V/V305A/T307Q/M428L/N434Y
F367	1.50E-08	S239K/M252Y/E258H/D270F/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F368	2.00E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/N325G/E382A/M428I/N434Y
F369	7.50E-08	M252Y/P257V/T307Q/M428I/N434Y
F372	1.30E-08	S239K/M252W/V308P/M428Y/N434Y
F373	1.10E-08	S239K/M252W/V308P/Q311A/M428Y/N434Y
F374	1.20E-08	S239K/M252W/T256E/V308P/M428Y/N434Y
F375	5.50E-09	S239K/M252W/N286E/V308P/M428Y/N434Y
F376	9.60E-09	S239K/M252Y/T256E/D270F/N286E/V308P/N434Y
F377	1.30E-07	S239K/M252W/T307P/M428Y/N434Y
F379	9.00E-09	S239K/M252W/T256E/V308P/Q311A/M428Y/N434Y
F380	5.60E-09	S239K/M252W/T256E/N286E/V308P/M428Y/N434Y
F381	1.10E-07	P257V/T307A/Q311A/M428L/N434Y
F382	8.70E-08	P257V/V305A/T307A/M428L/N434Y
F386	3.20E-08	M252Y/V308P/L309E/N434Y
F387	1.50E-07	M252Y/V308P/L309D/N434Y
F388	7.00E-08	M252Y/V308P/L309A/N434Y
F389	1.70E-08	M252W/V308P/L309E/M428Y/N434Y
F390	6.80E-08	M252W/V308P/L309D/M428Y/N434Y
F391	3.60E-08	M252W/V308P/L309A/M428Y/N434Y
F392	6.90E-09	S239K/M252Y/N286E/V308P/M428I/N434Y
F393	1.20E-08	S239K/M252Y/N286E/V308P/N434Y
F394	5.30E-08	S239K/M252Y/T307Q/Q311A/M428I/N434Y
F395	2.40E-08	S239K/M252Y/T256E/V308P/N434Y
F396	2.00E-08	S239K/M252Y/D270F/N286E/T307Q/Q311A/M428I/N434Y
F397	4.50E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/Q311A/P387E/M428I/N434Y
F398	4.40E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y
F399	6.50E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/T307Q/V308P/M428I/N434Y
F400	6.10E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/Q311A/M428I/N434Y
F401	6.90E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/P387E/M428I/N434Y
F402	2.30E-08	P257V/T307Q/M428L/N434W

[表2-8]

F403	5.10E-08	P257V/T307A/M428L/N434W
F404	9.40E-08	P257A/T307Q/L309P/M428L/N434Y
F405	1.70E-07	P257V/T307Q/L309P/M428L/N434Y
F406	1.50E-07	P257A/T307Q/L309R/M428L/N434Y
F407	1.60E-07	P257V/T307Q/L309R/M428L/N434Y
F408	2.50E-07	P257V/N286E/M428L/N434Y
F409	2.00E-07	P257V/P387E/M428L/N434Y
F410	2.20E-07	P257V/T307H/M428L/N434Y
F411	1.30E-07	P257V/T307N/M428L/N434Y
F412	8.80E-08	P257V/T307G/M428L/N434Y
F413	1.20E-07	P257V/T307P/M428L/N434Y
F414	1.10E-07	P257V/T307S/M428L/N434Y
F415	5.60E-08	P257V/N286E/T307A/M428L/N434Y
F416	9.40E-08	P257V/T307A/P387E/M428L/N434Y
F418	6.20E-07	S239K/M252Y/T307P/N325G/M428Y/N434Y
F419	1.60E-07	M252Y/T307A/Q311H/K360H/N434Y
F420	1.50E-07	M252Y/T307A/Q311H/P387E/N434Y
F421	1.30E-07	M252Y/T307A/Q311H/M428A/N434Y
F422	1.80E-07	M252Y/T307A/Q311H/E382A/N434Y
F423	8.40E-08	M252Y/T307W/Q311H/N434Y
F424	9.40E-08	S239K/P257A/V308P/M428L/N434Y
F425	8.00E-08	P257A/V308P/L309E/M428L/N434Y
F426	8.40E-08	P257V/T307Q/N434Y
F427	1.10E-07	M252Y/P257V/T307Q/M428V/N434Y
F428	8.00E-08	M252Y/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F429	3.70E-08	M252Y/P257V/T307Q/N434Y
F430	8.10E-08	M252Y/P257V/T307Q/M428Y/N434Y
F431	6.50E-08	M252Y/P257V/T307Q/M428F/N434Y
F432	9.20E-07	P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428V/N434Y
F433	6.00E-08	P257V/T307Q/Q311A/N325G/N434Y
F434	2.00E-08	P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428Y/N434Y
F435	2.50E-08	P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428F/N434Y
F436	2.50E-07	P257A/T307Q/M428V/N434Y
F437	5.70E-08	P257A/T307Q/N434Y
F438	3.60E-08	P257A/T307Q/M428Y/N434Y
F439	4.00E-08	P257A/T307Q/M428F/N434Y
F440	1.50E-08	P257V/N286E/T307Q/Q311A/N325G/M428L/N434Y
F441	1.80E-07	P257A/Q311A/M428L/N434Y
F442	2.00E-07	P257A/Q311H/M428L/N434Y
F443	5.50E-08	P257A/T307Q/Q311A/M428L/N434Y
F444	1.40E-07	P257A/T307A/Q311A/M428L/N434Y
F445	6.20E-08	P257A/T307Q/Q311H/M428L/N434Y
F446	1.10E-07	P257A/T307A/Q311H/M428L/N434Y
F447	1.40E-08	P257A/N286E/T307Q/M428L/N434Y
F448	5.30E-08	P257A/N286E/T307A/M428L/N434Y
F449	5.70E-07	S239K/M252Y/D270F/T307P/N325G/M428Y/N434Y
F450	5.20E-07	S239K/M252Y/T307P/L309E/N325G/M428Y/N434Y
F451	1.00E-07	P257S/T307A/M428L/N434Y

[表2-9]

F452	1.40E-07	P257M/T307A/M428L/N434Y
F453	7.80E-08	P257N/T307A/M428L/N434Y
F454	9.60E-08	P257I/T307A/M428L/N434Y
F455	2.70E-08	P257V/T307Q/M428Y/N434Y
F456	3.40E-08	P257V/T307Q/M428F/N434Y
F457	4.00E-08	S239K/P257V/V308P/M428L/N434Y
F458	1.50E-08	P257V/T307Q/V308P/N325G/M428L/N434Y
F459	1.30E-08	P257V/T307Q/V308P/Q311A/N325G/M428L/N434Y
F460	4.70E-08	P257V/T307A/V308P/N325G/M428L/N434Y
F462	8.50E-08	P257A/V308P/N325G/M428L/N434Y
F463	1.30E-07	P257A/T307A/V308P/M428L/N434Y
F464	5.50E-08	P257A/T307Q/V308P/M428L/N434Y
F465	2.10E-08	P257V/N286E/T307Q/N325G/M428L/N434Y
F466	3.50E-07	T256E/P257V/N434Y
F467	5.70E-07	T256E/P257T/N434Y
F468	5.70E-08	S239K/P257T/V308P/M428L/N434Y
F469	5.60E-08	P257T/V308P/N325G/M428L/N434Y
F470	5.40E-08	T256E/P257T/V308P/N325G/M428L/N434Y
F471	6.60E-08	P257T/V308P/N325G/E382A/M428L/N434Y
F472	5.40E-08	P257T/V308P/N325G/P387E/M428L/N434Y
F473	4.50E-07	P257T/V308P/L309P/N325G/M428L/N434Y
F474	3.50E-07	P257T/V308P/L309R/N325G/M428L/N434Y
F475	4.30E-08	T256E/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F476	5.50E-08	P257V/T307Q/E382A/M428L/N434Y
F477	4.30E-08	P257V/T307Q/P387E/M428L/N434Y
F480	3.90E-08	P257L/V308P/N434Y
F481	5.60E-08	P257T/T307Q/N434Y
F482	7.00E-08	P257V/T307Q/N325G/N434Y
F483	5.70E-08	P257V/T307Q/Q311A/N434Y
F484	6.20E-08	P257V/V305A/T307Q/N434Y
F485	9.70E-08	P257V/N286E/T307A/N434Y
F486	3.40E-07	P257V/T307Q/L309R/Q311H/M428L/N434Y
F488	3.50E-08	P257V/V308P/N325G/M428L/N434Y
F490	7.50E-08	S239K/P257V/V308P/Q311H/M428L/N434Y
F492	9.80E-08	P257V/V305A/T307A/N325G/M428L/N434Y
F493	4.90E-07	S239K/D270F/T307P/N325G/M428Y/N434Y
F497	3.10E-06	P257T/T307A/M428V/N434Y
F498	1.30E-06	P257A/M428V/N434Y
F499	5.20E-07	P257A/T307A/M428V/N434Y
F500	4.30E-08	P257S/T307Q/M428L/N434Y
F506	1.90E-07	P257V/N297A/T307Q/M428L/N434Y
F507	5.10E-08	P257V/N286A/T307Q/M428L/N434Y
F508	1.10E-07	P257V/T307Q/N315A/M428L/N434Y
F509	5.80E-08	P257V/T307Q/N384A/M428L/N434Y
F510	5.30E-08	P257V/T307Q/N389A/M428L/N434Y
F511	4.20E-07	P257V/N434Y
F512	5.80E-07	P257T/N434Y
F517	3.10E-07	P257V/N286E/N434Y

[表2-10]

F518	4.20E-07	P257T/N286E/N434Y
F519	2.60E-08	P257V/N286E/T307Q/N434Y
F521	1.10E-08	P257V/N286E/T307Q/M428Y/N434Y
F523	2.60E-08	P257V/V305A/T307Q/M428Y/N434Y
F526	1.90E-08	P257T/T307Q/M428Y/N434Y
F527	9.40E-09	P257V/T307Q/V308P/N325G/M428Y/N434Y
F529	2.50E-08	P257T/T307Q/M428F/N434Y
F533	1.20E-08	P257A/N286E/T307Q/M428F/N434Y
F534	1.20E-08	P257A/N286E/T307Q/M428Y/N434Y
F535	3.90E-08	T250A/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F538	9.90E-08	T250F/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F541	6.00E-08	T250I/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F544	3.10E-08	T250M/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F549	5.40E-08	T250S/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F550	5.90E-08	T250V/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F551	1.20E-07	T250W/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F552	1.10E-07	T250Y/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F553	1.70E-07	M252Y/Q311A/N434Y
F554	2.80E-08	S239K/M252Y/S254T/V308P/N434Y
F556	1.50E-06	M252Y/T307Q/Q311A
F559	8.00E-08	M252Y/S254T/N286E/N434Y
F560	2.80E-08	M252Y/S254T/V308P/N434Y
F561	1.40E-07	M252Y/S254T/T307A/N434Y
F562	8.30E-08	M252Y/S254T/T307Q/N434Y
F563	1.30E-07	M252Y/S254T/Q311A/N434Y
F564	1.90E-07	M252Y/S254T/Q311H/N434Y
F565	9.20E-08	M252Y/S254T/T307A/Q311A/N434Y
F566	6.10E-08	M252Y/S254T/T307Q/Q311A/N434Y
F567	2.20E-07	M252Y/S254T/M428I/N434Y
F568	1.10E-07	M252Y/T256E/T307A/Q311H/N434Y
F569	2.00E-07	M252Y/T256Q/T307A/Q311H/N434Y
F570	1.30E-07	M252Y/S254T/T307A/Q311H/N434Y
F571	8.10E-08	M252Y/N286E/T307A/Q311H/N434Y
F572	1.00E-07	M252Y/T307A/Q311H/M428I/N434Y
F576	1.60E-06	M252Y/T256E/T307Q/Q311H
F577	1.30E-06	M252Y/N286E/T307A/Q311A
F578	5.70E-07	M252Y/N286E/T307Q/Q311A
F580	8.60E-07	M252Y/N286E/T307Q/Q311H
F581	7.20E-08	M252Y/T256E/N286E/N434Y
F582	7.50E-07	S239K/M252Y/V308P
F583	7.80E-07	S239K/M252Y/V308P/E382A
F584	6.30E-07	S239K/M252Y/T256E/V308P
F585	2.90E-07	S239K/M252Y/N286E/V308P
F586	1.40E-07	S239K/M252Y/N286E/V308P/M428I
F587	1.90E-07	M252Y/N286E/M428L/N434Y
F592	2.00E-07	M252Y/S254T/E382A/N434Y
F593	3.10E-08	S239K/M252Y/S254T/V308P/M428I/N434Y
F594	1.60E-08	S239K/M252Y/T256E/V308P/M428I/N434Y

[表2-11]

F595	1.80E-07	S239K/M252Y/M428I/N434Y
F596	4.00E-07	M252Y/D312A/E382A/M428Y/N434Y
F597	2.20E-07	M252Y/E382A/P387E/N434Y
F598	1.40E-07	M252Y/D312A/P387E/N434Y
F599	5.20E-07	M252Y/P387E/M428Y/N434Y
F600	2.80E-07	M252Y/T256Q/E382A/N434Y
F601	9.60E-09	M252Y/N286E/V308P/N434Y
F608		G236A/S239D/I332E
F611	2.80E-07	M252Y/V305T/T307P/V308I/L309A/N434Y
F612	3.60E-07	M252Y/T307P/V308I/L309A/N434Y
F613		S239D/A330L/I332E
F616		S239D/K326D/L328Y
F617	7.40E-07	S239K/N434W
F618	6.40E-07	S239K/V308F/N434Y
F619	3.10E-07	S239K/M252Y/N434Y
F620	2.10E-07	S239K/M252Y/S254T/N434Y
F621	1.50E-07	S239K/M252Y/T307A/Q311H/N434Y
F622	3.50E-07	S239K/M252Y/T256Q/N434Y
F623	1.80E-07	S239K/M252W/N434W
F624	1.40E-08	S239K/P257A/N286E/T307Q/M428L/N434Y
F625	7.60E-08	S239K/P257A/T307Q/M428L/N434Y
F626	1.30E-06	V308P
F629	3.90E-08	M252Y/V279L/V308P/N434Y
F630	3.70E-08	S239K/M252Y/V279L/V308P/N434Y
F633	2.40E-08	M252Y/V282D/V308P/N434Y
F634	3.20E-08	S239K/M252Y/V282D/V308P/N434Y
F635	4.50E-08	M252Y/V284K/V308P/N434Y
F636	4.80E-08	S239K/M252Y/V284K/V308P/N434Y
F637	1.50E-07	M252Y/K288S/V308P/N434Y
F638	1.40E-07	S239K/M252Y/K288S/V308P/N434Y
F639	2.70E-08	M252Y/V308P/G385R/N434Y
F640	3.60E-08	S239K/M252Y/V308P/G385R/N434Y
F641	3.00E-08	M252Y/V308P/Q386K/N434Y
F642	3.00E-08	S239K/M252Y/V308P/Q386K/N434Y
F643	3.20E-08	L235G/G236R/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F644	3.00E-08	G236R/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F645	3.30E-08	S239K/M252Y/V308P/L328R/N434Y
F646	3.80E-08	S239K/M252Y/N297A/V308P/N434Y
F647	2.90E-08	P238D/M252Y/V308P/N434Y
F648		P238D
F649	1.20E-07	S239K/M252Y/N286E/N434Y
F650	1.70E-07	S239K/M252Y/T256E/N434Y
F651	1.80E-07	S239K/M252Y/Q311A/N434Y
F652	2.40E-07	P238D/M252Y/N434Y
F654	3.20E-08	L235K/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F655	3.40E-08	L235R/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F656	3.30E-08	G237K/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F657	3.20E-08	G237R/S239K/M252Y/V308P/N434Y

[表2-12]

F658	3.20E-08	P238K/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F659	3.00E-08	P238R/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F660	3.10E-08	S239K/M252Y/V308P/P329K/N434Y
F661	3.40E-08	S239K/M252Y/V308P/P329R/N434Y
F663	6.40E-09	S239K/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F664	3.90E-08	M252Y/N286A/V308P/N434Y
F665	2.00E-08	M252Y/N286D/V308P/N434Y
F666	2.10E-08	M252Y/N286F/V308P/N434Y
F667	3.00E-08	M252Y/N286G/V308P/N434Y
F668	4.00E-08	M252Y/N286H/V308P/N434Y
F669	3.50E-08	M252Y/N286I/V308P/N434Y
F670	2.10E-07	M252Y/N286K/V308P/N434Y
F671	2.20E-08	M252Y/N286L/V308P/N434Y
F672	2.40E-08	M252Y/N286M/V308P/N434Y
F673	2.30E-08	M252Y/N286P/V308P/N434Y
F674	3.20E-08	M252Y/N286Q/V308P/N434Y
F675	5.10E-08	M252Y/N286R/V308P/N434Y
F676	3.20E-08	M252Y/N286S/V308P/N434Y
F677	4.70E-08	M252Y/N286T/V308P/N434Y
F678	3.30E-08	M252Y/N286V/V308P/N434Y
F679	1.70E-08	M252Y/N286W/V308P/N434Y
F680	1.50E-08	M252Y/N286Y/V308P/N434Y
F681	4.90E-08	M252Y/K288A/V308P/N434Y
F682	8.20E-08	M252Y/K288D/V308P/N434Y
F683	5.00E-08	M252Y/K288E/V308P/N434Y
F684	5.10E-08	M252Y/K288F/V308P/N434Y
F685	5.30E-08	M252Y/K288G/V308P/N434Y
F686	4.60E-08	M252Y/K288H/V308P/N434Y
F687	4.90E-08	M252Y/K288I/V308P/N434Y
F688	2.80E-08	M252Y/K288L/V308P/N434Y
F689	4.10E-08	M252Y/K288M/V308P/N434Y
F690	1.00E-07	M252Y/K288N/V308P/N434Y
F691	3.20E-07	M252Y/K288P/V308P/N434Y
F692	3.90E-08	M252Y/K288Q/V308P/N434Y
F693	3.60E-08	M252Y/K288R/V308P/N434Y
F694	4.70E-08	M252Y/K288V/V308P/N434Y
F695	4.00E-08	M252Y/K288W/V308P/N434Y
F696	4.40E-08	M252Y/K288Y/V308P/N434Y
F697	3.10E-08	S239K/M252Y/V308P/N325G/N434Y
F698	2.20E-08	M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y
F699	2.30E-08	S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y
F700	5.20E-08	M252Y/V308P/L328E/N434Y
F705	7.10E-09	M252Y/N286E/V308P/M428I/N434Y
F706	1.80E-08	M252Y/N286E/T307Q/Q311A/M428I/N434Y
F707	5.90E-09	M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F708	4.10E-09	M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y
F709	2.00E-08	S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/M428I/N434Y
F710	1.50E-08	P238D/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/M428I/N434Y

[表2-13]

F711	6.50E-08	S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F712	6.00E-08	P238D/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F713	2.00E-08	P238D/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y
F714	2.30E-07	P238D/M252Y/N325S/N434Y
F715	2.30E-07	P238D/M252Y/N325M/N434Y
F716	2.70E-07	P238D/M252Y/N325L/N434Y
F717	2.60E-07	P238D/M252Y/N325I/N434Y
F718	2.80E-07	P238D/M252Y/Q295M/N434Y
F719	7.40E-08	P238D/M252Y/N325G/N434Y
F720	2.40E-08	M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F721	1.50E-08	M252Y/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y
F722	2.70E-07	P238D/M252Y/A327G/N434Y
F723	2.80E-07	P238D/M252Y/L328D/N434Y
F724	2.50E-07	P238D/M252Y/L328E/N434Y
F725	4.20E-08	L235K/G237R/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F726	3.70E-08	L235K/P238K/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F729	9.20E-07	T307A/Q311A/N434Y
F730	6.00E-07	T307Q/Q311A/N434Y
F731	8.50E-07	T307A/Q311H/N434Y
F732	6.80E-07	T307Q/Q311H/N434Y
F733	3.20E-07	M252Y/L328E/N434Y
F734	3.10E-07	G236D/M252Y/L328E/N434Y
F736	3.10E-07	M252Y/S267M/L328E/N434Y
F737	3.10E-07	M252Y/S267L/L328E/N434Y
F738	3.50E-07	P238D/M252Y/T307P/N434Y
F739	2.20E-07	M252Y/T307P/Q311A/N434Y
F740	2.90E-07	M252Y/T307P/Q311H/N434Y
F741	3.10E-07	P238D/T250A/M252Y/N434Y
F744	9.90E-07	P238D/T250F/M252Y/N434Y
F745	6.60E-07	P238D/T250G/M252Y/N434Y
F746	6.00E-07	P238D/T250H/M252Y/N434Y
F747	2.80E-07	P238D/T250I/M252Y/N434Y
F749	5.10E-07	P238D/T250L/M252Y/N434Y
F750	3.00E-07	P238D/T250M/M252Y/N434Y
F751	5.30E-07	P238D/T250N/M252Y/N434Y
F753	1.80E-07	P238D/T250Q/M252Y/N434Y
F755	3.50E-07	P238D/T250S/M252Y/N434Y
F756	3.70E-07	P238D/T250V/M252Y/N434Y
F757	1.20E-06	P238D/T250W/M252Y/N434Y
F758	1.40E-06	P238D/T250Y/M252Y/N434Y
F759		L235K/S239K
F760		L235R/S239K
F761	1.10E-06	P238D/N434Y
F762	3.60E-08	L235K/S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y
F763	3.50E-08	L235R/S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y
F764	6.30E-07	P238D/T307Q/Q311A/N434Y
F765	8.50E-08	P238D/M252Y/T307Q/L309E/Q311A/N434Y
F766	6.00E-07	T307A/L309E/Q311A/N434Y

[表2-14]

F767	4.30E-07	T307Q/L309E/Q311A/N434Y
F768	6.40E-07	T307A/L309E/Q311H/N434Y
F769	4.60E-07	T307Q/L309E/Q311H/N434Y
F770	3.00E-07	M252Y/T256A/N434Y
F771	4.00E-07	M252Y/E272A/N434Y
F772	3.80E-07	M252Y/K274A/N434Y
F773	3.90E-07	M252Y/V282A/N434Y
F774	4.00E-07	M252Y/N286A/N434Y
F775	6.20E-07	M252Y/K338A/N434Y
F776	3.90E-07	M252Y/K340A/N434Y
F777	3.90E-07	M252Y/E345A/N434Y
F779	3.90E-07	M252Y/N361A/N434Y
F780	3.90E-07	M252Y/Q362A/N434Y
F781	3.70E-07	M252Y/S375A/N434Y
F782	3.50E-07	M252Y/Y391A/N434Y
F783	4.00E-07	M252Y/D413A/N434Y
F784	5.00E-07	M252Y/L309A/N434Y
F785	7.40E-07	M252Y/L309H/N434Y
F786	2.80E-08	M252Y/S254T/N286E/T307Q/Q311A/N434Y
F787	8.80E-08	M252Y/S254T/T307Q/L309E/Q311A/N434Y
F788	4.10E-07	M252Y/N315A/N434Y
F789	1.50E-07	M252Y/N315D/N434Y
F790	2.70E-07	M252Y/N315E/N434Y
F791	4.40E-07	M252Y/N315F/N434Y
F792	4.40E-07	M252Y/N315G/N434Y
F793	3.30E-07	M252Y/N315I/N434Y
F794	4.10E-07	M252Y/N315K/N434Y
F795	3.10E-07	M252Y/N315L/N434Y
F796	3.40E-07	M252Y/N315M/N434Y
F798	3.50E-07	M252Y/N315Q/N434Y
F799	4.10E-07	M252Y/N315R/N434Y
F800	3.80E-07	M252Y/N315S/N434Y
F801	4.40E-07	M252Y/N315T/N434Y
F802	3.30E-07	M252Y/N315V/N434Y
F803	3.60E-07	M252Y/N315W/N434Y
F804	4.00E-07	M252Y/N315Y/N434Y
F805	3.00E-07	M252Y/N325A/N434Y
F806	3.10E-07	M252Y/N384A/N434Y
F807	3.20E-07	M252Y/N389A/N434Y
F808	3.20E-07	M252Y/N389A/N390A/N434Y
F809	2.20E-07	M252Y/S254T/T256S/N434Y
F810	2.20E-07	M252Y/A378V/N434Y
F811	4.90E-07	M252Y/E380S/N434Y
F812	2.70E-07	M252Y/E382V/N434Y
F813	2.80E-07	M252Y/S424E/N434Y
F814	1.20E-07	M252Y/N434Y/Y436I
F815	5.50E-07	M252Y/N434Y/T437R
F816	3.60E-07	P238D/T250V/M252Y/T307P/N434Y

[表2-15]

F817	9.80E-08	P238D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F819	1.40E-07	P238D/M252Y/N286E/N434Y
F820	3.40E-07	L235K/S239K/M252Y/N434Y
F821	3.10E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y
F822	1.10E-06	P238D/T250Y/M252Y/W313Y/N434Y
F823	1.10E-06	P238D/T250Y/M252Y/W313F/N434Y
F828	2.50E-06	P238D/T250V/M252Y/I253V/N434Y
F831	1.60E-06	P238D/T250V/M252Y/R255A/N434Y
F832	2.60E-06	P238D/T250V/M252Y/R255D/N434Y
F833	8.00E-07	P238D/T250V/M252Y/R255E/N434Y
F834	8.10E-07	P238D/T250V/M252Y/R255F/N434Y
F836	5.00E-07	P238D/T250V/M252Y/R255H/N434Y
F837	5.60E-07	P238D/T250V/M252Y/R255I/N434Y
F838	4.30E-07	P238D/T250V/M252Y/R255K/N434Y
F839	3.40E-07	P238D/T250V/M252Y/R255L/N434Y
F840	4.20E-07	P238D/T250V/M252Y/R255M/N434Y
F841	1.10E-06	P238D/T250V/M252Y/R255N/N434Y
F843	6.60E-07	P238D/T250V/M252Y/R255Q/N434Y
F844	1.30E-06	P238D/T250V/M252Y/R255S/N434Y
F847	3.40E-07	P238D/T250V/M252Y/R255W/N434Y
F848	8.30E-07	P238D/T250V/M252Y/R255Y/N434Y
F849	3.30E-07	M252Y/D280A/N434Y
F850	2.90E-07	M252Y/D280E/N434Y
F852	3.30E-07	M252Y/D280G/N434Y
F853	3.20E-07	M252Y/D280H/N434Y
F855	3.20E-07	M252Y/D280K/N434Y
F858	3.20E-07	M252Y/D280N/N434Y
F860	3.30E-07	M252Y/D280Q/N434Y
F861	3.20E-07	M252Y/D280R/N434Y
F862	3.00E-07	M252Y/D280S/N434Y
F863	2.70E-07	M252Y/D280T/N434Y
F867	2.80E-07	M252Y/N384A/N389A/N434Y
F868	2.00E-08	G236A/S239D/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y
F869		G236A/S239D
F870	7.30E-08	L235K/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F871	7.10E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F872	1.30E-07	L235K/S239K/M252Y/N286E/N434Y
F873	1.20E-07	L235R/S239K/M252Y/N286E/N434Y
F875	4.80E-07	M252Y/N434Y/Y436A
F877	8.30E-07	M252Y/N434Y/Y436E
F878	1.90E-07	M252Y/N434Y/Y436F
F879	9.20E-07	M252Y/N434Y/Y436G
F880	3.90E-07	M252Y/N434Y/Y436H
F881	3.10E-07	M252Y/N434Y/Y436K
F882	1.30E-07	M252Y/N434Y/Y436L
F883	2.10E-07	M252Y/N434Y/Y436M
F884	4.00E-07	M252Y/N434Y/Y436N
F888	4.80E-07	M252Y/N434Y/Y436S

[表2-16]

F889	2.20E-07	M252Y/N434Y/Y436T
F890	1.10E-07	M252Y/N434Y/Y436V
F891	1.70E-07	M252Y/N434Y/Y436W
F892	7.10E-08	M252Y/S254T/N434Y/Y436I
F893	9.80E-08	L235K/S239K/M252Y/N434Y/Y436I
F894	9.20E-08	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436I
F895	2.10E-08	L235K/S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N315E/N434Y
F896	2.00E-08	L235R/S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N315E/N434Y
F897	9.70E-08	M252Y/N315D/N384A/N389A/N434Y
F898	1.70E-07	M252Y/N315E/N384A/N389A/N434Y
F899	1.10E-07	M252Y/N315D/G316A/N434Y
F900	1.70E-07	M252Y/N315D/G316D/N434Y
F901	1.30E-07	M252Y/N315D/G316E/N434Y
F902	2.20E-07	M252Y/N315D/G316F/N434Y
F903	2.30E-07	M252Y/N315D/G316H/N434Y
F904	1.00E-07	M252Y/N315D/G316I/N434Y
F905	1.30E-07	M252Y/N315D/G316K/N434Y
F906	1.50E-07	M252Y/N315D/G316L/N434Y
F907	1.30E-07	M252Y/N315D/G316M/N434Y
F908	1.50E-07	M252Y/N315D/G316N/N434Y
F909	1.30E-07	M252Y/N315D/G316P/N434Y
F910	1.40E-07	M252Y/N315D/G316Q/N434Y
F911	1.30E-07	M252Y/N315D/G316R/N434Y
F912	1.20E-07	M252Y/N315D/G316S/N434Y
F913	1.10E-07	M252Y/N315D/G316T/N434Y
F914	1.50E-07	M252Y/N315D/G316V/N434Y
F915	2.30E-07	M252Y/N315D/G316W/N434Y
F917	2.50E-07	M252Y/N286S/N434Y
F918	2.80E-07	M252Y/D280E/N384A/N389A/N434Y
F919	3.30E-07	M252Y/D280G/N384A/N389A/N434Y
F920	2.50E-07	M252Y/N286S/N384A/N389A/N434Y
F921	1.20E-07	M252Y/N286E/N384A/N389A/N434Y
F922	5.90E-08	L235K/S239K/M252Y/N286E/N434Y/Y436I
F923	6.00E-08	L235R/S239K/M252Y/N286E/N434Y/Y436I
F924	3.40E-08	L235K/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436I
F925	3.20E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436I
F926	1.10E-07	L235K/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436I
F927	1.00E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436I
F928	2.90E-08	M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436I
F929	2.90E-08	M252Y/S254T/T307Q/Q311A/N434Y/Y436I
F930	1.40E-07	P238D/T250V/M252Y/N286E/N434Y
F931	1.20E-07	P238D/T250V/M252Y/N434Y/Y436I
F932	3.20E-07	T250V/M252Y/N434Y
F933	3.00E-07	L234R/P238D/T250V/M252Y/N434Y
F934	3.10E-07	G236K/P238D/T250V/M252Y/N434Y
F935	3.20E-07	G237K/P238D/T250V/M252Y/N434Y
F936	3.20E-07	G237R/P238D/T250V/M252Y/N434Y
F937	3.10E-07	P238D/S239K/T250V/M252Y/N434Y

[表2-17]

F938	1.60E-07	L235K/S239K/M252Y/N434Y/Y436V
F939	1.50E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V
F940	1.50E-07	P238D/T250V/M252Y/N434Y/Y436V
F941	1.20E-08	M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F942	4.20E-08	L235K/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F943	4.00E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F944	1.70E-07	T250V/M252Y/N434Y/Y436V
F945	1.70E-08	T250V/M252Y/V308P/N434Y/Y436V
F946	4.30E-08	T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F947	1.10E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F954	5.30E-07	M252Y/N434Y/H435K/Y436V
F957	7.70E-07	M252Y/N434Y/H435N/Y436V
F960	8.00E-07	M252Y/N434Y/H435R/Y436V
F966	3.10E-07	M252Y/S254A/N434Y
F970	2.50E-06	M252Y/S254G/N434Y
F971	2.60E-06	M252Y/S254H/N434Y
F972	2.60E-07	M252Y/S254I/N434Y
F978	1.30E-06	M252Y/S254Q/N434Y
F980	1.80E-07	M252Y/S254V/N434Y
F987	4.00E-08	P238D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F988	6.90E-08	P238D/T250V/M252Y/N286E/N434Y/Y436V
F989	1.40E-08	L235R/S239K/M252Y/V308P/N434Y/Y436V
F990	9.40E-09	L235R/S239K/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F991	1.30E-08	L235R/S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F992	5.10E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/M428I/N434Y/Y436V
F993	3.80E-08	M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F994	2.80E-07	M252Y/N325G/N434Y
F995	2.90E-07	L235R/P238D/S239K/M252Y/N434Y
F996	1.30E-07	L235R/P238D/S239K/M252Y/N434Y/Y436V
F997	3.80E-07	K248I/T250V/M252Y/N434Y/Y436V
F998	8.50E-07	K248Y/T250V/M252Y/N434Y/Y436V
F999	2.10E-07	T250V/M252Y/E258H/N434Y/Y436V
F1005		N325G
F1008	1.70E-07	L235R/S239K/T250V/M252Y/N434Y/Y436V
F1009	1.20E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1010	1.90E-07	L235R/S239K/M252Y/T307A/Q311H/N434Y
F1011	4.50E-08	T250V/M252Y/V308P/N434Y
F1012	4.70E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/V308P/N434Y
F1013	3.00E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F1014	3.20E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F1015	2.20E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F1016	3.80E-09	T250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1017	4.20E-09	L235R/S239K/T250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1018	3.20E-09	L235R/S239K/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1019	3.40E-07	P238D/T250V/M252Y/N325G/N434Y
F1020	8.50E-08	P238D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N325G/N434Y
F1021	3.30E-07	P238D/T250V/M252Y/N325A/N434Y
F1022		K326D/L328Y

[表2-18]

F1023	4.40E-08	S239D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F1024	4.00E-08	T250V/M252Y/T307Q/Q311A/K326D/L328Y/N434Y/Y436V
F1025	3.60E-08	S239D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/K326D/L328Y/N434Y/Y436V
F1026	8.40E-08	M252Y/T307A/Q311H/N434Y/Y436V
F1027	8.60E-08	L235R/S239K/M252Y/T307A/Q311H/N434Y/Y436V
F1028	4.60E-08	G236A/S239D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F1029	5.10E-08	T250V/M252Y/T307Q/Q311A/I332E/N434Y/Y436V
F1030		I332E
F1031	5.30E-08	G236A/S239D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/I332E/N434Y/Y436V
F1032	4.30E-08	P238D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N325G/N434Y/Y436V
F1033	1.00E-06	P238D/N434W
F1034	1.50E-08	L235K/S239K/M252Y/V308P/N434Y/Y436V
F1035	1.00E-08	L235K/S239K/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1036	1.40E-08	L235K/S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F1037	6.10E-08	L235K/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/M428I/N434Y/Y436V
F1038	2.80E-07	L235K/P238D/S239K/M252Y/N434Y
F1039	1.30E-07	L235K/P238D/S239K/M252Y/N434Y/Y436V
F1040	2.00E-07	L235K/S239K/T250V/M252Y/N434Y/Y436V
F1041	1.40E-08	L235K/S239K/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1042	2.00E-07	L235K/S239K/M252Y/T307A/Q311H/N434Y
F1043	5.20E-08	L235K/S239K/T250V/M252Y/V308P/N434Y
F1044	3.50E-08	L235K/S239K/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F1045	2.50E-08	L235K/S239K/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F1046	4.50E-09	L235K/S239K/T250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1047	3.40E-09	L235K/S239K/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1048	9.90E-08	L235K/S239K/M252Y/T307A/Q311H/N434Y/Y436V
F1050	3.50E-09	T250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y/Y436V
F1051	3.90E-09	L235R/S239K/T250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y/Y436V
F1052	3.20E-09	L235R/S239K/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y/Y436V
F1053	4.23E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F1058	1.31E-07	M252Y/Q386E/N434Y/Y436V
F1059	1.39E-07	M252Y/Q386R/N434Y/Y436V
F1060	1.43E-07	M252Y/Q386S/N434Y/Y436V
F1061	1.19E-07	M252Y/P387E/N434Y/Y436V
F1062	1.2E-07	M252Y/P387R/N434Y/Y436V
F1063	1.43E-07	M252Y/P387S/N434Y/Y436V
F1064	1.32E-07	M252Y/V422E/N434Y/Y436V
F1065	1.38E-07	M252Y/V422R/N434Y/Y436V
F1066	1.45E-07	M252Y/V422S/N434Y/Y436V
F1067	1.26E-07	M252Y/S424E/N434Y/Y436V
F1068	1.69E-07	M252Y/S424R/N434Y/Y436V
F1069	1.39E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438E
F1070	1.73E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438R
F1071	1.24E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438S
F1072	1.35E-07	M252Y/N434Y/Y436V/S440E
F1073	1.34E-07	M252Y/N434Y/Y436V/S440R
F1074	1.32E-07	S239D/M252Y/N434Y/Y436V
F1075	1.4E-07	M252Y/K326D/L328Y/N434Y/Y436V
F1076	1.27E-07	S239D/M252Y/K326D/L328Y/N434Y/Y436V

[表2-19]

F1077	2.03E-06	K248N/M252Y/N434Y
F1078	4.7E-07	M252Y/E380N/E382S/N434Y
F1079	3.44E-07	M252Y/E382N/N384S/N434Y
F1080	3.19E-07	M252Y/S424N/N434Y
F1081	6.2E-07	M252Y/N434Y/Y436N/Q438T
F1082	2.76E-07	M252Y/N434Y/Q438N
F1083	3.45E-07	M252Y/N434Y/S440N
F1094	2.6E-07	M252Y/N434Y/S442N
F1095	2.86E-07	M252Y/S383N/G385S/N434Y
F1096	2.72E-07	M252Y/Q386T/N434Y
F1097	2.82E-07	M252Y/G385N/P387S/N434Y
F1098	2.58E-07	S239D/M252Y/N434Y
F1099	2.57E-07	M252Y/K326D/L328Y/N434Y
F1100	2.41E-07	S239D/M252Y/K326D/L328Y/N434Y
F1101	6.59E-08	S239D/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F1102	6.46E-08	M252Y/T307Q/Q311A/K326D/L328Y/N434Y
F1103	6.11E-08	S239D/M252Y/T307Q/Q311A/K326D/L328Y/N434Y
F1104	1.77E-07	M252Y/V422E/S424R/N434Y/Y436V
F1105	1.54E-07	M252Y/V422S/S424R/N434Y/Y436V
F1106	1.42E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1107	1.23E-07	M252Y/V422D/N434Y/Y436V
F1108	1.26E-07	M252Y/V422K/N434Y/Y436V
F1109	1.27E-07	M252Y/V422T/N434Y/Y436V
F1110	1.33E-07	M252Y/V422Q/N434Y/Y436V
F1111	1.65E-07	M252Y/S424K/N434Y/Y436V
F1112	1.23E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438K
F1113	1.18E-07	M252Y/N434Y/Y436V/S440D
F1114	1.31E-07	M252Y/N434Y/Y436V/S440Q
F1115	1.35E-07	M252Y/S424N/N434Y/Y436V
F1116	7.44E-08	M252Y/T307Q/Q311A/S424N/N434Y
F1117	4.87E-08	T250V/M252Y/T307Q/Q311A/S424N/N434Y/Y436V
F1118	1.32E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/S424N/N434Y/Y436V
F1119	1.03E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/V422E/N434Y/Y436V
F1120	1.04E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/S424R/N434Y/Y436V
F1121	1.04E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/V422E/S424R/N434Y/Y436V
F1122	1.37E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R
F1123	9.55E-09	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V/S440E
F1124	1.22E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1125	5.18E-08	M252Y/T307Q/N434Y/Y436V
F1126	8.95E-08	M252Y/T307A/N434Y/Y436V
F1127	7.94E-08	M252Y/Q311A/N434Y/Y436V
F1128	1.17E-07	M252Y/Q311H/N434Y/Y436V
F1129	4.48E-08	M252Y/T307Q/Q311H/N434Y/Y436V
F1130	5.54E-08	M252Y/T307A/Q311A/N434Y/Y436V
F1131	1.29E-07	L235R/S239K/M252Y/V422E/N434Y/Y436V
F1132	1.4E-07	L235R/S239K/M252Y/V422S/N434Y/Y436V
F1133	1.58E-07	L235R/S239K/M252Y/S424R/N434Y/Y436V
F1134	1.66E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438R
F1135	1.26E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/S440E

[表2-20]

F1136	1.63E-07	L235R/S239K/M252Y/V422E/S424R/N434Y/Y436V
F1137	1.58E-07	L235R/S239K/M252Y/V422S/S424R/N434Y/Y436V
F1138	1.65E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1139	1.52E-07	L235R/S239K/M252Y/S424N/N434Y/Y436V
F1140	1.62E-07	M252Y/V422E/S424R/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1141	1.77E-07	M252Y/V422S/S424R/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1142	1.87E-07	L235R/S239K/M252Y/V422E/S424R/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1143	1.98E-07	L235R/S239K/M252Y/V422S/S424R/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1144	1.44E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1145	5.23E-08	T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1146	6.24E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1147	7.19E-08	M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Q438R/S440E
F1148	7.63E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Q438R/S440E
F1151	2.51E-07	L235R/S239K/M252Y/S424N/N434Y
F1152	7.38E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/S424N/N434Y
F1153	4.85E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/S424N/N434Y/Y436V
F1154	1.34E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/S424N/N434Y/Y436V
F1157	2.09E-07	M252Y/N434Y/Q438R/S440E
F1158	2.44E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Q438R/S440E
F1159	4.79E-07	S424N/N434W
F1160	2.88E-07	V308F/S424N/N434Y
F1161	1.07E-06	I332V/S424N/N434Y
F1162	3.43E-07	P238D/T250Y/M252Y/N434Y/Y436V
F1163	1.54E-07	P238D/T250Y/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F1164	6.96E-08	P238D/T250Y/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F1165	1.63E-08	P238D/T250Y/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1174	4.9E-07	P257I/N434H
F1176	1.98E-06	V308F
F1178	8.72E-07	V259I/V308F/M428L
F1183	1.28E-06	E380A/M428L/N434S
F1184	1E-06	T307A/M428L/N434S
F1185	9.17E-07	T307A/E380A/M428L/N434S
F1188	1.72E-06	T307A/E380A/N434H
F1189	1.57E-07	M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1190	2.4E-07	M252Y/H433E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1191	2.11E-07	M252Y/N434Y/Y436V/T437A/Q438R/S440E
F1192	1.27E-07	M252Y/N434Y/Y436V/T437G/Q438R/S440E
F1194	1.55E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/K439D/S440E
F1195	1.76E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440E/L441A
F1196	1.51E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440E/L441E
F1197	9.46E-08	M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1198	7.83E-08	M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1199	6.25E-08	M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1200	1.26E-07	T250V/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1201	1.07E-07	T250V/M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1202	8.81E-08	T250V/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1203	1.52E-07	M252Y/T256Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1204	1.18E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1205	1.98E-07	T250V/M252Y/T256Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E

[表2-21]

F1206	1.69E-07	T250V/M252Y/S254T/T256Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1207	1.11E-06	I332E/M428L/N434S
F1208	5.71E-07	L251A/M252Y/N434Y/Y436V
F1211	1.23E-06	L251H/M252Y/N434Y/Y436V
F1213	6.33E-07	L251N/M252Y/N434Y/Y436V
F1216	1.16E-06	L251S/M252Y/N434Y/Y436V
F1217	1.14E-06	L251T/M252Y/N434Y/Y436V
F1218	2.51E-07	L251V/M252Y/N434Y/Y436V
F1229	2.81E-06	M252Y/I253V/N434Y/Y436V
F1230	1.12E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1231	9.73E-08	M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1232	9.79E-08	M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1243	1.25E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1244	1.02E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1245	8.2E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1246	1.73E-07	L235R/S239K/T250V/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1247	1.45E-07	L235R/S239K/T250V/M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1248	1.2E-07	L235R/S239K/T250V/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1249	2.06E-07	L235R/S239K/M252Y/T256Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1250	1.66E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1251	2.77E-07	L235R/S239K/T250V/M252Y/T256Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1252	2.33E-07	L235R/S239K/T250V/M252Y/S254T/T256Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1253	1.12E-07	L235R/S239K/M252Y/T307A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1254	6.42E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1255	1.11E-07	L235R/S239K/M252Y/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1256	1.56E-07	L235R/S239K/M252Y/Q311H/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1257	7.81E-08	L235R/S239K/M252Y/T307A/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1258	1.05E-07	L235R/S239K/M252Y/T307A/Q311H/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1259	4.46E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1260	6.53E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311H/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1261	1.35E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1262	1.26E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1263	1.24E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1264	1.27E-07	L235R/S239K/M252Y/T256A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1265	1.57E-07	L235R/S239K/M252Y/T256G/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1266	9.99E-08	L235R/S239K/M252Y/T256N/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1267	1.5E-07	L235R/S239K/M252Y/S254A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1268	2E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1269	1.69E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1270	1.18E-07	L235R/S239K/M252Y/S254A/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1271	2.05E-07	L235R/S239K/M252Y/S254A/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1272	1.71E-07	L235R/S239K/M252Y/S254A/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1273	1.53E-07	L235R/S239K/M252Y/T256Q/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1274	2.48E-07	L235R/S239K/M252Y/T256Q/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1275	2.09E-07	L235R/S239K/M252Y/T256Q/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1276	1.02E-07	L235R/S239K/M252Y/T256A/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1277	1.69E-07	L235R/S239K/M252Y/T256A/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1278	1.4E-07	L235R/S239K/M252Y/T256A/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1279	1.23E-07	L235R/S239K/M252Y/T256G/N434Y/Y436V/Q438K/S440D

[表2-22]

F1280	2.09E-07	L235R/S239K/M252Y/T256G/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1281	1.74E-07	L235R/S239K/M252Y/T256G/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1282	7.69E-08	L235R/S239K/M252Y/T256N/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1283	1.34E-07	L235R/S239K/M252Y/T256N/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1284	1.12E-07	L235R/S239K/M252Y/T256N/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1285	9.36E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1286	1.57E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1287	1.5E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1288	7.95E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1289	1.33E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1290	1.11E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1291	1.51E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V
F1292	4.24E-07	L235R/S239K/H433D/N434W/Y436V/Q438R/S440E
F1293	1.61E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Q438R/S440E
F1294	2E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1295	9.84E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1296	2.27E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Q438R/S440E
F1297	2.5E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1298	1.47E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1299	1.5E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Q438K/S440D
F1300	1.63E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436T/Q438K/S440D
F1301	8.3E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436F/Q438K/S440D
F1302	2.15E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Q438K/S440D
F1303	2.1E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440D
F1304	1.24E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436F/Q438K/S440D
F1305	2.05E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1306	1.92E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1307	1.44E-07	L235R/S239K/M252Y/V422A/S424A/N434Y/Y436V
F1308	2.06E-07	L235R/S239K/M252Y/V422L/S424L/N434Y/Y436V
F1309	1.26E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438A/S440A
F1310	2.28E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438L/S440L
F1311	1.69E-07	L235R/S239K/M252Y/V422A/S424A/H433D/N434Y/Y436V
F1312	1.79E-07	L235R/S239K/M252Y/V422L/S424L/H433D/N434Y/Y436V
F1313	1.77E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438A/S440A
F1314	2.27E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438L/S440L
F1315	1.52E-07	G237K/S239K/M252Y/N434Y/Y436V
F1316	1.49E-07	G237R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V
F1317	1.38E-07	S239K/M252Y/P329K/N434Y/Y436V
F1318	1.43E-07	S239K/M252Y/P329R/N434Y/Y436V
F1319	2.67E-07	M252Y/L328Y/N434Y
F1320	1.22E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1321	1.03E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1322	1.6E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1323	1.49E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1324	1.32E-07	L234A/L235A/M252Y/N434Y/Y436V
F1325	2.13E-07	L234A/L235A/M252Y/N297A/N434Y/Y436V
F1326	1.09E-08	L234A/L235A/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1327	1.41E-08	L234A/L235A/T250V/M252Y/N297A/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1328	1.52E-07	L235R/G236R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440E

[表2-23]

F1329	1.29E-07	L235R/G236R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1330	1.03E-07	L235R/G236R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1331	7.75E-08	L235R/G236R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1333	1.23E-07	L235R/G236R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V
F1334	1.04E-07	L235R/G236R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1335	8.78E-08	L235R/G236R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1336	7.18E-08	L235R/G236R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1337	7.41E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1338	1.04E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1339	2.51E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1340	5.58E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1341	3.22E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1342	2.51E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1343	2.01E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1344	3.96E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1345	1.05E-07	L235R/G236R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1346	8.59E-08	L235R/G236R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1347	7.14E-08	L235R/G236R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1348	5.52E-08	L235R/G236R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1349	3.36E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1350	1.18E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1351	1.62E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1352	3.93E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1353	4.33E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1354	2.29E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1355	2.47E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1356	1.58E-07	G236R/M252Y/L328R/N434Y/Y436V
F1357	2.81E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1358	9.07E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1359	1.28E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1360	3.12E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1361	3.52E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1362	1.41E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1363	1.9E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1364	7.49E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1365	3.14E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1366	1.17E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1367	1.79E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1368	5.49E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1369	7.6E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1370	9.14E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1371	1.09E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1372	2.28E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1373	8.67E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1374	1.2E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1375	1.03E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V
F1376	9.09E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V
F1377	8.27E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436V
F1378	3.61E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436T

[表2-24]

F1379	2.85E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436F
F1410	1.90E-06	V308P/I332V
F1411	1.70E-07	V308P/I332V/M428L/N434S
F1413	3.70E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/T307Q/Q311A/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1414	5.60E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/T307Q/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1415	5.90E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/Q311A/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1416	1.30E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1417	5.90E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434W/Y436V/Q438K/S440E
F1418	7.50E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434W/Y436V/Q438R/S440E
F1419	1.50E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434W/Y436V/Q438R/S440E
F1420	1.30E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434W/Y436V/Q438K/S440E
F1421	3.20E-08	V308P/M428L/N434W
F1422	1.90E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1423	1.60E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/V302D/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1424	1.60E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/V302E/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1425	1.90E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/V303D/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1426	1.80E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/V303E/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1428	1.50E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/S304E/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1430	3.10E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/V305E/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1433	4.50E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/T307D/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1434	3.60E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/T307E/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1437	1.2E-07	V308P/M428L/N434F
F1438	2.2E-07	V308P/M428L/N434H
F1439	4.7E-08	V308P/M428Y/N434W
F1440	2.6E-07	V308P/M428I/N434W
F1441	2.5E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/M428L/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1442	2.4E-07	V308P/M428L/N434S
F1443	5.0E-07	T307A/V308P/M428L/N434S
F1444	2.6E-07	T307Q/V308P/M428L/N434S
F1445	2.1E-07	V308P/Q311A/M428L/N434S
F1446	2.1E-07	T307Q/V308P/Q311A/M428L/N434S
F1447	6.7E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1448	4.3E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1449	1.2E-07	L235R/S239K/M252W/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1450	8.6E-08	L235R/S239K/M252W/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1451	4.0E-07	L235R/S239K/D249A/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1452	6.1E-07	L235R/S239K/D249E/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1455	7.9E-07	L235R/S239K/D249H/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1460	5.8E-07	L235R/S239K/D249N/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1464	8.4E-07	L235R/S239K/D249S/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1465	8.2E-07	L235R/S239K/D249T/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1469	9.2E-08	L235R/S239K/T250A/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1472	5.3E-07	L235R/S239K/T250F/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1475	2.0E-07	L235R/S239K/T250I/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1478	2.0E-07	L235R/S239K/T250M/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1479	1.2E-06	L235R/S239K/T250N/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1481	1.1E-07	L235R/S239K/T250Q/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1483	1.8E-07	L235R/S239K/T250S/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E

[表2-25]

F1484	1.5E-07	L235R/S239K/T250V/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1486	3.1E-07	L235R/S239K/T250Y/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1490	4.6E-07	L235R/S239K/L251F/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1495	5.4E-07	L235R/S239K/L251M/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1504	6.3E-07	L235R/S239K/L251Y/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1520	1.3E-06	L235R/S239K/M252Y/I253V/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1523	1.8E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255A/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1524	1.4E-06	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255D/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1525	4.2E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255E/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1526	1.7E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255F/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1527	1.9E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255G/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1528	1.6E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255H/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1529	1.5E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255I/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1530	1.5E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255K/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1531	6.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1532	1.1E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255M/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1533	3.2E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255N/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1535	2.7E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255Q/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1536	2.2E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255S/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1537	3.0E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1538	7.4E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255V/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1539	5.6E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255W/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1540	1.7E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255Y/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1541	1.2E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258A/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1542	5.7E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1543	1.2E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258F/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1544	8.2E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258G/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1545	9.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258H/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1546	6.2E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1547	7.9E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258K/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1548	6.6E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258L/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1549	7.8E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258M/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1550	1.2E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258N/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1552	8.1E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258Q/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1553	6.9E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258R/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1554	1.1E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258S/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1555	9.6E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258T/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1556	7.4E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258V/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1557	8.9E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258W/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1558	1.3E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1559	1.4E-07	V308P/Q311A/I332V/M428L/N434S
F1560	2.4E-08	V308P/Q311A/M428L/N434W
F1561	2.5E-08	V308P/Q311A/M428Y/N434W
F1562	2.7E-07	K288D/V308P/I332V/M428L/N434S
F1563	5.0E-08	K288D/V308P/M428L/N434W
F1564	4.8E-08	K288D/V308P/M428Y/N434W
F1565	3.1E-08	V308P/I332V/M428Y/N434W
F1566	3.4E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1567	4.8E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E

[表2-26]

F1568	1.5E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1569	2.6E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433F/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1570	2.1E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433G/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1571	1.7E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433I/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1572	4.1E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1573	1.3E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433L/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1574	9.4E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433M/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1575	8.8E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433N/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1576	4.3E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1577	6.6E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1578	4.6E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1579	5.4E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1580	9.8E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433T/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1581	1.4E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433V/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1582	1.9E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433W/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1583	2.7E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1586	5.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1587	6.1E-08	L235R/S239K/T250Q/M252Y/S254T/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1588	3.4E-08	L235R/G236R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/M428I/N434Y/Y436V
F1589	4.2E-08	L235R/G236R/S239K/T250V/M252Y/V308P/N434Y
F1590	4.7E-08	L235R/G236R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F1591	4.3E-08	L235R/G236R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1592	5.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1593	5.9E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258K/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1594	5.7E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258L/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1595	6.3E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258M/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1596	5.7E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258Q/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1597	5.6E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258R/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1598	6.6E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258V/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1599	7.4E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1600	8.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1601	3.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1602	3.6E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1603	5.9E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1604	6.0E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1605	6.1E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1606	3.2E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/V302D/V308P/H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1607	2.0E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/V302D/V308P/H433D/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1608	2.9E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/V302D/V308P/H433D/N434Y/Q438R/S440E
F1610	4.8E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1611	5.2E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E

[表2-27]

F1612	4.9E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1613	5.2E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1614	5.1E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1615	6.0E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1616	8.2E-08	L235R/S239K/T250Q/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1617	9.6E-08	L235R/S239K/T250Q/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1618	8.6E-08	L235R/S239K/T250Q/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1619	8.8E-08	L235R/S239K/T250Q/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1620	6.4E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1621	5.8E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1622	6.1E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1623	5.9E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1624	7.3E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1625	6.5E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1626	5.4E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1627	6.5E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1628	6.0E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1629	6.9E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1641	4.1E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1642	4.1E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1643	3.9E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1644	3.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1645	3.6E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1646	3.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1647	3.8E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1648	3.8E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1649	3.7E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1650	4.0E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1651	4.4E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1652	4.0E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1653	4.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1654	4.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1655	4.4E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1656	6.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1657	6.1E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1659	3.0E-06	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E
F1670	1.1E-06	L235R/S239K/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1671	2.0E-06	L235R/S239K/N434Y/Y436V
F1672	2.3E-06	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E
F1673	1.8E-06	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D
F1674	2.0E-06	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I
F1675	9.6E-07	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436V
F1677	3.7E-06	L235R/S239K/S254T/T256E/N434H
F1680	1.3E-06	L235R/S239K/N434Y/Y436T

[表2-28]

F1681	1.3E-06	L235R/S239K/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1683	1.1E-06	L235R/S239K/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1684	1.8E-06	L235R/S239K/N434Y
F1686	4.0E-06	L235R/S239K/N434A/Y436V/Q438R/S440E
F1689	1.5E-06	L235R/S239K/N434F/Y436V/Q438R/S440E
F1703	8.5E-07	L235R/S239K/N434W/Y436V/Q438R/S440E
F1705	2.0E-06	L235R/S239K/M428L/N434S
F1706	2.1E-06	L235R/G236R/S239K/M428L/N434S
F1708	2.4E-06	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/Q438R/S440E
F1709	1.7E-06	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/Q438R/S440E
F1710	2.1E-06	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/Q438R/S440E
F1711	1.8E-06	L235R/S239K/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1712	9.3E-07	L235R/S239K/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1713	9.6E-07	L235R/S239K/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1714	1.2E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1715	1.0E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1716	1.0E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1717	9.6E-07	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1718	2.0E-06	N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1719	1.8E-06	N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1720	9.0E-07	N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1721	9.0E-07	N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1722	1.1E-06	H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1723	9.9E-07	H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1724	9.6E-07	H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1725	9.1E-07	H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1734	1.2E-06	L235R/S239K/N434Y/Y436F/Q438R/S440D
F1735	8.1E-07	L235R/S239K/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1736	8.9E-07	L235R/S239K/N434Y/Y436F/Q438K/S440D
F1737	1.3E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1738	1.2E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436F/Q438R/S440D
F1739	9.7E-07	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1740	1.1E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436F/Q438K/S440D
F1741	1.1E-06	N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1742	1.1E-06	N434Y/Y436F/Q438R/S440D
F1743	8.2E-07	N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1744	9.2E-07	N434Y/Y436F/Q438K/S440D
F1745	1.1E-06	H433D/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1746	1.2E-06	H433D/N434Y/Y436F/Q438R/S440D
F1747	9.6E-07	H433D/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1748	1.0E-06	H433D/N434Y/Y436F/Q438K/S440D
F1749	1.3E-06	L235R/S239K/N434Y/Y436T/Q438R/S440D
F1750	1.1E-06	L235R/S239K/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1751	1.1E-06	L235R/S239K/N434Y/Y436T/Q438K/S440D
F1752	1.4E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1753	1.3E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440D
F1754	1.1E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1755	1.3E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440D
F1756	1.2E-06	N434Y/Y436T/Q438R/S440E

[表2-29]

F1757	1.1E-06	N434Y/Y436T/Q438R/S440D
F1758	1.1E-06	N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1759	1.0E-06	N434Y/Y436T/Q438K/S440D
F1760	1.2E-06	H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1761	1.3E-06	H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440D
F1762	1.1E-06	H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1763	1.1E-06	H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440D
F1764	4.8E-06	L235R/S239K/N434Y/Q438R/S440D
F1765	1.7E-06	L235R/S239K/N434Y/Q438K/S440E
F1766	2.4E-06	L235R/S239K/N434Y/Q438K/S440D
F1767	1.5E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Q438R/S440E
F1768	1.5E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Q438R/S440D
F1769	1.9E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Q438K/S440E
F1770	1.4E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Q438K/S440D
F1771	1.9E-06	N434Y/Q438R/S440E
F1772	3.4E-06	N434Y/Q438R/S440D
F1773	1.7E-06	N434Y/Q438K/S440E
F1774	2.7E-06	N434Y/Q438K/S440D
F1775	1.3E-06	H433D/N434Y/Q438R/S440E
F1776	1.5E-06	H433D/N434Y/Q438R/S440D
F1777	1.4E-06	H433D/N434Y/Q438K/S440E
F1778	1.3E-06	H433D/N434Y/Q438K/S440D

作爲改變的例子，係包含一個以上之變異、例如，包含取代爲與起始 Fc 區域之胺基酸不同的胺基酸殘基之變異、或由對起始 Fc 區域之胺基酸插入一個以上胺基酸殘基或由起始 Fc 區域之胺基酸缺失一個以上之胺基酸等。較佳爲，包含於改變後之 Fc 區域的胺基酸序列中包含天然不產生之 Fc 區域的至少一部分的胺基酸序列。如此之變種必然具有與起始 Fc 區域低於 100%之序列同一性或類似性。在較佳之實施形態中，變種係具有與起始 Fc 區域之胺基酸序列低於約 75%～100%之胺基酸序列同一性或類似性、更佳爲低於約 80%～100%、又更佳爲低於 85%～100%、又更佳爲低於約 90%～100%、最佳爲具有低於約 95%～100%之同一性或類似性之胺基酸序列。在本發明之

非限定的其一態樣中，起始 Fc 區域及本發明之經改變之 Fc 區域之間至少具有 1 個胺基酸的差。起始 Fc 區域與改變 Fc 區域之胺基酸的不同，藉由特別於以前述 EU 編號特定之胺基酸殘基位置的特定之胺基酸的不同亦可適合地來特定。

爲了改變 Fc 區域之胺基酸，可適當採用部位特異性變異誘發法(Kunkel 等人(Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82, 488-492))或 Overlap extension PCR 等之公知方法。又，作爲取代爲天然胺基酸以外之胺基酸的胺基酸改變方法，亦可採用複數之公知方法(Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. (2006)35, 225-249、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003) 100(11), 6353-6357)。例如，含有非天然胺基酸與終止密碼子之一的 UAG 密碼子(琥珀密碼子)之互補的琥珀抑制子 tRNA 結合的 tRNA 之無細胞轉譯系統(Clover Direct(Protein Express))等亦可適合使用。

具有編碼如前述之施加胺基酸變異的 FcRn 結合結構域之改變體之聚核苷酸、與編碼隨著如前述之經選擇的條件其結合活性會變化之抗原結合分子分子的聚核苷酸連結爲同一讀框之重鏈的編碼抗原結合分子之聚核苷酸，亦作爲本發明之改變體的其一態樣被製造。

藉由本發明，提供了包含了由經導入與編碼 FcRn 結合結構域之聚核苷酸連結爲同一讀框且與由本發明之病毒中單離之聚核苷酸連結爲能夠作用之載體的細胞培養液中回收抗原結合分子的抗原結合分子之製造方法。又，亦提

供包含了由經導入與編碼於載體中預先連結爲能夠作用之FcRn 結合結構域之聚核苷酸連結爲同一讀框且與由本發明之病毒中單離之聚核苷酸連結爲能夠作用之載體的細胞培養液中回收抗原結合分子的抗原結合分子之製造方法。

醫藥組成物

本發明不拘束於特定理論，例如，使在 pH 酸性區域對抗原的結合活性比在 pH 中性區域條件下對抗原的結合活性低的方式，將包含隨著離子濃度條件不同對抗原的結合活性會變化之抗原結合結構域及附加地在 pH 中性區域條件下具有對人類 FcRn 之結合活性的抗體恆定區域等之FcRn 結合結構域的抗原結合分子投與至生體時促進對生體中之細胞之攝入，藉以使 1 分子的抗原結合分子能夠結合之抗原數目會增加的理由、及血漿中抗原濃度之消失被促進的理由，可爲例如以下所說明者。

例如，將抗原結合分子結合於膜抗原之抗體對生體內投與時，該抗體與抗原結合後，藉由在與抗原結合的狀態下與抗原一起內化(internalization)而被攝入細胞內之內體。之後，在與抗原結合的狀態下移動至溶體之抗體，係與抗原一起藉由溶體而被分解。透過內化而由血漿中之消失，係被稱爲抗原依存性消失，於多數抗體分子中有被報導(Drug Discov Today(2006)11(1-2), 81-88)。1 分子之IgG 抗體以 2 價結合至抗原時，係在 1 分子抗體結合至 2 分子抗原的狀態下被內化，以該狀態下於溶體被分解。因

此，通常之抗體的情況時，1分子IgG抗體無法與3分子以上之抗原結合。例如，具有中和活性之1分子的IgG抗體的情況時，無法中和3分子以上之抗原。

IgG分子之血漿中滯留性較長(消失慢)，係因爲已知作爲IgG分子之補救受體的人類FcRn發揮功能。藉由胞飲作用被攝入於內體的IgG分子，係與內體內之酸性條件下表現於內體內之人類FcRn結合。無法與人類FcRn結合之IgG分子會在之後移動的溶體內被分解。另一方面，結合於人類FcRn之IgG分子係移動至細胞表面。在血漿中之中性條件下，IgG分子會由人類FcRn解離，因此該IgG分子會再度被回收至血漿中。

又抗原結合分子爲與可溶型抗原結合之抗體的情況時，對生體內投與之抗體係與抗原結合，之後抗體係在與抗原結合的狀態下被攝入細胞內。被攝入細胞內之抗體大多於內體內與FcRn結合後移動至細胞表面。血漿中之中性條件下，抗體會由人類FcRn解離，故被放出至細胞外。但是，包含隨著pH等離子濃度之條件不同，對抗原的結合活性不變之通常的抗原結合結構域之抗體，係在與抗原結合的狀態下被放出至細胞外，因此無法再度與抗原結合。因此，與結合於膜抗原之抗體同樣地，隨著pH等離子濃度之條件不同，對抗原的結合活性不變之通常的1分子IgG抗體，無法與3分子以上之抗原結合。

於血漿中之pH中性區域條件下對抗原強力結合、且在內體內之pH酸性區域條件下由抗原解離之pH依存性

地對抗原結合之抗體(於 pH 中性區域條件下對抗原結合、於 pH 酸性區域條件下解離的抗體)或於血漿中之高鈣離子濃度條件下對抗原強力結合、且在內體內脂低鈣離子濃度條件下由抗原解離之鈣離子濃度依存性地對抗原結合之抗體(於高鈣離子濃度條件下對抗原結合、於低鈣離子濃度條件下解離的抗體)可在內體內由抗原解離。pH 依存性地對抗原結合的抗體或鈣離子濃度依存性地對抗原結合的抗體，在解離抗原後藉由 FcRn 而被回收至血漿中時，可再度與抗原結合。因此一分子之抗體能夠與複數個抗原分子重複地結合。又，與抗原結合分子結合之抗原藉由在內體內自抗體解離，不回收至血漿中而在溶體內被分解。藉由將如此之抗原結合分子對生體投與，可促進抗原對細胞內之攝入、且使血漿中之抗原濃度降低。

藉由對於血漿中之 pH 中性區域條件下對抗原強力結合、且在內體內之 pH 酸性區域條件下由抗原解離之 pH 依存性地對抗原結合之抗體(於 pH 中性區域條件下對抗原結合、於 pH 酸性區域條件下解離的抗體)或於血漿中之高鈣離子濃度條件下對抗原強力結合、且在內體內脂低鈣離子濃度條件下由抗原解離之鈣離子濃度依存性地對抗原結合之抗體(於高鈣離子濃度條件下對抗原結合、於低鈣離子濃度條件下解離的抗體)，賦予在 pH 中性區域條件下(pH7.4)對人類 FcRn 的結合能力，會進一步促進抗原結合分子所結合的抗原對細胞內之攝入。亦即，藉由將如此之抗原結合分子對生體投與，可促進抗原的消失、且使血漿

中之抗原濃度降低。不具有 pH 依存性地對抗原的結合能力、或鈣離子濃度依存性地對抗原的結合能力之通常的抗體及其抗體-抗原複合體，藉由非特異性內吞作用而被攝入細胞中，藉由在內體內之酸性條件下與 FcRn 結合而被輸送至細胞表面，藉由在細胞表面之中性條件下由 FcRn 解離而被回收至血漿中。因此，充分對 pH 依存性地對抗原結合(在 pH 中性區域條件下結合、在 pH 酸性區域條件下解離)、或充分對鈣離子濃度依存性地對抗原結合(在高鈣離子濃度條件下結合、在低鈣離子濃度條件下解離)之抗體在血漿中與抗原結合、在內體內，使結合之抗原解離時，可認爲抗原之消失速度變得與非特異性內吞作用所致之抗體及其抗體-抗原複合體對細胞之攝入速度相等。抗體與抗原間之結合的 pH 依存性或鈣離子濃度依存性不充分時，於內體內不自抗體解離之抗原亦與抗體一起被回收至血漿中、pH 依存性充分時，關於抗原之消失速度，非特異性內吞作用所致之對細胞的攝入速度係成爲速率決定步驟。又，FcRn 係將抗體由內體內輸送至細胞表面，因此可認爲 FcRn 之一部分亦存在於細胞表面。

通常、抗原結合分子之其一態樣之 IgG 型免疫球蛋白，幾乎沒有在 pH 中性區域中對 FcRn 的結合活性。本發明者等人認爲，在 pH 中性區域中具有對 FcRn 的結合活性之 IgG 型免疫球蛋白，可與存在於細胞表面之 FcRn，藉由與存在於細胞表面之 FcRn 結合，該 IgG 型免疫球蛋白係 FcRn 依存性地被攝入細胞中。透過 FcRn 對細胞之攝入

速度，比非特異性內吞作用所致對細胞之攝入速度更快。因此，藉由賦予在 pH 中性區域中對 FcRn 之結合能力，可認爲能夠使抗原結合分子所致之抗原的消失速度進一步增快。亦即，在 pH 中性區域中具有對 FcRn 的結合能力之抗原結合分子，相較於通常(天然型人類)之 IgG 型免疫球蛋白，係更快地將抗原送入細胞內，於內體內使抗原解離、再度回收於細胞表面或血漿中，於該處再度與抗原結合，或透過 FcRn 被攝入細胞內。藉由使 pH 中性區域中對 FcRn 的結合能力提高，可使此循環之循環速度變快，因此使抗原由血漿中消失的速度增快。進一步地，藉由將抗原結合分子在 pH 酸性區域對抗原的結合活性變得比在 pH 中性區域對抗原的結合活性更低，可進一步使抗原由血漿中消失的速度增快。又，因爲使此循環之循環速度變快，結果產生之其循環數目增大，可認爲 1 分子之抗原結合分子所能夠結合之抗原的分子數亦變多。本發明之抗原結合分子，因爲係由抗原結合結構域與 FcRn 結合結構域所構成，FcRn 結合結構域對與抗原結合不會帶來影響，又，由上述機制來考慮，與抗原種類無關地，可認爲藉由使抗原結合分子在 pH 酸性區域或低鈣離子濃度條件等之離子濃度下之抗原結合活性(結合能力)變得比 pH 中性區域或高鈣離子濃度條件等之離子濃度下之抗原結合活性(結合能力)低、及/或使於血漿中之 pH 中對 FcRn 之結合活性增大，可促進抗原結合分子所致之抗原對細胞內之攝入，使抗原之消失速度增快。因而本發明之抗原結合分子，可認

爲就抗原所帶來之副作用降低、抗體之投與量上昇、抗體之生體內動態的改善等方面，係發揮比習知之治療用抗體更優良的效果。

亦即，本發明係關於本發明之抗原結合分子、藉由本發明之篩選方法而單離之抗原結合分子、或包含藉由本發明之製造方法所製造之抗原結合分子的醫藥組成物。本發明之抗原結合分子或藉由本發明之製造方法所製造之抗原結合分子，藉由其投與，相較於通常之抗原結合分子，使血漿中之抗原濃度降低的作用高，故有用於作爲醫藥組成物。本發明之醫藥組成物中可包含醫藥上容許的載劑。

本發明之醫藥組成物，通常係指用於疾病之治療或預防、或檢查/診斷之藥劑。

本發明之醫藥組成物，可使用所屬技術領域中具有通常知識者公知之方法予以製劑化。例如，能夠以與水或其以外之藥學上可容許之液體的無菌性溶液、或懸濁液劑之注射劑的形式非經口地使用。例如，藥理學上容許的載劑或媒介，具體而言，可與滅菌水或生理食鹽水、植物油、乳化劑、懸濁劑、界面活性劑、安定劑、香味劑、賦形劑、媒介物(vehicle)、防腐劑、結合劑等適當組合，藉由以一般所認可的製藥實施上被要求之單位用量形態混合而製劑化。該等製劑中的有效成分量，係設定爲可得到所指示範圍之適當容量。

用於注射之無菌組成物可使用如注射用蒸餾水之媒介物，遵照通常之製劑實施來處方。作爲注射用之水溶液

者，可列舉例如包含生理食鹽水、葡萄糖或其他輔助藥(例如 D-山梨醇、D-甘露糖、D-甘露醇、氯化鈉)之等張液。可併用適當的溶解輔助劑、例如醇(乙醇等)、多元醇(丙二醇、聚乙二醇等)、非離子性界面活性劑(聚山梨醇酯80(TM)、HCO-50等)。

油性液可列舉芝麻油、大豆油，作爲溶解輔助劑亦可併用安息香苄酯及/或苄醇。又，可摻合緩衝劑(例如，磷酸鹽緩衝液及乙酸鈉緩衝液)、無痛化劑(例如，鹽酸普羅卡因)、安定劑(例如，苄醇及酚)、抗氧化劑。調製之注射液通常係填充於適當的安瓿。

本發明之醫藥組成物，較佳爲藉由非經口投與來投與。例如係投與注射劑型、經鼻投與劑型、經肺投與劑型、經皮投與型之組成物。例如，可藉由靜脈內注射、肌肉內注射、腹腔內注射、皮下注射等來全身或局部地投與。

投與方法可隨患者之年齡、症狀來適當選擇。含有抗原結合分子之醫藥組成物的投與量，例如，可設定爲每一次體重每 1 kg 爲 0.0001 mg 至 1000 mg 之範圍。或例如，可設定爲每名患者 0.001～100000 mg 之投與量，但本發明並非必然限定於該等數值。投與量及投與方法，係隨著患者之體重、年齡、症狀等而變動，只要係所屬技術領域中具有通常知識者即可考慮該等條件來設定適當投與量及投與方法。

再者，本發明記載之胺基酸序列中所含之胺基酸亦有

接受轉譯後修飾(例如，N 末端之麩醯胺的焦麩胺醯化所致對焦麩胺酸之修飾爲所屬技術領域中具有通常知識者所眾所周知之修飾)的情況，如此之胺基酸經轉譯後修飾的情況亦當然包含於本發明記載之胺基酸序列。

再者本說明書中引用之全部先前技術文獻，係作爲參照而編入本說明書中。

本說明書中使用時，以「包含(包括、含有)···(comprising)」之表現方式所表示的態樣，係包括「本質上由···所構成(essentially consisting of)」之表現方式所表示的態樣、以及「由···所構成(consisting of)」之表現方式所表示的態樣。

[實施例]

以下藉由實施例具體說明本發明，但本發明不被該等實施例所限制。

[實施例 1]pH 依存的結合抗體庫之設計

(1-1)pH 依存性結合抗體之取得方法

WO2009125825 揭示了藉由於抗原結合分子中導入組胺酸，於 pH 中性區域與 pH 酸性區域性質會變化之 pH 依存性地對抗原結合的抗體。所揭示之 pH 依存性結合抗體，係藉由將所期望之抗原結合分子之胺基酸序列的一部分取代爲組胺酸之改變而取得。爲了在不預先得到改變之對象的抗原結合分子之下，更有效率地取得 pH 依存性結

合抗體，可考慮由將組胺酸導入於可變區域(更佳爲可能與抗原結合相關之位置)的抗原結合分子集團(稱爲 His 庫)取得與所期望之抗原結合之抗原結合分子。由 His 庫得到之抗原結合分子相較於通常之抗體庫，組胺酸係更高頻率地出現，因此認爲能夠有效率地取得具有所期望之性質的抗原結合分子。

(1-2)設計經導入組胺酸殘基於可變區域之抗體分子集團(His 庫)，以能夠有效率地取得 pH 依存性地對抗原結合之結合抗體

首先，選擇於 His 庫導入組胺酸之位置。WO2009125825 中揭示了藉由將 IL-6 受體抗體、IL-6 抗體及 IL-31 受體抗體之序列中的胺基酸殘基取代爲組胺酸，來製造 pH 依存性地對抗原結合的抗體。進一步地，藉由將抗原結合分子之胺基酸序列取代爲組胺酸，可製造具有 pH 依存性抗原結合能力之抗蛋白溶菌酶抗體(FEBS Letter 11483, 309, 1, 85-88)及抗鐵調素(hepcidin)抗體(WO2009139822)。於 IL-6 受體抗體、IL-6 抗體、IL-31 受體抗體、蛋白溶菌酶抗體及鐵調素抗體導入組胺酸之位置係表示於表 3。表 3 所示位置，可列舉爲能夠控制抗原與抗體之結合的位置之候補。再者表 3 所示位置以外，與抗原接觸之可能性高的位置亦可被認爲適合作爲導入組胺酸之位置。

[表3]

抗體	鏈	位置(Kabat編號)								
IL-6受體抗體	H	27	31	32	35	50	58	62	100B	102
	L	28	32	53	56	92				
IL-6 抗體	H	32	59	61	99					
	L	53	54	90	94					
IL-31受體抗體	H	33								
	L									
蛋白溶菌酶抗體	H	33	98							
	L	54								
鐵調素抗體	H	52	56	95	100c					
	L	28	90							

由重鏈可變區域與輕鏈可變區域所構成之 His 庫當中，重鏈可變區域係使用人類抗體序列、輕鏈可變區域中係導入組胺酸。作爲以 His 庫導入組胺酸之位置，係選擇上述列舉之位置、與可能與抗原結合相關之位置，亦即輕鏈之 30 位、32 位、50 位、53 位、91 位、92 位及 93 位(Kabat 編號、Kabat EA et al. 1991. Sequence of Proteins of Immunological Interest. NIH)。又，作爲導入組胺酸之輕鏈可變區域的模板序列，係選擇 Vk1 序列。於模板序列出現複數之胺基酸而構成分子庫之抗原結合分子的多樣性會擴大。出現複數胺基酸之位置，係選擇露出於與抗原相互作用之可能性高的可變區域之表面的位置。具體而言，作爲如此之柔性殘基，係選擇輕鏈之 30 位、31 位、32 位、34 位、50 位、53 位、91 位、92 位、93 位、94 位及 96 位(Kabat 編號、Kabat EA et al. 1991. Sequence of Proteins of Immunological Interest. NIH)。

接著設定出現之胺基酸殘基的種類與其出現率。解析登錄於 Kabat 資料庫(KABAT, E.A. ET AL.: 'Sequences of

proteins of immunological interest', vol. 91, 1991, NIH PUBLICATION)之 hVk1 與 hVk3 序列中的柔性殘基中胺基酸之出現頻率。根據解析結果，由於各位置出現頻率高之胺基酸選擇於 His 庫出現之胺基酸的種類。此時，亦選擇於解析結果中判定爲出現頻率少的胺基酸以使胺基酸之性質不偏差。又，被選擇之胺基酸的出現頻率，係參考 Kabat 資料庫之解析結果來設定。

藉由考慮如以上方式設定之胺基酸及出現頻率，設計組胺酸於各 CDR 必定有 1 個而固定之 His 庫 1 與相較於 His 庫 1 更重視序列多樣性之 His 庫 2 以作爲 His 庫。His 庫 1 及 His 庫 2 之詳細設計係如表 4 及表 5 所示(各表中之位置表示 Kabat 編號)。又，表 4 及 5 所記載之胺基酸的出現頻率，以 Kabat 編號表示之 92 位爲 Asn(N)時，94 位可將 Ser(S)除外。

[表4]

位置	胺基酸								
CDR1									
28	S:100%								
29	I:100%								
30	N:25%	S:25%	R:25%	H:25%					
31	S:100%								
32	H:100%								
33	L:100%								
34	A:50%	N:50%							
CDR2									
50	H:100%				或	A:25%	D:25%	G:25%	K:25%
51	A:100%					A:100%			
52	S:100%					S:100%			
53	K:33.3%	N:33.3%	S:33.3%			H:100%			
54	L:100%					L:100%			
55	Q:100%					Q:100%			
56	S:100%					S:100%			
CDR3									
90	Q:100%				或	Q:100%			
91	H:100%					S:33.3%	R:33.3%	Y:33.3%	
92	G:25%	N:25%	S:25%	Y:25%		H:100%			
93	H:33.3%	N:33.3%	S:33.3%			H:33.3%	N:33.3%	S:33.3%	
94	S:50%	Y:50%				S:50%	Y:50%		
95	P:100%					P:100%			
96	L:50%	Y:50%				L:50%	Y:50%		

[表5]

CDR	位置	胺基酸				
CDR1	28	S:100%				
	29	I : 100%				
	30	H : 30%	N : 10%	S : 50%	R : 10%	
	31	N : 35%	S : 65%			
	32	H : 40%	N : 20%	Y : 40%		
	33	L:100%				
	34	A : 70%	N : 30%			
CDR2	50	A : 25%	D : 15%	G : 25%	H : 30%	K : 5%
	51	A:100%				
	52	S:100%				
	53	H : 30%	K : 10%	N : 15%	S : 45%	
	54	L:100%				
	55	Q : 100%				
	56	S:100%				
CDR3	90	Q:100%				
	91	H : 30%	S : 15%	R : 10%	Y : 45%	
	92	G : 20%	H : 30%	N : 20%	S : 15%	Y : 15%
	93	H : 30%	N : 25%	S : 45%		
	94	S : 50%	Y : 50%			
	95	P:100%				
	96	L : 50%	Y : 50%			

[實施例 2]用以取得 pH 依存性地與抗原結合之抗體之人類抗體噬菌體展示分子庫(His 庫 1)的製造

以由人類 PBMC 製成之多 A RNA、或市售之人類多 A RNA 等作爲模板，以 PCR 法放大抗體重鏈可變區域之基因庫。將實施例 1 記載之作爲 His 庫 1 所設計之抗體輕鏈可變區域的基因庫使用 PCR 法放大。如此方式製造之抗體重鏈可變區域的基因庫與抗體輕鏈可變區域之基因庫的組合係插入噬粒載體，構築展現由人類抗體序列所構成之 Fab 結構域的人類抗體噬菌體展示分子庫。構築方法係參考(Methods Mol Biol.(2002)178, 87-100)。上述分子庫構

築時，係使用連接噬粒之 Fab 與噬菌體 pIII 蛋白質之連結子部分、及輔助噬菌體 pIII 蛋白基因之 N2 結構域與 CT 結構域之間經插入胰蛋白酶切斷序列之噬菌體展示分子庫的序列。確認由經導入抗體基因庫之大腸菌單離之抗體基因部分的序列，得到 132 殖株之序列資訊。設計之胺基酸分布、與確認之序列中的胺基酸分布係如圖 1 所示。構築了包含對應於設計之胺基酸分布之多樣序列的分子庫。

[實施例 3]pH 依存性地與 IL-6R 結合之抗體的取得

(3-1)由珠篩選之分子庫取得 pH 依存性地與抗原結合之抗體片段

由構築之 His 庫 1 的最初選拔，係藉由僅濃縮具有對抗原(IL-6R)之結合能力的抗體片段來實施。

由保持構築之噬菌體展示用噬粒之大腸菌中進行噬菌體產生。藉由將經於進行過噬菌體產生之大腸菌培養液中添加 2.5 M NaCl/10%PEG 而沈澱之噬菌體集團以 TBS 稀釋，以得到噬菌體庫液。藉由於噬菌體庫液中添加 BSA 及 $CaCl_2$，調製爲終濃度 4% BSA、1.2mM 鈣離子。作爲篩選方法，係參照使用了一般方法之固定化於磁珠之抗原的篩選方法(J. Immunol. Methods.(2008)332(1-2), 2-9、J. Immunol. Methods.(2001)247(1-2), 191-203、Biotechnol. Prog.(2002)18(2)212-20、Mol. Cell Proteomics(2003)2(2), 61-9)。磁珠係使用 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated)或 Streptavidin coated

beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)。

具體而言，藉由於經調製之噬菌體庫液中添加 250 pmol 之生物素標誌抗原，將該噬菌體庫液於室溫與抗原接觸 60 分鐘。添加經 BSA 阻斷之磁珠，將抗原與噬菌體之複合體與磁珠在室溫結合 15 分鐘。將磁珠以 1 mL 之 1.2 mM $CaCl_2$/TBST(含有 1.2 mM $CaCl_2$、0.1% Tween20 之 TBS)洗淨 3 次後，以 1 mL 之 1.2 mM $CaCl_2$/TBS (pH7.6)進一步洗淨 2 次。之後，將添加 1mg/mL 胰蛋白酶 0.5mL 後之磁珠於室溫懸濁 15 分鐘後，立即使用磁性架台將磁珠分離，回收噬菌體溶液。將回收之噬菌體溶液添加於對數增殖期(OD600 爲 0.4-0.7)之 10 mL 大腸菌株 ER2738。藉由於 37℃緩慢地進行上述大腸菌之攪拌培養 1 小時，使噬菌體感染大腸菌。經感染之大腸菌係播種於 225 mm x 225 mm 之盤。接著，藉由自經播種之大腸菌培養液中回收噬菌體，調製噬菌體庫液。

第 2 次以後之篩選，係以抗原結合能力或 pH 依存性結合能力爲指標進行噬菌體之濃縮。具體而言，藉由於調製之噬菌體庫液中添加 40 pmol 之生物素標誌抗原，使噬菌體庫於室溫與抗原接觸 60 分鐘。添加經 BSA 阻斷之磁珠，將抗原與噬菌體之複合體與磁珠在室溫結合 15 分鐘。磁珠係以 1 mL 之 1.2 mM $CaCl_2$/TBST 與 1.2 mM $CaCl_2$/TBS 洗淨複數次。之後以抗原結合能力爲指標而濃縮時，將添加 1mg/mL 胰蛋白酶 0.5mL 後之磁珠於室溫懸濁 15 分鐘後，立即使用磁性架台將磁珠分離，回收噬菌

體溶液。以 pH 依存性抗原結合能力爲指標而濃縮時，將添加 0.1mL 之 50mM MES/1.2mM $CaCl_2$/150mM NaCl (pH5.5)後之磁珠於室溫懸濁後、立即使用磁性架台將磁珠分離，藉由於回收之噬菌體溶液中添加 100mg/mL 之胰蛋白酶 5μL，不展現 Fab 之噬菌體的 pIII 蛋白質(來自輔助噬菌體之 pIII 蛋白質)被切斷，使對不展現 Fab 之噬菌體的大腸菌之感染能力喪失。將回收之噬菌體添加於對數增殖期(OD600 爲 0.4-0.7)之 10 mL 大腸菌株 ER2738。藉由於 37℃緩慢地進行上述大腸菌之攪拌培養 1 小時，使噬菌體感染大腸菌。經感染之大腸菌係播種於 225 mm x 225 mm 之盤。接著，藉由自經播種之大腸菌培養液中回收噬菌體，回收噬菌體庫液。以抗原結合能力或 pH 依存性結合能力爲指標之篩選係重複 2 次。

(3-2)噬菌體 ELISA 之評估

遵習一般方法(Methods Mol. Biol.(2002)178, 133-145)，由藉由上述方法所得之大腸菌單一菌落，回收含有噬菌體之培養上清液。

將添加 BSA 及 $CaCl_2$ 使成爲終濃度 4%BSA 及鈣離子濃度 1.2 mM 之含有噬菌體之培養上清液依以下順序供 ELISA。將 StreptaWell 96 微量孔盤(Roche)以含有生物素標誌抗原之 100μL PBS 被覆一晚。將該盤之各孔以 PBST(含有 0.1% Tween20 之 PBS)洗淨藉以去除抗原後，將該孔以 4% BSA-TBS 250μL 阻斷 1 小時以上。將於去除

4% BSA-TBS 之各孔中添加有所調製之培養上清液的該盤於 37℃靜置 1 小時，使展現噬菌體之抗體與存在於各孔之抗原結合。於經 1.2 mM $CaCl_2$/TBST 洗淨之各孔中添加 1.2 mM $CaCl_2$/TBS(pH7.6)或 1.2 mM $CaCl_2$/TBS(pH5.5)，該盤係在 37℃靜置 30 分鐘培養。經 1.2 mM $CaCl_2$/TBST 洗淨後，將經添加以 4% BSA 及離子化鈣濃度 1.2 mM 之 TBS 稀釋之 HRP 結合抗 M13 抗體(Amersham Pharmacia Biotech)至各孔的盤培養 1 小時。以 1.2 mM $CaCl_2$/TBST 洗淨後，將經添加 TMB single 溶液(ZYMED)之各孔中溶液之發色反應藉由添加硫酸以停止後、以 450 nm 吸光度來測定該發色。

以抗原結合能力爲指標來濃縮時，對實施過 2 次篩選者實施噬菌體 ELISA 後，抗原特異性地 ELISA 陽性者在 96 殖株中爲 17 殖株，因此解析經實施 3 次篩選者。另一方面，以 pH 依存性的抗原結合能力爲指標來濃縮時，對實施過 2 次篩選者實施噬菌體 ELISA 後，ELISA 陽性者在 94 殖株中爲 70 殖株，因此解析經實施 2 次篩選者。

對經實施上述之噬菌體 ELISA 的殖株，係解析使用特異的引子放大之基因的鹼基序列。

噬菌體 ELISA 及序列解析之結果如以下表 6 所示。

[表6]

分子庫	His庫1	His庫1
濃縮指標	抗原結合能力	pH依存性抗原結合能力
篩選次數	3	2
試驗之殖株數	80	94
ELISA陽性	76	70
ELISA陽性殖株序列種類	30	67
pH依存性結合殖株序列種類	22	47

藉由同樣方法，由天然人類抗體噬菌體展示分子庫，進行具有 pH 依存性抗原結合能力之抗體的取得。以抗原結合能力爲指標來濃縮時，88 殖株評估中取得了 13 種之 pH 依存性結合抗體。又，以 pH 依存性抗原結合能力爲指標來濃縮時，83 殖株評估中取得了 27 種之 pH 依存性結合抗體。

由以上結果，確認了相較於天然人類抗體噬菌體展示分子庫，His 庫 1 所得之具有 pH 依存性抗原結合能力之殖株的變化較多。

(3-3)抗體之表現與純化

噬菌體 ELISA 之結果，判斷爲具有 pH 依存性地對抗原的結合能力之殖株，係導入動物細胞表現用質體。抗體之表現係使用以下方法進行。將來自人類胎兒腎細胞之 FreeStyle 293-F 株(Invitrogen)懸濁於 FreeStyle 293 Expression Medium 培養基(Invitrogen)，以 1.33×10^6 細胞/mL 之細胞密度對 6 孔盤之各孔各播種 3 mL。調製之

質體係藉由脂質體轉染法導入細胞。於 CO_2 培養器(37度、8%CO_2、90 rpm)中進行 4 日培養。使用 rProtein A SepharoseTM Fast Flow(Amersham Biosciences)，使用所屬技術領域中具有通常知識者公知之方法，由上述所得之培養上清液中純化抗體。使用分光光度計測定經純化之抗體溶液在 280 nm 之吸光度。藉由使用以 PACE 法算出之吸光係數，由所得之測定值算出抗體濃度(Protein Science (1995)4, 2411-2423)。

(3-4)取得之抗體對人類 IL-6 受體之 pH 依存性結合能力的評估

爲了判斷於(3-3)中取得之抗體 6RpH#01(重鏈序列編號：18、輕鏈序列編號：19)、及 6RpH#02(重鏈序列編號：20)、輕鏈序列編號：21)、及 6RpH#03(重鏈序列編號：22)、輕鏈序列編號：23)對人類 IL-6 受體之結合活性是否爲 pH 依存性，使用 Biacore T100(GE Healthcare)來解析該等抗體與人類 IL-6 受體之相互作用。作爲不具有對人類 IL-6 受體之 pH 依存性的結合活性之對照抗體，係使用 tocilizumab(重鏈序列編號：24)、輕鏈序列編號：25)。作爲中性區域 pH 及酸性區域 pH 之條件，分別於 pH7.4 及 pH6.0 之溶液中解析抗原抗體反應之相互作用。於以胺偶合法固定化適當量之 protein A/G(Invitrogen)之 Sensor chip CM5(GE Healthcare)上，各捕捉目的抗體 300RU 左右。跑動緩衝液係使用 20 mM ACES、150 mM

NaCl、0.05%(w/v) Tween20、1.2 mM $CaCl_2$(pH7.4)或 20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05%(w/v) Tween20、1.2mM $CaCl_2$(pH6.0)之 2 種緩衝液。人類 IL-6 受體之稀釋亦使用各自的緩衝液。測定全部在 37℃實施。

在使用了對照抗體之 tocilizumab 抗體、6RpH#01 抗體及 6RpH#02 抗體及 6RpH#03 抗體之抗原抗體反應之相互作用的解析時，藉由將 IL-6 受體之稀釋液與空白的跑動緩衝液以流速 5μL/min 注入 3 分鐘，使 IL-6 受體與被捕捉於感應晶片(sensor chip)上之 tocilizumab 抗體、6RpH#01 抗體及 6RpH#02 抗體及 6RpH#03 抗體相互作用。之後，藉由將 10 mMGlycine-HCl(pH1.5)以流速 30μL/min 注入 30 秒，使感應晶片再生。

藉由前述方法所測定之 pH7.4 之表面電漿共振感應圖(sensorgram)係如圖 2 所示。又，以同樣方法取得之在 pH6.0 之條件下的表面電漿共振感應圖(sensorgram)係如圖 3 所示。

由前述結果，可觀察到 6RpH#01 抗體、6RpH#02 抗體及 6RpH#03 抗體，藉由使緩衝液中之 pH 由 pH7.4 變爲 pH6.0，對 IL6 受體之結合能力大幅降低。

[實施例 4]用於取得 pH 依存性地與抗原結合之抗體之人類抗體噬菌體展示分子庫(His 庫 2)之製造

藉由以自人類 PBMC 製成之多 A RNA、或市售之人類多 A RNA 等作爲模板，以 PCR 法放大抗體重鏈可變區域

之基因庫。如實施例 1 所記載般地，爲了提高具有 pH 依存性抗原結合能力之抗體的出現頻率，設計了在抗體可變區域之輕鏈部分當中，經提高成爲抗原接觸部位之可能性高之部位的組胺酸殘基出現頻率之抗體可變區域輕鏈部分。又，作爲柔性殘基當中經導入組胺酸之殘基以外的胺基酸殘基，設計了由在天然人類抗體之胺基酸出現頻率的資訊所特定之出現頻率高的胺基酸呈均等分布之抗體輕鏈可變區域的分子庫。合成如上述方式設計之抗體輕鏈可變區域的基因庫。分子庫之合成亦可委託商業上受委託的公司等來製造。如此所製造之抗體重鏈可變區域之基因庫與抗體輕鏈可變區域之基因庫的組合係被插入噬粒載體，根據公知之方法(Methods Mol Biol.(2002)178, 87-100)，構築展現由人類抗體序列所構成之 Fab 結構域之人類抗體噬菌體展示分子庫。根據實施例 2 所記載之方法，確認由經導入抗體基因庫之大腸菌中單離之抗體基因部分的序列。

[實施例 5]pH 依存性地與 IL-6R 結合之抗體的取得

(5-1)磁珠篩選之由分子庫中取得 pH 依存性地與抗原結合之抗體片段

由經構築之 His 庫 2 的最初選拔，係藉由僅濃縮具有對抗原(IL-6 受體)之結合能力的抗體片段來實施。

進行由保持有構築之噬菌體展示用噬粒的大腸菌中產生噬菌體。藉由將於經進行噬菌體產生之大腸菌培養液中添加 2.5 M NaCl/10%PEG 藉以沈澱之噬菌體集團以 TBS

稀釋而得到噬菌體庫液。接著，於噬菌體庫液添加作爲阻斷劑之 BSA 或脫脂奶。篩選方法係參照一般方法之使用了固定化於磁珠之抗原的篩選方法(J. Immunol. Methods. (2008) 332(1-2), 2-9、J. Immunol. Methods.(2001) 247(1-2), 191-203、Biotechnol. Prog.(2002) 18(2) 212-20、Mol. Cell Proteomics (2003) 2(2), 61-9)。磁珠係使用 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated)或 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)。

具體而言，藉由於調製之噬菌體庫液中添加 250 pmol 之生物素標誌抗原，使該噬菌體庫液於室溫與抗原接觸 60 分鐘。添加經阻斷劑阻斷之磁珠，使抗原與噬菌體之複合體與磁珠在室溫結合 15 分鐘。將磁珠以 1 mL 之 TBST 洗淨 3 次後，以 1 mL 之 TBS 進一步洗淨 2 次。之後，將添加 1 mg/mL 之胰蛋白酶 0.5 mL 的磁珠於室溫懸濁 15 分鐘後，立即使用磁性架台將磁珠分離，回收噬菌體溶液。將回收之噬菌體溶液，添加於成爲對數增殖期(OD600 爲 0.4-0.7)之 10 mL 大腸菌株 ER2738 中。藉由於 37℃緩慢地進行上述大腸菌之攪拌培養 1 小時，使噬菌體感染大腸菌。將被感染之大腸菌播種於 225 mm x 225 mm 之盤。接著，藉由自播種之大腸菌的培養液中回收噬菌體，以調製噬菌體庫液。

第 2 次以後之篩選中，以抗原結合能力或 pH 依存性結合能力爲指標來進行噬菌體的濃縮。具體而言，藉由於經調製之噬菌體庫液中添加 40 pmol 之生物素標誌抗原，

使噬菌體庫在室溫與抗原接觸 60 分鐘。添加經 BSA 或脫脂奶阻斷之磁珠，使抗原與噬菌體之複合體與磁珠在室溫結合 15 分鐘。將磁珠以 1 mL 之 TBST 與 TBS 洗淨。之後，以抗原結合能力作爲指標來濃縮的情況時，係將添加 1mg/mL 胰蛋白酶 0.5mL 後之磁珠於室溫懸濁 15 分鐘後，立即使用磁性架台將磁珠分離，回收噬菌體溶液。以 pH 依存性抗原結合能力作爲指標來濃縮的情況時，係將經添加 0.1 mL 之 50 mM MES/1.2 mM $CaCl_2$/150 mM NaCl (pH5.5)的磁珠在室溫懸濁後，立即使用磁性架台將磁珠分離，回收噬菌體溶液。藉由於回收之噬菌體溶液中添加 100 mg/mL 之胰蛋白酶 5μL，不展現 Fab 之噬菌體的 pIII 蛋白質(來自輔助噬菌體之 pIII 蛋白質)被切斷，使對不展現 Fab 之噬菌體的大腸菌之感染能力喪失。將經回收之噬菌體添加於成爲對數增殖期(OD600 爲 0.4-0.7)之 10 mL 大腸菌株 ER2738 中。藉由於 37℃緩慢地進行上述大腸菌之攪拌培養 1 小時，使噬菌體感染大腸菌。將被感染之大腸菌播種於 225 mm x 225 mm 之盤。接著，藉由自經播種之大腸菌培養液中回收噬菌體，回收噬菌體庫液。重複複數次之以抗原結合能力或 pH 依存性結合能力爲指標之篩選。

(5-2)噬菌體 ELISA 之評估

遵習一般方法(Methods Mol. Biol.(2002)178, 133-145)，由藉由上述方法所得之大腸菌單一菌落，回收含有

噬菌體之培養上清液。

將添加 BSA 及 $CaCl_2$ 之含有噬菌體的培養上清液依以下順序供 ELISA。將 StreptaWell 96 微量孔盤(Roche)以含有生物素標誌抗原之 100μL PBS 被覆一晚。將該盤之各孔以 PBST 洗淨藉以去除抗原後，將該孔以 4% BSA-TBS 250μL 阻斷 1 小時以上。將於去除 4% BSA-TBS 之各孔中添加有所調製之培養上清液的該盤於 37℃靜置 1 小時，使展現噬菌體之抗體與存在於各孔之抗原結合。於經 1.2 mM $CaCl_2$/TBST 洗淨之各孔中添加 1.2 mM $CaCl_2$/TBS (pH7.6)或 1.2 mM $CaCl_2$/TBS(pH5.5)，將該盤於 37℃靜置而培養 30 分鐘。於以 1.2 mM $CaCl_2$/TBST 洗淨後，將於在各孔添加有經成爲 4% BSA 及離子化鈣濃度 1.2 mM 之 TBS 稀釋之 HRP 結合抗 M13 抗體(Amersham Pharmacia Biotech)的盤培養 1 小時。以 1.2 mM $CaCl_2$/TBST 洗淨後，將經添加 TMB single 溶液(ZYMED)之各孔中溶液之發色反應藉由添加硫酸以停止後，藉由 450 nm 之吸光度來測定該發色。

上述噬菌體 ELISA 之結果，以判斷爲具有 pH 依存性地對抗原之結合能力的抗體片段爲模板，進行經特異引子放大之基因的鹼基序列解析。

(5-3)抗體之表現與純化

噬菌體 ELISA 之結果，判斷爲具有 pH 依存性地對抗原之結合能力的殖株係被導入動物細胞表現用質體。抗體

之表現係使用以下方法來進行。來自人類胎兒腎細胞之FreeStyle 293-F 株(Invitrogen)係懸濁於 FreeStyle 293 Expression Medium 培養基(Invitrogen)，以 1.33 x 10^6 細胞/mL之細胞密度對 6 孔盤之各孔各播種 3 mL。調製之質體係藉由脂質體轉染法導入細胞。於 CO_2 培養器(37 度、8%CO_2、90 rpm)中進行 4 日培養。使用 rProtein A SepharoseTM Fast Flow(Amersham Biosciences)，使用所屬技術領域中具有通常知識者公知之方法，由上述所得之培養上清液中純化抗體。使用分光光度計，測定純化之抗體溶液在 280 nm 之吸光度。藉由使用以 PACE 法算出之吸光係數，由所得之測定值算出抗體濃度(Protein Science(1995)4, 2411-2423)。

(5-4)取得之抗體對人類 IL-6 受體之 pH 依存性結合能力的評估

爲了判斷實施例 5 中取得之抗體對人類 IL-6 受體之結合活性是否爲 pH 依存性，使用 Biacore T100(GE Healthcare)來進行該等抗體與人類 IL-6 受體之相互作用解析。作爲不具有對人類 IL-6 受體之 pH 依存性的結合活性之對照抗體，係使用 tocilizumab(重鏈序列編號：24)、輕鏈序列編號：25)。作爲中性區域 pH 及酸性區域 pH 之條件，分別於 pH7.4 及 pH6.0 之溶液中解析抗原抗體反應之相互作用。於以胺偶合法固定化適當量之 protein A/G (Invitrogen)之 Sensor chip CM5(GE Healthcare)上，捕捉

目的抗體。跑動緩衝液係使用 20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05%(w/v) Tween20、1.2 mM $CaCl_2$(pH7.4)或 20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05%(w/v) Tween20、1.2mM $CaCl_2$(pH6.0)之 2 種緩衝液。人類 IL-6 受體之稀釋亦使用各自的緩衝液。測定全部在 37℃實施。

在使用了對照抗體之 tocilizumab 抗體、實施例 5 中取得之抗體的抗原抗體反應之相互作用的解析時，藉由注入 IL-6 受體之稀釋液與空白的跑動緩衝液，使 IL-6 受體與被捕捉於感應晶片上之抗體相互作用。之後，藉由將 10 mM Glycine-HCl(pH1.5)以流速 30μL/min 注入 30 秒，使感應晶片再生。pH6.0 之條件下的表面電漿共振感應圖(sensorgram)亦以同樣方法取得。

[實施例 6]與鈣離子結合之人類生殖細胞系列序列的探索

(6-1)鈣依存性地與抗原結合之抗體

鈣依存性地與抗原結合之抗體(鈣依存性抗原結合之抗體)係隨著鈣濃度不同，與抗原之相互作用會變化的抗體。鈣依存性抗原結合之抗體，可認爲是透過鈣離子與抗原結合，因此形成抗原側之抗原決定部位的胺基酸，係能夠鉗合鈣離子之負電荷胺基酸或成爲氫結合接受體之胺基酸(圖 4B)。由形成如此抗原決定部位之胺基酸性質，可鎖定藉由導入圖 4A 所示之組胺酸而製造之 pH 依存性地與抗原結合的結合分子以外之抗原決定部位。進一步地，如圖 4C 所示，藉由使用兼具鈣依存性及 pH 依存性地與抗原

結合之性質的抗原結合分子，可認爲可製造能夠個別鎖定具有廣泛性質之多樣的抗原決定部位之抗原結合分子。因而，若構築包含鈣所結合之模式結構的分子集合(Ca 庫)，由此分子集團取得抗原結合分子，則可認爲能夠有效率地得到鈣依存性抗原結合之抗體。

(6-2)人類生殖細胞系列序列之取得

作爲包含鈣所結合之模式結構的分子集合之例子，可考慮該分子爲抗體的例子。換言之可考慮包含鈣所結合之模式結構的抗體庫爲 Ca 庫的情況。

至今爲止並未被報導包含人類生殖細胞系列序列之抗體且爲鈣離子會結合者。因而，爲了判定包含人類生殖細胞系列序列之抗體是否會與鈣離子結合，以由 Human Fetal Spreen Poly RNA(Clontech)所調製之 cDNA 作爲模板，選殖包含人類生殖細胞系列序列之抗體的生殖細胞系列之序列。經選殖之 DNA 片段係被插入動物細胞表現載體。所得之表現載體的鹼基序列，係以所屬技術領域中具有通常知識者公知之方法決定，胺基酸序列之序列編號係如表 7 所示。編碼序列編號：6(Vk1)、序列編號：7(Vk2)、序列編號：8(Vk3)、序列編號：9(Vk4)以及序列編號：1(Vk5)之聚核苷酸藉由 PCR 法與編碼天然型 Kappa 鏈之恆定區域(序列編號：26)的聚核苷酸連結的 DNA 片段係接入動物細胞表現用載體。又，編碼序列編號：27(Vk1)、序列編號：28(Vk2)、序列編號：29(Vk3)以及序列編號：30(Vk4)

之重鏈可變區域聚核苷酸藉由 PCR 法與編碼序列編號：14之 C 末端 2 胺基酸缺失之 IgG1 的聚核苷酸連結的 DNA 片段係接入動物細胞表現用載體。所製造之改變體序列係以所屬技術領域中具有通常知識者公知之方法確認。再者，人類之 Vk1 亦有記載爲 hVk1、人類之 Vk2 亦有記載爲 hVk2、人類之 Vk3 亦有記載爲 hVk3、人類之 Vk4 亦有記載爲 hVk4 者。

[表7]

輕鏈生殖細胞系列序列	重鏈(可變區域)序列編號	輕鏈可變區域序列編號
Vk1	27	6
Vk2	28	7
Vk3	29	8
Vk4	30	9
Vk5	4	1

(6-3)抗體之表現與純化

將插入有包含所取得之 5 種人類生殖細胞系列序列的 DNA 片段之動物細胞表現載體導入動物細胞。抗體之表現係使用以下方法進行。來自人類胎兒腎細胞之 FreeStyle 293-F 株(Invitrogen)係懸濁於 FreeStyle 293 Expression Medium 培養基(Invitrogen)，以 1.33 x 10^6 細胞/mL 之細胞密度對 6 孔盤之各孔各播種 3mL。調製之質體係藉由脂質體轉染法導入細胞。在 CO_2 培養器(37 度、8% CO_2、90 rpm)中進行 4 日培養。使用 rProtein A SepharoseTM Fast Flow(Amersham Biosciences)，使用所屬技術領域中具有通常知識者公知之方法，由上述所得之培養上清液中純化

抗體。使用分光光度計測定經純化之抗體溶液在 280 nm 之吸光度。藉由使用以 PACE 法算出之吸光係數，由所得之測定值算出抗體濃度(Protein Science(1995)4, 2411-2423)。

(6-4)包含人類生殖細胞系列序列之抗體的鈣離子結合活性評估

評估經純化抗體之鈣離子結合活性。作爲鈣離子對抗體結合之評估的指標，測定了示差掃描型熱量測定(DSC)之熱變性中間溫度(Tm 值)(MicroCal VP-Capillary DSC、MicroCal)。熱變性中間溫度(Tm 值)爲安定性之指標，藉由鈣離子之結合使蛋白質安定化時，熱變性中間溫度(Tm 值)係比鈣離子未結合時高(J. Biol.Chem.(2008)283, 37, 25140-25149)。藉由評估因應抗體溶液中之鈣離子濃度變化之抗體 Tm 值的變化，評估鈣離子對抗體之結合活性。經純化之抗體係供以 20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、2 mM $CaCl_2$(pH7.4)或 20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl, 3μM $CaCl_2$(pH7.4)之溶液爲外液的透析(EasySEP、TOMY)處理。使用透析所用之溶液，以調製爲大約 0.1 mg/mL 之抗體溶液作爲被驗物質，由 20℃至 115℃，以 240℃/hr 之昇溫速度進行 DSC 測定。基於所得到之 DSC 的變性曲線而算出之各抗體之 Fab 結構域的熱變性中間溫度(Tm 值)係如表 8 所示。

[表8]

輕鏈生殖細胞系列序列	鈣離子濃度		ΔTm（℃）
	3μM	2 mM	2 mM-3μM
hVk1	80.32	80.78	0.46
hVk2	80.67	80.61	-0.06
hVk3	81.64	81.36	-0.28
hVk4	70.74	70.74	0
hVk5	71.52	74.17	2.65

結果，包含 hVk1、hVk2、hVk3、hVk4 序列之抗體的 Fab 結構域之 Tm 值，不隨包含該 Fab 結構域之溶液中的鈣離子濃度不同而變動。另一方面，包含 hVk5 序列之抗體之 Fab 結構域的 Tm 值，隨著包含該 Fab 結構域之抗體溶液中的鈣離子濃度不同而變動，故顯示 hVk5 序列係與鈣離子結合。

(6-5)hVk5-2 序列之鈣結合評估

於實施例 6 之(6-2)中，在 Vk5-2(使序列編號：26 與序列編號：1 融合者)之外，得到了分類爲 Vk5-2 之 Vk5-2 變異型 1(序列編號：2)及 Vk5-2 變異型 2(序列編號：3)。對該等變異型亦進行了鈣結合評估。Vk5-2、Vk5-2 變異型 1 及 Vk5-2 變異型 2 之 DNA 片段係分別被接入動物細胞用表現載體。以所屬技術領域中具有通常知識者公知之方法來決定所得表現載體之鹼基序列。分別接入有 Vk5-2、Vk5-2 變異型 1 及 Vk5-2 變異型 2 之 DNA 片段的動物細胞用表現載體，係與以表現 CIM_H(序列編號：4)作爲重鏈的方式接入的動物表現用載體一起藉由實施例 6 之(6-

3)中記載之方法導入動物細胞中，純化抗體。評估經純化之抗體的鈣離子結合活性。經純化之抗體係供以 20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、2 mM $CaCl_2$(pH7.5)或 20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl(pH7.5)之溶液(表 9 中表述爲鈣離子濃度 0mM)爲外液之透析(EasySEP、TOMY)處理。使用透析所用之溶液，以調製爲大約 0.1 mg/mL 之抗體溶液作爲被驗物質，由 20℃至 115℃，以 240℃/hr 之昇溫速度進行 DSC 測定。基於所得到之 DSC 的變性曲線而算出之各抗體之 Fab 結構域的熱變性中間溫度(Tm 值)係如表 9 所示。

[表9]

輕鏈	鈣離子濃度		ΔTm (℃)
	0 mM	2 mM	2 mM-0mM
Vk5-2	71.65	74.38	2.73
Vk5-2	65.75	72.24	6.49
Vk5-2	66.46	72.24	5.78

結果，包含 Vk5-2、Vk5-2 變異型 1 及 Vk5-2 變異型 2 之序列的抗體之 Fab 結構域之 Tm 值，隨著包含該 Fab 結構域之抗體溶液中的鈣離子濃度不同而變動，故顯示具有分類爲 Vk5-2 之序列的抗體係與鈣離子結合。

[實施例 7]人類 Vk5(hVk5)序列之評估

(7-1)hVk5 序列

Kabat 資料庫中，僅登錄有 hVk5-2 序列作爲 hVk5 序列。以下係將 hVk5 與 hVk5-2 視爲同意義。WO2010136598

中，記載了 hVk5-2 序列在生殖細胞系列序列中之存在比爲 0.4%。在其他報告中亦敘述 hVk5-2 序列在生殖細胞系列序列中之存在比爲 0～0.06%(J. Mol. Biol.(2000)296, 57-86、Proc. Natl. Acad. Sci.(2009)106, 48, 20216-20221)。如上所述，hVk5-2 序列係爲在生殖細胞系列序列中出現頻率低之序列，因此可認爲藉由對表現以人類生殖細胞系列序列構成之抗體庫或人類抗體的小鼠誘發免疫所取得之 B 細胞中，取得與鈣結合之抗體，其效率不佳。因而，雖可考慮設計包含人類 hVk5-2 序列之 Ca 庫的可能性，但已報導之合成抗體庫(WO2010105256 或 WO2010136598)中不含 hVk5 序列。而且，hVk5-2 序列之物性亦未被報導，其實現的可能性爲未知。

(7-2)糖鏈非附加型 hVk5-2 序列之構築、表現及純化

hVk5-2 序列係具有於 20 位(Kabat 編號)胺基酸附加有 N 型糖鏈之序列。於蛋白質附加之糖鏈係存在異質性(heterogeneity)，因此由物質之均一性觀點來看，較期望不附加糖鏈。因而，製造了 20 位(Kabat 編號)之 Asn(N)殘基被取代爲 Thr(T)殘基之改變體 hVk5-2_L65(序列編號：5)。胺基酸之取代係以使用 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit(Stratagene)之所屬技術領域中具有通常知識者公知之方法進行。編碼改變體 hVk5-2_L65 之 DNA 係接入動物表現用載體。所製造之改變體 hVk5-2_L65 經接入 DNA 之動物表現用載體，係與以表現 CIM_H(序列編

號：4)作爲重鏈的方式接入之動物表現用載體以實施例 6 記載之方法一起導入動物細胞中。包含於導入之動物細胞中表現的 hVk5-2_L65 及 CIM_H 之抗體，係以實施例 6 記載之方法純化。

(7-3)包含糖鏈非附加型 hVk5-2 序列之抗體的物性評估

使用離子交換層析，來分析包含經取得之改變序列 hVk5-2_L65 的抗體，相較於包含改變前原來的 hVk5-2 序列的抗體，其異質性是否減少。離子交換層析之方法示於表 10。分析之結果，如圖 5 所示之糖鏈附加部位被改變的 hVk5-2_L65，相較於原來的 hVk5-2 序列，顯示了異質性有減少。

[表10]

	條件
管柱	TOSOH TSKgel DEAE-NPR
移動相	A; 10 mM Tris-HCl, 3 μM $CaCl_2$ (pH8.0)
	B; 10 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 3 μM $CaCl_2$ (pH8.0)
梯度排程	%B = 0 - (5min) - 0 - 2%/1min
管柱溫度	40℃
檢測	280 nm
注入量	100 μL (5 μg)

接著，使用實施例 6 記載之方法，來評估包含異質性經減少之 hVk5-2_L65 序列的抗體是否與鈣離子結合。結果，如表 11 所示，包含糖鏈附加部位被改變之 hVk5-2_L65 之抗體的 Fab 結構域的 Tm 值，亦隨著抗體

溶液中鈣離子濃度之變化而變動。亦即，顯示鈣離子會與包含糖鏈附加部位經改變之 hVk5-2_L65 之抗體的 Fab 結構域結合。

[表11]

輕鏈	糖鏈附加序列	鈣離子濃度		ΔTm (℃)
		3μM	2 mM	2 mM-3μM
hVk5-2	有	71.52	74.17	2.65
hVk5-2_L65	無	71.51	73.66	2.15

[實施例 8]鈣離子對包含 hVk5-2 序列之 CDR 序列的抗體分子之結合活性的評估

(8-1)包含 hVk5-2 序列之 CDR 序列的改變抗體之製造、表現及純化

hVk5-2_L65 序列爲存在於人類 Vk5-2 序列之框架的糖鏈附加部位之胺基酸被改變的序列。於實施例 7 雖顯示即使改變糖鏈附加部位，鈣離子亦會結合，但框架序列由免疫原性之觀點來看，一般較佳爲生殖細胞系列之序列。因而，探討了在維持鈣離子對該抗體之結合活性之下，將抗體之框架序列取代爲不附加糖鏈之生殖細胞系列序列之框架序列是否可能。

將使編碼將化學合成之 hVk5-2 序列的框架序列改變爲 hVk1、hVk2、hVk3 及 hVk4 序列之序列(分別爲 CaVk1(序列編號：31)、CaVk2(序列編號：32)、CaVk3(序列編號：33)、CaVk4(序列編號：34))的聚核苷酸藉由 PCR 法與編碼天然型 Kappa 鏈之恆定區域(序列編號：26)的聚核

苷酸連結之 DNA 片段，接入動物細胞表現用載體中。以所屬技術領域中具有通常知識者公知之方法確認所製造之改變體的序列。如上述方式製造之各質體，係與編碼 CIM_H(序列編號：4)之聚核苷酸所接入的質體，以實施例 6 記載之方法一起導入動物細胞。由如上述方式導入之動物細胞的培養液中，純化所表現之所期望之抗體分子。

(8-2)包含 hVk5-2 序列之 CDR 序列的改變抗體之鈣離子結合活性評估

藉由實施例 6 記載之方法評估鈣離子是否會結合於包含 hVk5-2 序列以外之生殖細胞系列序列(hVk1、hVk2、hVk3、hVk4)之框架序列及 hVK5-2 序列之 CDR 序列的改變抗體。評估之結果如表 12 所示。顯示了各改變抗體之 Fab 結構域的 Tm 值，係隨著抗體溶液中之鈣離子濃度的變化而變動。因此，顯示了包含 hVk5-2 序列之框架序列以外之框架序列的抗體亦會與鈣離子結合。

[表12]

生殖細胞系列(輕鏈框架序列)	鈣離子濃度		ΔTm (℃)
	3μM	2 mM	2 mM-3μM
hVk1	77.51	79.79	2.28
hVk2	78.46	80.37	1.91
hVk3	77.27	79.54	2.27
hVk4	80.35	81.38	1.03
hVk5-2	71.52	74.17	2.65

進一步地，明顯得知以包含 hVk5-2 序列以外之生殖

細胞系列序列(hVk1、hVk2、hVk3、hVk4)的框架序列及hVK5-2序列之CDR序列的方式來改變之各抗體的Fab結構域之熱安定性指標即熱變性溫度(Tm值)，比包含改變前原來的hVk5-2序列之抗體的Fab結構域之Tm值更增加。由此結果，發現了包含hVk1、hVk2、hVk3、hVk4之框架序列及hVk5-2序列之CDR序列的抗體，不只具有與鈣離子結合之性質，由熱安定性觀點亦爲優良的分子。

[實施例 9]存在於人類生殖細胞系列hVk5-2序列之鈣離子結合部位的鑑定

(9-1)hVk5-2序列之CDR序列中變異部位的設計

如實施例8所記載，顯示了包含hVk5-2序列之CDR部分被導入於其他生殖細胞系列之框架序列的輕鏈之抗體，亦會與鈣離子結合。由此結果，暗示了存在於hVk5-2之鈣離子結合部位，係存在於CDR中。與鈣離子結合、亦即鉗合鈣離子之胺基酸，可列舉負電荷之胺基酸或可成爲氫結合之接受體之胺基酸。因而，評估了包含存在於hVk5-2序列之CDR序列中的Asp(D)殘基或Glu(E)殘基被取代爲Ala(A)殘基之變異hVk5-2序列的抗體是否會與鈣離子結合。

(9-2)hVk5-2序列之Ala取代體的製造以及抗體的表現及純化

製造包含存在於hVk5-2序列之CDR序列中的Asp及

/或 Glu 殘基被改變爲 Ala 殘基之輕鏈的抗體分子。如實施例 7 所記載，由未附加糖鏈之改變體 hVk5-2_L65 維持與鈣離子結合看來，就鈣離子結合性的觀點可認爲與 hVk5-2 序列同等。本實施例中以 hVk5-2_L65 作爲模板序列來進行胺基酸取代。所製造之改變體如表 13 所示。胺基酸之取代係藉由 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit(Stratagene)、PCR 或 In fusion Advantage PCR cloning kit(TAKARA)等之所屬技術領域中具有通常知識者公知的方法來進行，構築胺基酸經取代之改變輕鏈的表現載體。

[表13]

輕鏈改變體名	改變部位(Kabat編號)	序列編號
hVk5-2_L65	野生型	5
hVk5-2_L66	30	35
hVk5-2_L67	31	36
hVk5-2_L68	32	37
hVk5-2_L69	50	38
hVk5-2_L70	30, 32	39
hVk5-2_L71	30, 50	40
hVk5-2_L72	30, 32, 50	41
hVk5-2_L73	92	42

以所屬技術領域中具有通常知識者公知之方法來決定所得到之表現載體之鹼基序列。將所製造之改變輕鏈之表現載體與重鏈 CIM_H(序列編號：4)之表現載體一起暫時性地(transiently)導入來自人類胎兒腎癌細胞之 HEK293H 株(Invitrogen)、或 FreeStyle293 細胞(Invitrogen)，藉以使抗體表現。由所得之培養上清液中，使用 rProtein A

SepharoseTM Fast Flow(GE Healthcare)，以所屬技術領域中具有通常知識者公知之方法純化抗體。使用分光光度計來測定純化之抗體溶液在 280 nm 的吸光度。藉由使用以 PACE 法算出之吸光係數，由所得之測定值算出抗體濃度(Protein Science(1995)4, 2411-2423)。

(9-3)包含 hVk5-2 序列之 Ala 取代體的抗體之鈣離子結合活性評估

藉由實施例 6 記載之方法判定所得之純化抗體是否會與鈣離子結合。結果如表 14 所示。藉由將存在於 hVk5-2 序列之 CDR 序列中之 Asp 或 Glu 殘基取代爲與鈣離子之結合或鉗合無關的 Ala 殘基，存在了隨著抗體溶液之鈣離子濃度變化，其 Fab 結構域之 Tm 值不會變動的抗體。顯示了隨著 Ala 取代而 Tm 值不變動的取代部位(32 位及 92 位(Kabat 編號))，對鈣離子與抗體的結合特別重要。

[表14]

輕鏈改變體名	改變部位 (Kabat編號)	鈣離子濃度		ΔTm (℃) 2 mM-0 mM
		0 mM	2 mM	
hVk5-2_L65	野生型	71.71	73.69	1.98
hVk5-2_L66	30	71.65	72.83	1.18
hVk5-2_L67	31	71.52	73.30	1.78
hVk5-2_L68	32	73.25	74.03	0.78
hVk5-2_L69	50	72.00	73.97	1.97
hVk5-2_L70	30, 32	73.42	73.60	0.18
hVk5-2_L71	30, 50	71.84	72.57	0.73
hVk5-2_L72	30, 32, 50	75.04	75.17	0.13
hVk5-2_L73	92	75.23	75.04	-0.19

[實施例 10]包含具有鈣離子結合模式結構之 hVk1 序列的抗體評估

(10-1)具有鈣離子結合模式結構之 hVk1 序列的製造以及抗體之表現及純化

由實施例 9 記載之 Ala 取代體與鈣之結合活性結果來看，顯示了 hVk5-2 序列之 CDR 序列中，Asp 或 Glu 殘基對於鈣結合很重要。因而，評估了僅將 30 位、31 位、32 位、50 位及 92 位(Kabat 編號)之殘基導入其他生殖細胞系列之可變區域序列，是否亦可與鈣離子結合。具體而言，製造了將人類生殖細胞系序列之 hVk1 序列的 30 位、31 位、32 位、50 位及 92 位(Kabat 編號)殘基取代爲 hVk5-2 序列的 30 位、31 位、32 位、50 位及 92 位(Kabat 編號)之殘基的改變體 LfVk1_Ca(序列編號：43)。亦即，判定包含 hVk5-2 序列中之僅導入該等 5 殘基的 hVk1 序列之抗體是否可與鈣結合。改變體之製造係與實施例 9 同樣方式進行。將所得之包含輕鏈改變體 LfVk1_Ca 及輕鏈 hVk1 序列之 LfVk1(序列編號：44)與重鏈 CIM_H(序列編號：4)一起表現。抗體之表現及純化係以與實施例 9 同樣之方法實施。

(10-2)包含具有鈣離子結合模式結構之人類 hVk1 序列的抗體之鈣離子結合活性評估

以實施例 6 記載之方法判定如上述方式得到之純化抗體是否會與鈣離子結合。其結果示於表 15。包含具有

hVk1 序列之 LfVk1 的抗體之 Fab 結構域的 Tm 值不隨著抗體溶液中鈣濃度的變化而變動，另一方面，包含 LfVk1_Ca 之抗體序列的 Tm 值係隨著抗體溶液中鈣濃度之變化而變化 1℃以上，由此顯示包含 LfVk1_Ca 之抗體會與鈣結合。由上述結果，顯示了鈣離子之結合，不一定必需要 hVk5-2 之 CDR 序列全部，僅有構築 LfVk1_Ca 序列時所導入之殘基亦已充分。

[表15]

輕鏈改變體	鈣離子濃度		ΔTm (℃)
	3μM	2 mM	2 mM-3μM
LfVk1	83.18	83.81	0.63
LfVk1_Ca	79.83	82.24	2.41

(10-3)分解抑制型 LfVk1_Ca 序列之構築、表現及純化

於實施例 10 之(10-1)製造了將人類生殖細胞系序列之 hVk1 序列之 30 位、31 位、32 位、50 位及 92 位(Kabat 編號)殘基取代爲 hVk5-2 序列之 30 位、31 位、32 位、50 位及 92 位(Kabat 編號)殘基的改變體 LfVk1_Ca(序列編號：43)，顯示鈣離子會結合。因而，雖可考慮設計包含 LfVk1_Ca 序列之 Ca 庫的可能性，但 LfVk1_Ca 序列之物性並未被報導，其實現可能性爲未知。LfVk1_Ca 序列，係於 30 位、31 位及 32 位(Kabat 編號)存在 Asp，被報導在酸性條件下會分之 Asp-Asp 序列係存在於 CDR1 序列中(J. Pharm. Biomed. Anal.(2008)47(1), 23-30)。由保存安定性之觀點而言，期望避免在酸性條件之分解。因而，製造

了將有分解可能性之 Asp(D)殘基取代爲 Ala(A)殘基之改變體 LfVk1_Ca1(序列編號：45)、LfVk1_Ca2(序列編號：46)及 LfVk1_Ca3(序列編號：47)。胺基酸之取代係使用 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit(Stratagene)，以所屬技術領域中具有通常知識者公知之方法進行。將編碼改變體之 DNA 接入動物表現用載體。所製造之改變體之 DNA 被接入的動物表現用載體，係與以表現 GC_H(序列編號：48)作爲重鏈而接入的動物表現用載體，以實施例 6 記載之方法一起導入動物細胞中。在導入之動物細胞中表現的抗體，係以實施例 6 記載之方法純化。

(10-4)包含分解抑制型 LfVk1_Ca 序列之抗體的安定性評估

藉由熱加速後之各抗體異質性的比較，來評估於實施例 10 之(10-3)取得之抗體，是否相較於包含改變前原來的 LfVk1_Ca 序列之抗體，在 pH6.0 溶液中之分解得到抑制。將各抗體在 20 mM Histidine-HCl、150 mM NaCl、pH6.0 之溶液中以一晚 4℃之條件透析。將經透析之抗體調製爲 0.5mg/mL，於 5℃或 50℃保存 3 日。將保存後之各抗體以實施例 7 記載之方法進行離子交換層析。分析之結果，顯示了如圖 6 所示之分解部位經改變的 LfVk1_Ca1，比原來的 LfVk1_Ca 序列異質性更少，熱加速所致之分解係顯著被抑制。亦即，表示於存在於 LfVk1_Ca 序列中之 30 位的 Asp(D)殘基顯示之分解，可藉由胺基酸改變而迴避。

(10-5)輕鏈 30 位 Asp 殘基分解抑制型 LVk1_Ca 序列之製造以及抗體的表現及純化

由實施例 10 之(10-4)記載之 Ala 取代體的分解抑制結果，顯示了 LfVk1_Ca 序列之 CDR 序列中 30 位(Kabat 編號)之 Asp(D)殘基在酸性條件分解，可藉由將 30 位(Kabat 編號)取代爲其他胺基酸(於(10-4)中，係取代爲 Ala(A)殘基)而抑制分解。因而，評估了將 30 位(Kabat 編號)殘基取代爲鈣離子可鉗合之殘基的代表之 Ser(S)殘基之序列(稱爲 LfVk1_Ca6。序列編號：49)是否亦會抑制分解。改變體之製造係與實施例 10 同樣方式進行。將所得之輕鏈改變體 LfVk1_Ca6 及輕鏈 LfVk1_Ca 序列，與重鏈 GC_H(序列編號：48)一起表現。抗體之表現及純化係與實施例 10 同樣之方法實施。

(10-5)輕鏈 30 位 Asp 殘基分解抑制型 LVk1_Ca 序列之評估

以於實施例 10 之(10-4)記載之方法來判定如上述方式所得之純化抗體在酸性條件下之保存安定性。結果，如圖 7 所示，顯示了包含 LfVk1_Ca6 序列之抗體，相較於包含原來之 LfVk1_Ca 序列之抗體，其分解更被抑制。

進一步地，以實施例 6 記載之方法來判定包含 LfVk1_Ca 序列之抗體及包含 LfVk1_Ca6 序列之抗體是否與鈣離子結合。其結果示於表 16。包含 LfVk1_Ca 序列之抗體及包含分解抑制型之 LfVk1_Ca6 序列的抗體之 Fab 結

構域的 Tm 值，分別隨著抗體溶液中鈣濃度之變化而變化 1℃以上。

[表16]

輕鏈改變體	鈣離子濃度		ΔTm (℃)
	3μM	2 mM	2 mM-3μM
LfVk1_Ca	78.45	80.06	1.61
LfVk1_Ca6	78.44	79.74	1.30

[實施例 11]爲了能夠有效率地取得 Ca 濃度依存性地與抗原結合之結合抗體，設計鈣離子結合模式結構被導入可變區域之抗體分子集團(Ca 庫)

作爲鈣結合模式結構，可適合列舉例如 hVk5-2 序列或其 CDR 序列、進一步可列舉殘基經縮小範圍的 30 位、31 位、32 位、50 位、92 位(Kabat 編號)。其他，與鈣結合之蛋白質所具有的 EF hand 模式結構(調鈣素等)或 C 型凝集素(ASGPR 等)亦符合鈣結合模式結構。

Ca 庫係由重鏈可變區域與輕鏈可變區域所構成。重鏈可變區域係使用人類抗體序列、輕鏈可變區域係導入鈣結合模式結構。作爲經導入鈣結合模式結構之輕鏈可變區域的模板序列，係選擇 hVk1 序列。包含於 hVk1 序列導入鈣結合模式結構之一即 hVk5-2 之 CDR 序列的 LfVk1_Ca 序列之抗體，係如實施例 10 所示，顯示與鈣離子結合。於模板序列出現複數之胺基酸，擴大了構成分子庫之抗原結合分子的多樣性。出現複數之胺基酸的位置，係選擇與抗原之相互作用可能性高之露出於可變區域之表

面的位置。具體而言，作爲如此之柔性殘基，係選擇 30 位、31 位、32 位、34 位、50 位、53 位、91 位、92 位、93 位、94 位及 96 位(Kabat 編號)。

接著，設定所出現之胺基酸殘基種類與其出現率。解析登錄於 Kabat 資料庫(KABAT, E.A. ET AL.: 'Sequences of proteins of immunological interest', vol. 91, 1991, NIH PUBLICATION)中之 hVk1 與 hVk3 序列中之柔性殘基中的胺基酸出現頻率。基於解析結果，由在各位置出現頻率高之胺基酸來選擇於 Ca 庫出現之胺基酸種類。此時，亦選擇於解析結果中判定爲出現頻率少的胺基酸以使胺基酸之性質不偏差。又，被選擇之胺基酸的出現頻率，係參考 Kabat 資料庫之解析結果來設定。

藉由考慮如以上方式設定之胺基酸及出現頻率，作爲 Ca 庫，設計包含鈣結合模式結構，且於該模式結構以外之各殘基包含複數之胺基酸之重視序列多樣性的 Ca 庫。於表 17 及 18 顯示 Ca 庫之詳細設計(各表中的位置表示 Kabat 編號)。又，表 17 及 18 記載之胺基酸出現頻率，Kabat 編號表示之 92 位爲 Asn(N)時，94 位可不爲 Ser(S)而爲 Leu(L)。

[表17]

CDR	位置	全體之70%				
CDR1	28	S ; 100%				
	29	I ; 100%				
	30	E ; 72%	H; 14%	S ; 14%		
	31	D ; 100%				
	32	D ; 100%				
	33	L ; 100%				
	34	A ; 70%	N ; 30%			
CDR2	50	E ; 100%				
	51	A ; 100%				
	52	S ; 100%				
	53	H ; 5%	N ; 25%	S ; 45%	T ; 25%	
	54	L ; 100%				
	55	Q ; 100%				
	56	S ; 100%				
CDR3	90	Q ; 100%				
	91	H ; 25%	S ; 15%	R ; 15%	Y ; 45%	
	92	D ; 80%	N ; 10%	S ; 10%		
	93	D ; 5%	G ; 10%	N ; 25%	S ; 50%	R ; 10%
	94	S ; 50%	Y ; 50%			
	95	P ; 100%				
	96	L ; 50%	Y ; 50%			

[表18]

CDR	位置	全體之30%之胺基酸				
CDR1	28	S : 100%				
	29	I : 100%				
	30	E : 83%	S : 17%			
	31	D : 100%				
	32	D : 100%				
	33	L : 100%				
	34	A : 70%	N : 30%			
CDR2	50	H : 100%				
	51	A : 100%				
	52	S : 100%				
	53	H : 5%	N : 25%	S : 45%	T : 25%	
	54	L : 100%				
	55	Q : 100%				
	56	S : 100%				
CDR3	90	Q:100%				
	91	H : 25%	S : 15%	R : 15%	Y : 45%	
	92	D : 80%	N : 10%	S : 10%		
	93	D : 5%	G : 10%	N : 25%	S : 50%	R : 10%
	94	S : 50%	Y : 50%			
	95	P : 100%				
	96	L : 50%	Y : 50%			

[實施例 12]Ca 庫之製造

以由人類 PBMC 製成之多 A RNA、或市售之人類多 A RNA 等作爲模板，以 PCR 法放大抗體重鏈可變區域之基因庫。關於抗體輕鏈可變區域部分，係如實施例 11 所記載，設計了維持鈣結合模式結構且可鈣濃度依存性地對抗原結合之抗體的出現頻率經提高之抗體可變區域輕鏈部分。又，作爲柔性殘基當中經導入鈣結合模式結構之殘基以外的胺基酸殘基，參考於天然人類抗體中之胺基酸出現頻率的資訊((KABAT, E.A. ET AL.: 'Sequences of proteins of immunological interest', vol. 91, 1991, NIH PUBLICATION)，

設計使於天然人類抗體序列中出現頻率高之胺基酸呈均等分布之抗體輕鏈可變區域的分子庫。如此方式製造之抗體重鏈可變區域之基因庫與抗體輕鏈可變區域之基因庫的組合係被插入噬粒載體，構築展現由人類抗體序列所構成之Fab 結構域的人類抗體噬菌體展示分子庫(Methods Mol Biol.(2002)178, 87-100)。

根據實施例 2 記載之方法，確認了由經導入抗體基因庫之大腸菌中單離之抗體基因部分的序列。所得之 290 種殖株之序列的胺基酸分布、與設計之胺基酸分布係如圖 8 所示。

[實施例 13]Ca 庫中所含之分子的鈣離子結合活性評估

(13-1)Ca 庫中所含之分子的鈣離子結合活性

如實施例 7 所示，顯示與鈣離子結合之 hVk5-2 序列爲在生殖細胞系列序列中出現頻率低之序列，因此由以人類生殖細胞系列序列構成之抗體庫或藉由對表現人類抗體之小鼠誘發免疫而取得之 B 細胞中，取得與鈣結合之抗體可認爲是效率不佳的。因而，於實施例 12 中構築了 Ca 庫。評估於構築的 Ca 庫中是否存在顯示鈣結合的殖株。

(13-2)抗體之表現與純化

Ca 庫中所含的殖株係被導入動物細胞表現用質體。抗體之表現係使用以下方法進行。來自人類胎兒腎細胞之 FreeStyle 293-F 株 (Invitrogen)係懸濁於 FreeStyle 293

Expression Medium 培養基(Invitrogen)，以 1.33 x 10^6 細胞/mL 之細胞密度對 6 孔盤之各孔各播種 3 mL。將經調製之質體藉由脂質體轉染法導入細胞。於 CO_2 培養器(37 度、8% CO_2、90 rpm)中進行 4 日培養。使用 rProtein A SepharoseTM Fast Flow(Amersham Biosciences)，使用所屬技術領域中具有通常知識者公知之方法，由上述所得之培養上清液中純化抗體。使用分光光度計測定經純化之抗體溶液在 280 nm 之吸光度。藉由使用以 PACE 法算出之吸光係數，由所得之測定值算出抗體濃度(Protein Science (1995)4, 2411-2423)。

(13-3)對取得之抗體的鈣離子結合評估

以實施例 6 記載之方法來判定如上述方式得到之純化抗體是否會與鈣離子結合。其結果示於表 19。Ca 庫中所含之複數的抗體之 Fab 結構域的 Tm，係隨著鈣離子濃度而變動，顯示了含有與鈣離子結合之分子。

[表19]

抗體	序列編號		鈣離子濃度		ΔTm (℃)
	重鏈	輕鏈	3μM	2 mM	2 mM-3μM
Ca_B01	50	61	70.88	71.45	0.57
Ca_E01	51	62	84.31	84.95	0.64
Ca_H01	52	63	77.87	79.49	1.62
Ca_D02	53	64	78.94	81.1	2.16
Ca_E02	54	65	81.41	83.18	1.77
Ca_H02	55	66	72.84	75.13	2.29
Ca_D03	56	67	87.39	86.78	-0.61
Ca_C01	57	68	74.74	74.92	0.18
Ca_G01	58	69	65.21	65.87	0.66
Ca_A03	59	70	80.64	81.89	1.25
Ca_B03	60	71	93.02	93.75	0.73

[實施例 14]Ca 依存性地與 IL-6 受體結合之抗體的取得

(14-1)磁珠篩選之由分子庫中取得 Ca 依存性地與抗原結合之抗體片段

由構築之 Ca 庫的最初選拔，係藉由僅濃縮具有對抗原(IL-6 受體)之結合能力的抗體片段來實施。

由保持構築之噬菌體展示用噬粒之大腸菌中進行噬菌體產生。藉由將經於進行過噬菌體產生之大腸菌培養液中添加 2.5 M NaCl/10%PEG 而沈澱之噬菌體集團以 TBS 稀釋，以得到噬菌體庫液。接著，藉由於噬菌體庫液中添加 BSA 及 $CaCl_2$，調製爲終濃度 4%BSA、1.2mM 鈣離子。作爲篩選方法，係參照使用了一般方法之固定化於磁珠之抗原的篩選方法(J. Immunol. Methods. (2008) 332(1-2), 2-9、J. Immunol. Methods. (2001) 247(1-2), 191-203、Biotechnol. Prog. (2002) 18(2) 212-20、Mol. Cell Proteomics (2003) 2(2), 61-9)。磁珠係使用

NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) 或 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)。

具體而言，藉由於經調製之噬菌體庫液中添加 250 pmol 之生物素標誌抗原，將該噬菌體庫液於室溫與抗原接觸 60 分鐘。添加經 BSA 阻斷之磁珠，將抗原與噬菌體之複合體與磁珠在室溫結合 15 分鐘。將磁珠以 1 mL 之 1.2 mM $CaCl_2$/TBST(含有 1.2 mM $CaCl_2$ 之 TBST)洗淨 3 次後，以 1 mL 之 1.2 mM $CaCl_2$/TBS(含有 1.2 mM $CaCl_2$ 之 TBS)進一步洗淨 2 次。之後，將添加 1mg/mL 胰蛋白酶 0.5mL 後之磁珠於室溫懸濁 15 分鐘後，立即使用磁性架台將磁珠分離，回收噬菌體溶液。將回收之噬菌體溶液添加於對數增殖期(OD600 爲 0.4-0.7)之 10 mL 大腸菌株 ER2738。藉由於 37℃緩慢地進行上述大腸菌之攪拌培養 1 小時，使噬菌體感染大腸菌。經感染之大腸菌係播種於 225 mm x 225 mm 之盤。接著，藉由自經播種之大腸菌培養液中回收噬菌體，調製噬菌體庫液。

第 2 次之篩選中，係以抗原結合能力或 Ca 依存性結合能力爲指標來進行噬菌體之濃縮。

具體而言，在以抗原結合能力爲指標進行濃縮時，藉由於經調製之噬菌體庫液中添加 40 pmol 之生物素標誌抗原，使噬菌體庫於室溫與抗原接觸 60 分鐘。添加經 BSA 阻斷之磁珠，將抗原與噬菌體之複合體與磁珠在室溫結合 15 分鐘。磁珠係以 1 mL 之 1.2 mM $CaCl_2$/TBST 洗淨 3

次、以 1.2 mM $CaCl_2$/TBS 洗淨 2 次。之後，將添加 1 mg/mL 之胰蛋白酶 0.5 mL 的磁珠於室溫懸濁 15 分鐘後，立即使用磁性架台將磁珠分離，回收噬菌體溶液。藉由於回收之噬菌體溶液中添加 100 mg/mL 之胰蛋白酶 5μL，不展現 Fab 之噬菌體的 pIII 蛋白質(來自輔助噬菌體之 pIII 蛋白質)被切斷，使不展現 Fab 之噬菌體對大腸菌之感染能力喪失。將回收之噬菌體添加於對數增殖期(OD600 爲 0.4-0.7)之 10 mL 大腸菌株 ER2738。藉由於 37℃緩慢地進行上述大腸菌之攪拌培養 1 小時，使噬菌體感染大腸菌。經感染之大腸菌係播種於 225 mm x 225 mm 之盤。接著，藉由自經播種之大腸菌培養液中回收噬菌體，回收噬菌體庫液。

在以 Ca 依存性結合能力爲指標進行濃縮時，藉由於經調製之噬菌體庫液中添加 40 pmol 之生物素標誌抗原，使噬菌體庫於室溫與抗原接觸 60 分鐘。添加經 BSA 阻斷之磁珠，將抗原與噬菌體之複合體與磁珠在室溫結合 15 分鐘。磁珠係以 1 mL 之 1.2 mM $CaCl_2$/TBST 與 1.2 mM $CaCl_2$/TBS 洗淨。之後，將經添加 0.1 mL 之 2 mM EDTA/TBS(含有 2 mM 之 EDTA 的 TBS)之磁珠於室溫懸濁後，立即使用磁性架台將磁珠分離，回收噬菌體溶液。藉由於回收之噬菌體溶液中添加 100 mg/mL 之胰蛋白酶 5μL，不展現 Fab 之噬菌體的 pIII 蛋白質(來自輔助噬菌體之 pIII 蛋白質)被切斷，使不展現 Fab 之噬菌體對大腸菌之感染能力喪失。將回收之噬菌體添加於對數增殖期

(OD600 爲 0.4-0.7)之 10 mL 大腸菌株 ER2738。藉由於37℃緩慢地進行上述大腸菌之攪拌培養 1 小時，使噬菌體感染大腸菌。經感染之大腸菌係播種於 225 mm x 225 mm之盤。接著，藉由自經播種之大腸菌培養液中回收噬菌體，回收噬菌體庫液。

(14-2)噬菌體 ELISA 之評估

遵習一般方法(Methods Mol. Biol.(2002)178, 133-145)，由藉由上述方法所得之大腸菌單一菌落，回收含有噬菌體之培養上清液。

將經添加 BSA 及 $CaCl_2$ 之含有噬菌體的培養上清液依以下順序供 ELISA。將 StreptaWell 96 微量孔盤(Roche)以含有生物素標誌抗原之 100μL PBS 被覆一晚。將該盤之各孔以 PBST 洗淨藉以去除抗原後，將該孔以 4% BSA-TBS 250μL 阻斷 1 小時以上。將於去除 4% BSA-TBS 之各孔中添加有所調製之培養上清液的該盤於 37℃靜置 1 小時，藉以使展現噬菌體之抗體與存在於各孔之抗原結合。於經 1.2 mM $CaCl_2$/TBST 洗淨之各孔中添加 1.2 mM $CaCl_2$/TBS 或 1 mM EDTA/TBS，該盤係在 37℃靜置 30 分鐘培養。經 1.2 mM $CaCl_2$/TBST 洗淨後將添加藉由以離子化鈣濃度 1.2 mM 之 TBS 稀釋之 HRP 結合抗 M13 抗體(Amersham Pharmacia Biotech)至各孔的盤培養 1 小時。以 1.2 mM $CaCl_2$/TBST 洗淨後，將經添加 TMB single 溶液(ZYMED)之各孔中溶液之發色反應藉由添加硫酸以停止後、以 450

nm 吸光度來測定該發色。

對經實施上述之噬菌體 ELISA 的殖株，使用特異性引子來進行經放大基因之鹼基序列解析。噬菌體 ELISA、序列解析之結果如以下表 20 所示。

[表20]

分子庫	Ca 庫	Ca 庫
濃縮指標	抗原結合能力	依存性抗原結合能力
篩選次數	2	2
試驗之殖株數	85	86
ELISA陽性	77	75
ELISA陽性殖株序列種類	74	72
Ca依存性結合殖株序列種類	13	47

(14-3)抗體之表現與純化

噬菌體 ELISA 之結果，將判斷爲具有 Ca 依存性地對抗原之結合能力的殖株導入動物細胞表現用質體。抗體之表現係使用以下方法進行。將來自人類胎兒腎細胞之 FreeStyle 293-F 株 (Invitrogen) 懸濁於 FreeStyle 293 Expression Medium 培養基 (Invitrogen)，以 1.33 x 10^6 細胞/mL 之細胞密度對 6 孔盤之各孔各播種 3 mL。調製之質體係藉由脂質體轉染法導入細胞。於 CO_2 培養器 (37 度、8%CO_2、90 rpm)中進行 4 日培養。使用 rProtein A SepharoseTM Fast Flow (Amersham Biosciences)，使用所屬技術領域中具有通常知識者公知之方法，由上述所得之培養上清液中純化抗體。使用分光光度計測定經純化之抗體溶液在 280 nm 之吸光度。藉由使用以 PACE 法算出之吸光係數，由所得

之測定值算出抗體濃度(Protein Science(1995)4, 2411-2423)。

(14-4)對所取得之抗體對人類 IL-6 受體之 Ca 依存性結合能力的評估

爲了判斷於實施例 14 取得之抗體 6RC1IgG_010(重鏈序列編號：72、輕鏈序列編號：73)、及 6RC1IgG_012(重鏈序列編號：74、輕鏈序列編號：75)、及 6RC1IgG_019(重鏈序列編號：76、輕鏈序列編號：77)對人類 IL-6 受體之結合活性是否爲 Ca 依存性，使用 Biacore T100(GE Healthcare)來解析該等抗體與人類 IL-6 受體之相互作用。作爲不具有對人類 IL-6 受體之 Ca 依存性的結合活性之對照抗體，係使用 tocilizumab(重鏈序列編號：24)、輕鏈序列編號：25)。作爲高鈣離子濃度及低鈣離子濃度之條件，分別於 1.2 mM 及 3μM 鈣離子濃度之溶液中進行相互作用解析。於以胺偶合法固定化適當量之 protein A/G(Invitrogen)之 Sensor chip CM5(GE Healthcare)上，捕捉目的抗體。跑動緩衝液係使用 20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05%(w/v) Tween20、1.2 mM $CaCl_2$(pH7.4)或 20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05%(w/v) Tween20、3μM $CaCl_2$(pH7.4)之 2 種緩衝液。人類 IL-6 受體之稀釋亦使用各自的緩衝液。測定全部在 37℃實施。

在使用了對照抗體之 tocilizumab 抗體、6RC1IgG_010 抗體及 6RC1IgG_012 抗體及 6RC1IgG_019 抗體之抗原抗

體反應之相互作用的解析時，藉由將 IL-6 受體之稀釋液與空白的跑動緩衝液以流速 5μL/min 注入 3 分鐘，使 IL-6 受體與被捕捉於感應晶片(sensor chip)上之 tocilizumab 抗體、6RC1IgG_010 抗體及 6RC1IgG_012 抗體及 6RC1IgG_019 抗體相互作用。之後，藉由將 10 mMGlycine-HCl(pH1.5)以流速 30μL/min 注入 30 秒，使感應晶片再生。

藉由此方法測定之高鈣離子濃度中之表面電漿共振感應圖(sensorgram)，係如圖 9 所示。

低鈣離子濃度之條件下的 tocilizumab 抗體、6RC1IgG_010 抗體及 6RC1IgG_012 抗體及 6RC1IgG_019 抗體的表面電漿共振感應圖(sensorgram)，亦以同樣方法取得。低鈣離子濃度中之表面電漿共振感應圖(sensorgram)，係如圖 10 所示。

由上述結果，觀察到 6RC1IgG_010 抗體及 6RC1IgG_012 抗體及 6RC1IgG_019 抗體，藉由使在緩衝液中之鈣離子濃度成爲 1.2mM 至 3μM，對 IL6 受體之結合能力會大幅降低。

[實施例 15]由使用了噬菌體展示技術之人類抗體庫中取得 Ca 依存性地與 IL-6 受體結合之抗體

(15-1)天然人類抗體噬菌體展示分子庫之製造

以由人類 PBMC 製成之多 A RNA、或市售之人類多 A RNA 等作爲模板，遵照所屬技術領域中具有通常知識者公知之方法，構築由展現彼此相異之人類抗體序列的 Fab 結

構域之複數個噬菌體所構成之人類抗體噬菌體展示分子庫。

(15-2)磁珠篩選之由分子庫中取得 Ca 依存性地與抗原結合之抗體片段

由經構築之天然人類抗體噬菌體展示分子庫的最初選拔，係藉由僅濃縮具有對抗原(IL-6 受體)之結合能力的抗體片段、或藉由以對 Ca 濃度依存性的抗原(IL-6 受體)之結合能力作爲指標之抗體片段的濃縮來實施。以對 Ca 濃度依存性的抗原(IL-6 受體)之結合能力作爲指標之抗體片段的濃縮，係藉由使用鉗合 Ca 離子之 EDTA，在 Ca 離子存在下由與 IL-6 受體結合之噬菌體庫中溶出噬菌體來實施。作爲抗原係使用經生物素標誌之 IL-6 受體。

由保持構築之噬菌體展示用噬粒之大腸菌中進行噬菌體產生。藉由將經於進行過噬菌體產生之大腸菌培養液中添加 2.5 M NaCl/10%PEG 而沈澱之噬菌體集團以 TBS 稀釋，以得到噬菌體庫液。藉由於噬菌體庫液中添加 BSA 及 $CaCl_2$，調製爲終濃度 4% BSA、1.2mM 鈣離子。作爲篩選方法，係參照使用了一般方法之固定化於磁珠之抗原的篩選方法(J. Immunol. Methods.(2008)332(1-2), 2-9、J. Immunol. Methods.(2001) 247(1-2), 191-203、Biotechnol. Prog.(2002) 18(2)212-20、Mol. Cell Proteomics(2003) 2(2), 61-9)。磁珠係使用 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) 或 Streptavidin

coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)。

具體而言，藉由於經調製之噬菌體庫液中添加 250 pmol 之生物素標誌抗原，將該噬菌體庫液於室溫與抗原接觸 60 分鐘。添加經 BSA 阻斷之磁珠，使抗原與噬菌體之複合體與磁珠在室溫結合 15 分鐘。磁珠係以 1 mL 之 1.2 mM $CaCl_2$/TBS(含有 1.2 mM $CaCl_2$之 TBS)洗淨 1 次。之後，濃縮具有對 IL-6 受體之結合能力的抗體片段時，藉由一般的方法之溶出；以對 Ca 濃度依存性的 IL-6 受體之結合能力作爲指標來濃縮抗體片段時，係藉由由懸濁於 2 mM EDTA/TBS(含有 2mMEDTA 之 TBS)之磁珠中溶出，來回收噬菌體溶液。將回收之噬菌體溶液添加於對數增殖期(OD600 爲 0.4-0.7)之 10 mL 大腸菌株 TG1。藉由於 37℃緩慢地進行上述大腸菌之攪拌培養 1 小時，使噬菌體感染大腸菌。將經感染之大腸菌播種於 225 mm x 225 mm 之盤。接著，藉由自經播種之大腸菌培養液中回收噬菌體，來調製噬菌體庫液。

第 2 次以後之篩選中，係以 Ca 依存性結合能力爲指標進行噬菌體之濃縮。具體而言，藉由於經調製之噬菌體庫液中添加 40 pmol 之生物素標誌抗原，使噬菌體庫於室溫與抗原接觸 60 分鐘。添加經 BSA 阻斷之磁珠，將抗原與噬菌體之複合體與磁珠在室溫結合 15 分鐘。磁珠係以 1 mL 之 1.2 mM $CaCl_2$/TBST 與 1.2 mM $CaCl_2$/TBS 洗淨。之後，將經添加 0.1mL 之 2 mM EDTA/TBS 的磁珠在室溫懸濁後，立即使用磁性架台將磁珠分離，回收噬菌體溶液。

將回收之噬菌體溶液添加於對數增殖期(OD600 爲 0.4-0.7)之 10 mL 大腸菌株 TG1。藉由於 37℃緩慢地進行上述大腸菌之攪拌培養 1 小時，使噬菌體感染大腸菌。經感染之大腸菌係播種於 225 mm x 225 mm 之盤。接著，藉由自經播種之大腸菌培養液中回收噬菌體，回收噬菌體庫液。以 Ca 依存性結合能力爲指標之篩選係重複複數次。

(15-3)噬菌體 ELISA 之評估

遵習一般方法(Methods Mol. Biol.(2002)178, 133-145)，由藉由上述方法所得之大腸菌單一菌落，回收含有噬菌體之培養上清液。

將添加 BSA 及 $CaCl_2$ 使成爲終濃度 4%BSA 及鈣離子濃度 1.2 mM 之含有噬菌體之培養上清液依以下順序供 ELISA。將 StreptaWell 96 微量孔盤(Roche)以含有生物素標誌抗原之 100μL PBS 被覆一晚。將該盤之各孔以 PBST 洗淨藉以去除抗原後，將該孔以 4% BSA-TBS 250μL 阻斷 1 小時以上。將於去除 4% BSA-TBS 之各孔中添加有所調製之培養上清液的該盤於 37℃靜置 1 小時，使展現噬菌體之抗體與存在於各孔之抗原結合。於經 1.2 mM $CaCl_2$/TBST 洗淨之各孔中添加 1.2 mM $CaCl_2$/TBS 或 1 mM EDTA/TBS，該盤係在 37℃靜置 30 分鐘培養。經 1.2 mM $CaCl_2$/TBST 洗淨後將經添加藉由終濃度 4%之 BSA 及 1.2 mM 之離子化鈣濃度之 TBS 稀釋之 HRP 結合抗 M13 抗體(Amersham Pharmacia Biotech)至各孔的盤培養 1 小時。以 1.2 mM $CaCl_2$/TBST

洗淨後，將經添加 TMB single 溶液(ZYMED)之各孔中溶液之發色反應藉由添加硫酸以停止後、以 450 nm 吸光度來測定該發色。

上述噬菌體 ELISA 之結果，進行以判斷爲具有對 Ca 依存性的抗原之結合能力的抗體片段作爲模板而以特異性引子放大之基因的鹼基序列解析。

(15-4)抗體之表現與純化

噬菌體 ELISA 之結果，將判斷爲具有對 Ca 依存性的抗原具有結合能力之殖株導入動物細胞表現用質體。抗體之表現係使用以下方法進行。將來自人類胎兒腎細胞之 FreeStyle 293-F 株 (Invitrogen) 懸濁於 FreeStyle 293 Expression Medium 培養基(Invitrogen)，以 1.33 x 10^6 細胞/mL 之細胞密度對 6 孔盤之各孔各播種 3 mL。調製之質體係藉由脂質體轉染法導入細胞。於 CO_2 培養器(37 度、8%CO_2、90 rpm)中進行 4 日培養。使用 rProtein A SepharoseTM Fast Flow(Amersham Biosciences)，使用所屬技術領域中具有通常知識者公知之方法，由上述所得之培養上清液中純化抗體。使用分光光度計測定經純化之抗體溶液在 280 nm 之吸光度。藉由使用以 PACE 法算出之吸光係數，由所得之測定值算出抗體濃度 (Protein Science(1995)4, 2411-2423)。

[實施例 16]所取得之抗體對人類 IL-6 受體之 Ca 依存性結

合能力之評估

爲了判斷實施例 15 中取得之抗體 6RL#9-IgG1(重鏈(使來自 IgG1 之恆定區域與序列編號：78、序列編號：10 連結之序列)、輕鏈序列編號：79)、及 FH4-IgG1(重鏈序列編號：80、輕鏈序列編號：81)對人類 IL-6 受體之結合活性是否爲 Ca 依存性，使用 Biacore T100(GE Healthcare)，來進行該等抗體與人類 IL-6 受體之抗原抗體反應的速度論解析。作爲不具有對人類 IL-6 受體之 Ca 依存性結合活性的對照抗體，係使用 WO2009125825 記載之 H54/L28-IgG1(重鏈序列編號：82、輕鏈序列編號：83)。作爲高鈣離子濃度及低鈣離子濃度之條件，分別在 2 mM 及 3μM 之鈣離子濃度的溶液中進行抗原抗體反應之速度論解析。於以胺偶合法固定化適當量之 protein A(Invitrogen)之 Sensor chip CM4(GE Healthcare)上，捕捉目的抗體。跑動緩衝液係使用 10 mM ACES、150 mM NaCl、0.05%(w/v) Tween20、2 mM $CaCl_2$(pH7.4)或 10 mM ACES、150 mM NaCl、0.05%(w/v) Tween20、3μmol/L $CaCl_2$(pH7.4)之 2 種緩衝液。人類 IL-6 受體之稀釋亦使用各自的緩衝液。測定全部在 37℃實施。

在使用了 H54/L28-IgG1 抗體之抗原抗體反應的速度論解析時，藉由將 IL-6 受體之稀釋液與空白的跑動緩衝液以流速 20μL/min 注入 3 分鐘，使 IL-6 受體與被捕捉於感應晶片(sensor chip)上之 H54/L28-IgG1 抗體相互作用。之後，以流速 20μL/min 流動跑動緩衝液 10 分鐘，觀察

IL-6 受體之解離後，藉由將 10 mMGlycine-HCl(pH1.5)以流速 30μL/min 注入 30 秒，使感應晶片再生。由測定而得之表面電漿共振感應圖(sensorgram)，算出動態參數(kinetics parameter)之結合速度常數 ka(1/Ms)、及解離速度常數 kd(1/s)。使用該等之值算出 H54/L28-IgG1 抗體對人類 IL-6 受體之解離常數 KD(M)。各參數之算出，係使用 Biacore T100 Evaluation Software(GE Healthcare)。

在使用了 FH4-IgG1 抗體及 6RL#9-IgG1 抗體之抗原抗體反應的速度論解析時，藉由以流速 5μL/min 將 IL-6 受體之稀釋液與空白之跑動緩衝液注入 15 分鐘，使 IL-6 受體與被捕捉於感應晶片上之 FH4-IgG1 抗體或 6RL#9-IgG1 抗體相互作用。之後，藉由將 10 mM Glycine-HCl(pH1.5)以流速 30μL/min 注入 30 秒，使感應晶片再生。由測定所得之表面電漿共振感應圖(sensorgram)，使用 steady state affinity model 算出解離常數 KD(M)。各參數之算出係使用 Biacore T100 Evaluation Software(GE Healthcare)。

藉由此方法所決定之在 2 mM $CaCl_2$ 存在下之各抗體與 IL-6 受體的解離常數 KD 係如表 21 所示。

[表21]

抗體	H54/L28-IgG1	FH4-IgG1	6RL#9-IgG1
kD (M)	1.9E-9	5.9E-7	2.6E-7

Ca 濃度爲 3μM 之條件下的 H54/L28-IgG1 抗體之 KD，可藉由與 2 mMCa 濃度存在下同樣的方法來算出。Ca

濃度爲 3μM 之條件下，FH4-IgG1 抗體及 6RL#9-IgG1 抗體幾乎沒有觀察到對 IL-6 受體之結合，因此難以用上述方法算出 KD。但是，藉由使用下述式 1(Biacore T100 Software Handbook, BR-1006-48, AE 01/2007)，可預測在 Ca 濃度爲 3μM 之條件下之該等抗體的 KD。

[式 1]

$$Req=C \times Rmax/(KD+C)+RI$$

上述式 1 中各項目之意義如下述；

Req(RU)：恆定狀態結合水準(Steady state binding levels)

Rmax(RU)：待分析物之面結合能力(Analyte binding capacity of the surface)

RI(RU)：試樣中之容積折射率貢獻(Bulk refractive index contribution in the sample)

C(M)：待分析物濃度(Analyte concentration)

KD(M)：平衡解離常數(Equilibrium dissociation constant)

表示之。

使用了上述式 1 之於 Ca 濃度爲 3μmol/L 時各抗體與 IL-6 受體之解離常數 KD 之預測的概算結果係示於表 22。表 22 中之 Req、Rmax、RI、C 係基於測定結果而假定的值。

[表22]

抗體	H54/L28-IgG1	FH4-IgG1	6RL#9-IgG1
Req (RU)		5	10
Rmax (RU)		39	72
RI (RU)		0	0
C (M)		5E-06	5E-06
KD (M)	2.2E-9	3.4E-05	3.1E-05

由上述結果，預測了 FH4-IgG1 抗體及 6RL#9-IgG1 抗體，藉由使緩衝液中之 $CaCl_2$ 濃度由 2 mM 減少至 3μM，對 IL-6 受體之 KD 分別上昇約 60 倍、約 120 倍(親和性降低 60 倍、120 倍以上)。

於表 23 整理了 H54/L28-IgG1、FH4-IgG1、6RL#9-IgG1 之 3 種抗體在 2 mM $CaCl_2$ 存在下及 3μM $CaCl_2$ 存在下之 KD 值、及 KD 值之 Ca 依存性。

[表23]

抗體	H54/L28-IgG1	FH4-IgG1	6RL#9-IgG1
KD (M) (2 mM $CaCl_2$)	1.9E-9	5.9E-7	2.6E-7
KD (M) (3μM $CaCl_2$)	2.2E-9	3.4E-5以上	3.1E-5以上
Ca依存性	約1倍	約60倍以上	約120倍以上

並沒有觀察到因 Ca 濃度不同所致 H54/L28-IgG1 抗體對 IL-6 受體之結合的不同。另一方面，於低濃度 Ca 條件下，觀察到 FH4-IgG1 抗體及 6RL#9-IgG1 抗體對 IL-6 受體之結合係顯著地減弱(表 23)。

[實施例 17]對所取得之抗體之鈣離子結合評估

接著，作爲鈣離子對抗體結合之評估的指標，測定了示差掃描型熱量測定(DSC)之熱變性中間溫度(Tm 值)(MicroCal VP-Capillary DSC、MicroCal)。熱變性中間溫度(Tm 值)爲安定性之指標，藉由鈣離子之結合使蛋白質安定化時，熱變性中間溫度(Tm 值)係比鈣離子未結合時高(J. Biol. Chem.(2008)283, 37, 25140-25149)。藉由評估因應抗體溶液中之鈣離子濃度變化之抗體 Tm 值的變化，評估鈣離子對抗體之結合活性。經純化之抗體係供以 20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、2 mM $CaCl_2$(pH7.4)或 20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl, 3μM $CaCl_2$(pH7.4)之溶液爲外液的透析(EasySEP、TOMY)處理。使用透析所用之溶液，以調製爲大約 0.1 mg/mL 之抗體溶液作爲被驗物質，由 20℃至 115℃，以 240℃/hr 之昇溫速度進行 DSC 測定。基於所得到之 DSC 的變性曲線而算出之各抗體之 Fab 結構域的熱變性中間溫度(Tm 值)係如表 24 所示。

[表24]

抗體	鈣離子濃度		ΔTm (℃)
	3μM	2 mM	2 mM-3μM
H54/L28-IgG1	92.87	92.87	0.00
FH4-IgG1	74.71	78.97	4.26
6RL#9-IgG1	77.77	78.98	1.21

由表 24 之結果，顯示了展現鈣依存性結合能力之 FH4-IgG1 抗體及 6RL#9-IgG1 抗體之 Fab 的 Tm 值係隨著

鈣離子濃度之變化而變動；不展現鈣依存性結合能力之H54/L28-IgG1抗體之Fab的Tm值不隨著鈣離子濃度之變化而變動。FH4-IgG1抗體及6RL#9-IgG1抗體之Fab的Tm值變動，係表示鈣離子與該等抗體結合，Fab部分會安定化。由上述結果，顯示鈣離子會與FH4-IgG1抗體及6RL#9-IgG1抗體結合，另一方面，鈣離子不與H54/L28-IgG1抗體結合。

[實施例18]6RL#9抗體之鈣離子結合部位之X射線結晶構造解析的鑑定

(18-1)X射線結晶構造解析

如實施例17所示，由熱變性溫度Tm值之測定，暗示了6RL#9抗體會與鈣離子結合。但是，無法預測6RL#9抗體之何部位會與鈣離子結合，因此藉由使用X射線結晶構造解析之手法，特定了鈣離子會相互作用之6RL#9抗體序列中之殘基。

(18-2)6RL#9抗體之表現及純化

純化用於X射線結晶構造解析而表現的6RL#9抗體。具體而言，將調製爲可分別表現6RL#9抗體之重鏈(序列編號：78)與輕鏈(序列編號：79)的動物表現用質體暫時地導入動物細胞。於對FreeStyle 293 Expression Medium培養基(Invitrogen)懸濁，使最終細胞密度成爲1 x 10^6細胞/mL之800 mL來自人類胎兒腎細胞之FreeStyle 293-F株

(Invitrogen)中，以脂質體轉染法導入調製的質體。經導入質體之細胞係在 CO_2 培養器(37℃、8%CO_2、90 rpm)中培養 5 日。遵照使用了 rProtein A SepharoseTM Fast Flow (Amersham Biosciences)之所屬技術領域中具有通常知識者公知的方法，由如上述方式得到之培養上清液中純化抗體。使用分光光度計測定經純化之抗體溶液在 280 nm 之吸光度。使用藉由 PACE 法算出之吸光係數，由測定值算出抗體濃度(Protein Science(1995)4, 2411-2423)。

(18-3)由 6RL#9 抗體純化 Fab 片段

使用分子量區分尺寸 10000MWCO 之超微過濾膜，濃縮 6RL#9 抗體至成爲 21 mg/mL。使用 L-Cystein 4 mM、EDTA 5 mM、20 mM 磷酸鈉緩衝液(pH 6.5)，調製以 5 mg/mL 稀釋之 2.5 mL 該抗體試樣。將添加 0.125 mg 之 Papain(RocheApplied Science)而經攪拌之該試樣在 35℃靜置 2 小時。靜置後，進一步於該試樣中添加溶解有蛋白酶抑制劑雞尾酒 mini、EDTAfree(Roche Applied Science)1 錠之 10 mL 的 25 mM MES 緩衝液(pH6)，於冰中靜置藉以使 Papain 之蛋白酶反應停止。接著，將該試樣添加於在下游縱列連接有 1 mL 尺寸之蛋白質 A 載劑管柱 HiTrap MabSelect Sure(GE Healthcare)之經 25 mM MES 緩衝液 pH6 平衡化的 1 mL 尺寸的陽離子交換管柱 HiTrap SP HP (GE Healthcare)。將同緩衝液中 NaCl 濃度直線上昇至 300 mM 而進行溶出，藉以得到 6RL#9 抗體之 Fab 片段的純化

部分。接著，將所得之純化部分藉由 5000MWCO 之超微過濾膜濃縮至 0.8 mL 左右。將濃縮液添加至經含有 50 mM NaCl之 100 mM HEPES緩衝液(pH 8)平衡化的凝膠過濾管柱 Superdex 200 10/300 GL(GE Healthcare)中。使用同緩衝液，由管柱溶出結晶化用之純化 6RL#9 抗體的 Fab 片段。再者，上述之全部的管柱操作係在 6 至 7.5℃之低溫下實施。

(18-4)6RL#9 抗體之 Fab 片段在 Ca 存在下之結晶化

預先以一般的條件設定，得到 6RL#9 Fab 片段之種晶。接著將經添加 $CaCl_2$成爲 5 mM 之純化 6RL#9 抗體之 Fab 片段，使用 5000MWCO 之超微過濾膜濃縮爲 12 mg/mL。接著，藉由懸滴(hanging drop)蒸氣擴散法，實施如前述濃縮之試樣的結晶化。作爲蛋白結晶溶液(reservoir solution)係使用含有 20-29%之 PEG4000 的 100 mMHEPES 緩衝液(pH7.5)。於蓋玻片上，對 0.8μl 之蛋白結晶溶液及 0.8μl 之前述濃縮試樣的混合液，添加經於含有 29% PEG4000 及 5 mM $CaCl_2$之 100 mM HEPES 緩衝液(pH7.5)中破碎的前述種晶被稀釋 100-10000 倍之稀釋系列溶液 0.2μl 藉以調製結晶滴。測定將該結晶滴於 20℃靜置 2 日至 3 日而得之薄板狀結晶之 X 射線繞射數據。

(18-5)6RL#9 抗體之 Fab 片段在 Ca 非存在下之結晶化

使用 5000MWCO 之超微過濾膜，使純化之 6RL#9 抗

體的 Fab 片段濃縮至 15 mg/ml。接著，藉由懸滴蒸氣擴散法，如前述方式實施濃縮試樣之結晶化。作爲蛋白結晶溶液係使用含有 18-25%之 PEG4000 的 100 mM HEPES 緩衝液(pH7.5)。於蓋玻片上，對 0.8μl 之蛋白結晶溶液及 0.8μl 之前述濃縮試樣的混合液，添加經於含有 25% PEG4000 之 100 mM HEPES 緩衝液(pH7.5)中破碎的在 Ca 存在下所得之 6RL#9 抗體 Fab 片段之結晶被稀釋 100-10000 倍之稀釋系列溶液 0.2μl 藉以調製結晶滴。測定將該結晶滴於 20℃靜置 2 日至 3 日而得之薄板狀結晶之 X 射線繞射數據。

(18-6)6RL#9 抗體之 Fab 片段在 Ca 存在下之結晶的 X 射線繞射數據測定

將浸於包含 35% PEG4000 及 5 mM $CaCl_2$ 之 100mM HEPES 緩衝液(pH7.5)溶液之 6RL#9 抗體 Fab 片段在 Ca 存在下得到之一單結晶，使用附有微小尼龍圈環之針用連同外液一起撈起，將該單結晶在液體氮中冷凍。使用高能加速器研究機構之放射光設施 photon factory 之射束 BL-17A，測定前述冷凍結晶之 X 射線繞射數據。再者，測定中係將冷凍結晶經常放置於-178℃之氮氣流中藉以維持冷凍狀態。使用射束所安裝之 CCD 偵測器 Quantum315r (ADSC)，將結晶一次旋轉 1°，收集總共 180 枚之繞射影像。晶格常數之決定，賦予繞射斑點之指數，及繞射數據之處理係藉由程式 Xia2(CCP4 Software Suite)、XDS Package

(Walfgang Kabsch)以及 Scala(CCP4 Software Suite)進行。最終得到解析度高達 2.2Å 之繞射強度數據。本結晶屬於空間群 $P2_12_12_1$，晶格常數 a=45.47Å、b=79.86Å、c=116.25Å、α=90°、β=90°、γ=90°。

(18-7)6RL#9 抗體之 Fab 片段在 Ca 非存在下之結晶的 X 射線繞射數據測定

將浸於包含 35% PEG4000 之 100 mM HEPES 緩衝液(pH7.5)溶液之 6RL#9 抗體 Fab 片段在 Ca 非存在下得到之一單結晶，使用附有微小尼龍圈環之針用連同外液一起撈起，將該單結晶在液體氮中冷凍。使用高能加速器研究機構之放射光設施 photon factory 之射束 BL-5A，測定前述之冷凍結晶的 X 射線繞射數據。再者，測定中係將冷凍結晶經常放置於-178℃之氮氣流中藉以維持冷凍狀態。使用射束所安裝之 CCD 偵測器 Quantum210r (ADSC)，將結晶一次旋轉 1°，收集總共 180 枚之繞射影像。晶格常數之決定，賦予繞射斑點之指數，及繞射數據之處理係藉由程式 Xia2(CCP4 Software Suite)、XDS Package(Walfgang Kabsch)以及 Scala(CCP4 Software Suite)進行。最終得到解析度高達 2.3Å 之繞射強度數據。本結晶屬於空間群 $P2_12_12_1$，晶格常數 a=45.40Å、b=79.63Å、c=116.07Å、α=90°、β=90°、γ=90°，與 Ca 存在下之結晶爲同型。

(18-8)6RL#9 抗體之 Fab 片段在 Ca 存在下之結晶構造解析

藉由使用了程式 Phaser(CCP4 Software Suite)之分子取代法，決定 6RL#9 抗體之 Fab 片段在 Ca 存在下之結晶構造。由所得之結晶格子大小與 6RL#9 抗體 Fab 片段之分子量，預測了非對稱單位中之分子數爲一個。基於一次序列上之相同性，將由 PDB code: 1ZA6 之構造座標取出之 A 鏈 112-220 號及 B 鏈 116-218 號胺基酸殘基部分作爲 CL 及 CH1 區域之探索用模式分子。接著將由 PDB code: 1ZA6 之構造座標取出之 B 鏈 1-115 號胺基酸殘基部分作爲 VH 區域之探索用模式分子。最後將由 PDB code 2A9M 之構造座標取出之輕鏈 3-147 號胺基酸殘基作爲 VL 區域之探索用模式分子。遵此順序決定由旋轉函數及轉換函數決定各探索用模式分子在結晶格子內之方向與位置，藉以得到 6RL#9 抗體之 Fab 片段初期構造模式。藉由對該初期構造模式運動 VH、VL、CH1、CL 之各結構域以進行剛體精密化，使相對於 25-3.0Å 之反射數據的結晶學信賴度因子 R 值爲 46.9%、Free R 值爲 48.6%。進一步地進行了使用程式 Refmac5(CCP4 Software Suite)之構造精密化；與以使用實驗決定之構造因子 Fo 與由模式計算之構造因子 Fc 及位相而計算之 2Fo-Fc、Fo-Fc 作爲係數，一邊參照電子密度圖同時重複地修正模式之程式 Coot(Paul Emsley)上來進行的模式精密化。最後基於以 2Fo-Fc、Fo-Fc 作爲係數之電子密度圖，將 Ca 離子及水分子加入模式，藉以使用程式 Refmac5(CCP4 Software Suite)來進行精密化。使用解析度 25-2.2Å 之 21020 個反射數據，最終對 3440 原

子之模式的結晶學信賴度因子 R 值爲 20.0%、Free R 值爲 27.9%。

(18-9)6RL#9 抗體之 Fab 片段在 Ca 非存在下之結晶 X 射線繞射數據測定

6RL#9 抗體之 Fab 片段在 Ca 非存在下之結晶構造，係使用同型之在 Ca 存在下結晶構造來決定。由 6RL#9 抗體 Fab 片段在 Ca 存在下之結晶構造座標中去除水分子與 Ca 離子分子，藉由運動 VH、VL、CH1、CL 之各結構域以進行剛體精密化。相對於 25-3.0Å 之反射數據的結晶學信賴度因子 R 值爲 30.3%、FreeR 值爲 31.7%。進一步地進行了使用程式 Refmac5(CCP4 Software Suite)之構造精密化；與以使用實驗決定之構造因子 Fo 與由模式計算之構造因子 Fc 及位相而計算之 2Fo-Fc、Fo-Fc 作爲係數，一邊參照電子密度圖同時重複地修正模式之程式 Coot(Paul Emsley)上來進行的模式精密化。最後基於以 2Fo-Fc、Fo-Fc 作爲係數之電子密度圖，將水分子加入模式，藉以使用程式 Refmac5(CCP4 Software Suite)來進行精密化。使用解析度 25-2.3Å 之 18357 個反射數據，最終對 3351 原子之模式的結晶學信賴度因子 R 值爲 20.9%、Free R 值爲 27.7%。

(18-10)6RL#9 抗體 Fab 片段在 Ca 存在或非存在下之結晶的 X 射線繞射數據比較

比較 6RL#9 抗體 Fab 片段在 Ca 存在下之結晶及在 Ca 非存在下之結晶構造時，可見到於重鏈 CDR3 有大的變化。以 X 射線結晶構造解析決定之 6RL#9 抗體的 Fab 片段之重鏈 CDR3 構造係如圖 11 所示。具體而言，在 Ca 存在下之 6RL#9 抗體的 Fab 片段結晶中，鈣離子存在於重鏈 CDR3 圈環部分之中心部分。鈣離子可認爲與重鏈 CDR3 之 95 位、96 位及 100a 位(Kabat 編號)相互作用。在 Ca 存在下，認爲與抗原之結合重要之重鏈 CDR3 圈環藉由與鈣結合而安定化，成爲與抗原結合最適合的構造。至今爲止，鈣與抗體之重鏈 CDR3 結合之例尚未被報導，鈣與抗體之重鏈 CDR3 結合之構造爲新穎的構造。

由 6RL#9 抗體之 Fab 片段構造而明確化之重鏈 CDR3 中存在的鈣結合模式結構，亦可成爲設計如實施例 11 記載之 Ca 庫之新的要素。亦即，實施例 11 中係於輕鏈可變區域導入鈣結合模式結構，但可考慮例如包含 6RL#9 抗體重鏈 CDR3，且包含輕鏈之其以外的 CDR 中含有柔性殘基的分子庫。

[實施例 19]由使用了噬菌體展示技術之人類抗體庫中取得 Ca 依存性地與 IL-6 結合之抗體

(19-1)天然人類抗體噬菌體展示分子庫之製造

以由人類 PBMC 製成之多 A RNA、或市售之人類多 A RNA 等作爲模板，遵照所屬技術領域中具有通常知識者公知之方法，構築了由展現彼此相異之人類抗體序列 Fab 結

構域的複數噬菌體所構成之人類抗體噬菌體展示分子庫。

(19-2)磁珠篩選之由分子庫中取得 Ca 依存性地與抗原結合之抗體片段

由構築之天然人類抗體噬菌體展示分子庫中的最初選拔，係藉由僅濃縮具有對抗原(IL-6)之結合能力的抗體片段來實施。抗原係使用生物素標誌之 IL-6。

由保持構築之噬菌體展示用噬粒之大腸菌中進行噬菌體產生。藉由將經於進行過噬菌體產生之大腸菌培養液中添加 2.5 M NaCl/10%PEG 而沈澱之噬菌體集團以 TBS 稀釋，以得到噬菌體庫液。接著，藉由於噬菌體庫液中添加 BSA 及 $CaCl_2$，使成爲終濃度 4% BSA 及 1.2mM 鈣離子濃度。作爲篩選方法，係參照使用了一般方法之固定化於磁珠之抗原的篩選方法(J. Immunol. Methods.(2008) 332(1-2), 2-9、J. Immunol. Methods.(2001) 247(1-2), 191-203、Biotechnol. Prog.(2002) 18(2) 212-20、Mol. Cell Proteomics (2003) 2(2), 61-9)。磁珠係使用 NeutrAvidin coated beads (Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated)或 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)。

具體而言，藉由於經調製之噬菌體庫液中添加 250 pmol 之生物素標誌抗原，將該噬菌體庫液於室溫與抗原接觸 60 分鐘。添加經 BSA 阻斷之磁珠，使抗原與噬菌體之複合體與磁珠在室溫結合 15 分鐘。將磁珠以 1.2 mM $CaCl_2$/TBST(含有 1.2 mM $CaCl_2$之 TBST)洗淨 3 次後，以

1 mL 之 1.2 mM $CaCl_2$/TBS(含有 1.2 mM $CaCl_2$ 之 TBS)進一步洗淨 2 次。之後，將經添加 0.5 mL 之 1 mg/mL 胰蛋白酶的磁珠在室溫懸濁 15 分鐘後，立即使用磁性架台將磁珠分離，回收噬菌體溶液。將回收之噬菌體溶液添加於對數增殖期(OD600 爲 0.4-0.7)之 10 mL 大腸菌株 TG1。藉由於 37℃緩慢地進行上述大腸菌之攪拌培養 1 小時，使噬菌體感染大腸菌。將經感染之大腸菌播種於 225 mm x 225 mm 之盤。接著，藉由自經播種之大腸菌培養液中回收噬菌體，來調製噬菌體庫液。

第 2 次以後之篩選中，係以 Ca 依存性結合能力爲指標來進行噬菌體濃縮。具體而言，藉由於經調製之噬菌體庫液中添加 40 pmol 之生物素標誌抗原，使噬菌體庫於室溫與抗原接觸 60 分鐘。添加經 BSA 阻斷之磁珠，將抗原與噬菌體之複合體與磁珠在室溫結合 15 分鐘。磁珠係以 1 mL 之 1.2 mM $CaCl_2$/TBST 與 1.2 mM $CaCl_2$/TBS 洗淨。之後將經添加 0.1mL 之 2 mM EDTA/TBS 的磁珠在室溫懸濁後，立即使用磁性架台將磁珠分離，回收噬菌體溶液。藉由在回收之噬菌體溶液中添加 100 mg/mL 之胰蛋白酶 5μL，不展現 Fab 之噬菌體的 pIII 蛋白質(來自輔助噬菌體之 pIII 蛋白質)被切斷，使不展現 Fab 之噬菌體對大腸菌之感染能力喪失。將自經胰蛋白酶處理之噬菌體溶液中回收的噬菌體添加至對數增殖期(OD600 爲 0.4-0.7)之 10 mL 大腸菌株 TG1 中。藉由於 37℃緩慢地進行上述大腸菌之攪拌培養 1 小時，使噬菌體感染大腸菌。經感染之大腸菌

係播種於 225 mm x 225 mm 之盤。接著，藉由自經播種之大腸菌培養液中回收噬菌體，回收噬菌體庫液。以 Ca 依存性結合能力爲指標的篩選係重複 3 次。

(19-3)噬菌體 ELISA 之評估

遵習一般方法(Methods Mol. Biol.(2002)178, 133-145)，由藉由上述方法所得之大腸菌單一菌落，回收含有噬菌體之培養上清液。

將含有經添加 BSA 及 $CaCl_2$ 而成爲終濃度 4%BSA 及 1.2 mM 鈣離子濃度的含有噬菌體之培養上清液依以下順序供 ELISA。將 StreptaWell 96 微量孔盤(Roche)以含有生物素標誌抗原之 100μL PBS 被覆一晚。將該盤之各孔以 PBST 洗淨藉以去除抗原後，將該孔以 4% BSA-TBS 250μL 阻斷 1 小時以上。將於去除 4% BSA-TBS 之各孔中添加有所調製之培養上清液的該盤於 37℃靜置 1 小時，藉以使展現噬菌體之抗體與存在於各孔之抗原結合。於經 1.2 mM $CaCl_2$/TBST 洗淨之各孔中添加 1.2 mM $CaCl_2$/TBS 或 1 mM EDTA/TBS，該盤係在 37℃靜置 30 分鐘培養。以 1.2 mM $CaCl_2$/TBST 洗淨之後，將經終濃度 4%之 BSA 及 1.2 mM 之離子化鈣濃度的 TBS 稀釋之 HRP 結合抗 M13 抗體(Amersham Pharmacia Biotech)至各孔的盤培養 1 小時。以 1.2 mM $CaCl_2$/TBST 洗淨後，將經添加 TMB single 溶液(ZYMED)之各孔中溶液之發色反應藉由添加硫酸以停止後、以 450 nm 吸光度來測定該發色。

藉由使用單離之 96 殖株來進行噬菌體 ELISA，得到具有對 IL-6 之 Ca 依存性結合能力的 6KC4-1#85 抗體。上述噬菌體 ELISA 之結果，以判斷爲具有 Ca 依存性地對抗原之結合能力的抗體片段爲模板，進行經特異引子放大之基因的鹼基序列解析。6KC4-1#85 抗體之重鏈可變區域序列記載於序列編號：11；及輕鏈可變區域之序列係記載於序列編號：84。編碼 6KC4-1#85 抗體之重鏈可變區域(序列編號：11)的聚核苷酸藉由 PCR 法與編碼來自 IgG1 之序列的聚核苷酸連結的 DNA 片段，係被接入動物細胞表現用載體，構築表現以序列編號：85 表示之重鏈的載體。編碼 6KC4-1#85 抗體之輕鏈可變區域(序列編號：84)的聚核苷酸藉由 PCR 法與編碼天然型 Kappa 鏈恆定區域(序列編號：26)之聚核苷酸連結的 DNA 片段，係被接入動物細胞表現用載體。所製造之改變體序列係以所屬技術領域中具有通常知識者公知之方法確認。所製造之改變體序列係以所屬技術領域中具有通常知識者公知之方法確認。

(19-4)抗體之表現與純化

噬菌體 ELISA 之結果，判斷爲具有對 Ca 依存性的抗原之結合能力之殖株 6KC4-1#85，係被導入動物細胞表現用質體。抗體之表現係使用以下方法進行。將來自人類胎兒腎細胞之 FreeStyle 293-F 株(Invitrogen)懸濁於 FreeStyle 293 Expression Medium 培養基(Invitrogen)，以 1.33×10^6 細胞/mL 之細胞密度對 6 孔盤之各孔各播種 3 mL。經調製

之質體係藉由脂質體轉染法導入細胞。在 CO_2 培養器(37度、8%CO_2、90 rpm)中進行 4 日培養。使用 rProtein A SepharoseTM Fast Flow(Amersham Biosciences)，使用所屬技術領域中具有通常知識者公知之方法，由上述所得之培養上清液中純化抗體。使用分光光度計測定經純化之抗體溶液在 280 nm 之吸光度。藉由使用以 PACE 法算出之吸光係數，由所得之測定值算出抗體濃度(Protein Science (1995)4, 2411-2423)。

[實施例 20]6KC4-1#85 抗體之鈣離子結合評估

評估由人類抗體庫取得之鈣依存性抗原結合之抗體 6KC4-1#85 抗體是否與鈣結合。在離子化鈣濃度不同的條件下，以實施例 6 記載之方法評估所測定之 Tm 值是否變動。

6KC4-1#85 抗體之 Fab 結構域的 Tm 值係如表 25 所示。如表 25 所示，6KC4-1#85 抗體之 Fab 結構域的 Tm 值隨著鈣離子濃度而變動，故明顯得知 6KC4-1#85 抗體會與鈣結合。

[表25]

抗體	鈣離子濃度		ΔTm (℃)
	3μM	2 mM	2 mM-3μM
6KC4-1#85	71.49	75.39	3.9

[實施例 21]6KC4-1#85 抗體之鈣離子結合部位的鑑定

如實施例 20 所示，雖顯示 6KC4-1#85 抗體與鈣離子結合，但 6KC4-1#85 不具有由 hVk5-2 序列之探討而明確之鈣結合模式結構。因而，爲了確認鈣離子係與 6KC4-1#85 抗體之重鏈結合、與輕鏈結合或與兩者結合，係評估鈣離子對於與鈣離子不結合之抗磷脂肌醇聚糖 3 抗體(重鏈序列 GC_H(序列編號：48)、輕鏈序列 GC_L(序列編號：86))之重鏈與輕鏈各自交換之改變抗體的結合。根據實施例 6 所示方法所測定之改變抗體的 Tm 值係如表 26 所示。結果，具有 6KC4-1#85 抗體之重鏈的改變抗體之 Tm 值隨著鈣離子濃度而變化，因此可認爲 6KC4-1#85 抗體之重鏈與鈣結合。

[表26]

重鏈	輕鏈	鈣離子濃度		ΔTm (℃) 2 mM-3μM
		3μM	2 mM	
6KC4-1#85	6KC4-1#85	71.46	75.18	3.72
6KC4-1#85	GC_L	78.87	80.01	1.14
GC_H	6KC4-1#85	75.69	75.94	0.25
GC_H	GC_L	79.94	80.01	0.07

因而，爲了進一步鑑定鈣離子係與 6KC4-1#85 抗體之重鏈殘基的何者結合，製造了將存在於 6KC4-1#85 抗體 CDR 之 Asp(D)殘基取代爲與鈣離子之結合或鉗合無關的 Ala(A)殘基之改變重鏈(6_H1-11(序列編號：87)、6_H1-12(序列編號：88)、6_H1-13(序列編號：89)、6_H1-14(序列編號：90)、6_H1-15(序列編號：91))、或改變輕鏈

(6_L1-5(序列編號：92)及 6_L1-6(序列編號：93))。由經導入包含改變抗體基因之表現載體的動物細胞之培養液中，遵照實施例 19 記載之方法來純化改變抗體。純化之改變抗體的鈣結合，係遵照實施例 6 記載之方法測定。測定結果示於表 27。如表 27 所示，藉由將 6KC4-1#85 抗體之重鏈 CDR3 的 95 位或 101 位(Kabat 編號)取代爲 Ala 殘基，而喪失 6KC4-1#85 抗體之鈣結合能力，故可認爲此殘基在與鈣之結合上爲重要。存在於由 6KC4-1#85 抗體之改變抗體的鈣結合性而明確化之 6KC4-1#85 抗體重鏈 CDR3 之圈環根部附近之鈣結合模式結構，亦可成爲如實施例 11 記載之 Ca 庫設計之新的要素。亦即，於實施例 11 中係於輕鏈可變區域導入鈣結合模式結構，但可考慮於例如包含 6KC4-1#85 抗體之重鏈 CDR3、且包含輕鏈之其以外的 CDR 中包含柔性殘基的分子庫。

[表27]

重鏈	輕鏈	改變殘基	鈣離子濃度		ΔTm（℃）
			3μM	2 mM	2 mM-3μM
6KC4-1#85	6KC4-1#85	野生型	71.49	75.39	3.9
6H1-11	6KC4-1#85	H鏈61位(Kabat編號)	71.73	75.56	3.83
6H1-12	6KC4-1#85	H鏈95位(Kabat編號)	72.9	73.43	0.53
6H1-13	6KC4-1#85	H鏈100a位(Kabat編號)	70.94	76.25	5.31
6H1-14	6KC4-1#85	H鏈100g位(Kabat編號)	73.95	75.14	1.19
6H1-15	6KC4-1#85	H鏈101位(Kabat編號)	65.37	66.25	0.87
6KC4-1#85	6L1-5	L鏈50位(Kabat編號)	71.92	76.08	4.16
6KC4-1#85	6L1-6	L鏈92位(Kabat編號)	72.13	78.74	6.61

[實施例22]Ca依存性地與人類IgA結合之抗體的取得

(22-1)MRA-hIgA、GC-hIgA及附加生物素之人類IgA-Fc的調製

作爲人類IgA，如以下方式調製MRA-hIgA(重鏈序列編號97、輕鏈序列編號25)GC-hIgA(重鏈序列編號98、輕鏈序列編號99)及附加生物素之人類IgA-Fc(亦稱爲生物素標誌hIgA-Fc、hIgA_CH2-CH3-Avitag：序列編號100)。

(22-1-1)MRA-hIgA之調製

如以下方式調製人類 IgA 之重組體即 MRA-hIgA(以下稱爲 MRA-hIgA)。包含表現之 H(WT)-IgA1(序列編號：97)與 L(WT)(序列編號：25)之 hIgA，係藉由所屬技術領域中具有通常知識者公知之方法，使用離子交換層析及凝膠過濾層析來純化。

(22-1-2)GC-hIgA 之調製

人類 IgA 之重組體的 GC-hIgA，係如以下方式調製。編碼 GC-hIgA(重鏈序列編號：98、輕鏈序列編號：99)之基因片段係被接入動物細胞表現用載體。所構築之質體載體，係使用 293Fectin(Invitrogen)，與表現 EBNA1 之基因一起導入 FreeStyle293(Invitrogen)。之後，將經導入基因之細胞在 37℃、CO_2 8%培養 6 日，使 GC-hIgA 蛋白質分泌於培養上清液中。

將含有 GC-hIgA 之細胞培養液以 0.22μm 瓶頂過濾器(bottle top filter)過濾而得到培養上清液。將經 20 mM Tris-HCl, pH8.0 稀釋之培養上清液加入經同溶液平衡化之 HiTrap Q HP(GE healthcare)，藉由 NaCl 之濃度梯度使 GC-hIgA 溶出。之後，以由 Superdex200 之凝膠過濾層析進行結合體之去除與對 20 mM His-HCl, 150 mM NaCl, pH6.0 之取代，得到純化 GC-hIgA。

(22-1-3)生物素標誌 hIgA-Fc 之調製

爲了使生物素附加於目的蛋白質(人類 IgA-Fc)之 C 末

端，將編碼藉由生物素連接酶會附加生物素之特異序列(Avitag 序列)之基因片段連結於於編碼人類 IgA-Fc 區域之基因片段的下游。將編碼經連結人類 IgA 與 Avitag 序列之蛋白質(hIgA_CH2-CH3-Avitag(序列編號：100))之基因片段接入動物細胞表現用載體。所構築之質體載體係使用 293Fectin(Invitrogen)將基因導入 FreeStyle293 (Invitrogen)。此時將表現 EBNA1 之基因及表現生物素連接酶(BirA)之基因同時導入，藉由添加生物素來標誌生物素。將遵照前述順序經導入基因之細胞在 37℃、CO_2 8%培養 6 日，使目的蛋白質分泌於培養上清液中。

將含有目的人類 IgA-Fc 之細胞培養液以 0.22μm 瓶頂過濾器過濾，得到培養上清液。將以 20 mM Tris-HCl, pH7.4 溶液稀釋之培養上清液加入經同溶液平衡化之 HiTrap Q HP(GE healthcare)，藉由 NaCl 之濃度梯度來溶出目的之人類 IgA-Fc。將以 50 mM Tris-HCl, pH8.0 稀釋之 HiTrap Q HP 溶出液，加入經同溶液平衡化之 SoftLink Avidin column，以 5 mM Biotin, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH8.0 溶出。之後，以由 Superdex200 之凝膠過濾層析進行結合體之去除與對 20 mM His-HCl, 150 mM NaCl, pH6.0 之取代，得到純化人類 IgA-Fc。

(22-2)磁珠篩選之由 Ca 庫取得 Ca 依存性地與抗原結合之抗體片段

由經構築 Ca 依存性地與抗原結合之抗體庫(Ca 庫)的

最初選拔，係以對抗原(人類 IgA-Fc)之結合能力作爲指標來實施。

由保持構築之噬菌體展示用噬粒之大腸菌中進行噬菌體產生。藉由將經於進行過噬菌體產生之大腸菌培養液中添加 2.5 M NaCl/10%PEG 而沈澱之噬菌體集團以 TBS 稀釋，以得到噬菌體庫液。接著，藉由於噬菌體庫液中添加 BSA 或 SkimMilk、及 $CaCl_2$，成爲終濃度 4%BSA、1.2 mM 鈣離子或 3%SkimMilk、1.2 mM 鈣離子，以調製經阻斷的噬菌體庫液。作爲篩選方法，係參照使用了一般方法之固定化於磁珠之抗原的篩選方法(J. Immunol. Methods. (2008)332(1-2), 2-9、J. Immunol. Methods.(2001)247(1-2), 191-203、Biotechnol. Prog.(2002)18(2)212-20、Mol. Cell Proteomics(2003)2(2), 61-9)。磁珠係使用 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated)或 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)。

具體而言，藉由於經調製之噬菌體庫液中添加 250 pmol 之生物素標誌抗原(生物素標誌 IgA-Fc)，將該噬菌體庫液於室溫與抗原接觸 60 分鐘。添加經 BSA 或 SkimMilk 阻斷之磁珠，使抗原與噬菌體之複合體與磁珠在室溫結合 15 分鐘。將磁珠以 1mL 之 1.2 mM $CaCl_2$/TBST(含有 1.2 mM $CaCl_2$、0.1% Tween20 之 TBS)與 1 mL 之 1.2 mM $CaCl_2$/TBS(含有 1.2 mM $CaCl_2$ 之 TBS)洗淨。之後，將添加 1mg/mL 胰蛋白酶 0.5mL 後之磁珠於室溫懸濁 15 分鐘後，立即使用磁性架台將磁珠分離，回收噬菌體溶液。將

回收之噬菌體添加於對數增殖期(OD600 爲 0.4-0.7)之 10 mL 大腸菌株 ER2738。藉由於 37℃緩慢地進行上述大腸菌之攪拌培養 1 小時，使噬菌體感染大腸菌。將經感染之大腸菌播種於 225 mm x 225 mm 之盤。接著，藉由自經播種之大腸菌培養液中回收噬菌體，來調製噬菌體庫液。

第 2 次、第 3 次之篩選中，係以 Ca 離子濃度依存性抗原結合能力爲指標進行噬菌體濃縮。具體而言，係與第 1 次之篩選同樣地進行阻斷，藉由於經調製之噬菌體庫液中添加 40 pmol 之生物素標誌抗原，使噬菌體庫於室溫與抗原接觸 60 分鐘。添加經 BSA 阻斷之磁珠，將抗原與噬菌體之複合體與磁珠在室溫結合 15 分鐘。磁珠係以 1 mL 之 1.2 mM $CaCl_2$/TBST 與 1.2 mM $CaCl_2$/TBS 洗淨。之後，將經添加 0.1 mL 之 2 mM EDTA/TBS(含有 2 mM 之 EDTA 的 TBS)之磁珠於室溫懸濁後，立即使用磁性架台將磁珠分離，回收噬菌體溶液。藉由於回收之噬菌體溶液中添加 100 mg/mL 之胰蛋白酶 5μL，不展現 Fab 之噬菌體的 pIII 蛋白質(來自輔助噬菌體之 pIII 蛋白質)被切斷，使不展現 Fab 之噬菌體對大腸菌之感染能力喪失。將回收之噬菌體添加於對數增殖期(OD600 爲 0.4-0.7)之 10 mL 大腸菌株 ER2738。藉由於 37℃緩慢地進行上述大腸菌之攪拌培養 1 小時，使噬菌體感染大腸菌。經感染之大腸菌係播種於 225 mm x 225 mm 之盤。接著，藉由自經播種之大腸菌培養液中回收噬菌體，回收噬菌體庫液。

(22-3)Biacore 之人類 IgA 結合抗體的篩選

將由第 2 次篩選結束後所得大腸菌中取得之噬粒中萃取之抗體片段基因插入動物細胞表現用載體。抗體之表現係使用以下方法進行。將來自人類胎兒腎細胞之 FreeStyle 293-F 株 (Invitrogen)懸濁於 FreeStyle 293 Expression Medium 培養基(Invitrogen)，以 2.63 x 10^5 細胞/mL 之細胞密度對 96 孔盤之各孔各播種 190μL。經調製之質體係藉由脂質體轉染法導入細胞。在 CO_2 培養器(37 度、8% CO_2)中進行 4 日培養。

使用藉由上述方法所得之培養上清液，使用 BiacoreA100 解析對 GC-hIgA 之結合能力。對以胺偶合法固定化適當量之蛋白質 A(invitrogen)之 sensor chip CM5(GE Healthcare)，固定化培養上清液中之抗體。跑動緩衝液係使用 20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05%(w/v) Tween20、1.2 mM $CaCl_2$ (pH7.4)之緩衝液。GC-hIgA 之稀釋亦使用各自的緩衝液。測定全部在 25℃實施。

上述之於 IgG Biacore 的結合能力解析結果，對判斷爲具有對 GC-hIgA 之結合能力的抗體，解析由用於表現之動物細胞表現用載體使用特異之引子放大的抗體基因之鹼基序列。

(22-4)Phage ELISA 之 hIgA 結合抗體篩選

由在(22-2)實施之第 3 次篩選後所得之大腸菌單一菌落中，遵照一般方法(Methods Mol. Biol.(2002)178, 133-

145)進行噬菌體培養，回收含有噬菌體之培養上清液。將添加 BSA 及 $CaCl_2$ 使成爲終濃度 4%BSA 及 1.2 mM 鈣離子濃度之含有噬菌體的培養上清液依以下順序供 ELISA。將 StreptaWell 96 微量孔盤(Roche)以含有生物素標誌 IgA-Fc 之 100μL PBS 被覆一晚。將該盤之各孔以 PBST 洗淨藉以去除抗原後，將該孔以 4% BSA-TBS 250μL 阻斷 1 小時以上。將於去除 4% BSA-TBS 之各孔中添加有所調製之培養上清液的該盤於 37℃靜置 1 小時，藉以使展現噬菌體之抗體與存在於各孔的 IgA-Fc 結合。於經 1.2 mM $CaCl_2$/TBST 洗淨之各孔中，添加 1.2 mM $CaCl_2$/TBS 或 1 mM EDTA/TBS，該盤係在 37℃靜置 30 分鐘培養。以 1.2 mM $CaCl_2$/TBST 洗淨後，將經添加以 4% BSA 及離子化鈣濃度 1.2 mM 之 TBS 稀釋之 HRP 結合抗 M13 抗體(Amersham Pharmacia Biotech)至各孔的盤培養 1 小時。以 1.2 mM $CaCl_2$/TBST 洗淨後，將經添加 TMB single 溶液(ZYMED)之各孔中溶液之發色反應藉由添加硫酸以停止後、以 450 nm 吸光度來測定該發色。

上述噬菌體 ELISA 之結果，對於判斷爲隨著 Ca 離子濃度不同，對 IgA-Fc 之結合能力會變化之殖株，進行抗體片段基因之鹼基序列解析。

(22-5)以固層篩選法由 Ca 庫取得 Ca 依存性地與抗原結合之抗體片段

由構築之 Ca 依存性地與抗原結合之抗體庫(Ca 庫)的

最初選拔，係以對抗原(人類 IgA-Fc)之結合能力作爲指標來實施。

由保持構築之噬菌體展示用噬粒之大腸菌中進行噬菌體產生。藉由將經於進行過噬菌體產生之大腸菌培養液中添加 2.5 M NaCl/10%PEG 而沈澱之噬菌體集團以 TBS 稀釋，以得到噬菌體庫液。接著，藉由於噬菌體庫液中添加 BSA 或 SkimMilk、及 $CaCl_2$，成爲終濃度 4%BSA、1.2 mM 鈣離子或 3%SkimMilk、1.2 mM 鈣離子，以調製經阻斷的噬菌體庫液。篩選方法係參照第 1 次篩選中之一般方法、即使用了固定化於磁珠之抗原的篩選方法(J. Immunol. Methods.(2008) 332(1-2), 2-9、J. Immunol. Methods. (2001) 247(1-2), 191-203、Biotechnol. Prog. (2002) 18(2) 212-20、Mol. Cell Proteomics (2003) 2(2), 61-9)。磁珠係使用 NeutrAvidin coated beads (Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) 或 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)。

具體而言，藉由於經調製之噬菌體庫液中添加 250 pmol 之生物素標誌抗原(生物素標誌 IgA-Fc)，將該噬菌體庫液於室溫與抗原接觸 60 分鐘。添加經 SkimMilk 阻斷之磁珠，使抗原與噬菌體之複合體與磁珠在室溫結合 15 分鐘。磁珠係以 1mL 之 1.2 mM $CaCl_2$/TBST(含有 1.2 mM $CaCl_2$、0.1% Tween20 之 TBS)與 1 mL 之 1.2 mM $CaCl_2$/TBS (含有 1.2 mM $CaCl_2$ 之 TBS)洗淨。之後，將添加 1mg/mL 胰蛋白酶 0.5mL 後之磁珠於室溫懸濁 15 分鐘後，立即使

用磁性架台將磁珠分離，回收噬菌體溶液。將回收之噬菌體添加於對數增殖期(OD600 爲 0.4-0.7)之 10 mL 大腸菌株 ER2738。藉由於 37℃緩慢地進行上述大腸菌之攪拌培養 1 小時，使噬菌體感染大腸菌。將經感染之大腸菌播種於 225 mm x 225 mm 之盤。接著，藉由自經播種之大腸菌培養液中回收噬菌體，來調製噬菌體庫液。

第 2 次篩選中，係進行使用了固層化於盤上之抗原的篩選。具體而言，於被覆有鏈黴蛋白素之 10 孔盤(Streptawell, Roche)中各孔添加 5pmol 之生物素標誌抗原，在室溫與抗原接觸 60 分鐘後，製造以 TBST(含有 0.1% Tween20 之 TBS)洗淨 3 次之抗原固相化盤。於其中添加經含有 1.2mM Ca 之 SkimMilk 阻斷之噬菌體庫，在室溫與抗原接觸 60 分鐘。盤係以 1.2 mM $CaCl_2$/TBST，藉由盤洗淨器(Skan WASHER, SKARON)洗淨 3 次。之後，進一步浸漬於 2L 之 1.2 mM $CaCl_2$/TBST，和緩震盪 60 分鐘。將經添加 0.1 mL 之 2 mM EDTA/TBS(含有 2 mM 之 EDTA 的 TBS)之孔在室溫懸濁後，回收噬菌體溶液。藉由於回收之噬菌體溶液中添加 100 mg/mL 之胰蛋白酶 5μL，不展現 Fab 之噬菌體的 pIII 蛋白質(來自輔助噬菌體之 pIII 蛋白質)被切斷，使不展現 Fab 之噬菌體對大腸菌之感染能力喪失。將回收之噬菌體添加於對數增殖期(OD600 爲 0.4-0.7)之 10 mL 大腸菌株 ER2738。藉由於 37℃緩慢地進行上述大腸菌之攪拌培養 1 小時，使噬菌體感染大腸菌。經感染之大腸菌係播種於 225 mm x 225 mm 之盤。

(22-6)Phage ELISA 之 hIgA 結合抗體的篩選

由上述篩選後所得之大腸菌單一菌落中，遵照一般方法(Methods Mol. Biol.(2002)178, 133-145)進行噬菌體培養，回收含有噬菌體之培養上清液。於(22-4)記載之方法中，實施 PhageELISA，對於判斷具有 Ca 依存性抗原結合能力之殖株進行鹼基序列解析，插入於動物細胞表現用載體，作爲抗體而表現、純化。

[實施例 23]所取得之抗體對人類 IgA 之 Ca 依存性結合能力評估

(23-1)所取得之抗人類 IgA 抗體表現及純化

作爲於實施例 22 中判斷爲具有對人類 IgA 之結合能力的抗體而取得之抗體當中，使用以下的方法來表現 GA1-IgG1((22-3)中取得之重鏈序列編號 101、輕鏈序列編號 102)、GA2-IgG1((22-4)中取得之重鏈序列編號 103、輕鏈序列編號 104)、GA3-IgG1((22-6)中取得之重鏈序列編號 105、輕鏈序列編號 106)、GA4-IgG1((22-3)中取得之重鏈序列編號 107、輕鏈序列編號 108)，進行該抗體之純化。將懸濁於 FreeStyle 293 Expression Medium 培養基(Invitrogen)之來自人類胎兒腎細胞之 FreeStyle 293-F 株(Invitrogen)，以 1.33 x 10^6 細胞/mL 之細胞密度對 6 孔盤之各孔各播種 3 mL。經調製之質體係藉由脂質體轉染法導入細胞。於 CO_2 培養器(37 度、8%CO_2、90 rpm)中進行

4日培養。使用 rProtein A SepharoseTM Fast Flow(Amersham Biosciences)，使用所屬技術領域中具有通常知識者公知之方法，由上述所得之培養上清液中純化抗體。使用分光光度計測定經純化之抗體溶液在 280 nm 之吸光度。藉由使用以 PACE 法算出之吸光係數，由所得之測定值算出抗體濃度(Protein Science(1995)4, 2411-2423)。

(23-2)所取得之抗體對人類 IgA 之 Ca 依存性結合能力評估

使用 Biacore T200(GE Healthcare)，評估於(23-1)取得之抗體(GA1-IgG1, GA2-IgG1, GA3-IgG1 及 GA4-IgG1)對人類 IgA 的結合活性(解離常數 K_D(M))。使用含有 3μM 或 1.2 mM $CaCl_2$之 0.05% Tween20, 20 mmol/l ACES, 150 mmol/l NaCl(pH7.4 及 pH5.8)；含有 0.1μM 或 10 mM $CaCl_2$ 之 0.05% Tween20, 20 mmol/l ACES, 150 mmol/l NaCl、pH8.0 作爲跑動緩衝液來測定該結合活性。

使抗體與以胺偶合法在 Sensor chip CM5(GE Healthcare)上固定化適當量之重組型蛋白質 A/G(Thermo Scientific)結合。作爲待分析物，注入適當濃度之 MRA-hIgA((22-1)所記載)，與感應晶片上之抗體相互作用。之後，注入 10 mmol/L Glycine-HCl, pH1.5，使感應晶片再生。測定係在37℃進行。藉由使用 Biacore T200 Evaluation Software(GE Healthcare)之測定結果曲線擬合之解析及平衡值解析，算出解離常數 K_D(M)。其結果示於表 28。又，所得之表面電漿共振感應圖(sensorgram)示於圖 12。GA2-IgG1、GA3-

IgG1、GA4-IgG1 明顯地顯示在 Ca^{2+}濃度爲 1.2 mM 時與人類 IgA 強力結合，然在 Ca 離子濃度 3μM 時與人類 IgA 微弱結合。

[表28]

抗體名	條件	Fit	ka	kd	KD[M]
GA1-IgG1	pH8.0, 10mM Ca	1:1binding model	1.2E+06	1.2E-01	1.0E-07
	pH8.0, 0.1μM Ca	1:1binding model	1.1E+06	2.4E-01	2.2E-07
	pH7.4, 1.2mM Ca	1:1binding model	5.7E+05	8.4E-02	1.5E-07
	pH7.4, 3μM Ca	1:1binding model	6.4E+05	1.2E-01	1.9E-07
	pH5.8, 1.2mM Ca	1:1binding model	6.8E+05	9.9E-02	1.4E-07
	pH5.8, 3μM Ca	1:1binding model	7.1E+05	1.1E-01	1.5E-07
GA2-IgG1	pH7.4, 1.2mM Ca	1:1binding model	4.0E+05	1.6E-02	3.9E-08
	pH7.4, 3μM Ca	Steady State Affinity	-	-	6.7E-06
	pH5.8, 1.2mM Ca	Steady State Affinity	-	-	4.0E-06
	pH5.8, 3μM Ca	Steady State Affinity	-	-	5.0E-06
GA3-IgG1	pH7.4, 1.2mM Ca	1:1binding model	4.3E+05	3.3E-02	7.9E-08
	pH7.4, 3μM Ca	Steady State Affinity	-	-	-
	pH5.8, 1.2mM Ca	1:1binding model	4.4E+05	3.5E-02	8.1E-08
	pH5.8, 3μM Ca	Steady State Affinity	-	-	1.1E-06
GA4-IgG1	pH7.4, 1.2mM Ca	Steady State Affinity	-	-	4.2E-07
	pH7.4, 3μM Ca	Steady State Affinity	-	-	8.9E-07
	pH5.8, 1.2mM Ca	Steady State Affinity	-	-	1.1E-06
	pH5.8, 3μM Ca	Steady State Affinity	-	-	1.5E-06

於實施例 14 中由 Ca 庫取得了對 IL6 受體，Ca 離子濃度依存性地與抗原(IL6 受體)之相互作用會變化的抗體，但明顯可知 Ca 離子濃度依存性地與抗原結合之抗體，不僅由 IL6 受體，由人類 IgA 亦可取得。

[實施例 24]Ca 依存性地與人類磷脂肌醇聚糖 3(GPC3)結合之抗體的取得

(24-1)人類磷脂肌醇聚糖 3 之調製

如以下方式調製作爲抗原使用之重組人類磷脂肌醇

聚糖 3(以下 GPC3)。使將表現 6 殘基組胺酸經連結於不含人類磷脂肌醇聚糖 3 之膜貫通區域的胺基酸序列之序列(序列編號：109)之質體恆定地導入之 CHO 細胞，回收培養上清液。將所得之培養上清液離子交換層析純化後，進行使用了 His 標籤之親和性純化及凝膠過濾層析純化，得到 GPC3。使用 EZ-Link NHS-PEG4-Biotin (Thermo SCIENTIFIC)，調製對該 GPC3 標誌生物素之生物素標誌 GPC3。

(24-2)磁珠篩選之由分子庫取得 Ca 依存性地與抗原結合之抗體片段

由構築之 Ca 依存性地與 GPC3 結合之抗體庫的最初選拔，係以對抗原(GPC3)之結合能力爲指標來實施。

由保持構築之噬菌體展示用噬粒之大腸菌中進行噬菌體產生。藉由將經於進行過噬菌體產生之大腸菌培養液中添加 2.5 M NaCl/10%PEG 而沈澱之噬菌體集團以 TBS 稀釋，以得到噬菌體庫液。接著，於噬菌體庫液添加 BSA 或 SkimMilk、及 $CaCl_2$，使成爲終濃度 4%BSA、1.2 mM 鈣離子或 3%SkimMilk、1.2 mM 鈣離子，以調製經阻斷之噬菌體庫液。篩選方法係參照一般方法之使用了固定化於磁珠之抗原的篩選方法(J. Immunol. Methods.(2008) 332(1-2), 2-9、J. Immunol. Methods.(2001) 247(1-2), 191-203、Biotechnol. Prog.(2002) 18(2)212-20、Mol. Cell Proteomics (2003) 2(2), 61-9)。磁珠係使用 NeutrAvidin coated beads

(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated)或 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)。

具體而言，藉由於經調製之噬菌體庫液中添加 250 pmol 之生物素標誌抗原(生物素標誌 GPC3)，將該噬菌體庫液於室溫與抗原接觸 60 分鐘。BSA 或添加經 SkimMilk 阻斷之磁珠，使抗原與噬菌體之複合體與磁珠在室溫結合 15 分鐘。磁珠係以 1mL 之 1.2 mM $CaCl_2$/TBST(含有 1.2 mM $CaCl_2$之 TBST)與 1 mL 之 1.2 mM $CaCl_2$/TBS(含有 1.2 mM $CaCl_2$之 TBS)洗淨。之後，將添加 1mg/mL 胰蛋白酶 0.5mL 後之磁珠於室溫懸濁 15 分鐘後，立即使用磁性架台將磁珠分離，回收噬菌體溶液。將回收之噬菌體添加於對數增殖期(OD600 爲 0.4-0.7)之 10 mL 大腸菌株 ER2738。藉由於 37℃緩慢地進行上述大腸菌之攪拌培養 1 小時，使噬菌體感染大腸菌。將經感染之大腸菌播種於 225 mm x 225 mm 之盤。接著，藉由自經播種之大腸菌培養液中回收噬菌體，來調製噬菌體庫液。

第 2 次以後之篩選中，係以 Ca 依存性結合能力爲指標來進行噬菌體濃縮。具體而言，係與第 1 次之篩選同樣地進行阻斷，藉由於經調製之噬菌體庫液中添加 40 pmol 之生物素標誌抗原，使噬菌體庫於室溫與抗原接觸 60 分鐘。BSA 或添加經 SkimMilk 阻斷之磁珠，將抗原與噬菌體之複合體與磁珠在室溫結合 15 分鐘。磁珠係以 1 mL 之 1.2 mM $CaCl_2$/TBST 與 1.2 mM $CaCl_2$/TBS 洗淨。之後，將經添加 0.1 mL 之 2 mM EDTA/TBS(含有 2 mM 之 EDTA 的

TBS)之磁珠於室溫懸濁後，立即使用磁性架台將磁珠分離，回收噬菌體溶液。藉由於回收之噬菌體溶液中添加100 mg/mL之胰蛋白酶 5μL，不展現 Fab 之噬菌體的 pIII 蛋白質(來自輔助噬菌體之 pIII 蛋白質)被切斷，使不展現 Fab 之噬菌體對大腸菌之感染能力喪失。將回收之噬菌體添加於對數增殖期(OD600 爲 0.4-0.7)之 10 mL 大腸菌株 ER2738。藉由於 37℃緩慢地進行上述大腸菌之攪拌培養 1 小時，使噬菌體感染大腸菌。經感染之大腸菌係播種於 225 mm x 225 mm 之盤。接著，藉由自經播種之大腸菌培養液中回收噬菌體，回收噬菌體庫液。

(24-3)Phage ELISA 之 GPC3 結合抗體的篩選

由經上述方法實施之第 2 次及第 3 次篩選後所得的大腸菌單一菌落中，遵照一般方法(Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145)進行噬菌體培養，回收含有噬菌體之培養上清液。

將添加 BSA 及 $CaCl_2$ 成爲終濃度 4%BSA 及 1.2 mM 鈣離子濃度之含有噬菌體的培養上清液依以下順序供 ELISA。將 StreptaWell 96 微量孔盤(Roche)以含有生物素標誌抗原之 100μL PBS 被覆一晚。將該盤之各孔以 PBST(含有 0.1% Tween20 之 PBS)洗淨藉以去除抗原後，將該孔以 4% BSA-TBS 250μL 阻斷 1 小時以上。將於去除 4% BSA-TBS 之各孔中添加有所調製之培養上清液的該盤於 37℃靜置 1 小時，藉以使展現噬菌體之抗體與存在於各

孔之抗原結合。於經 1.2 mM $CaCl_2$/TBST 洗淨之各孔中添加 1.2 mM $CaCl_2$/TBS 或 1 mM EDTA/TBS，該盤係在 37℃靜置 30 分鐘培養。以 1.2 mM $CaCl_2$/TBST 洗淨後，將經添加以 4% BSA 及離子化鈣濃度 1.2 mM 之 TBS 稀釋之 HRP 結合抗 M13 抗體(Amersham Pharmacia Biotech)至各孔的盤培養 1 小時。以 1.2 mM $CaCl_2$/TBST 洗淨後、將經添加 TMB single 溶液(ZYMED)之各孔中溶液之發色反應藉由添加硫酸以停止後、以 450 nm 吸光度來測定該發色。

上述噬菌體 ELISA 之結果，以判斷爲具有 Ca 依存性的對抗原之結合能力之抗體片段作爲模板，解析藉由特異引子放大之基因的鹼基序列。

(24-4)與人類 GPC3 結合之抗體之表現與純化

噬菌體 ELISA 之結果，將判斷爲具有 Ca 依存性地對抗原的結合能力之 4 抗體、CSCM-01_005(重鏈序列：110、輕鏈序列：111)、CSCM-01_009(重鏈序列：112、輕鏈序列：113)、CSCM-01_015(重鏈序列：114、輕鏈序列：115)、及 CSCM-01_023(重鏈序列：116、輕鏈序列：117)以及作爲控制組的抗人類 GPC3 抗體之 GC-IgG1(重鏈序列：118、輕鏈序列：119)分別插入動物細胞表現用質體。使用以下方法表現抗體。將懸濁於 FreeStyle 293 Expression Medium 培養基(Invitrogen)之來自人類胎兒腎細胞之 FreeStyle 293-F 株(Invitrogen)以 1.33×10^6 個

/mL 之細胞密度對 6 孔盤之各孔各播種 3 mL。經調製之質體係藉由脂質體轉染法導入細胞。於 CO_2 培養器(37℃、8%CO_2, 90 rpm)進行 4 日培養。使用 rProtein A SepharoseTM Fast Flow(Amersham Biosciences)，使用所屬技術領域中具有通常知識者公知之方法，由上述所得之培養上清液中純化抗體。使用分光光度計測定經純化之抗體溶液在 280 nm 之吸光度。藉由使用以 PACE 法算出之吸光係數，由所得之測定值算出抗體濃度(Protein Science 1995; 4: 2411-2423)。再者，對於 GC-IgG1 抗體，由恆定地表現 GC-IgG1 抗體之 CHO 細胞培養上清液中以同樣方法純化抗體，算出濃度。

(24-5)所取得之抗體對人類 GPC3 之 Ca 依存性結合能力評估

將取得之抗體依以下順序供 ELISA。將 StreptaWell 96 微量孔盤(Roche)以含有生物素標誌抗原之 100μL PBS 被覆一晚。將該盤之各孔以 ACES buffer(10 mM ACES, 150 mM NaCl, 100 mM $CaCl_2$，0.05% Tween20, pH7.4)洗淨藉以去除抗原後，將該孔以含有 2%BSA 之 ACES Buffer 250μL 阻斷 1 小時以上。於經去除含有 2%BSA 之 ACES Buffer 的各孔中，添加預先進行過由 10μg/mL 起每次稀釋 4 倍之純化 IgG 各 100μL，將該盤靜置一小時，藉以使 IgG 與存在於各孔之抗原結合。於經 ACES Buffer 洗淨之各孔中添加「10 mM ACES，150 mM NaCl, 1.2 mM $CaCl_2$, pH7.4」、「10 mM ACES, 150 mM NaCl, 3μM $CaCl_2$,

pH7.4」、「10 mM ACES, 150 mM NaCl, 1.2 mM $CaCl_2$, pH5.8」或「10 mM ACES, 150 mM NaCl, 3μM $CaCl_2$, pH5.8」，該盤係在 37℃靜置 30 分鐘培養。以 ACES Buffer 洗淨後，將經於各孔中添加藉由含有 2%BSA 之 ACES Buffer 稀釋之 HRP 結合抗人類 IgG 抗體(BIOSOURCE)之盤培養 1 小時。以 ACES Buffer 洗淨後，將經添加 TMB single 溶液(ZYMED)之各孔中溶液之發色反應藉由添加硫酸以停止後、以 450 nm 吸光度來測定該發色。

測定結果如圖 13 所示。GC-IgG1 中，與鈣離子濃度無關地，吸光度相同，相對於此，CSCM-01_005、CSCM-01_009、CSCM-01_015 及 CSCM-01_023，比起 1.2 mM 鈣離子濃度(高鈣離子濃度)之吸光度，3μM 鈣離子濃度(低鈣離子濃度)之吸光度爲顯著地低之結果。由此結果，顯示 CSCM-01_005、CSCM-01_009、CSCM-01_015 及 CSCM-01_023 具有隨著鈣離子濃度不同，與抗原之結合會變化的性質，顯示了對於人類磷脂肌醇聚糖 3 亦可取得鈣依存性抗體。

[實施例 25]pH 依存性地與小鼠 IgA 結合之抗體的取得

(25-1)附加 GC-mIgA 及生物素之小鼠 IgA-Fc 的調製

作爲小鼠 IgA，由以下方式調製附加 GC-mIgA(重鏈序列編號 120、輕鏈序列編號 121)及生物素之小鼠 IgA-Fc(亦稱爲生物素標誌 mIgA-Fc、mIgA_CH2-CH3-Avitag：序列編號 122)。

(25-1-1)GC-mIgA 之調製

將小鼠 IgA 重組體之 GC-mIgA 由如以下方式調製。將編碼 GC-mIgA(重鏈序列編號：120、輕鏈序列編號：121)之基因片段接入動物細胞表現用載體。經構築之質體載體，係使用 293Fectin(Invitrogen)，與表現 EBNA1 之基因一起導入 FreeStyle293(Invitrogen)。之後，將經基因導入之細胞在 37℃、CO_2 8%培養 4 日，使 GC-mIgA 蛋白質分泌於培養上清液中。

將含有 GC-mIgA 之細胞培養液以 0.22μm 瓶頂過濾器過濾，得到培養上清液。於經 20 mM Tris-HCl, pH8.0 平衡化後，將以同溶液稀釋之培養上清液加入 HiTrap Q HP(GE healthcare)，藉由 NaCl 濃度梯度溶出 GC-mIgA。之後，藉由使用了 Superdex200 之凝膠過濾層析經去除結合體之含有 GC-mIgA 之緩衝液取代爲 20 mM His-HCl, 150 mM NaCl, pH6.0，得到純化 GC-mIgA。

(25-1-2)生物素標誌 mIgA-Fc 之調製

爲了將生物素附加於目的蛋白質(小鼠 IgA-Fc)之 C 末端，將編碼藉由生物素連接酶會附加生物素之特異序列(Avitag 序列)之基因片段連結於於編碼小鼠 IgA-Fc 區域之基因片段的下游。將編碼經連結小鼠 IgA 與 Avitag 序列之蛋白質(mIgA_CH2-CH3-Avitag(序列編號：122))之基因片段接入動物細胞表現用載體。所構築之質體載體係使用

293Fectin(Invitrogen)將基因導入 FreeStyle293(Invitrogen)。此時將表現 EBNA1 之基因及表現生物素連接酶(BirA)之基因同時導入，藉由添加生物素來標誌生物素。將遵照前述順序經導入基因之細胞在 37℃、CO_2 8%培養 6 日，使目的蛋白質分泌於培養上清液中。

將含有目的小鼠 IgA-Fc 之細胞培養液以 0.22μm 瓶頂過濾器過濾，得到培養上清液。將以 20 mM Tris-HCl, pH7.4 溶液稀釋之培養上清液加入經同溶液平衡化之 HiTrap Q HP(GE healthcare)，藉由 NaCl 之濃度梯度來溶出目的之小鼠 IgA-Fc。接著，以 50 mM Tris-HCl, pH8.0 平衡化後，由經加入以同溶液稀釋之前述 HiTrap Q HP 溶出液之 SoftLink Avidin column 中，以 5 mMBiotin, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH8.0 溶出目標的小鼠 IgA-Fc。之後，藉由使用了 Superdex200 之凝膠過濾層析將經去除結合體之含有小鼠 IgA-Fc 的緩衝液取代爲 20 mM His-HCl, 150 mM NaCl, pH6.0，得到純化小鼠 IgA-Fc。

(25-2)磁珠篩選之由 His 庫取得 pH 依存性地與抗原結合之抗體片段

由經構築之 pH 依存性地與抗原結合的抗體庫(His 庫 1)之最初選拔，係以對抗原(小鼠 IgA-Fc)之結合能力作爲指標來實施。

由保持構築之噬菌體展示用噬粒之大腸菌中進行噬菌體產生。將於經產生噬菌體之大腸菌培養液中添加 2.5 M

NaCl/10%PEG 而沈澱之噬菌體集團以 TBS 稀釋，藉以得到噬菌體庫液。接著，於噬菌體庫液中添加 Skim Milk 使終濃度成爲 3%SkimMilk，調製經阻斷之噬菌體庫液。篩選方法係參照一般方法之使用了固定化於磁珠之抗原的篩選方法(J. Immunol. Methods. (2008) 332(1-2), 2-9、J. Immunol. Methods.(2001) 247(1-2), 191-203、Biotechnol. Prog.(2002) 18(2) 212-20、Mol. Cell Proteomics(2003) 2(2), 61-9)。磁珠係使用 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated)或 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)。

具體而言，藉由於經調製之噬菌體庫液中添加生物素標誌抗原(生物素標誌 mIgA-Fc)，將該噬菌體庫液於室溫與抗原接觸 60 分鐘。第 1 次篩選中使用 250pmol、第 2 次篩選中使用 40 pmol、第 3 次篩選中使用 10pmol之生物素標誌抗原。添加經 Skim Milk 阻斷之磁珠，使抗原與噬菌體之複合體與磁珠在室溫結合 15 分鐘。磁珠係以 1 mL 之 1.2 mM $CaCl_2$/TBST(含有 1.2 mM $CaCl_2$、0.1% Tween20 之 TBS, pH7.6)與 1 mL 之 1.2 mM $CaCl_2$/TBS(含有 1.2 mM $CaCl_2$之 TBS, pH7.6)洗淨。之後，將添加 1 mg/mL 之胰蛋白酶 0.5 mL 的磁珠於室溫懸濁 15 分鐘後，立即使用磁性架台將磁珠分離，回收噬菌體溶液。將回收之噬菌體添加於對數增殖期(OD600 爲 0.4-0.7)之 10 mL 大腸菌株 ER2738。藉由於 37℃緩慢地進行上述大腸菌之攪拌培養 1 小時，使噬菌體感染大腸菌。將經感染之大腸菌播種於

225 mm x 225 mm之盤。接著，藉由自經播種之大腸菌培養液中回收噬菌體，來調製噬菌體庫液。篩選係合計重複3次。

(25-3)Biacore之小鼠IgA結合抗體的結合能力評估

將由第3次篩選結束後所得之大腸菌中所取得的噬粒中萃取之抗體片段基因插入動物細胞表現用載體。抗體之表現係使用以下方法進行。將來自人類胎兒腎細胞之FreeStyle 293-F株(Invitrogen)懸濁於FreeStyle 293 Expression Medium培養基(Invitrogen)，以2.63 x 10^5細胞/mL之細胞密度對96孔盤之各孔各播種190μL。經調製之質體係藉由脂質體轉染法導入細胞。於CO_2培養器(37℃、8%CO_2)中進行4日培養。

使用藉由上述方法所得之培養上清液，使用BiacoreA100來解析對GC-mIgA之結合能力。於以胺偶合法經固定化適當量之蛋白質A/G(PIERCE)的sensor chip CM5(GE Healthcare)捕捉培養上清液中之抗體。跑動緩衝液係使用20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05%(w/v) Tween20、1.2 mM $CaCl_2$(pH7.4)及20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05%(w/v) Tween20、1.2 mM $CaCl_2$(pH5.8)之2種緩衝液，解析中性區域pH及酸性區域pH之條件中的抗原抗體反應相互作用。GC-mIgA之稀釋亦使用各自的緩衝液，藉由以流速10μL/min注入60秒，與捕捉於感應晶片上之抗體相互作用。之後，藉由將10 mM Glycine-HCl (pH1.5)

以流速 30μL/min 注入 30 秒，使感應晶片再生。測定全部在 25℃實施。

上述 Biacore 之結合評估結果，作爲被判斷對 GC-mIgA 具有 pH 依存性結合能力之抗體，得到了 mIAP1B3-3_#024 (重鏈序列編號：123、輕鏈序列編號：124)、mIAP1B3-3_#130 (重鏈序列編號：125、輕鏈序列編號：126)、mIAP1B3-3_#230 (重鏈序列編號：127、輕鏈序列編號：128)。該等抗體之 pH7.4 及 pH5.8 之表面電漿共振感應圖(sensorgram)如圖 14 所示。藉由使緩衝液中之 pH 由 pH7.4 變爲 pH5.8，觀察到對小鼠 IgA 的結合能力降低。

對該等抗體，由用於表現之動物細胞表現用載體解析抗體基因之鹼基序列。

實施例 3 中由 His 庫 1 取得對於 IL-6R 而言 pH 依存性地與抗原(IL-6R)相互作用會變化的抗體，但明顯得知 pH 依存性地與抗原結合之抗體，不僅由 IL6R，由小鼠 IgA 亦可取得。

[實施例 26]pH 依存性地與人類 HMGB1 結合之抗體的取得

(26-1)人類 HMGB1 及附加生物素之人類 HMGB1 的調製

由如以下的方式來調製人類 HMGB1(序列編號：129)、及附加生物素之人類 HMGB1-Avi(亦稱爲生物素標誌 hHMGB1、hHMGB1-Avitag：序列編號 130)。

(26-1-1)人類 HMGB1 之調製

人類 HMGB1 之重組體的 hHMGB1 係由以下方式調製。將編碼 hHMGB1(序列編號：129)之基因片段接入動物細胞表現用載體。將構築之質體載體使用 293Fectin (Invitrogen)，與表現 EBNA1 之基因一起導入 FreeStyle293 (Invitrogen)。之後，將經基因導入之細胞在 37℃、CO_2 8%培養，使 hHMGB1 蛋白質分泌於培養上清液中。以 PBS 平衡化之後，將所得培養上清液加入 HiTrap SP Sepharose HP(GE Healthcare 社)，以 PBS 洗淨後，藉由氯化鈉之直線濃度梯度使吸附於管柱之蛋白質溶出。以 20 mM Histidine-HCl, pH5.0 平衡化之後，加入以同緩衝液稀釋爲 3 倍之包含前述 hHMGB1 的溶出部分。將吸附於管柱之蛋白質藉由氯化鈉之直線濃度梯度由經同緩衝液洗淨之管柱中溶出。將經超微過濾膜濃縮之含有 hHMGB1 部分，加入經 300 mM NaCl, 20 mM 組胺酸, pH6.0 平衡化之 Superdex200 管柱(GE Healthcare 公司)。藉由以同緩衝液分離而得到 hHMGB1 純化部分。

(26-1-2)生物素標誌人類 HMGB1 之調製

爲了將生物素附加於目的蛋白質(人類 HMGB1)之 C 末端，將編碼藉由生物素連接酶會附加生物素之特異序列(Avitag 序列)之基因片段連結於於編碼人類 HMGB1 區域之基因片段的下游。將編碼經連結人類 HMGB1 與 Avitag 序列之蛋白質(hHMGB1-Avitag(序列編號：130))之基因片段接入動物細胞表現用載體。所構築之質體載體係使用

293Fectin(Invitrogen)將基因導入 FreeStyle293 (Invitrogen)。此時將表現 EBNA1 之基因及表現生物素連接酶(BirA)之基因同時導入，藉由添加生物素來標誌生物素。將遵照前述順序經導入基因之細胞在 37℃、CO_2 8%培養，使目的蛋白質分泌於培養上清液中。

經 PBS 平衡化之後，將前述所得培養上清液加入 HiTrap SP Sepharose HP(GE Healthcare 公司)，以 PBS 洗淨後，藉由氯化鈉之直線濃度梯度使吸附於管柱之蛋白質溶出。將經 100 mM Tris-HCl, pH7.4 稀釋爲 2 倍之含有 HMGB1-Avi 的部分，加入經 TBS 平衡化之 SoftLink Soft Release Avidin Resin 管柱(Promega 公司)。將吸附於管柱之蛋白質以含有 5 mMBiotin 之 TBS(pH8.0)由經 TBS 洗淨之管柱中溶出。將經超微過濾膜濃縮之含有 HMGB1-Avi 的部分，加入經 300 mM NaCl, 20 mM 組胺酸，pH6.0 平衡化之 Superdex200 管柱(GE Healthcare 公司)。藉由以同緩衝液分離，得到 Biotin 化之 HMGB1-Avi 純化部分。

(26-2)磁珠篩選之由 His 庫取得 pH 依存性地與抗原結合之抗體片段

由構築之 pH 依存性地與抗原結合之抗體庫(His 庫 1)的最初選拔，係以對抗原(人類 HMGB1)之結合能力作爲指標來實施。

由保持構築之噬菌體展示用噬粒之大腸菌中進行噬菌體產生。藉由將經於進行過噬菌體產生之大腸菌培養液中

添加 2.5 M NaCl/10%PEG 而沈澱之噬菌體集團以 TBS 稀釋，以得到噬菌體庫液。藉由於噬菌體庫液中添加 BSA、及 $CaCl_2$，成爲終濃度 4% BSA、1.2mM 鈣離子，以調製經阻斷之噬菌體庫液。作爲篩選方法，係參照使用了一般方法之固定化於磁珠之抗原的篩選方法(J. Immunol. Methods. (2008) 332(1-2), 2-9、J. Immunol. Methods.(2001) 247(1-2), 191-203、Biotechnol. Prog.(2002) 18(2)212-20、Mol. Cell Proteomics(2003) 2(2), 61-9)。磁珠係使用 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) 或 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)。

具體而言，藉由於經調製之噬菌體庫液中添加 250 pmol 之生物素標誌抗原(生物素標誌 hHMGB1)，將該噬菌體庫液於室溫與抗原接觸 60 分鐘。添加經 BSA 阻斷之磁珠，使抗原與噬菌體之複合體與磁珠在室溫結合 15 分鐘。磁珠係以 1mL 之 1.2 mM $CaCl_2$/TBST(50mM Tris, 300mM NaCl, 1.2 mM $CaCl_2$、0.1% Tween20, pH7.6)與 1 mL 之 1.2 mM $CaCl_2$/TBS(50mM Tris, 300mM NaCl, 1.2 mM $CaCl_2$, pH7.6)洗淨。之後，將添加 1 mg/mL 之胰蛋白酶 0.5 mL 的磁珠於室溫懸濁 15 分鐘後，立即使用磁性架台將磁珠分離，回收噬菌體溶液。將回收之噬菌體添加於對數增殖期(OD600 爲 0.4-0.7)之 10 mL 大腸菌株 ER2738。藉由於 37℃緩慢地進行上述大腸菌之攪拌培養 1 小時，使噬菌體感染大腸菌。將經感染之大腸菌播種於 225 mm x

225 mm 之盤。接著，藉由自經播種之大腸菌培養液中回收噬菌體，來調製噬菌體庫液。

第 2 次以後之篩選中，係以抗原結合能力或 pH 依存性結合能力爲指標來進行噬菌體濃縮。具體而言，藉由於經調製之噬菌體庫液中添加 40 pmol 之生物素標誌抗原，使噬菌體庫於室溫與抗原接觸 60 分鐘。添加經 BSA 阻斷之磁珠，將抗原與噬菌體之複合體與磁珠在室溫結合 15 分鐘。磁珠係以 1 mL 之 1.2 mM $CaCl_2$/TBST 與 1.2 mM $CaCl_2$/TBS 洗淨複數次。之後以抗原結合能力作爲指標來濃縮的情況時，係將經添加 1mg/mL 之胰蛋白酶 0.5 mL 的磁珠在室溫懸濁 15 分鐘後，立即使用磁性架台將磁珠分離，回收噬菌體溶液。以 pH 依存性抗原結合能力爲指標而濃縮時，於 Round2 係添加 0.4 mL、於 Round3 以後係添加 0.1 mL 之 50 mM MES/1.2 mM $CaCl_2$/150 mM NaCl (pH5.5)，將磁珠在室溫懸濁後，使用磁性架台將磁珠分離。於回收之噬菌體溶液中，在 Round2 添加 20μL、在 Round3 以後係添加 5μL 之 100 mg/mL 之胰蛋白酶，藉以使不展現 Fab 之噬菌體的 pIII 蛋白質(來自輔助噬菌體之 pIII 蛋白質)被切斷，使不展現 Fab 之噬菌體對大腸菌之感染能力喪失。將回收之噬菌體添加於對數增殖期(OD600 爲 0.4-0.7)之 10 mL 大腸菌株 ER2738。藉由於 37℃緩慢地進行上述大腸菌之攪拌培養 1 小時，使噬菌體感染大腸菌。經感染之大腸菌係播種於 225 mm x 225 mm 之盤。接著，藉由自經播種之大腸菌培養液中回收噬菌體，回收噬

菌體庫液。以抗原結合能力或 pH 依存性結合能力爲指標的篩選係重複 3 次。

(26-3)Phage ELISA 之人類 HMGB1 結合抗體的篩選

由於(26-2)實施之第 3 次、第 4 次篩選後所得之大腸菌單一菌落，遵照一般方法(Methods Mol. Biol.(2002)178, 133-145)進行噬菌體培養，回收含有噬菌體之培養上清液。添加 BSA 及 $CaCl_2$ 使成爲終濃度 4%BSA 及 1.2 mM 鈣離子濃度之含有噬菌體的培養上清液係依以下順序供 ELISA。將 StreptaWell 96 微量孔盤(Roche)以含有生物素標誌 hHMGB1 之 100μL 的 PBS 被覆 4 小時以上。將該盤之各孔以 PBST 洗淨藉以去除抗原後，將該孔以 250μL 之 4%BSA-TBS(50mM Tris, 300mM NaCl, 2.5mM $CaCl_2$, 4% BSA)阻斷 1 小時以上。將於去除 4% BSA-TBS 之各孔中添加有所調製之培養上清液的該盤於 37℃靜置 1 小時，藉以使展現噬菌體之抗體與存在於各孔之 HMGB1 結合。在經 1.2 mM $CaCl_2$/TBST(pH7.6)洗淨之各孔中，添加 1.2 mM $CaCl_2$/TBS(pH7.6)或 1.2 mM $CaCl_2$/150 mM NaCl/50 mM MES(pH5.5)，該盤係在 37℃靜置 30 分鐘培養。以 1.2 mM $CaCl_2$/TBST(pH7.6)洗淨後，將經添加藉由 4%BSA-TBS 稀釋之 HRP 結合抗 M13 抗體(Amersham Pharmacia Biotech)於各孔的盤培養 1 小時。以 1.2 mM $CaCl_2$/TBST (pH7.6)洗淨後，使經添加 TMB single 溶液(invitrogen)之各孔中的溶液之發色反應藉由添加硫酸停止後，以 450 nm 吸光

度來測定該發色。

上述噬菌體 ELISA 之結果，解析判斷爲隨著 pH 不同，對人類 HMGB1 之結合能力會變化的殖株中所含之體片段基因的鹼基序列。

(26-4)與人類 HMGB1 結合之抗體的表現與純化

噬菌體 ELISA 之結果，將判斷爲具有 pH 依存性地對抗原之結合能力的 3 抗體、HM_3_2_R_017(重鏈序列編號：131、輕鏈序列編號：132)、HM_3_2_R_054(重鏈序列編號：133、輕鏈序列編號：134)、及 HM_4_1_R_001(重鏈序列編號：135、輕鏈序列編號：136)分別插入動物細胞表現用質體。抗體係使用以下方法來表現。將懸濁於 FreeStyle 293 Expression Medium 培養基(Invitrogen)之來自人類胎兒腎細胞之 FreeStyle 293-F 株(Invitrogen)以 1.33×10^6 個 /mL 之細胞密度對 6 孔盤之各孔各播種 3 mL。經調製之質體係藉由脂質體轉染法導入細胞。於 CO_2 培養器(37℃、8%CO_2, 90 rpm)中進行 4 日培養。使用 rProtein A Sepharose™ Fast Flow(Amersham Biosciences)，使用所屬技術領域中具有通常知識者公知之方法，由上述所得之培養上清液中純化抗體。使用分光光度計測定經純化之抗體溶液在 280 nm 之吸光度。藉由使用以 PACE 法算出之吸光係數，由所得之測定值算出抗體濃度(Protein Science 1995; 4: 2411-2423)。

(26-5)所取得之抗體對人類 HMGB1 之 pH 依存性結合能力評估

爲了判斷(26-4)中取得之抗體 HM_3_2_R_017(重鏈序列編號：131、輕鏈序列編號：132)、HM_3_2_R_054(重鏈序列編號：133、輕鏈序列編號：134)、及 HM_4_1_R_001(重鏈序列編號：135、輕鏈序列編號：136)對 hHMGB1 的結合活性是否爲 pH 依存性，使用 Biacore T100(GE Healthcare)解析該等抗體與 hHMGB1 之相互作用。作爲中性區域 pH 及酸性區域 pH 之條件，分別在 pH7.4 及 pH5.8 之溶液中解析抗原抗體反應之相互作用。於經胺偶合法固定化適當量之 protein A/G(PIERCE)的 Sensor chip CM4(GE Healthcare)上，分別捕捉目的抗體 200RU 左右。跑動緩衝液係使用 20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05%(w/v) Tween20、1.2 mM $CaCl_2$(pH7.4)或 20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05%(w/v) Tween20、1.2mM $CaCl_2$(pH5.8)之 2 種緩衝液。hHMGB1 之稀釋亦使用各自的緩衝液。測定全部在 25℃實施。

在使用了 HM_3_2_R_017 抗體及 HM_3_2_R_054 抗體及 HM_4_1_R_001 抗體之抗原抗體反應相互作用的解析時，藉由將 hHMGB1 之稀釋液與空白之跑動緩衝液以流速 10μL/min 注入 60 秒，捕捉於感應晶片上。使 hHMGB1 與 HM_3_2_R_017 抗體及 HM_3_2_R_054 抗體及 HM_4_1_R_001 抗體相互作用。之後，藉由將 10 mM Glycine-HCl(pH1.5)以流速 30μL/min 注入 30 秒，使感應晶片再生。

藉由前述方法所測定之 pH7.4, pH5.8 之表面電漿共振

感應圖(sensorgram)係如圖 15 所示。

由前述結果，HM_3_2_R_017 抗體、HM_3_2_R_054 抗體及 HM_4_1_R_001 抗體，藉由將緩衝液中之 pH 由 pH7.4 變爲 pH5.8，觀察到對 hHMGB1 之結合能力降低，顯示對人類 HMGB1 亦可取得 pH 依存性結合抗體。

[參考實施例 1]使用正常小鼠之 Ca 依存性結合抗體對抗原之血漿中滯留性之影響的評估

(1-1)使用正常小鼠之 in vivo 試驗

對正常小鼠(C57BL/6J mouse、Charles River Japan)單獨投與 hsIL-6R(可溶型人類 IL-6 受體：於參考實施例 4 中製造)或同時投與 hsIL-6R 及抗人類 IL-6 受體抗體後，評估 hsIL-6R 及抗人類 IL-6 受體抗體之體內動態。將 hsIL-6R 溶液(5μg/mL)、或、hsIL-6R 與抗人類 IL-6 受體抗體之混合溶液對尾靜脈以 10 mL/kg 單次投與。抗人類 IL-6 受體抗體係使用前述之 H54/L28-IgG1、6RL#9-IgG1、FH4-IgG1。

混合溶液中之 hsIL-6R 濃度全部爲 5μg/mL，但抗人類 IL-6 受體抗體濃度隨著各抗體而不同，H54/L28-IgG1 爲 0.1 mg/mL、6RL#9-IgG1 及 FH4-IgG1 爲 10 mg/mL，此時，相對於 hsIL-6R，抗人類 IL-6 受體抗體存在充分過剩的量，因此可認爲 hsIL-6R 大部分與抗體結合。在投與後 15 分鐘、7 小時、1 日、2 日、4 日、7 日、14 日、21 日、28 日之時點進行採血。將採取之血液立即在 4℃、

12,000 rpm 離心分離 15 分鐘藉以得到血漿。分離之血漿，至實施測定爲止係保存在設定爲-20℃以下之冷凍庫。

(1-2)ELISA 法正常小鼠血漿中之抗人類 IL-6 受體抗體濃度的測定

小鼠血漿中之抗人類 IL-6 受體抗體濃度係以 ELISA 法測定。首先將 Anti-Human IgG(γ-chain specific)F(ab')2 Fragment of Antibody(SIGMA)分注於 Nunc-Immuno Plate, MaxiSoup(Nalge nunc International)，於 4℃靜置 1 晚藉以製成 Anti-Human IgG 固相化盤。作爲血漿中濃度，將 0.64、0.32、0.16、0.08、0.04、0.02、0.01μg/mL 之校準曲線試樣及稀釋 100 倍以上之小鼠血漿測定試樣分別分注至 Anti-Human IgG 固相化盤，於 25℃培養 1 小時。之後使 Biotinylated Anti-human IL-6 R Antibody(R&D)在 25℃反應 1 小時後，使 Streptavidin-PolyHRP80(Stereospecific Detection Technologies)在 25℃反應 0.5 小時。使用 TMB One Component HRP Microwell Substrate(BioFX Laboratories)作爲基質進行發色反應。藉由 1N-Sulfuric acid(Showa Chemical)停止發色反應後，使用微孔盤讀取器測定發色液在 450 nm 之吸光度。使用解析軟體 SOFTmax PRO (Molecular Devices)，以校準曲線之吸光度爲基準來算出小鼠血漿中濃度。用此方法測定之靜脈內投與後正常小鼠中之 H54/L28-IgG1、6RL#9-IgG1、FH4-IgG1 在血漿中之抗體濃度轉變係如圖 16 所示。

(1-3)電化學發光法之血漿中 hsIL-6R 濃度的測定

以電化學發光法測定小鼠之血漿中 hsIL-6R 濃度。將調整爲 2000、1000、500、250、125、62.5、31.25 pg/mL 之 hsIL-6R 校準曲線試樣及稀釋 50 倍以上之小鼠血漿測定試樣、經 SULFO-TAG NHS Ester(Meso Scale Discovery)釕化之 Monoclonal Anti-human IL-6R Antibody(R&D)及 Biotinylated Anti-human IL-6 R Antibody(R&D)及 tocilizumab (重鏈序列編號：24、輕鏈序列編號：25)溶液之混合液在 4℃反應一晚。使樣品中之 Free Ca 濃度降低，使樣品中之大致全部之 hsIL-6R 由 6RL#9-IgG1 或 FH4-IgG1 解離，爲了成爲與添加之 tocilizumab 結合的狀態，此時之 Assay buffer 中含有 10 mMEDTA。之後，將該反應液分注於 MA400 PR Streptavidin Plate(Meso Scale Discovery)。進一步地將經在 25℃反應 1 小時之盤的各孔洗淨後，於各孔中分注 Read Buffer T(×4)(Meso Scale Discovery)。立即使用 SECTOR PR 400 reader(Meso Scale Discovery)測定反應液。hSIL-6R 濃度係由校準曲線之反應，使用解析軟體 SOFTmax PRO(Molecular Devices)算出。經前述方法測定之靜脈內投與後正常小鼠中血漿中之 hsIL-6R 濃度轉變，係如圖 17 所示。

結果，單獨 hsIL-6R 時顯示非常快的消失，相對於此，與 hsIL-6R 不進行 Ca 依存性的結合之通常抗體即 H54/L28-IgG1 同時投與時，hsIL-6R 之消失會大幅延遲。

相對於此，與會與 hsIL-6R 進行 100 倍以上之 Ca 依存性的結合之 6RL#9-IgG1 或 FH4-IgG1 同時投與時，hsIL-6R 之消失係大幅地加速。相較於將 H54/L28-IgG1 同時投與時的情況，將 6RL#9-IgG1 及 FH4-IgG1 同時投與時，一日後血漿中之 hsIL-6R 濃度分別降低 39 倍及 2 倍。由此可確認鈣依存性結合抗體由血漿中可加速抗原的消失。

[參考實施例 2]Ca 依存性抗原結合抗體之抗原消失加速效果的提高探討(抗體製造)

(2-1)關於 IgG 抗體對 FcRn 之結合

IgG 抗體藉由與 FcRn 結合，而具有長的血漿中滯留性。IgG 與 FcRn 之結合僅在酸性條件下(pH6.0)被觀察到，於中性條件下(pH7.4)幾乎觀察不到其結合。IgG 抗體係非特異性地被攝入細胞，但在內體內之酸性條件下藉由與內體內之 FcRn 結合，回到細胞表面上，在血漿中之中性條件下會由 FcRn 解離。於 IgG 之 Fc 區域導入變異，使酸性條件下對 FcRn 之結合喪失時，會變得不自內體內回收到血漿中，因此抗體之血漿中滯留性顯著地受損。

作爲改善 IgG 抗體之血漿中滯留性的方法，係報導有在酸性條件下使對 FcRn 之結合提高之方法。藉由於 IgG 抗體之 Fc 區域導入胺基酸取代，使酸性條件下對 FcRn 之結合提高，藉以使由內體內至血漿中之 IgG 抗體回收效率上昇。結果，IgG 抗體在血漿中之滯留性會改善。導入胺基酸之取代時重要者，爲不使中性條件下對 FcRn 之結合

提高。中性條件下與 FcRn 結合之 IgG 抗體，即使在內體內之酸性條件下能夠與 FcRn 結合藉以回到細胞表面上，因爲在中性條件下之血漿中，IgG 抗體不由 FcRn 解離，不回收到血漿中，因此 IgG 抗體在血漿中滯留性反而受損。

例如，如 Dall' Acqua 等人(J. Immunol.(2002) 169(9), 5171-5180)所記載，報導了對小鼠投與之藉由導入胺基酸取代而在中性條件下(pH7.4)觀察到對小鼠 FcRn 之結合的 IgG1 抗體在血漿中滯留性會惡化。又，如 Yeung 等人(J. Immunol.(2009) 182(12), 7663-7671)、Datta-Mannan 等人(J. Biol. Chem.(2007) 282(3), 1709-1717)、Dall' Acqua 等人(J. Immunol.(2002) 169(9), 5171-5180)所記載，藉由導入胺基酸取代，在酸性條件下(pH6.0)對人類 FcRn 之結合提高的 IgG1 抗體改變體，在中性條件下(pH7.4)同時觀察到對人類 FcRn 之結合。有報導對食蟹獼猴投與之該抗體之血漿中滯留性未改善，未觀察到血漿中滯留性之變化。因此，在提高抗體功能之抗體工程技術中，係致力於不使在中性條件下(pH7.4)對人類 FcRn 之結合增加，而使在酸性條件下對人類 FcRn 之結合增加，藉以改善抗體之血漿中滯留性。亦即，至今爲止並未有報導藉由於其 Fc 區域導入胺基酸取代，在中性條件下(pH7.4)對人類 FcRn 之結合會增加之 IgG1 抗體的優點。

Ca 依存性地與抗原結合之抗體，具有使可溶型抗原之消失加速，使一個抗體分子重複複數次地與可溶型抗原

結合之效果，故極爲有用。作爲使此抗原消失加速效果進一步提高的方法，在中性條件下(pH7.4)使對 FcRn 之結合增強之方法被驗證。

(2-2)中性條件下具有對 FcRn 之結合活性之 Ca 依存性的人類 IL-6 受體結合抗體之調製

藉由於具有鈣依存性抗原結合能力之 FH4-IgG1、6RL#9-IgG1、及作爲對照使用之不具有鈣依存性抗原結合能力之 H54/L28-IgG1 的 Fc 區域中導入胺基酸變異，製造於中性條件下(pH7.4)具有對 FcRn 之結合的改變體。胺基酸變異之導入係使用使用了 PCR 之所屬技術領域中具有通常知識者公知方法來進行。具體而言，製造對 IgG1 之重鏈恆定區域，將 EU 編號表示之 434 位之胺基酸之 Asn 以 Trp 取代之 FH4-N434W(重鏈序列編號：94、輕鏈序列編號：81)、6RL#9-N434W(重鏈序列編號：95、輕鏈序列編號：79)與 H54/L28-N434W(重鏈序列編號：96、輕鏈序列編號：83)。使用 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit(Stratagene)，使用所附說明書記載之方法製造插入有編碼其胺基酸經取代之變異體的聚核苷酸之動物細胞表現載體。抗體之表現、純化、濃度測定係根據實施例 15 記載之方法來實施。

[參考實施例 3]使用正常小鼠之 Ca 依存性結合抗體的消失加速效果評估

(3-1)使用了正常小鼠之 in vivo 試驗

對正常小鼠(C57BL/6J mouse、Charles River Japan)評估單獨投與 hsIL-6R(可溶型人類 IL-6 受體：於參考實施例 4 製造)、或同時投與 hsIL-6R 及抗人類 IL-6 受體抗體後之 hsIL-6R 及抗人類 IL-6 受體抗體的體內動態。將 hsIL-6R 溶液(5μg/mL)、或 hsIL-6R 與抗人類 IL-6 受體抗體之混合溶液對尾靜脈以 10 mL/kg 單次投與。抗人類 IL-6 受體抗體係使用上述之 H54/L28-N434W、6RL#9-N434W、FH4-N434W。

混合溶液中之 hsIL-6R 濃度全部爲 5μg/mL，但抗人類 IL-6 受體抗體之濃度隨著抗體而不同，H54/L28-N434W 調製爲 0.042 mg/mL、6RL#9-N434W 調製爲 0.55 mg/mL、FH4-N434W 調製爲 1 mg/mL。此時，相對於 hsIL-6R，抗人類 IL-6 受體抗體存在充分過剩的量，因此可認爲 hsIL-6R 之大部分係與抗體結合。在投與後 15 分鐘、7 小時、1 日、2 日、4 日、7 日、14 日、21 日、28 日之時點進行採血。將採取之血液立即以 4℃、12,000 rpm 離心分離 15 分鐘藉以得到血漿。分離之血漿，到實施測定爲止係保存在設定爲-20℃以下之冷凍庫。

(3-2)ELISA 法之正常小鼠血漿中之抗人類 IL-6 受體抗體濃度的測定

小鼠血漿中之抗人類 IL-6 受體抗體濃度，係以與參考實施例 1 同樣之 ELISA 法來測定。經此方法測定之靜脈

內投與後正常小鼠中 H54/L28-N434W、6RL#9-N434W、FH4-N434W 抗體在血漿中抗體濃度之轉變，係如圖 18 所示。

(3-3)電化學發光法之血漿中 hsIL-6R 濃度測定

小鼠血漿中 hsIL-6R 濃度係以電化學發光法測定。將調製爲 2000、1000、500、250、125、62.5、31.25 pg/mL 之 hsIL-6R 校準曲線試樣及稀釋 50 倍以上之小鼠血漿測定試樣、與經 SULFO-TAG NHS Ester(Meso Scale Discovery)釕化之 Monoclonal Anti-human IL-6R Antibody (R&D)及 Biotinylated Anti-human IL-6 R Antibody(R&D)之混合液在 4℃反應 1 晚。使樣品中之 Free Ca 濃度降低，爲了使樣品中之大致全部之 hsIL-6R 係由 6RL#9-N434W 或 FH4-N434W 解離，使成爲作爲 free 體存在之狀態，此時之 Assay buffer 中含有 10 mMEDTA。之後，將該反應液分注於 MA400 PR Streptavidin Plate(Meso Scale Discovery)。進一步地，經於 25℃反應 1 小時反應之盤的各孔洗淨後，於各孔中分注 Read Buffer T(×4)(Meso Scale Discovery)。立即使用 SECTOR PR 400 reader(Meso Scale Discovery)測定反應液。hSIL-6R 濃度係由校準曲線之回應，使用解析軟體 SOFTmax PRO(Molecular Devices)來算出。以前述方法測定之靜脈內投與後正常小鼠中，血漿中之 hsIL-6R 的濃度轉變係如圖 19 所示。

結果，經同時投與 pH7.4 時具有對 FcRn 之結合活

性，另一方面，不具有對 hsIL-6R 之 Ca 依存性的結合活性之 H54/L28-N434W 抗體時，相較於單獨投與 hsIL-6R 之情況，hsIL-6R 之消失係大幅地延遲。相對於此，同時投與對 hsIL-6R 具有 100 倍以上之 Ca 依存性結合，且 pH7.4 時具有對 FcRn 之結合的 6RL#9-N434W 抗體或 FH4-N434W 抗體時，相較於單獨投與 hsIL-6R 時，hsIL-6R 之消失更爲加速。相較於單獨投與 hsIL-6R 時的情況，同時投與 6RL#9-N434W 抗體或 FH4-N434W 抗體時，投與後一日之血漿中的 hsIL-6R 濃度分別降低 3 倍及 8 倍。結果，確認了藉由對鈣依存性地對抗原結合之抗體賦予在 pH7.4 對 FcRn 之結合活性，抗原由血漿中之消失可進一步加速。

相較於不具有對 hsIL-6R 之 Ca 依存性結合的 H54/L28-IgG1 抗體，對 hsIL-6R 具有 100 倍以上之 Ca 依存性結合活性之 6RL#9-IgG1 抗體或 FH4-IgG1 抗體，確認了會增大 hsIL-6R 消失之效果。對 hsIL-6R 具有 100 倍以上之 Ca 依存性的結合，且具有在 pH7.4 對 FcRn 之結合的 6RL#9-N434W 抗體或 FH4-N434W 抗體，被確認了 hsIL-6R 之消失比起 hsIL-6R 單獨投與更爲加速。該等數據暗示了與 pH 依存性地與抗原結合之抗體同樣地，Ca 依存性地與抗原結合之抗體在內體內會使抗原解離。

[參考實施例 4]可溶型人類 IL-6 受體(hsIL-6R)之調製

抗原之人類 IL-6 受體的重組人類 IL-6 受體係如以下

方式調製。以所屬技術領域中具有通常知識者公知之方法構築 Mullberg 等人(J. Immunol.(1994)152, 4958-4968)所報導之 N 末端側第 1 號至第 357 號之胺基酸序列所構成的可溶型人類 IL-6 受體(以下稱爲 hsIL-6R)之 CHO 恆定表現株。藉由培養該表現株，表現 hsIL-6R。由所得之培養上清液中，藉由 Blue Sepharose 6 FF 管柱層析、凝膠過濾管柱層析來純化 hsIL-6R。將最終步驟中作爲主要波峰而溶出的部分，作爲最終純化品來使用。

[參考實施例 5]NMR 之包含具有鈣離子結合模式結構之人類 hVk1 序列的抗體之鈣離子結合活性評估

(5-1)抗體之表現與純化

純化用於 NMR 測定所表現之包含 LfVk1_Ca 之抗體與包含 LfVk1 之抗體。具體而言，就包含 LfVk1_Ca 之抗體(亦稱爲 LfVk1_Ca 抗體)方面，係將調製爲可分別表現重鏈(序列編號：24)與輕鏈(序列編號：43)之動物表現用質體暫時地導入動物細胞。又，就包含 LfVk1 之抗體(亦稱爲 LfVk1 抗體)方面，係將調製爲可分別表現重鏈(序列編號：24)與輕鏈(序列編號：44)之動物表現用質體暫時地導入動物細胞。以最終細胞密度成爲 1 x 10^6 細胞/mL 的方式，於懸濁於 FreeStyle 293 Expression Medium 培養基(Invitrogen)之 100 mL 來自人類胎兒腎細胞之 FreeStyle 293-F 株(Invitrogen)細胞懸濁液中，添加標誌胺基酸。具體而言，就 Asp/Glu/Gln/Asn 標誌體，係添加將使 L-Aspartic

acid-$^{13}C_4$，^{15}N(10 mg)、L-Glutamic acid-$^{13}C_5$，^{15}N(2.5 mg)、L-Glutamine-$^{13}C_5$，$^{15}N_2$(60 mg)、L-Asparagine-$^{13}C_4$，$^{15}N_2$·H_2O(2.5 mg)、β-chloro-L-alanine(6 mg)懸濁於 10 mL 水的溶液，經 0.22μm 濾膜而過濾的液體。就 Leu 標誌體而言，係添加將使 L-Leucine-^{15}N(30 mg)、β-chloro-L-alanine (6 mg)懸濁於 10 mL 水的溶液，經 0.22μm 濾膜而過濾的液體。藉由脂質體轉染法，將調製之質體導入細胞。經導入質體之細胞係在 CO_2 培養器(37℃、8%CO_2、90 rpm)中進行 5 日培養。使用 rProtein A Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences)，遵照所屬技術領域中具有通常知識者公知之方法，由上述所得之培養上清液中純化抗體。使用分光光度計測定經純化之抗體溶液在 280 nm 之吸光度。使用由 PACE 法算出之吸光係數，由測定值算出抗體濃度(Protein Science(1995)4, 2411-2423)。

(5-2)Fab 片段之調製

使用分子量區分尺寸 30,000MWCO 之超微過濾膜，將各種抗體濃縮至 8.2-11.8 mg/mL。使用 L-Cystein 1 mM、EDTA 2 mM、50 mM 乙酸/125 mM TRIS 緩衝液(pH 6.8)調製稀釋爲 8 mg/mL 之該抗體的試樣。將對各抗體添加 1/240 量之 Papain(Roche Applied Science)且經攪拌之該試樣，在 37℃靜置 1 小時。靜置後，分別添加於在下游縱列聯結有 1 mL 尺寸之蛋白質 A 載劑管柱 HiTrap MabSelect Sure(GE Healthcare)的經 50 mM 乙酸/125 mM TRIS 緩衝

液(pH 6.8)平衡化之結合有 Gly-Gly-Tyr-Arg(Sigma)胜肽的 1 mL 尺寸的 HiTrap NHS-activated HP(GE Healthcare)。藉由上游之 Gly-Gly-Tyr-Arg 胜肽將活性化 Papain 去除，而且以下游之蛋白質 A 載劑管柱將 Fc 片段及未消化抗體去除，藉以得到 Fab 片段之純化部分。爲了防止 Fab 部分所含之不活性 Papain 活化，於 Fab 部分添加半胱胺酸蛋白酶阻礙劑 E64(Sigma)10μM。再者，上述全部的管柱操作均在 20 至 25℃之室溫下實施。

(5-3)LfVk1_Ca 抗體及 LfVk1 抗體之 Fab 片段之 NMR 試樣調製

將抗體溶液使用 MWCO 5000 之超微過濾器 Vivaspin (Sartorius)藉由離心濃縮至 0.5 mL。接著於上述超微過濾器設置濾洗杯，將緩衝液取代爲 NMR 用緩衝液：5 mM d-BisTris, 20 mM NaCl, 0.001 %(w/v) NaN_3, 5%(v/v) ^2H_2O, pH 7.0(使用 NaOH、HCl 調整 pH)(重複 3 次於濾洗杯中加入上述緩衝液 5 mL，且離心濃縮至 0.5 mL)，最後濃縮至 0.25 mL。最後，以 NMR 緩衝液潤洗超微過濾器，與濃縮液合併，使 LfVk1_Ca 抗體溶液成爲 420μL、LfVk1 抗體溶液成爲 270μL。於此階段再度確認 pH，依照需要藉由 NaOH、HCl 調整爲 pH 7.0。使用 UV 測定器 Nanodrop (Thermo Fisher Scientific)，測定 280 nm 之吸光度，使 280 nm 之莫耳吸光係數爲 70000 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$ 來定量 Fab 片段。使 Leu 標誌 LfVk1_Ca 抗體、Leu 標誌 LfVk1 抗體成

爲 0.12 mM；使 Asp、Glu、Asn、Gln 標誌 LfVk1_Ca 抗體、Asp、Glu、Asn、Gln 標誌 LfVk1 抗體成爲 0.24 mM。該等之試樣內，使用巴斯德吸管，對於 LfVk1_Ca 抗體而言係填充於直徑 5 mm 之 NMR 試樣管(shigemi)中、對於 LfVk1 抗體而言係填充於直徑 5 mm 之水溶液用對稱形微試樣管(shigemi)中。在 LfVk1_Ca 抗體之 Ca^{2+}滴定實驗中，依次添加 $CaCl_2$ 溶液於抗體溶液中，使得相對於抗體而言，Ca^{2+}成爲 1、2、5、10、20 莫耳當量。添加所用之 $CaCl_2$ 溶液，係準備了溶解於 NMR 緩衝液之 10、20、50、100 mM $CaCl_2$溶液。藉由使注射器部分比習知品更延長之特注微注射器(ITO)，以添加容量爲 3-10μL 的範圍之方式，將 $CaCl_2$ 溶液之必要量直接添加於填充於 NMR 試樣管之抗體溶液中，藉由旋渦混合器攪拌試樣管後，藉由手動離心器(Shimadzu)離心分離。

(5-3)用於觀測 LfVk1_Ca 抗體及 LfVk1_Ca 抗體之 Fab 片段的醯胺基訊息之 NMR 測定

NMR 測定係使用設置有 TCI CryoProbe 之 NMR 分光器 DRX750(Bruker Biospin)。將設定溫度設爲 307K(GasFlow 535 L/h)。用於觀測醯胺基訊息之 NMR 測定，係使用 ^{1}H-^{15}N HSQC。測定法係使用於 ^{15}N 進化期間(evolution period)將 α 碳與羰基碳同時 ^{13}C 去偶合、及伴隨使用用於消除溶劑水訊息之 3-9-19 脈衝群(pulse train)的 ^{1}H-^{15}N FHSQC，控制其之控制脈衝程式係使用製造商(Bruker

Biospin)訂爲標準所準備者。NMR 之測定條件如以下所示。光譜寬度：12019Hz(f2), 1976 Hz(f1)、數據點數：2048(f2), 128(f1)。數據處理係使用 Topspin 3.0(Bruker Biospin)。數據處理條件如以下所示。f2、f1 一起作爲窗函數乘上 shifted Sine(QSINE)，以成爲 2 倍數據點數的方式進行補零(zero filling)後，進行傅立葉轉換。訊息之化學位移係使用 NMR 解析軟體 Sparky(UCSF)算出。

(5-4)主鏈醯胺基之 NMR 訊息的設算

至今爲止 tocilizumab(重鏈序列編號：24、輕鏈序列編號：25)Fab 片段之主鏈醯胺基的 NMR 訊息中，80%已被設算(數據未公開)。LfVk1_Ca 抗體之 Fab 片段的胺基酸序列，除了輕鏈 CDR1、CDR2、CDR3 之一部分，及輕鏈 73、83 號胺基酸殘基以外，tocilizumab 與 Fab 片段之胺基酸序列係爲相同。對兩抗體中胺基酸序列相同的部分，其 NMR 訊息具有相同之化學位移，或該等化學位移接近，故可沿用 tocilizumab 設算資訊。關於 Leu 標誌試樣，輕鏈 11、(33)、(46)、(47)、(54)、(78)、125、135、136、154、175、179、181、201；重鏈 18、46、64、71、81、83、114、144、147、165、176、181、184、195 可沿用設算。上述之未附有括弧之編號係爲與 tocilizumab 相同之化學位移，可沿用設算之殘基編號，附有括弧之編號，係具有與 tocilizumab 接近之化學位移，此外並無具有接近之化學位移的訊息，因此爲能夠設算之殘基編號。

另一方面，對於 Asp、Glu、Asn、Gln 標誌試樣，比較 LfVk1_Ca 抗體與 LfVk1 抗體之光譜，於 LfVk1_Ca 新觀測到 4 個訊息。此可分類爲於此兩抗體間，Asp、Glu、Asn、Gln 殘基之內，作爲 Ca^{2+}結合模式結構而導入之序列相異的輕鏈 Asp30、31、32、92、Glu50 之 5 殘基當中任 4 殘基所由來。

(5-5)Ca^{2+}之在 LfVk1_Ca 抗體上之結合部位鑑定

比較 LfVk1_Ca 抗體之 Fab 片段的 Ca^{2+}未添加狀態、與添加 20 莫耳當量之 ^{1}H-^{15}N HSQC 光譜，萃取化學位移有變化之訊息。結果，由 Leu 標誌試樣可知輕鏈 Leu33 係與結合相關聯，此外之 Leu 殘基與結合無關。又，由 Asp、Glu、Asn、Gln 標誌試樣，可知輕鏈 Asp30、31、32、92、Glu50 之 5 殘基當中的任意 4 殘基係與結合相關聯，此外之 Asp、Glu、Asn、Gln 殘基當中除了 1 殘基之外，全部與結合無關。由以上所述，可知作爲 Ca^{2+}結合模式結構而導入之胺基酸序列當中，至少輕鏈 CDR1、此外輕鏈 CDR2、CDR3 之兩者或任一者之胺基酸係與 Ca^{2+}結合相關聯。此係與實施例 15 中所確認之 30 位、31 位、32 位、50 位及 92 位(Kabat 編號)當中之 4 個爲 hVk5-2 序列之胺基酸此一條件對鈣離子之結合很重要之結果一致。

(5-6)算出滴定實驗中之 Ca^{2+}解離常數

利用了 Ca^{2+}濃度相對於 LfVk1_Ca 抗體之 Fab 片段爲

0、1、2、5、10、20 莫耳當量時之 ^{1}H-^{15}N HSQC 光譜。以作爲結合部位而被鑑定之輕鏈 Leu33 訊息之 ^{1}H 或 ^{15}N 化學位移爲縱軸、以上述 Ca^{2+}之莫耳當量爲橫軸來作圖，使用製圖軟體 Gnuplot 來進行以下之式 2 所示之函數擬合。

[式 2]

$$f(x)=s\times[1-0.5/a\times\{(a\times x+a+Kd)-((a\times x+a+Kd)^{2}-4\times x\times a^{2})^{0.5}\}+t\times[0.5/a\times\{(a\times x+a+Kd)-((a\times x+a+Kd)^{2}-4\times x\times a^{2})^{0.5}\}$$

式 2 表示之函數中，s、t 分別顯示 Ca^{2+}非結合時之化學位移[ppm]、Ca^{2+}飽和結合時之推測化學位移[ppm]；a 顯示抗體 Fab 片段濃度[M]；Kd 顯示解離常數；x 顯示對抗體 Fab 片段所添加之 Ca^{2+}的莫耳當量。擬合時，係以 s，t，Kd 爲擬合參數。結果，由 ^{1}H 化學位移，估計 $Kd=7.1\times10^{-5}$[M]、由 ^{15}N 化學位移，估計 $Kd=5.9\times10^{-5}$[M]。

【圖式簡單說明】

[圖 1]顯示由經導入 pH 依存性地與抗原結合之抗體基因庫之大腸菌中單離之 132 殖株序列資訊的胺基酸之分布(表示爲 Library)與經設計之胺基酸分布(表示爲 Design)的關係之圖。橫軸表示以 Kabat 編號表示之胺基酸的部位。縱軸表示胺基酸之分布的比例。

[圖 2]顯示抗 IL-6R 抗體(tocilizumab)、6RpH#01 抗體、6RpH#02 抗體及 6RpH#03 抗體在 pH7.4 之表面電漿共振感應圖(sensorgram)。橫軸表示時間、縱軸表示 RU 值。

[圖 3]顯示抗 IL-6R 抗體(tocilizumab)、6RpH#01 抗體、6RpH#02 抗體及 6RpH#03 抗體在 pH6.0 之表面電漿共振感應圖(sensorgram)。橫軸表示時間、縱軸表示 RU 值。

[圖 4A]顯示 pH 依存性結合抗體在血漿中(pH7.4)與內體內(pH6.0)對抗原之相互作用的樣式之圖。

[圖 4B]顯示鈣依存性結合抗體在血漿中(Ca^{2+} 2mM)與內體內(Ca^{2+} 3μM)對抗原的相互作用樣式之圖。

[圖 4C]顯示 pH 及鈣依存性結合抗體在血漿中(Ca^{2+} 2mM)與內體內(Ca^{2+} 3μM)對抗原之相互作用的樣式之圖。

[圖 5]爲包含人類 Vk5-2 序列之抗體、與包含人類 Vk5-2 序列中之糖鏈附加序列被改變之 h Vk5-2_L65 序列之抗體的離子交換層析圖。實線表示包含人類 Vk5-2 序列之抗體(重鏈：CIM_H、序列編號：4 及輕鏈：hVk5-2、序列編號：1 與序列編號：26 融合者)之層析圖、虛線表示具有 hVk5-2_L65 序列之抗體(重鏈：CIM_H(序列編號：4)、輕鏈：hVk5-2_L65(序列編號：5))之層析圖。

[圖 6]爲包含 LfVk1_Ca 序列之抗體(重鏈：GC_H、序列編號：48 及輕鏈：LfVk1_Ca、序列編號：43)、與包含 LfVk1_Ca 序列中之 Asp(D)殘基被改變爲 Ala(A)殘基之序列的抗體在 5℃保存後(實線)或 50℃保存後(點線)之離子交換層析圖。將各自在 5℃保存後之離子交換層析圖中最高

之波峰作爲主要波峰(main peak)，以主要波峰進行 y 軸標準化後之圖。

[圖 7]爲包含 LfVk1_Ca 序列之抗體(重鏈：GC_H、序列編號：48 及輕鏈：LfVk1_Ca、序列編號：43)、與包含 LfVk1_Ca 序列中之 30 位(Kabat 編號)Asp(D)殘基被改變爲 Ser(S)殘基之 LfVk1_Ca6 序列(重鏈：GC_H、序列編號：48 及輕鏈：LfVk1_Ca6、序列編號：49)的抗體在 5℃保存後(實線)或 50℃保存後(點線)之離子交換層析圖。將各自在 5℃保存後之離子交換層析圖中最高之波峰作爲主要波峰，以主要波峰進行 y 軸標準化後之圖。

[圖 8]爲顯示由經導入 Ca 依存性地與抗原結合之抗體基因庫之大腸菌中單離的 290 殖株之序列資訊的胺基酸分布(表示爲 Library)與經設計之胺基酸分布(表示爲 Design)之關係圖。橫軸爲以 Kabat 編號表示之胺基酸部位。縱軸表示胺基酸分布之比例。

[圖 9]爲表示在高鈣離子濃度之條件(1.2 mM)下的抗 IL-6R 抗體(tocilizumab)、6RC1IgG_010 抗體、6RC1IgG_012 抗體及 6RC1IgG_019 抗體之表面電漿共振感應圖(sensorgram)。橫軸顯示時間、縱軸顯示 RU 值。

[圖 10]表示在低鈣離子濃度之條件(3μM)下的抗 IL-6R 抗體(tocilizumab)、6RC1IgG_010 抗體、6RC1IgG_012 抗體及 6RC1IgG_019 抗體之表面電漿共振感應圖(sensorgram)。橫軸顯示時間、縱軸顯示 RU 值。

[圖 11]表示於 X 射線結晶構造解析中決定之 6RL#9

抗體 Fab 片段的重鏈 CDR3 構造。(i)爲顯示於存在鈣離子之結晶化條件中得到之結晶構造之重鏈 CDR3 的圖、(ii)爲顯示於不存在鈣離子之結晶化條件中得到之結晶構造之重鏈 CDR3 的圖。

[圖 12]爲顯示使用了 Biacore 之抗人類 IgA 抗體在 Ca^{2+}1.2 mM 及 Ca^{2+} 3μM 下對人類 IgA 之相互作用的表面電漿共振感應圖(sensorgram)的圖。

[圖 13]爲顯示使用了 ELISA 法之抗人類磷脂肌醇聚糖 3(GPC3)抗體在 Ca^{2+}1.2 mM 及 Ca^{2+} 3μM 下對重組人類磷脂肌醇聚糖 3 之相互作用的圖。

[圖 14]爲顯示使用了 Biacore 之抗小鼠 IgA 抗體在 pH7.4 及 pH5.8 下對小鼠 IgA 之相互作用的表面電漿共振感應圖(sensorgram)之圖。實線表示 pH7.4、虛線表示 pH5.8 之條件。

[圖 15]爲顯示使用了 Biacore 之抗人類 HMGB1 抗體在 pH7.4 及 pH5.8 下對人類 HMGB1 之相互作用的表面電漿共振感應圖(sensorgram)之圖。實線表示 pH7.4、虛線表示 pH5.8 之條件。

[圖 16]爲顯示 H54/L28-IgG1 抗體、FH4-IgG1 抗體、及 6RL#9-IgG1 抗體在正常小鼠血漿中之抗體濃度轉變的圖。

[圖 17]爲顯示經投與 H54/L28-IgG1 抗體、FH4-IgG1 抗體、及、6RL#9-IgG1 抗體之正常小鼠血漿中的可溶型人類 IL-6 受體(hsIL-6R)濃度轉變之圖。

[圖 18]為顯示 H54/L28-N434W 抗體、FH4-N434W 抗體、及、6RL#9-N434W 抗體在正常小鼠血漿中之抗體濃度轉變的圖。

[圖 19]為顯示經投與 H54/L28-N434W 抗體、FH4-N434W 抗體、及、6RL#9-N434W 抗體在正常小鼠血漿中之可溶型人類 IL-6 受體(hsIL-6R)濃度轉變之圖。

序列表

<110> 中外製藥股份有限公司
<120> 離子濃度依存性結合分子庫
<130> PCG-9036WO
<150> JP 2011-218006
<151> 2011-09-30
<150> JP 2012-123479
<151> 2012-05-30
<160> 136
<170> PatentIn version 3.1
<210> 1
<211> 107
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 1

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

<210> 2
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 2

Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Thr Pro Gly
1 5 10 15
Asp Lys Val Asn Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Asp Asp
20 25 30
Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Ala Ile Phe Ile Ile
35 40 45
Gln Glu Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser
65 70 75 80
Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 3
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 3

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

Asp Lys Val Asn Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Glu Asp Asp
20 25 30
Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Ala Ile Phe Ile Ile
35 40 45
Gln Glu Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Ile Ser Pro Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser
65 70 75 80
Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 4
<211> 445
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 4

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30
Ile Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Asp Tyr Asn Pro Gln Phe
50 55 60
Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Gly Tyr Asp Asp Gly Pro Tyr Thr Leu Glu Thr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190
Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
195 200 205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys
210 215 220
Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
225 230 235 240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260 265 270
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
290 295 300
Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350
Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
385 390 395 400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 5
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段

<400> 5
Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Thr Pro Gly
1 5 10 15
Asp Lys Val Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Asp Asp
20 25 30
Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Ala Ile Phe Ile Ile
35 40 45
Gln Glu Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Ile Ser Pro Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser
65 70 75 80
Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 6
<211> 107
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段

<400> 6
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Phe
85 90 95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 7
<211> 112
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>

<223> 經改變的抗體片段
<400> 7
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30
Asn Gly Asp Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala 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 Val
85 90 95
Leu Arg Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Gln
100 105 110
<210> 8
<211> 107
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 8
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105
<210> 9
<211> 112
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 9
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Glu Ser Leu Val Leu Ser Leu Gly
1 5 10 15
Gly Thr Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30
Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Pro Pro Thr Leu Leu Phe Ser Trp Ala Ser Ile Arg Asp Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Asp Leu Gln Ala Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95
Tyr Tyr Arg Ala Pro Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Lys
100 105 110
<210> 10
<211> 121
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 10
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Asp Pro Gly Gly Gly Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 11
<211> 126
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 11

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

<210> 12
<211> 35
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 12

Gly Arg Met Lys Gln Leu Glu Asp Lys Val Glu Glu Leu Leu Ser Lys
1 5 10 15
Asn Tyr His Leu Glu Asn Glu Val Ala Arg Leu Lys Lys Leu Val Gly
20 25 30
Glu Arg Gly
35

<210> 13
<211> 19
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 13

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15
Val His Ser

<210> 14
<211> 330
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 14

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

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

<210> 15
<211> 326
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 15
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110
Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
165 170 175
Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270
Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320
Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325

<210> 16
<211> 377
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 16

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
100 105 110
Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
115 120 125
Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
130 135 140
Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
145 150 155 160
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
165 170 175
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
180 185 190
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
195 200 205
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
210 215 220
Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
225 230 235 240
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
245 250 255
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
260 265 270
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
275 280 285
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
290 295 300
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
305 310 315 320
Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
325 330 335
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
340 345 350
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
355 360 365
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375

<210> 17
<211> 327
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 17

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

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110
Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 18
<211> 458
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 18

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ala Ser Ile Tyr Cys Ser Ser Thr Ser Cys Tyr Glu Pro Pro
100 105 110
Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Met Val Thr Val
115 120 125
Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
130 135 140
Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
145 150 155 160
Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
165 170 175
Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
180 185 190
Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
195 200 205
Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
210 215 220
Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
225 230 235 240
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
245 250 255
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
260 265 270
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
275 280 285
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
290 295 300

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
305 310 315 320
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
325 330 335
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
340 345 350
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
355 360 365
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
370 375 380
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
385 390 395 400
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
405 410 415
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
420 425 430
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
435 440 445
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450 455

<210> 19
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 19

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser His
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser His Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His Asn Tyr Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 20
<211> 447
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 20

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

100 105 110
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 21
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 21

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile His Ser His
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr His Ala Ser Lys Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Gly Asn Ser Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210
<210> 22
<211> 451
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 22
Glu Val Gln Leu Val Gln 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 Asn Ala
20 25 30
Trp Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Arg Ile Lys Ser Lys Val Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60
Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Ala Asp Val Pro Ala Ser Asn Pro Tyr Gly Phe Asp Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445
Leu Ser Pro
450
<210> 23
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 23

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser His
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser His Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Asn Tyr Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 24
<211> 449
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 24

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30
His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp
35 40 45
Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60
Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80
Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445
Lys

<210> 25
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 25
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 26
<211> 107
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 26
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 27

<211> 128
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 27

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

<210> 28
<211> 122
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 28

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

<210> 29
<211> 124
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 29

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

<210> 30
<211> 119
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 30

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

<210> 31
<211> 107
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 31
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Asp Asp
20 25 30
Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Glu Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 32
<211> 107
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 32
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Asp Asp
20 25 30
Met Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Glu Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala
65 70 75 80
Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 33
<211> 107
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 33
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Asp Asp
20 25 30
Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Glu Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 34
<211> 107
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 34
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Asp Asp
20 25 30
Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Glu Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
65 70 75 80
Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 35
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 35
Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Thr Pro Gly
1 5 10 15
Asp Lys Val Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Ala Asp Asp
20 25 30
Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Ala Ile Phe Ile Ile
35 40 45
Gln Glu Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Ile Ser Pro Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser
65 70 75 80
Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 36
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 36
Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Thr Pro Gly
1 5 10 15
Asp Lys Val Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Ala Asp
20 25 30
Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Ala Ile Phe Ile Ile
35 40 45
Gln Glu Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Ile Ser Pro Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser
65 70 75 80
Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 37
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 37

Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Thr Pro Gly
1 5 10 15
Asp Lys Val Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Asp Ala
20 25 30
Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Ala Ile Phe Ile Ile
35 40 45
Gln Glu Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Ile Ser Pro Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser
65 70 75 80
Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 38
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 38

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

100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 39
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 39

Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Thr Pro Gly
1 5 10 15
Asp Lys Val Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Ala Asp Ala
20 25 30
Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Ala Ile Phe Ile Ile
35 40 45
Gln Glu Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Ile Ser Pro Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser
65 70 75 80
Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 40
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 40

Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Thr Pro Gly
1 5 10 15
Asp Lys Val Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Ala Asp Asp
20 25 30
Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Ala Ile Phe Ile Ile
35 40 45
Gln Ala Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Ile Ser Pro Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser
65 70 75 80
Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 41
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 41

Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Thr Pro Gly
1 5 10 15
Asp Lys Val Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Ala Asp Ala
20 25 30
Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Ala Ile Phe Ile Ile
35 40 45
Gln Ala Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Ile Ser Pro Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser
65 70 75 80
Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 42
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 42

Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Thr Pro Gly
1 5 10 15
Asp Lys Val Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Asp Asp
20 25 30
Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Ala Ile Phe Ile Ile
35 40 45
Gln Glu Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Ile Ser Pro Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser
65 70 75 80
Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Ala Asn Phe Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 43
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 43

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Asp Asp
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Glu Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ser Thr Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 44
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 44

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 45
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 45

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ala Asp Asp
            20                  25                  30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
Tyr Glu Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ser Thr Pro Tyr
                85                  90                  95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 46
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 46

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Ala Asp
            20                  25                  30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
Tyr Glu Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ser Thr Pro Tyr
                85                  90                  95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 47
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>

<223> 經改變的抗體片段
<400> 47

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Asp Ala
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Glu Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ser Thr Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 48
<211> 443
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 48

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
165 170 175
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
180 185 190
Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195 200 205
Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
210 215 220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440

<210> 49
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 49

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Asp
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Glu Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ser Thr Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 50
<211> 456
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 50

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

115 120 125
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
130 135 140
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
145 150 155 160
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
165 170 175
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
180 185 190
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
195 200 205
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
210 215 220
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
225 230 235 240
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
245 250 255
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
260 265 270
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
275 280 285
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
290 295 300
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
305 310 315 320
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
325 330 335
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
340 345 350
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
355 360 365
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
370 375 380
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385 390 395 400
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
405 410 415
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
420 425 430
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
435 440 445
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450 455

<210> 51
<211> 452
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 51
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 Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr 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 Ala Pro Gly Ile Gln Leu Trp Leu Arg Pro Ser Tyr Phe Asp
100 105 110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
130 135 140
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn

195 200 205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
210 215 220
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225 230 235 240
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
245 250 255
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
275 280 285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
290 295 300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305 310 315 320
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
325 330 335
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
340 345 350
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
355 360 365
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370 375 380
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385 390 395 400
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
405 410 415
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445
Ser Leu Ser Pro
450

<210> 52
<211> 447
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 52
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Trp Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ala Gly Asp Ser Ile Lys Tyr Ser
20 25 30
Ser Asp Tyr Trp Gly Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Ile Gly Ser Ser Tyr Leu Ser Gly Thr Thr Gln Tyr Asn Pro Ser
50 55 60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80
Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg His Arg Gly Pro Thr Gly Val Asp Gln Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

275 280 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 53
<211> 449
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 53
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Thr Leu Ser Cys Val Gly Tyr Gly Phe Thr Phe His Glu Asn
20 25 30
Asp Met His Trp Leu Arg Gln Pro Leu Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser His Ile Gly Trp Asn Asn Asn Arg Val Ala Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Ala Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe
65 70 75 80
Leu His Met Asn Ser Leu Arg Pro Asp Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Asp Leu Gly Asn Pro Ile Tyr Asp Val Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

370 375 380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445
Pro

<210> 54
<211> 452
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 54
Gln Pro Ala Leu Ala Gln Met Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
1 5 10 15
Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
20 25 30
Thr Phe Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
35 40 45
Gly Leu Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly
50 55 60
Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
65 70 75 80
Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
85 90 95
Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Val Leu Gly Asp Ala Phe Asp
100 105 110
Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
130 135 140
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
195 200 205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
210 215 220
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225 230 235 240
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
245 250 255
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
275 280 285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
290 295 300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305 310 315 320
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
325 330 335
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
340 345 350
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
355 360 365
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370 375 380
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385 390 395 400
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
405 410 415
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445
Ser Leu Ser Pro

450
<210> 55
<211> 454
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 55
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30
Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
50 55 60
Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80
Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95
Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Val Arg Ser Gly Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
100 105 110
Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120 125
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
130 135 140
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
145 150 155 160
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165 170 175
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
180 185 190
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
195 200 205
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
210 215 220
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225 230 235 240
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
245 250 255
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
260 265 270
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
275 280 285
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305 310 315 320
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
325 330 335
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
340 345 350
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
355 360 365
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
370 375 380
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385 390 395 400
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
405 410 415
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
420 425 430
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
435 440 445
Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450
<210> 56
<211> 450
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 56
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30
Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
50 55 60
Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ile Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80
Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95
Tyr Tyr Cys Ala Arg Lys Asp Pro Arg Val Trp Ala Phe Asp Ile Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445
Ser Pro
450

<210> 57
<211> 449
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 57

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

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ser Ala Gly Tyr Gly Gly Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445
Pro

<210> 58
<211> 447
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 58
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Lys Thr Tyr
20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Asn Ile Arg Ala Asp Gly Gly Gln Met Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asp Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ile Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Pro Phe Ala Ser Gly Gly Leu Asp Gln Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 59
<211> 450
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 59

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 Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Leu Ile Ser His Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Arg 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 Asp Arg Val Arg Tyr Phe Asp Ser Tyr Gly Met Asp Val Trp
100 105 110
Gly His Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445
Ser Pro
450

<210> 60
<211> 449
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 60

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15
Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Phe
20 25 30
Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Asn Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60
Gln Gly His Val Ala Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu His Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg His Arg Tyr Leu Gly Gln Leu Ala Pro Phe Asp Pro Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445
Pro

<210> 61
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 61
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Glu Asp Asp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Glu Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asp Asn Tyr Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 62
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 62
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Glu Asp Asp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr His Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ser Ser Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 63
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 63
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Glu Asp Asp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Glu Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Tyr Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 64
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 64
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Glu Asp Asp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Glu Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Gly Tyr Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210
<210> 65
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 65
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Glu Asp Asp
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Ser Ser Ser Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210
<210> 66
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 66
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Glu Asp Asp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210
<210> 67

<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 67

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Asp
            20                  25                  30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
Tyr His Ala Ser His Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Ser Pro Leu
                85                  90                  95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 68
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 68

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Asp
            20                  25                  30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
Tyr His Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Tyr Pro Tyr
                85                  90                  95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 69
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段

<400> 69
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Glu Asp Asp
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Glu Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asp Ser Ser Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 70
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 70
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Glu Asp Asp
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Glu Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Asp Tyr Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 71
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 71
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Glu Asp Asp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Glu Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asp Asn Tyr Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 72
<211> 453
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 72

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ala Ala Phe Leu Glu Trp Pro Ile Trp Gly Ser Glu Tyr Phe
100 105 110
Gln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
130 135 140
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
145 150 155 160
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
165 170 175
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
180 185 190
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
195 200 205
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
210 215 220
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225 230 235 240
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
245 250 255
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
260 265 270
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
290 295 300
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315 320
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
325 330 335
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
340 345 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
355 360 365
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385 390 395 400
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
405 410 415
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445
Leu Ser Leu Ser Pro
450

<210> 73
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 73
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Glu Asp Asp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr His Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asp Ser Tyr Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 74
<211> 451
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 74
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr 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 Arg Ala Thr Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Ala Pro Ala Phe Asp Ile
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val

145 150 155 160
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445
Leu Ser Pro
450
<210> 75
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 75
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Glu Asp Asp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Glu Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asp Asp Ser Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210
<210> 76

<211> 452
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 76

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Arg Gly Ser Gly Phe Asn Trp Gly Asn Tyr Ala Phe Asp
100 105 110
Ile Trp Gly Gln Gly Phe Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
130 135 140
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
195 200 205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
210 215 220
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225 230 235 240
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
245 250 255
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
275 280 285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
290 295 300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305 310 315 320
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
325 330 335
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
340 345 350
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
355 360 365
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370 375 380
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385 390 395 400
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
405 410 415
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445
Ser Leu Ser Pro
450

<210> 77
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 77

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Glu Asp Asp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Arg Tyr Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 78
<211> 449
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 78

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Asp Pro Gly Gly Gly Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445
Pro

<210> 79
<211> 217
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 79
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Arg Ser Asn Met Gly Ala Gly
20 25 30
Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Leu Leu Pro Gly Ala Ala Pro Lys Leu
35 40 45
Leu Ile Ser His Asn Thr His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Ala Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser His Asp Ser Ser
85 90 95
Leu Ser Ala Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser
100 105 110
Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
115 120 125
Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
130 135 140
Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
145 150 155 160
Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
165 170 175
Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
180 185 190
His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
195 200 205
Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 80
<211> 453
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 80
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Arg Asp Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Asp Ala Phe
100 105 110
Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
130 135 140
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu

145 150 155 160
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
165 170 175
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
180 185 190
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
195 200 205
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
210 215 220
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225 230 235 240
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
245 250 255
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
260 265 270
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
290 295 300
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315 320
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
325 330 335
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
340 345 350
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
355 360 365
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385 390 395 400
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
405 410 415
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445
Leu Ser Leu Ser Pro
450

<210> 81
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 81

Glu Thr Thr Val Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Thr Thr Asp Ile Asp Asp Asp
20 25 30
Met Asn Trp Phe Gln Gln Glu Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Ser Glu Gly Asn Ile Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser
50 55 60
Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Lys Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Phe
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 82

<211> 447
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 82

```
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1               5                  10                  15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Asp Asp
            20                  25                  30
Gln Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp
        35                  40                  45
Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65                  70                  75                  80
Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
            100                 105                 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        115                 120                 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445
```

<210> 83
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 83

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15
Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
            20                  25                  30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile
        35                  40                  45
```

Tyr Tyr Gly Ser Glu Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80
Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Ser Leu Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 84
<211> 106
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 84

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

<210> 85
<211> 454
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 85

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 Ser Tyr
20 25 30
Glu Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Ala Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Thr Asp Ala
100 105 110
Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120 125
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
130 135 140
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
145 150 155 160
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165 170 175
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
180 185 190
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile

195 200 205
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
210 215 220
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225 230 235 240
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
245 250 255
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
260 265 270
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
275 280 285
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305 310 315 320
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
325 330 335
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
340 345 350
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
355 360 365
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
370 375 380
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385 390 395 400
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
405 410 415
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
420 425 430
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
435 440 445
Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450

<210> 86
<211> 219
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 86

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30
Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
85 90 95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 87
<211> 454
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 87

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 Ser Tyr
20 25 30
Glu Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Ala Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Ala Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Thr Asp Ala
100 105 110
Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120 125
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
130 135 140
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
145 150 155 160
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165 170 175
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
180 185 190
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
195 200 205
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
210 215 220
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225 230 235 240
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
245 250 255
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
260 265 270
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
275 280 285
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305 310 315 320
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
325 330 335
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
340 345 350
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
355 360 365
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
370 375 380
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385 390 395 400
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
405 410 415
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
420 425 430
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
435 440 445
Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450

<210> 88
<211> 454
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 88

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 Ser Tyr
20 25 30
Glu Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ala Ala Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Thr Asp Ala
100 105 110
Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120 125
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
130 135 140
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
145 150 155 160
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165 170 175
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
180 185 190
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
195 200 205
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
210 215 220
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225 230 235 240
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
245 250 255
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
260 265 270
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
275 280 285
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305 310 315 320
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
325 330 335
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
340 345 350
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
355 360 365
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
370 375 380
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385 390 395 400
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
405 410 415
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
420 425 430
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
435 440 445
Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450

<210> 89
<211> 454
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 89

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 Ser Tyr
20 25 30
Glu Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Ala Pro Tyr Tyr Tyr Ala Ser Ser Gly Tyr Thr Asp Ala
100 105 110
Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120 125
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
130 135 140
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
145 150 155 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165 170 175
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
180 185 190
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
195 200 205
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
210 215 220
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225 230 235 240
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
245 250 255
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
260 265 270
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
275 280 285
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305 310 315 320
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
325 330 335
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
340 345 350
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
355 360 365
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
370 375 380
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385 390 395 400
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
405 410 415
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
420 425 430
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
435 440 445
Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450

<210> 90
<211> 454
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 90
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 Ser Tyr
20 25 30
Glu Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Ala Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Thr Ala Ala
100 105 110
Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120 125
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
130 135 140
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
145 150 155 160
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165 170 175
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
180 185 190
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
195 200 205
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
210 215 220
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225 230 235 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
245 250 255
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
260 265 270
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
275 280 285
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305 310 315 320
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
325 330 335
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
340 345 350
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
355 360 365
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
370 375 380
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385 390 395 400
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
405 410 415
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
420 425 430
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
435 440 445
Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450

<210> 91
<211> 454
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 91

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 Ser Tyr
20 25 30
Glu Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Ala Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Thr Asp Ala
100 105 110
Phe Ala Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120 125
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
130 135 140
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
145 150 155 160
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165 170 175
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
180 185 190
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
195 200 205
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
210 215 220
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225 230 235 240
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
245 250 255
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
260 265 270
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
275 280 285
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
325 330 335
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
340 345 350
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
355 360 365
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
370 375 380
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385 390 395 400
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
405 410 415
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
420 425 430
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
435 440 445
Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450

<210> 92
<211> 213
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 92
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Phe Ala Ala Ser Asn Arg Ala Ala Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asp Lys Trp Val Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Thr Val Glu Ile Arg Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205
Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 93
<211> 213
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 93
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Phe Asp Ala Ser Asn Arg Ala Ala Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Ala Lys Trp Val Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Thr Val Glu Ile Arg Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr

115 120 125
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205
Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 94
<211> 453
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 94
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Arg Asp Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Asp Ala Phe
100 105 110
Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
130 135 140
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
145 150 155 160
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
165 170 175
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
180 185 190
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
195 200 205
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
210 215 220
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225 230 235 240
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
245 250 255
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
260 265 270
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
290 295 300
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315 320
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
325 330 335
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
340 345 350
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
355 360 365
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385 390 395 400
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
405 410 415
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Trp His Tyr Thr Gln Lys Ser

435 440 445
Leu Ser Leu Ser Pro
450

<210> 95
<211> 449
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 95

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Asp Pro Gly Gly Gly Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430
His Glu Ala Leu His Trp His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445
Pro

<210> 96
<211> 447
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 96

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Asp Asp
20 25 30
Gln Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp
35 40 45
Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80
Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430
Ala Leu His Trp His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 97
<211> 464
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 97

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

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Pro Thr Ser Pro Lys Val Phe
115 120 125
Pro Leu Ser Leu Cys Ser Thr Gln Pro Asp Gly Asn Val Val Ile Ala
130 135 140
Cys Leu Val Gln Gly Phe Phe Pro Gln Glu Pro Leu Ser Val Thr Trp
145 150 155 160
Ser Glu Ser Gly Gln Gly Val Thr Ala Arg Asn Phe Pro Pro Ser Gln
165 170 175
Asp Ala Ser Gly Asp Leu Tyr Thr Thr Ser Ser Gln Leu Thr Leu Pro
180 185 190
Ala Thr Gln Cys Leu Ala Gly Lys Ser Val Thr Cys His Val Lys His
195 200 205
Tyr Thr Asn Pro Ser Gln Asp Val Thr Val Pro Cys Pro Val Pro Ser
210 215 220
Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser
225 230 235 240
Cys Cys His Pro Arg Leu Ser Leu His Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu
245 250 255
Leu Leu Gly Ser Glu Ala Asn Leu Thr Cys Thr Leu Thr Gly Leu Arg
260 265 270
Asp Ala Ser Gly Val Thr Phe Thr Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Ser
275 280 285
Ala Val Gln Gly Pro Pro Glu Arg Asp Leu Cys Gly Cys Tyr Ser Val
290 295 300
Ser Ser Val Leu Pro Gly Cys Ala Glu Pro Trp Asn His Gly Lys Thr
305 310 315 320
Phe Thr Cys Thr Ala Ala Tyr Pro Glu Ser Lys Thr Pro Leu Thr Ala
325 330 335
Thr Leu Ser Lys Ser Gly Asn Thr Phe Arg Pro Glu Val His Leu Leu
340 345 350
Pro Pro Pro Ser Glu Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr
355 360 365
Cys Leu Ala Arg Gly Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu
370 375 380
Gln Gly Ser Gln Glu Leu Pro Arg Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala Ser
385 390 395 400
Arg Gln Glu Pro Ser Gln Gly Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile
405 410 415
Leu Arg Val Ala Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys
420 425 430
Met Val Gly His Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile
435 440 445
Asp Arg Leu Ala Gly Lys Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
450 455 460

<210> 98
<211> 458
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 98

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser Ala Ser Pro Thr Ser Pro Lys Val Phe Pro Leu Ser Leu
115 120 125
Cys Ser Thr Gln Pro Asp Gly Asn Val Val Ile Ala Cys Leu Val Gln
130 135 140
Gly Phe Phe Pro Gln Glu Pro Leu Ser Val Thr Trp Ser Glu Ser Gly
145 150 155 160
Gln Gly Val Thr Ala Arg Asn Phe Pro Pro Ser Gln Asp Ala Ser Gly
165 170 175

Asp Leu Tyr Thr Thr Ser Ser Gln Leu Thr Leu Pro Ala Thr Gln Cys
180 185 190
Leu Ala Gly Lys Ser Val Thr Cys His Val Lys His Tyr Thr Asn Pro
195 200 205
Ser Gln Asp Val Thr Val Pro Cys Pro Val Pro Ser Thr Pro Pro Thr
210 215 220
Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Cys Cys His Pro
225 230 235 240
Arg Leu Ser Leu His Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu Leu Leu Gly Ser
245 250 255
Glu Ala Asn Leu Thr Cys Thr Leu Thr Gly Leu Arg Asp Ala Ser Gly
260 265 270
Val Thr Phe Thr Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Ser Ala Val Gln Gly
275 280 285
Pro Pro Glu Arg Asp Leu Cys Gly Cys Tyr Ser Val Ser Ser Val Leu
290 295 300
Pro Gly Cys Ala Glu Pro Trp Asn His Gly Lys Thr Phe Thr Cys Thr
305 310 315 320
Ala Ala Tyr Pro Glu Ser Lys Thr Pro Leu Thr Ala Thr Leu Ser Lys
325 330 335
Ser Gly Asn Thr Phe Arg Pro Glu Val His Leu Leu Pro Pro Pro Ser
340 345 350
Glu Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala Arg
355 360 365
Gly Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu Gln Gly Ser Gln
370 375 380
Glu Leu Pro Arg Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala Ser Arg Gln Glu Pro
385 390 395 400
Ser Gln Gly Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile Leu Arg Val Ala
405 410 415
Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys Met Val Gly His
420 425 430
Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp Arg Leu Ala
435 440 445
Gly Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
450 455

<210> 99
<211> 219
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段

<400> 99
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30
Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
35 40 45
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
85 90 95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 100
<211> 233
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 100

Cys His Pro Arg Leu Ser Leu His Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu Leu
1 5 10 15
Leu Gly Ser Glu Ala Asn Leu Thr Cys Thr Leu Thr Gly Leu Arg Asp
20 25 30
Ala Ser Gly Val Thr Phe Thr Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Ser Ala
35 40 45
Val Gln Gly Pro Pro Glu Arg Asp Leu Cys Gly Cys Tyr Ser Val Ser
50 55 60
Ser Val Leu Pro Gly Cys Ala Glu Pro Trp Asn His Gly Lys Thr Phe
65 70 75 80
Thr Cys Thr Ala Ala Tyr Pro Glu Ser Lys Thr Pro Leu Thr Ala Thr
85 90 95
Leu Ser Lys Ser Gly Asn Thr Phe Arg Pro Glu Val His Leu Leu Pro
100 105 110
Pro Pro Ser Glu Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr Cys
115 120 125
Leu Ala Arg Gly Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu Gln
130 135 140
Gly Ser Gln Glu Leu Pro Arg Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala Ser Arg
145 150 155 160
Gln Glu Pro Ser Gln Gly Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile Leu
165 170 175
Arg Val Ala Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys Met
180 185 190
Val Gly His Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp
195 200 205
Arg Leu Ala Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe
210 215 220
Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
225 230

<210> 101
<211> 450
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 101

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Val Ala Pro Gly Asn Trp Gly Ser Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

275 280 285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445
Ser Pro
450

<210> 102
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 102
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Glu Asp Asp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Glu Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asp Ser Ser Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 103
<211> 451
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 103
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Pro Arg Trp Glu Thr Ala Ile Ser Ser Asp Ala Phe Asp Ile
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445
Leu Ser Pro
450

<210> 104
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 104

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Asp
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Ser Ser Ser Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 105
<211> 448
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 105
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Asn Gly Asp Tyr Leu Glu Tyr Phe Gln His Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 106
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 106

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Asp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asp Ser Ser Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 107
<211> 452
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 107

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Ile Leu Gly Gly Ser Ile Ser Gly His
20 25 30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Asp Tyr Ser Gly Ser Thr His Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Asp Asn Trp Asp Phe Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Asn Trp Phe Asp
100 105 110
Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
130 135 140
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
195 200 205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
210 215 220
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225 230 235 240
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
245 250 255
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
275 280 285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn

290 295 300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305 310 315 320
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
325 330 335
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
340 345 350
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
355 360 365
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370 375 380
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385 390 395 400
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
405 410 415
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445
Ser Leu Ser Pro
450

<210> 108
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 108
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Glu Asp Asp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr His Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Asn Ser Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 109
<211> 545
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 109
Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro Asp Ala Thr Cys His Gln Val Arg Ser
1 5 10 15
Phe Phe Gln Arg Leu Gln Pro Gly Leu Lys Trp Val Pro Glu Thr Pro
20 25 30
Val Pro Gly Ser Asp Leu Gln Val Cys Leu Pro Lys Gly Pro Thr Cys
35 40 45
Cys Ser Arg Lys Met Glu Glu Lys Tyr Gln Leu Thr Ala Arg Leu Asn
50 55 60
Met Glu Gln Leu Leu Gln Ser Ala Ser Met Glu Leu Lys Phe Leu Ile
65 70 75 80
Ile Gln Asn Ala Ala Val Phe Gln Glu Ala Phe Glu Ile Val Val Arg
85 90 95

His Ala Lys Asn Tyr Thr Asn Ala Met Phe Lys Asn Asn Tyr Pro Ser
100 105 110
Leu Thr Pro Gln Ala Phe Glu Phe Val Gly Glu Phe Phe Thr Asp Val
115 120 125
Ser Leu Tyr Ile Leu Gly Ser Asp Ile Asn Val Asp Asp Met Val Asn
130 135 140
Glu Leu Phe Asp Ser Leu Phe Pro Val Ile Tyr Thr Gln Leu Met Asn
145 150 155 160
Pro Gly Leu Pro Asp Ser Ala Leu Asp Ile Asn Glu Cys Leu Arg Gly
165 170 175
Ala Arg Arg Asp Leu Lys Val Phe Gly Asn Phe Pro Lys Leu Ile Met
180 185 190
Thr Gln Val Ser Lys Ser Leu Gln Val Thr Arg Ile Phe Leu Gln Ala
195 200 205
Leu Asn Leu Gly Ile Glu Val Ile Asn Thr Thr Asp His Leu Lys Phe
210 215 220
Ser Lys Asp Cys Gly Arg Met Leu Thr Arg Met Trp Tyr Cys Ser Tyr
225 230 235 240
Cys Gln Gly Leu Met Met Val Lys Pro Cys Gly Gly Tyr Cys Asn Val
245 250 255
Val Met Gln Gly Cys Met Ala Gly Val Val Glu Ile Asp Lys Tyr Trp
260 265 270
Arg Glu Tyr Ile Leu Ser Leu Glu Glu Leu Val Asn Gly Met Tyr Arg
275 280 285
Ile Tyr Asp Met Glu Asn Val Leu Leu Gly Leu Phe Ser Thr Ile His
290 295 300
Asp Ser Ile Gln Tyr Val Gln Lys Asn Ala Gly Lys Leu Thr Thr Thr
305 310 315 320
Ile Gly Lys Leu Cys Ala His Ser Gln Gln Arg Gln Tyr Arg Ser Ala
325 330 335
Tyr Tyr Pro Glu Asp Leu Phe Ile Asp Lys Lys Val Leu Lys Val Ala
340 345 350
His Val Glu His Glu Glu Thr Leu Ser Ser Arg Arg Arg Glu Leu Ile
355 360 365
Gln Lys Leu Lys Ser Phe Ile Ser Phe Tyr Ser Ala Leu Pro Gly Tyr
370 375 380
Ile Cys Ser His Ser Pro Val Ala Glu Asn Asp Thr Leu Cys Trp Asn
385 390 395 400
Gly Gln Glu Leu Val Glu Arg Tyr Ser Gln Lys Ala Ala Arg Asn Gly
405 410 415
Met Lys Asn Gln Phe Asn Leu His Glu Leu Lys Met Lys Gly Pro Glu
420 425 430
Pro Val Val Ser Gln Ile Ile Asp Lys Leu Lys His Ile Asn Gln Leu
435 440 445
Leu Arg Thr Met Ser Met Pro Lys Gly Arg Val Leu Asp Lys Asn Leu
450 455 460
Asp Glu Glu Gly Phe Glu Ala Gly Asp Cys Gly Asp Asp Glu Asp Glu
465 470 475 480
Cys Ile Gly Gly Ala Gly Asp Gly Met Ile Lys Val Lys Asn Gln Leu
485 490 495
Arg Phe Leu Ala Glu Leu Ala Tyr Asp Leu Asp Val Asp Asp Ala Pro
500 505 510
Gly Asn Ser Gln Gln Ala Thr Pro Lys Asp Asn Glu Ile Ser Thr Phe
515 520 525
His Asn Leu Gly Asn Val His Ser Pro Leu Lys His His His His His
530 535 540
His
545

<210> 110
<211> 443
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 110
Glu Val Gln Leu Val Glu Thr 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
Ala 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 Arg Gly Ala Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
165 170 175
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
180 185 190
Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195 200 205
Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
210 215 220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440

<210> 111
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 111

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Glu Asp Asp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asp Ser Tyr Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 112
<211> 459
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 112

Gln Val Gln Leu Val Gln 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
Ala 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 Arg Glu Pro Ala Gly Arg His Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr
100 105 110
Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
115 120 125
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
130 135 140
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
145 150 155 160
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
165 170 175
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
180 185 190
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
195 200 205
Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
210 215 220
Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
225 230 235 240
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
245 250 255
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
260 265 270
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
275 280 285
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
290 295 300
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
305 310 315 320
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
325 330 335
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
340 345 350
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
355 360 365
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
370 375 380
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
385 390 395 400
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
405 410 415
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
420 425 430
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
435 440 445
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450 455

<210> 113
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 113

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Asp
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Leu Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 114
<211> 451
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 114

Gln Val Gln Leu Val Glu Thr 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 Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr 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 Asp Arg Thr Pro Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Leu Asp Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser

290 295 300
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445
Leu Ser Pro
450

<210> 115
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 115

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Glu Asp Asp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asp Ser Ser Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 116
<211> 451
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 116

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr 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 Arg Asp Ser Pro Leu Leu Trp Phe Gly Glu Pro Phe Phe Asp Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445
Leu Ser Pro
450

<210> 117
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 117
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Glu Asp Asp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr His Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ser Tyr Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 118
<211> 445
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 118

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
165 170 175
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
180 185 190
Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195 200 205
Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
210 215 220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 119
<211> 219
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段

<400> 119
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30
Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
85 90 95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 120
<211> 449
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 120
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser Ala Ser Ala Arg Asn Pro Thr Ile Tyr Pro Leu Thr Leu
115 120 125
Pro Pro Val Leu Cys Ser Asp Pro Val Ile Ile Gly Cys Leu Ile His
130 135 140
Asp Tyr Phe Pro Phe Gly Thr Met Asn Val Thr Trp Gly Lys Ser Gly
145 150 155 160
Lys Asp Ile Thr Thr Val Asn Phe Pro Pro Ala Leu Ala Ser Gly Gly
165 170 175
Arg Tyr Thr Met Ser Ser Gln Leu Thr Leu Pro Ala Val Glu Cys Pro
180 185 190
Glu Gly Glu Ser Val Lys Cys Ser Val Gln His Asp Ser Asn Pro Val
195 200 205
Gln Glu Leu Asp Val Asn Cys Ser Gly Pro Thr Pro Pro Pro Pro Ile
210 215 220
Thr Ile Pro Ser Cys Gln Pro Ser Leu Ser Leu Gln Arg Pro Ala Leu
225 230 235 240
Glu Asp Leu Leu Leu Gly Ser Asp Ala Ser Ile Thr Cys Thr Leu Asn
245 250 255
Gly Leu Arg Asn Pro Glu Gly Ala Ala Phe Thr Trp Glu Pro Ser Thr
260 265 270
Gly Lys Asp Ala Val Gln Lys Lys Ala Ala Gln Asn Ser Cys Gly Cys
275 280 285
Tyr Ser Val Ser Ser Val Leu Pro Gly Cys Ala Glu Arg Trp Asn Ser
290 295 300
Gly Ala Ser Phe Lys Cys Thr Val Thr His Pro Glu Ser Gly Thr Leu

305 310 315 320
Thr Gly Thr Ile Ala Lys Val Thr Val Asn Thr Phe Pro Pro Gln Val
325 330 335
His Leu Leu Pro Pro Pro Ser Glu Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Leu
340 345 350
Ser Leu Thr Cys Leu Val Arg Ala Phe Asn Pro Lys Glu Val Leu Val
355 360 365
Arg Trp Leu His Gly Asn Glu Glu Leu Ser Pro Glu Ser Tyr Leu Val
370 375 380
Phe Glu Pro Leu Lys Glu Pro Gly Glu Gly Ala Thr Thr Tyr Leu Val
385 390 395 400
Thr Ser Val Leu Arg Val Ser Ala Glu Thr Trp Lys Gln Gly Asp Gln
405 410 415
Tyr Ser Cys Met Val Gly His Glu Ala Leu Pro Met Asn Phe Thr Gln
420 425 430
Lys Thr Ile Asp Arg Leu Ser Gly Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
435 440 445
Lys

<210> 121
<211> 219
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 121
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30
Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
35 40 45
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
85 90 95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
115 120 125
Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
130 135 140
Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
145 150 155 160
Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175
Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
180 185 190
Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
195 200 205
Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210 215

<210> 122
<211> 233
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 122
Cys Gln Pro Ser Leu Ser Leu Gln Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu Leu
1 5 10 15
Leu Gly Ser Asp Ala Ser Ile Thr Cys Thr Leu Asn Gly Leu Arg Asn
20 25 30
Pro Glu Gly Ala Ala Phe Thr Trp Glu Pro Ser Thr Gly Lys Asp Ala
35 40 45
Val Gln Lys Lys Ala Ala Gln Asn Ser Cys Gly Cys Tyr Ser Val Ser
50 55 60
Ser Val Leu Pro Gly Cys Ala Glu Arg Trp Asn Ser Gly Ala Ser Phe
65 70 75 80
Lys Cys Thr Val Thr His Pro Glu Ser Gly Thr Leu Thr Gly Thr Ile
85 90 95
Ala Lys Val Thr Val Asn Thr Phe Pro Pro Gln Val His Leu Leu Pro
100 105 110

Pro Pro Ser Glu Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Leu Ser Leu Thr Cys
115 120 125
Leu Val Arg Ala Phe Asn Pro Lys Glu Val Leu Val Arg Trp Leu His
130 135 140
Gly Asn Glu Glu Leu Ser Pro Glu Ser Tyr Leu Val Phe Glu Pro Leu
145 150 155 160
Lys Glu Pro Gly Glu Gly Ala Thr Thr Tyr Leu Val Thr Ser Val Leu
165 170 175
Arg Val Ser Ala Glu Thr Trp Lys Gln Gly Asp Gln Tyr Ser Cys Met
180 185 190
Val Gly His Glu Ala Leu Pro Met Asn Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp
195 200 205
Arg Leu Ser Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe
210 215 220
Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
225 230

<210> 123
<211> 449
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 123

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Lys Thr
20 25 30
Tyr Ser Tyr Trp Ala Trp Ile Arg Gln His Pro Val Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Gly Gly Gly Thr His Tyr Asn Pro Ser
50 55 60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Ser Asp Thr Ser Lys Asn His Phe
65 70 75 80
Ser Leu Asn Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Ser Gly Phe Arg Val Phe Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445
Pro

<210> 124
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 124
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Arg Ser His
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser His Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Asn Ser Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 125
<211> 450
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 125
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30
Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg His Gly Pro Ser Gly Ser Tyr Tyr Ala Phe Asp Ile Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser

210 215 220
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445
Ser Pro
450

<210> 126
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 126

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser His
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Lys Ala Ser His Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg His His Ser Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 127
<211> 452
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 127

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Asn Val Ser Gly Tyr Tyr Ile Ser Ser Gly
20 25 30
Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45
Ile Gly Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Thr Ser His Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60
Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80
Leu Lys Leu Ser Ser Leu Ser Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ala Gly Val Ile Ala Gly Gly Pro Arg Thr Tyr Ala Phe Asp
100 105 110
Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
130 135 140
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
195 200 205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
210 215 220
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225 230 235 240
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
245 250 255
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
275 280 285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
290 295 300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305 310 315 320
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
325 330 335
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
340 345 350
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
355 360 365
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370 375 380
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385 390 395 400
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
405 410 415
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445
Ser Leu Ser Pro
450

<210> 128
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段

<400> 128
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Arg Ser His
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Lys Ala Ser His Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His His Ser Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 129
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 129

Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala
1 5 10 15
Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp
20 25 30
Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp
35 40 45
Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys
50 55 60
Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro Pro
65 70 75 80
Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg
85 90 95
Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr Arg Pro Lys Ile
100 105 110
Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys Leu
115 120 125
Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr Glu
130 135 140
Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala
145 150 155 160
Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys
165 170 175
Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp
180 185 190
Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Asp Glu Glu
195 200 205
Glu Asp Asp Asp Asp Glu
210

<210> 130
<211> 234
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 130

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

130 135 140
Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala
145 150 155 160
Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys
165 170 175
Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp
180 185 190
Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Asp Glu Glu
195 200 205
Glu Asp Asp Asp Asp Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile
210 215 220
Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
225 230

<210> 131
<211> 449
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 131
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Gly Pro Ile Ser Ser Ser
20 25 30
Gly Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Ile Gly Thr Val Tyr Phe Asn Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80
Ser Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Glu Glu Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly
100 105 110
Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

435 440 445
Pro

<210> 132
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 132
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser His
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Gly Ala Ser His Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His Ser Tyr Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 133
<211> 459
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 133
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Asn Arg Thr Leu Thr Tyr Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr
100 105 110
Ser Phe Trp Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
115 120 125
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
130 135 140
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
145 150 155 160
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
165 170 175
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
180 185 190
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
195 200 205
Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
210 215 220
Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
225 230 235 240

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
245 250 255
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
260 265 270
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
275 280 285
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
290 295 300
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
305 310 315 320
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
325 330 335
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
340 345 350
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
355 360 365
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
370 375 380
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
385 390 395 400
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
405 410 415
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
420 425 430
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
435 440 445
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450 455

<210> 134
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 134

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile His Ser His
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Gly Ala Ser His Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg His Ser Tyr Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 135
<211> 452
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段
<400> 135

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 Asn Tyr
20 25 30
Glu Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45
Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ser Asp Gly Trp Tyr Pro Ser Trp Phe Asp
100 105 110
Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
130 135 140
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
195 200 205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
210 215 220
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225 230 235 240
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
245 250 255
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
275 280 285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
290 295 300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305 310 315 320
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
325 330 335
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
340 345 350
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
355 360 365
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370 375 380
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385 390 395 400
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
405 410 415
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445
Ser Leu Ser Pro
450

<210> 136
<211> 214
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>
<223> 經改變的抗體片段

<400> 136
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser His
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr His Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Ser Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

```
          115                 120                 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

七、申請專利範圍：

1.一種分子庫，其係主要由彼此序列互異的複數個抗原結合分子所構成之分子庫，前述抗原結合分子中之抗原結合結構域，係由抗體的可變區域所形成，該可變區域之CDR序列係以由(i)～(iv)中選出的至少一個胺基酸殘基為隨著鈣離子濃度之條件不同，抗原結合分子對抗原的結合活性會變化之胺基酸殘基，該胺基酸殘基為絲胺酸、蘇胺酸、天門冬醯胺、麩醯胺、天門冬胺酸或麩胺酸為特徵：

(i)重鏈CDR3之以Kabat編號表示之95位、96位、100a位及101位的胺基酸殘基、

(ii)輕鏈CDR1之以Kabat編號表示之30位、31位及32位的胺基酸殘基、

(iii)輕鏈CDR2之以Kabat編號表示之50位的胺基酸殘基、

(iv)輕鏈CDR3之以Kabat編號表示之92位的胺基酸殘基。

2.如申請專利範圍第1項之分子庫，其中前述胺基酸殘基以外之胺基酸序列係包含天然序列之胺基酸序列。

3.如申請專利範圍第1或2項之分子庫，其中前述抗原結合分子之輕鏈可變區域係包含天然序列之胺基酸序列。

4.如申請專利範圍第1項之分子庫，其中前述抗原結合分子之輕鏈的框架係包含生殖細胞系列之框架序列。

5.如申請專利範圍第1項之分子庫，其中前述抗原結

合分子之重鏈可變區域係包含天然序列之胺基酸序列。

6.如申請專利範圍第 1 項之分子庫，其中抗體的可變區域含有 Vk5 之部分、序列編號 10、及序列編號 11 之任一者。

7.一種分子庫，其係主要由包含如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項所記載之抗原結合分子之複數個融合多肽所構成之分子庫，其特徵在於，前述融合多肽係抗原結合分子之重鏈可變區域與病毒外殼蛋白質之至少一部分經融合者。

8.如申請專利範圍第 7 項之分子庫，其中前述病毒外殼蛋白質係選自由蛋白質 pIII、主外殼蛋白質 pVIII、pVII、pIX、Soc、Hoc、gpD 及 pv1 所構成群組。

9.一種組成物，其係包含各自編碼如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項所記載之彼此序列互異的抗原結合分子或如申請專利範圍第 7 或 8 項所記載之彼此序列互異的融合多肽之複數個聚核苷酸分子。

10.一種組成物，其係包含：以連結為能夠作用的狀態各自包含如申請專利範圍第 9 項之複數個聚核苷酸分子之複數個載體。

11.如申請專利範圍第 10 項之組成物，其中載體為可複製之表現載體。

12.如申請專利範圍第 11 項之組成物，其中可複製之表現載體係使選自由 lac Z 啟動子系、鹼性磷酸酯酶 pho A 啟動子(Ap)、噬菌體 λPL 啟動子(溫度感受性啟動子)、

tac 啟動子、色胺酸啟動子、pBAD 啟動子及噬菌體 T7 啟動子所構成群組之啟動子區域在表現載體中與前述聚核苷酸連結為能夠作用。

13.如申請專利範圍第 11 或 12 項之組成物，其中可複製之表現載體為 M13、f1、fd、或 Pf3 噬菌體；或者 λ 型噬菌體。

14.一種組成物，其係包含：各自包含如申請專利範圍第 10 至 13 項中任一項所記載之載體的複數個病毒。

15.一種組成物，其係包含：各自於其表面展現如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項所記載之彼此序列互異的抗原結合分子或如申請專利範圍第 7 或 8 項所記載之彼此序列互異的融合多肽之複數個病毒。

16.一種分子庫，其係包含如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項所記載之彼此序列互異的抗原結合分子或如申請專利範圍第 7 或 8 項所記載之彼此序列互異的融合多肽之分子庫，且其係具有 1×10^{6} 至 1×10^{14} 個之彼此相異之可變區域序列。

17.如申請專利範圍第 16 項之分子庫，其係具有 1×10^{8} 以上個之彼此相異之可變區域序列。

18.一種選擇抗原結合分子之方法，其係選擇隨著離子濃度之條件不同，對抗原之結合活性會變化之抗原結合分子之方法，且其係包含

a)製造主要由如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項所記載之彼此序列互異的抗原結合分子或如申請專利範圍第

7 或 8 項所記載之彼此序列互異的融合多肽所構成之分子庫之步驟、

b)將前述分子庫在離子濃度相異之二個以上的條件下與抗原接觸之步驟、

c)由前述分子庫中區分依 100μM 至 10 mM 之高鈣離子濃度條件與 0.1μM 至 30μM 之低鈣濃度條件，對抗原的結合活性會變化之抗原結合分子的集團之步驟、

d)由於 c)所區分的集團中單離依 100μM 至 10 mM 之高鈣離子濃度條件與 0.1μM 至 30μM 之低鈣濃度條件，對抗原的結合活性會變化之抗原結合分子之步驟。

19.一種單離聚核苷酸之方法，其係單離編碼隨著離子濃度之條件不同，對抗原的結合活性會變化之抗原結合分子的聚核苷酸之方法，且其係包含

a)製造分子庫之步驟，該分子庫係包含以連結為能夠作用之狀態各自包含各自編碼如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項所記載之彼此序列互異的抗原結合分子或如申請專利範圍第 7 或 8 項所記載之彼此序列互異的融合多肽之複數個聚核苷酸的複數個可複製之表現載體、

b)於經導入前述分子庫所包含之各自的表現載體之複數個病毒表面，表現由前述聚核苷酸所編碼之前述彼此序列互異的抗原結合分子或融合多肽之步驟、

c)使前述複數個病毒在離子濃度相異之二個以上的條件下與抗原接觸之步驟、

d)由前述分子庫中區分依 100μM 至 10 mM 之高鈣離

子濃度條件與 0.1μM 至 30μM 之低鈣濃度條件，對抗原的結合活性會變化之病毒的集團之步驟、

e)由於 d)所區分之病毒的集團中單離依 100μM 至 10 mM 之高鈣離子濃度條件與 0.1μM 至 30μM 之低鈣濃度條件，對抗原的結合活性會變化之病毒之步驟、

f)由經單離之病毒中單離聚核苷酸之步驟。

20.如申請專利範圍第 19 項之方法，其中追加地重複由前述 c)至 d)的步驟至少 1 次。

21.如申請專利範圍第 19 項之方法，其係選擇在低鈣濃度之條件下對抗原的結合活性比在高鈣濃度之條件下的結合活性更低之抗原結合分子。

22.一種抗原結合分子之製造方法，其係隨著離子濃度之條件不同，對抗原的結合活性會變化之抗原結合分子之製造方法，其係包含

a)製造分子庫之步驟，該分子庫係包含以連結為能夠作用之狀態各自包含各自編碼如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項所記載之彼此序列互異的抗原結合分子或如申請專利範圍第 7 或 8 項所記載之彼此序列互異的融合多肽之複數個聚核苷酸的複數個可複製之表現載體、

b)於經導入前述分子庫所包含之各自的表現載體之複數個病毒表面，表現由前述聚核苷酸所編碼之前述彼此序列互異的抗原結合分子或融合多肽之步驟、

c)使前述複數個病毒在離子濃度相異之二個以上的條件下與抗原接觸之步驟、

d)由前述分子庫中區分依 100μM 至 10 mM 之高鈣離子濃度條件與 0.1μM 至 30μM 之低鈣濃度條件，對抗原的結合活性會變化之病毒的集團之步驟、

e)由於 d)所區分之病毒的集團中單離依 100μM 至 10 mM 之高鈣離子濃度條件與 0.1μM 至 30μM 之低鈣濃度條件，對抗原的結合活性會變化之病毒之步驟、

f)由經單離之病毒中單離聚核苷酸之步驟、

g)培養經導入以連結為能夠作用之狀態插入經單離之聚核苷酸的載體之宿主細胞的步驟、

h)由於 g)所培養之培養液中回收抗原結合分子之步驟。

23.一種抗原結合分子之製造方法，其係隨著離子濃度之條件不同，對抗原的結合活性會變化之抗原結合分子之製造方法，其係包含

a)製造分子庫之步驟，該分子庫係包含以連結為能夠作用之狀態各自包含各自編碼如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項所記載之彼此序列互異的抗原結合分子或如申請專利範圍第 7 或 8 項所記載之彼此序列互異的融合多肽之複數個聚核苷酸的複數個可複製之表現載體、

b)於經導入前述分子庫所包含之各自的表現載體之複數個病毒表面，表現由前述聚核苷酸所編碼之前述彼此序列互異的抗原結合分子或融合多肽之步驟、

c)使前述複數個病毒在離子濃度相異之二個以上的條件下與抗原接觸之步驟、

d)由前述分子庫中區分依 100μM 至 10 mM 之高鈣離子濃度條件與 0.1μM 至 30μM 之低鈣濃度條件，對抗原的結合活性會變化之病毒的集團之步驟、

e)由於 d)所區分之病毒的集團中單離依 100μM 至 10 mM 之高鈣離子濃度條件與 0.1μM 至 30μM 之低鈣濃度條件，對抗原的結合活性會變化之病毒之步驟、

f)由經單離之病毒中單離聚核苷酸之步驟、

g)使經單離之聚核苷酸與編碼抗體恆定區域之聚核苷酸連結為同一讀框之步驟、

h)培養經導入以連結為能夠作用之狀態插入於 g)中經連結之聚核苷酸的載體之宿主細胞的步驟、

i)由於 h)所培養之培養液中回收抗原結合分子之步驟。

24.如申請專利範圍第 22 或 23 項之製造方法，其中追加地重複由前述 c)至 d)的步驟至少 1 次。

25.如申請專利範圍第 22 或 23 項之製造方法，其係選擇在低鈣濃度之條件下對抗原的結合活性比在高鈣濃度之條件下的結合活性更低之抗原結合分子。

圖1

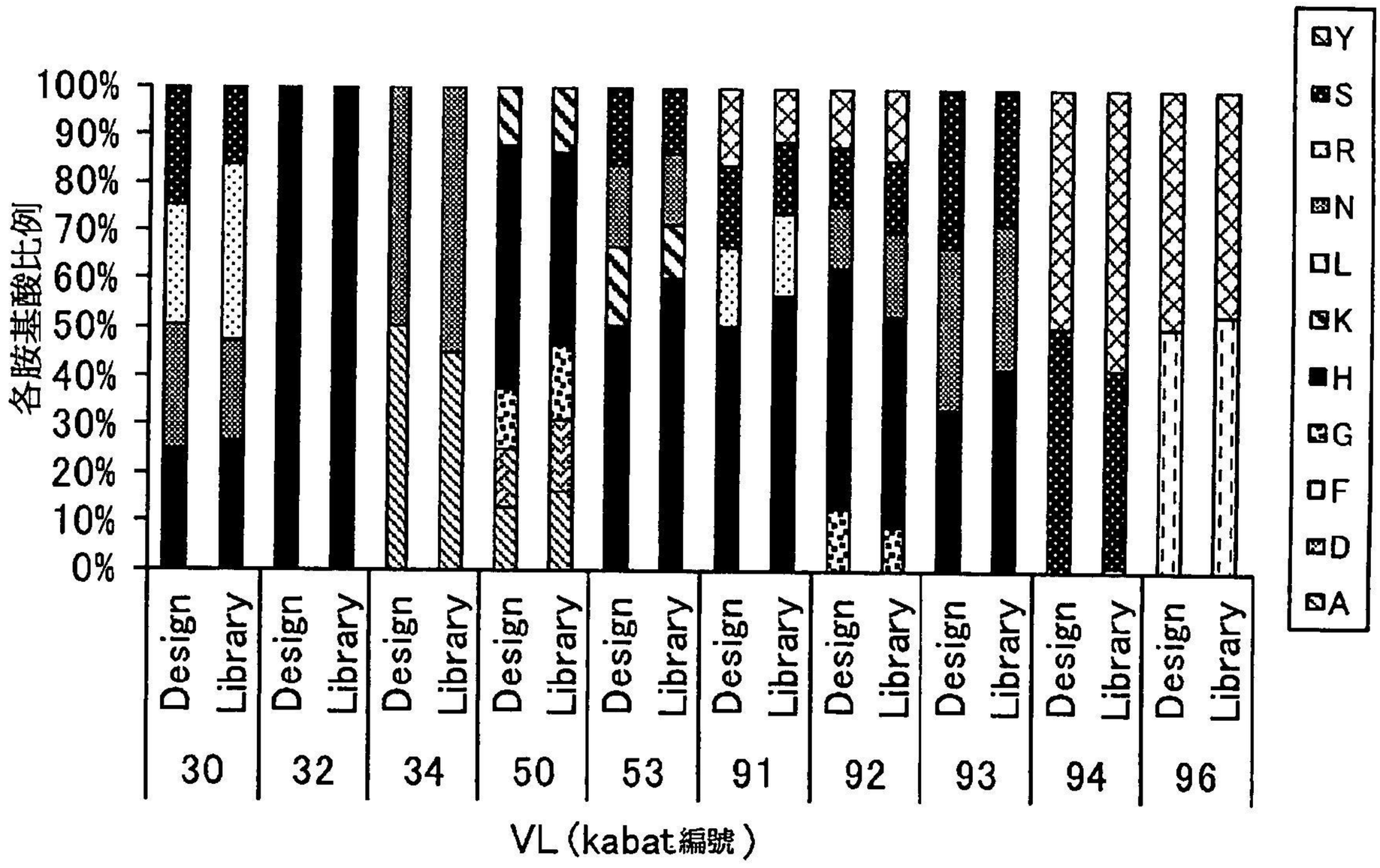
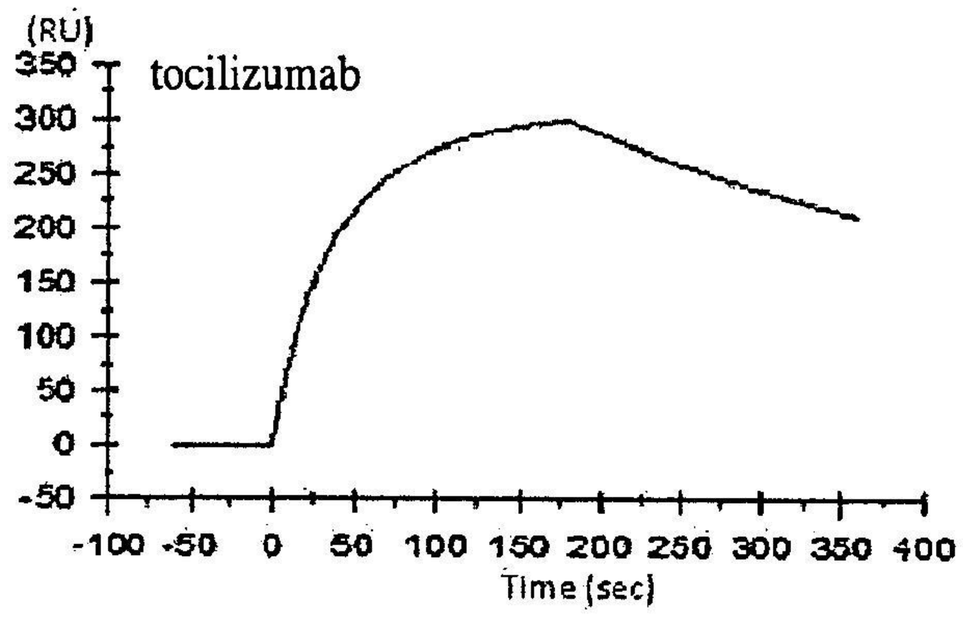
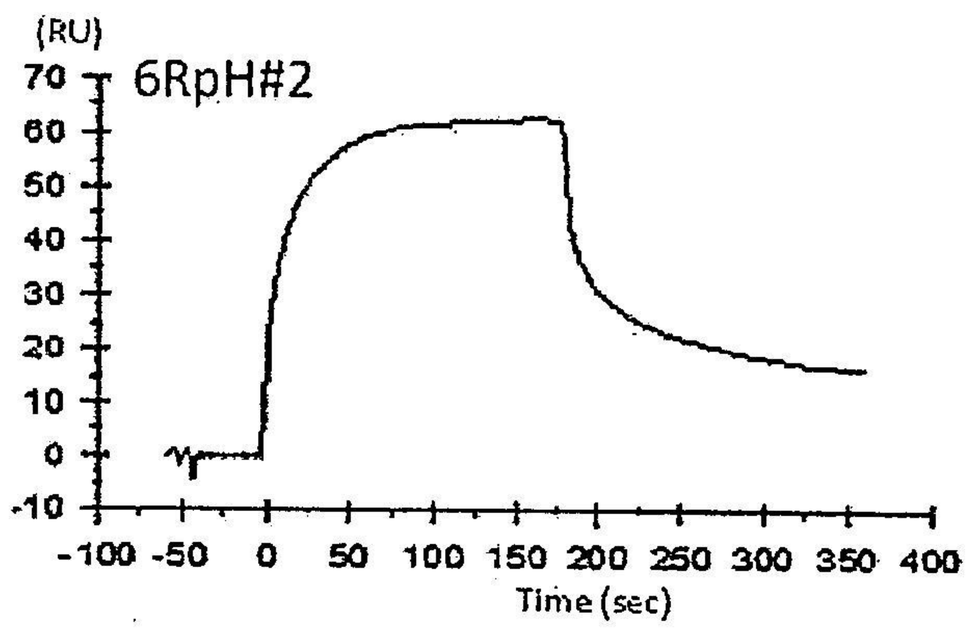
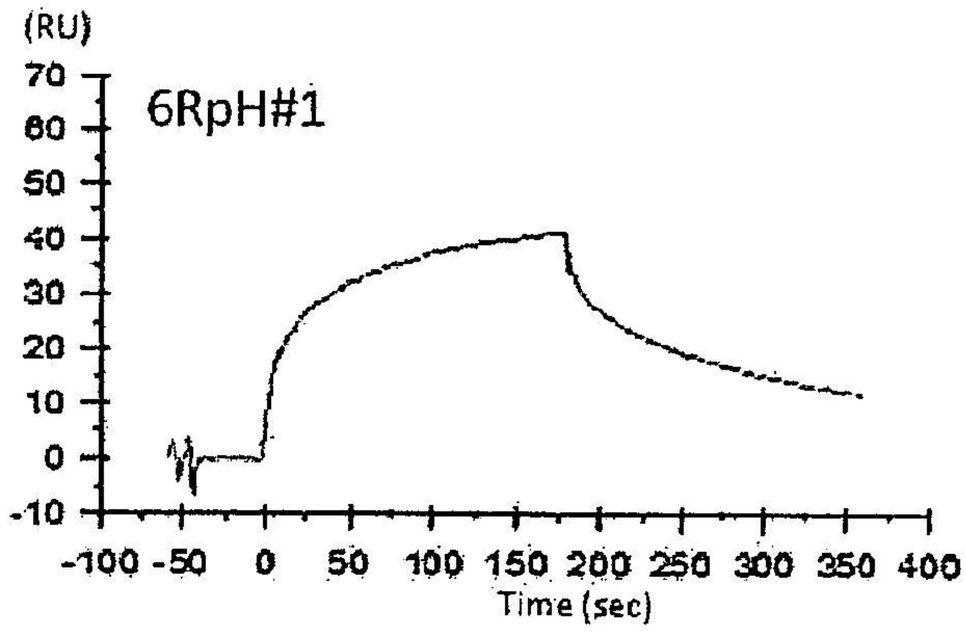

100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
各胺基酸比例
Design
Library
30
32
34
50
53
91
92
93
94
96
VL (kabat編號)
Y
S
R
N
L
K
H
G
F
D
A

圖2


(RU)
tocilizumab
350
300
250
200
150
100
50
0
-50
-100 -50 0 50 100 150 200 250 300 350 400
Time (sec)


(RU)
6RpH#2
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
-100 -50 0 50 100 150 200 250 300 350 400
Time (sec)


(RU)
6RpH#1
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
-100 -50 0 50 100 150 200 250 300 350 400
Time (sec)

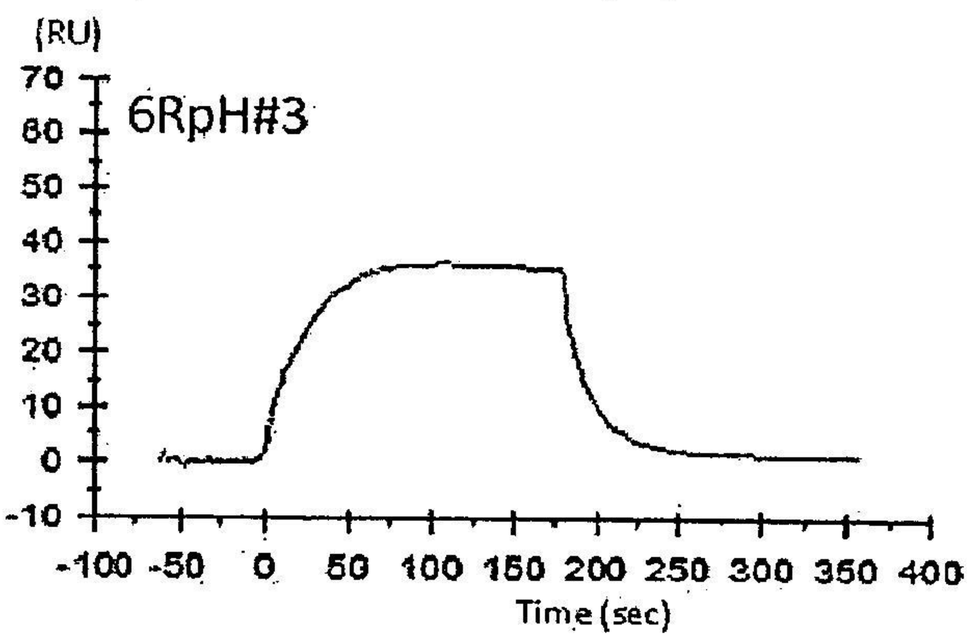

(RU)
6RpH#3
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
-100 -50 0 50 100 150 200 250 300 350 400
Time (sec)

圖3

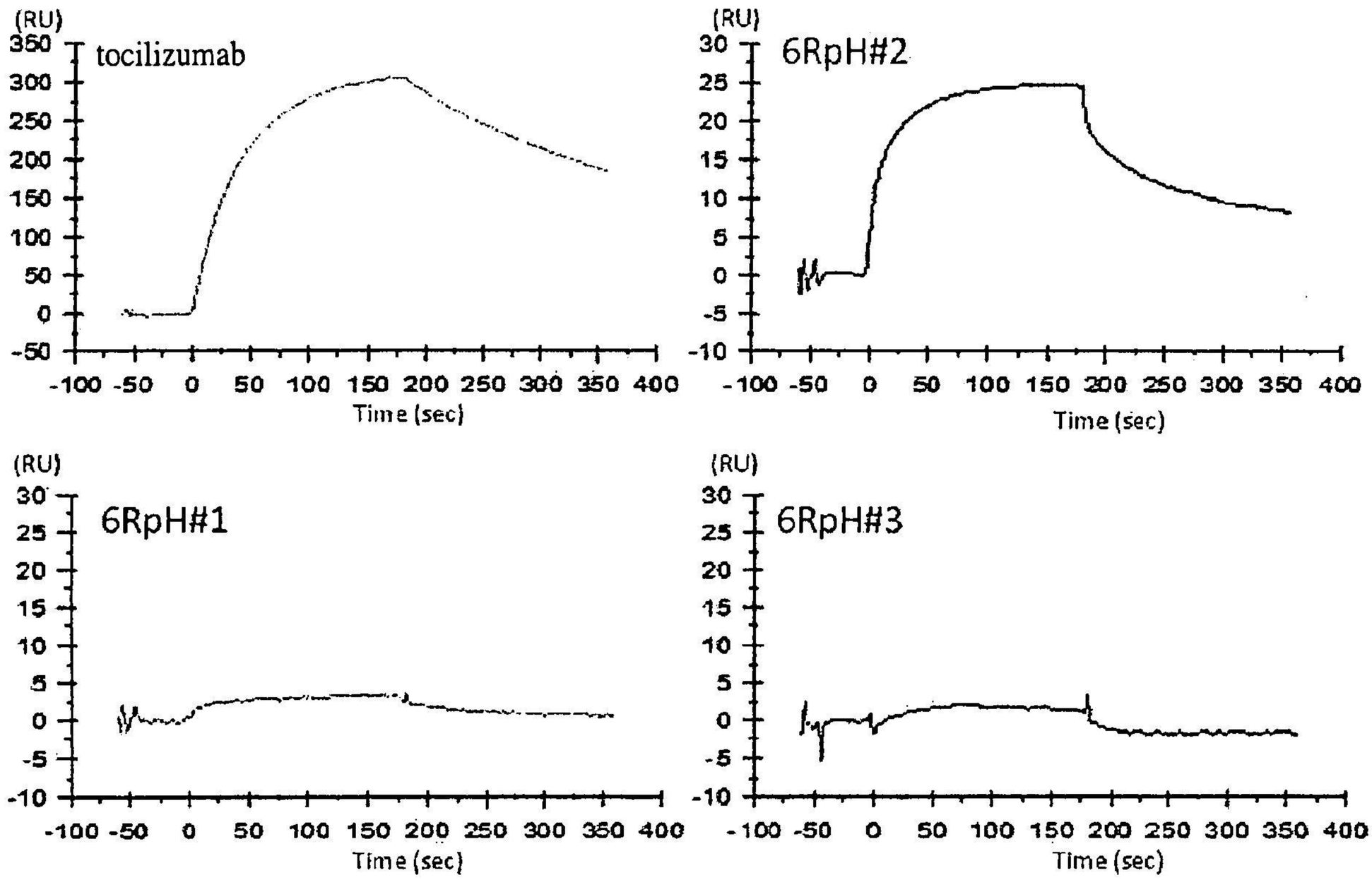

(RU)
tocilizumab
350
300
250
200
150
100
50
0
-50
-100 -50 0 50 100 150 200 250 300 350 400
Time (sec)
(RU)
6RpH#2
30
25
20
15
10
5
0
-5
-10
-100 -50 0 50 100 150 200 250 300 350 400
Time (sec)
(RU)
6RpH#1
30
25
20
15
10
5
0
-5
-10
-100 -50 0 50 100 150 200 250 300 350 400
Time (sec)
(RU)
6RpH#3
30
25
20
15
10
5
0
-5
-10
-100 -50 0 50 100 150 200 250 300 350 400
Time (sec)

圖4

圖4A

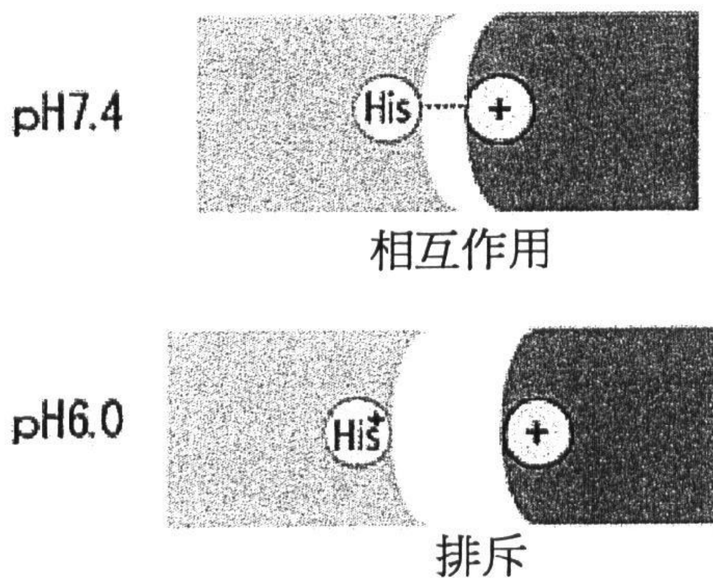


圖4B

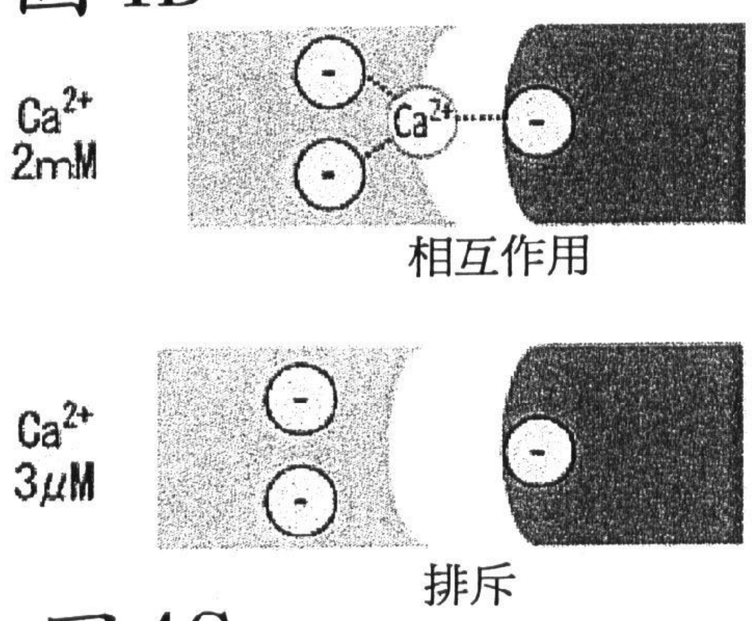


圖4C

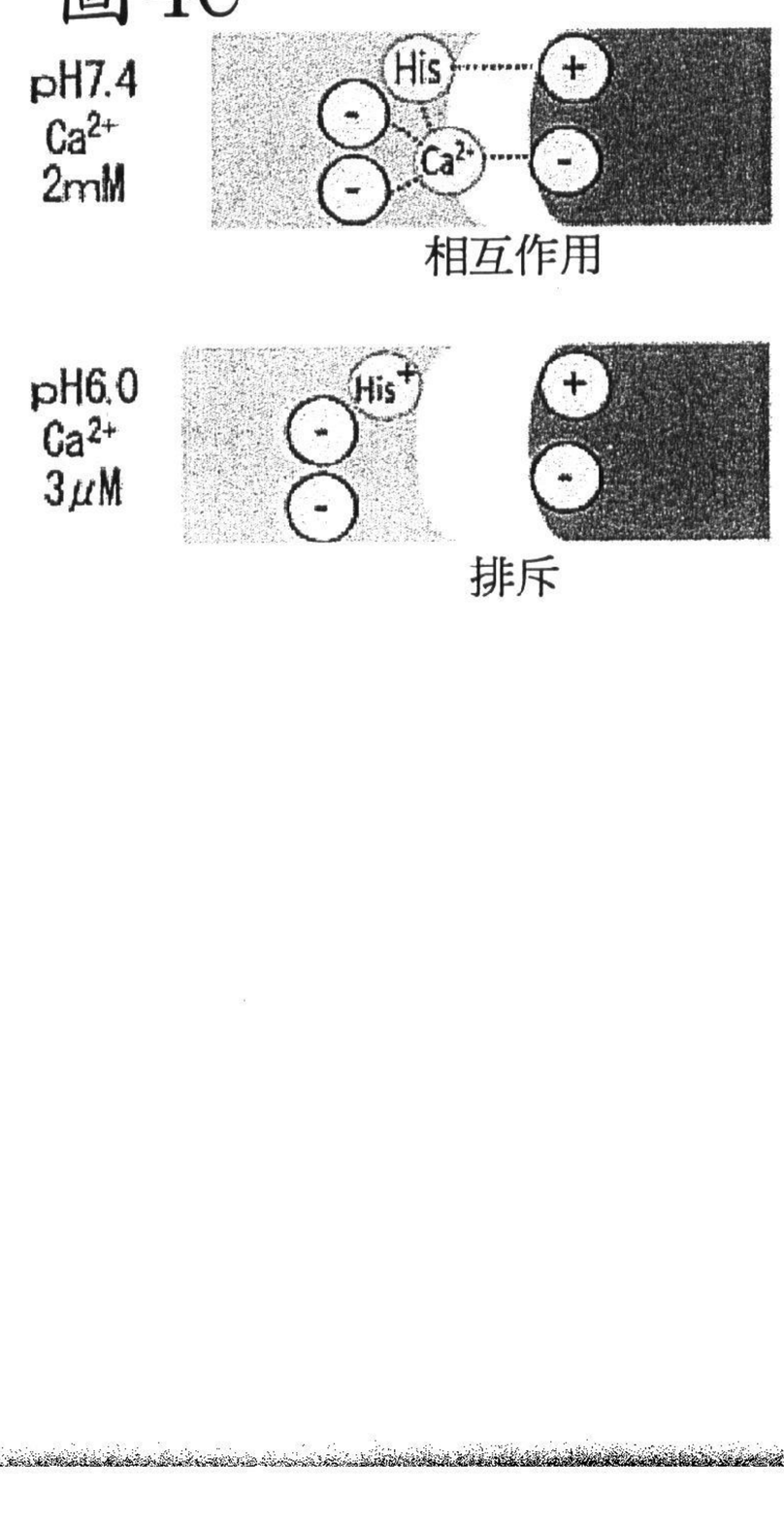


圖5

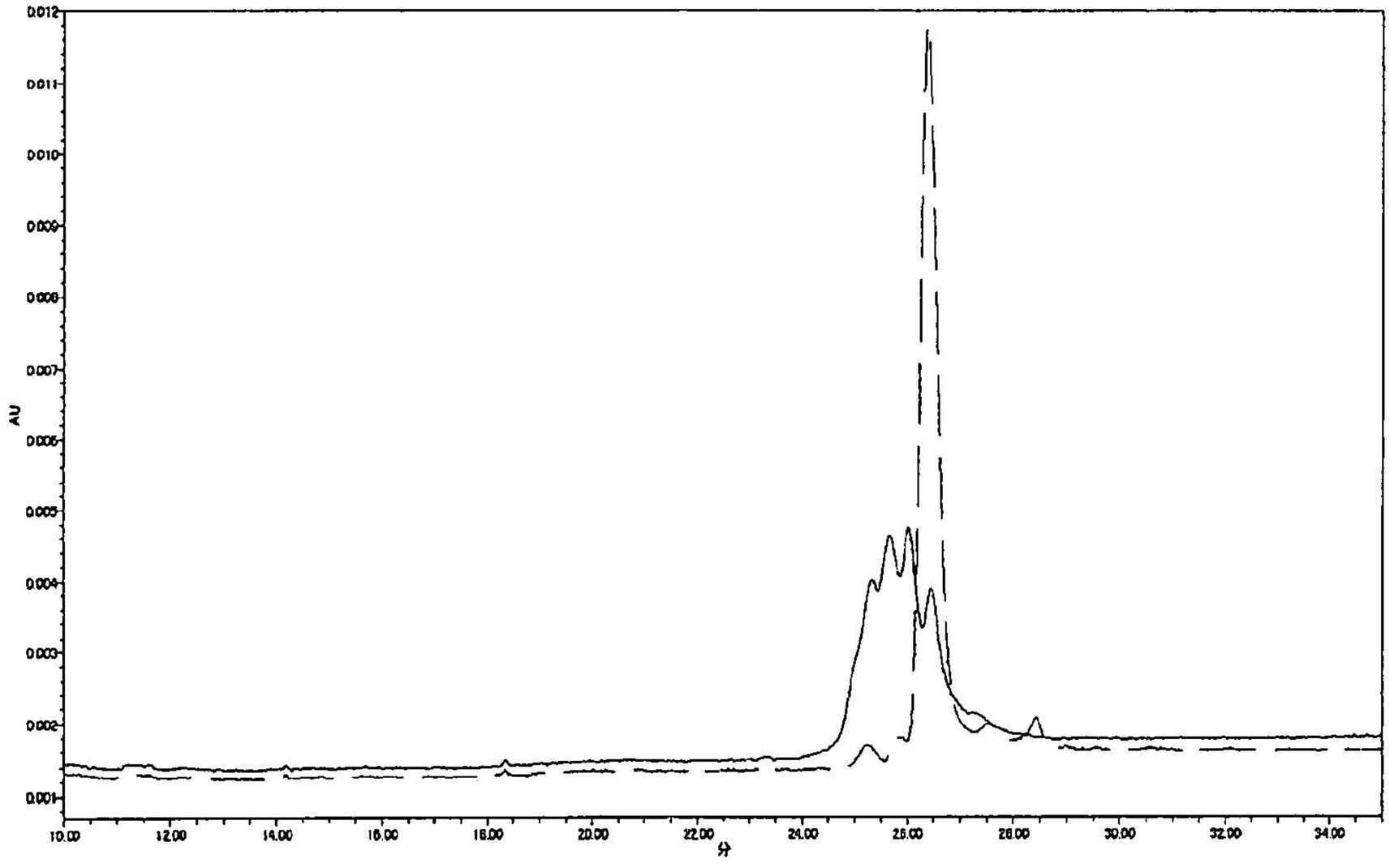

0.012
0.011
0.010
0.009
0.008
0.007
0.006
0.005
0.004
0.003
0.002
0.001
AU
10.00
12.00
14.00
16.00
18.00
20.00
22.00
24.00
26.00
28.00
30.00
32.00
34.00
分

圖6

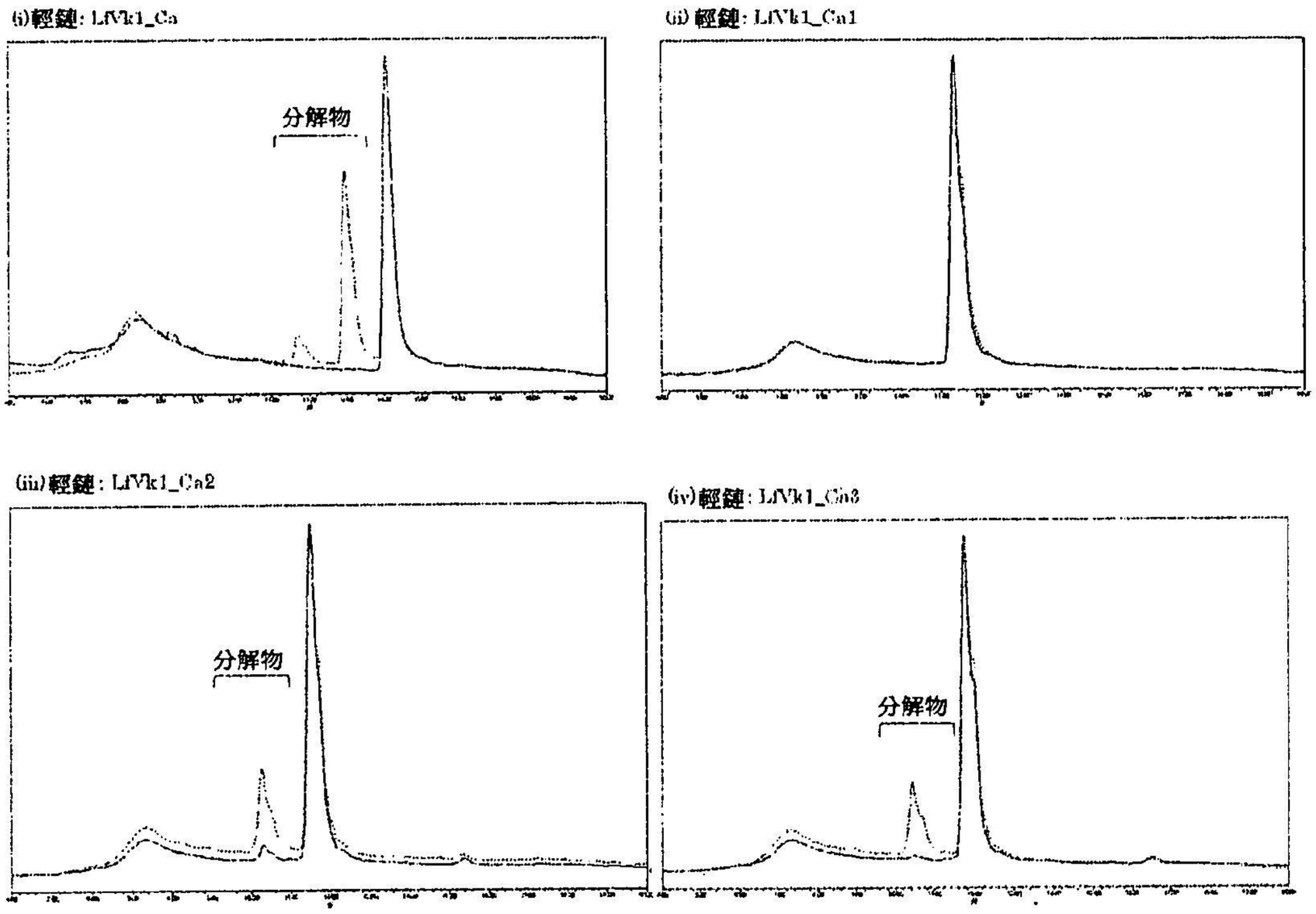
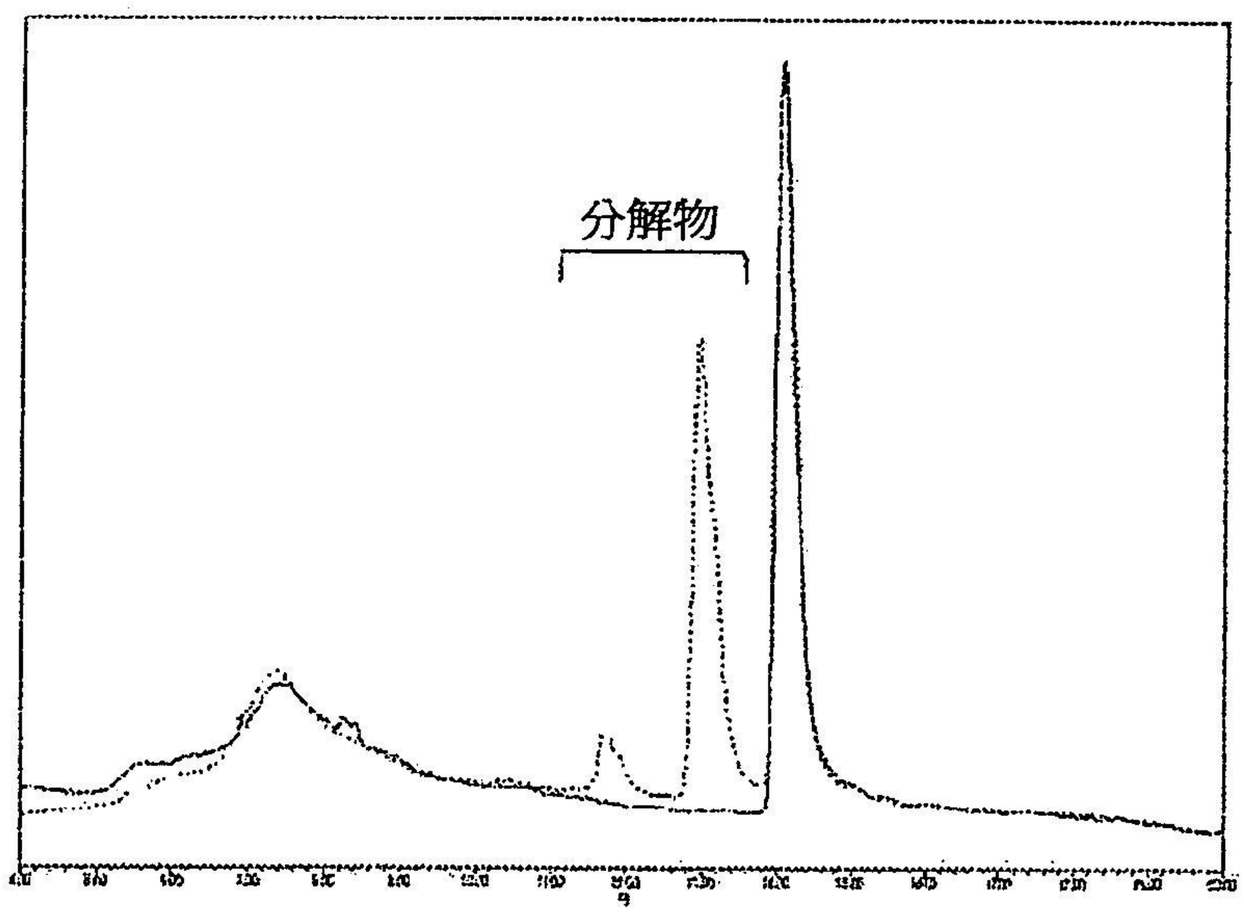

(i)輕鏈: LfVk1_Ca
分解物
(ii)輕鏈: LfVk1_Ca1
(iii)輕鏈: LfVk1_Ca2
分解物
(iv)輕鏈: LfVk1_Ca3
分解物

圖7

(i) 輕鏈：LfVk1_Ca



(ii)輕鏈：LfVk1_Ca6

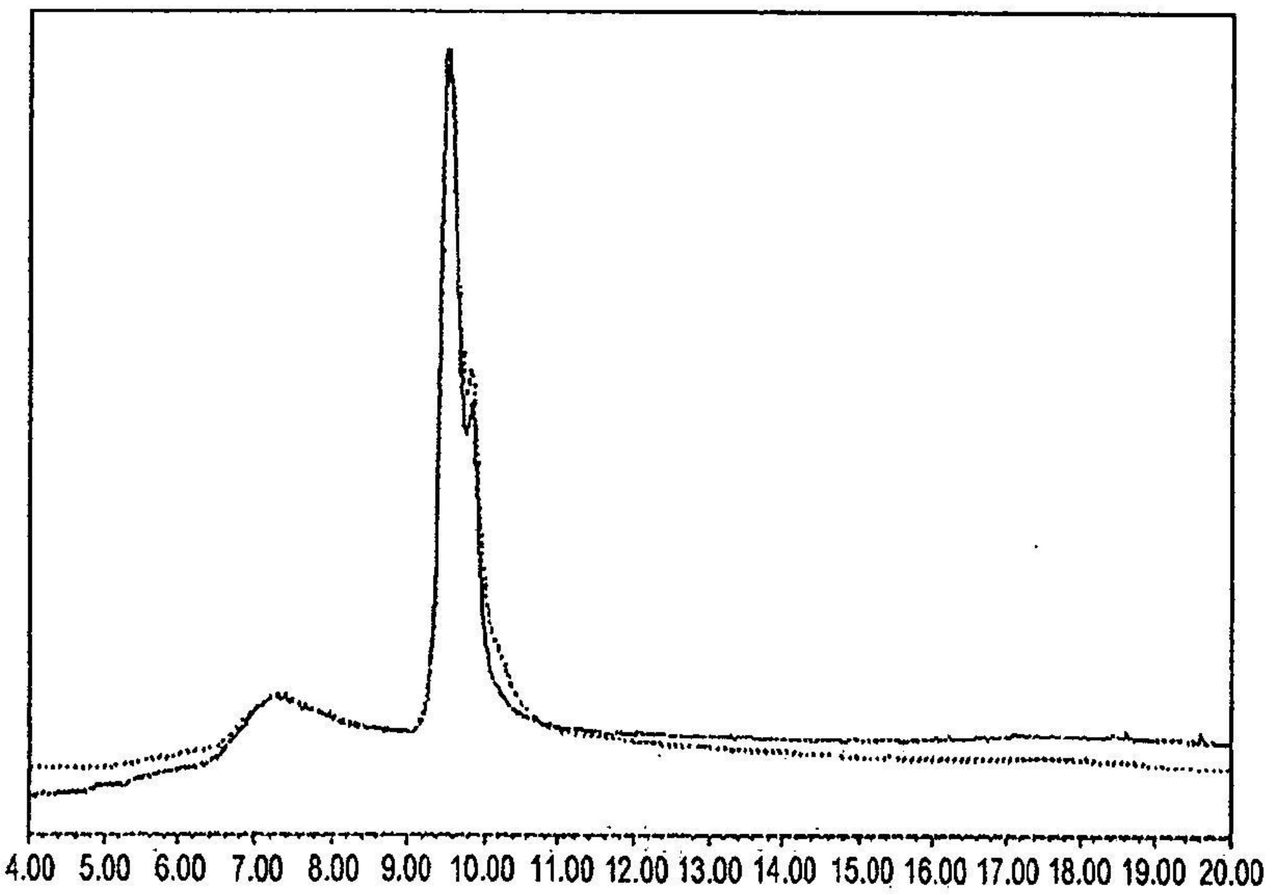


圖8

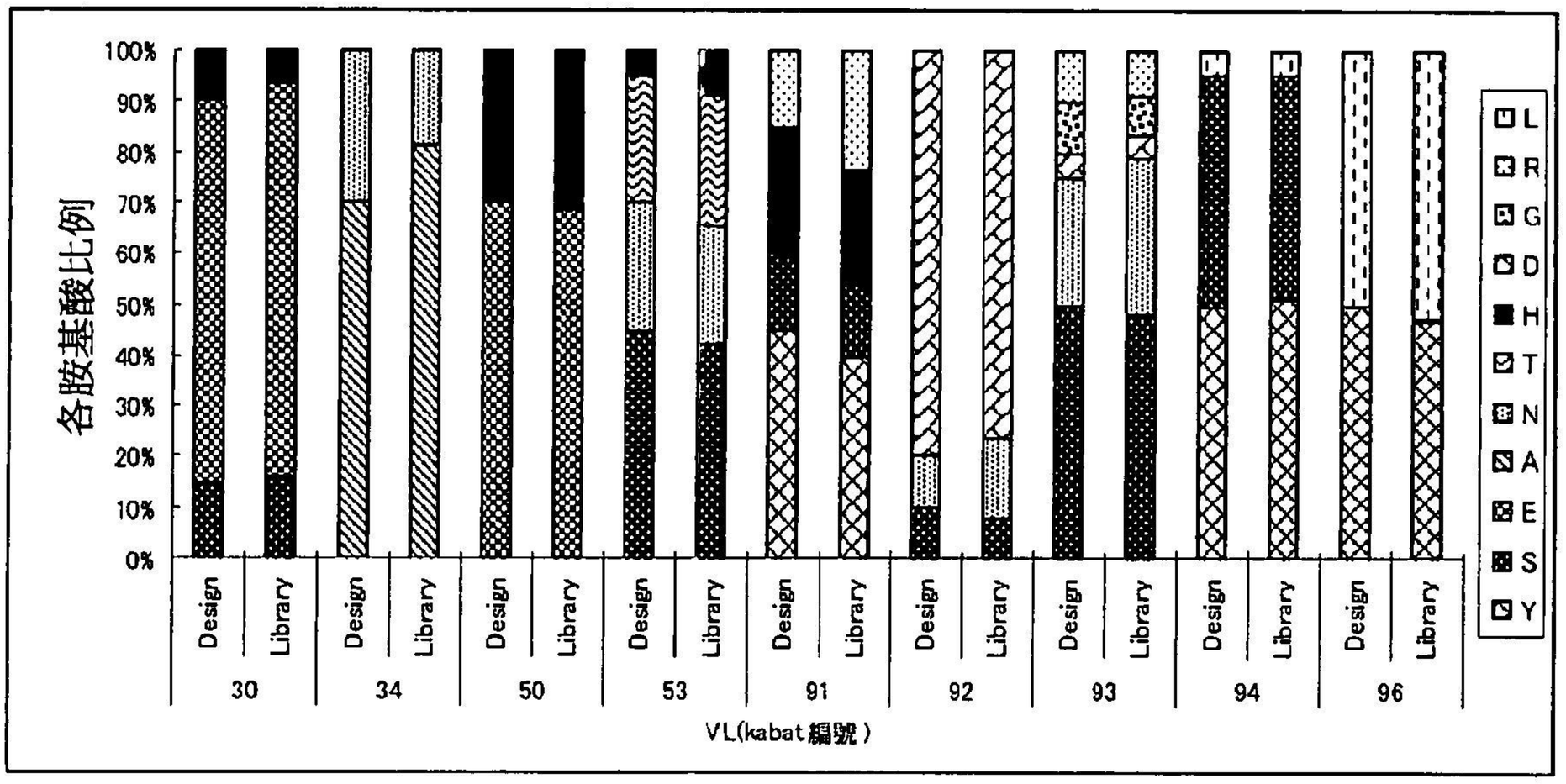
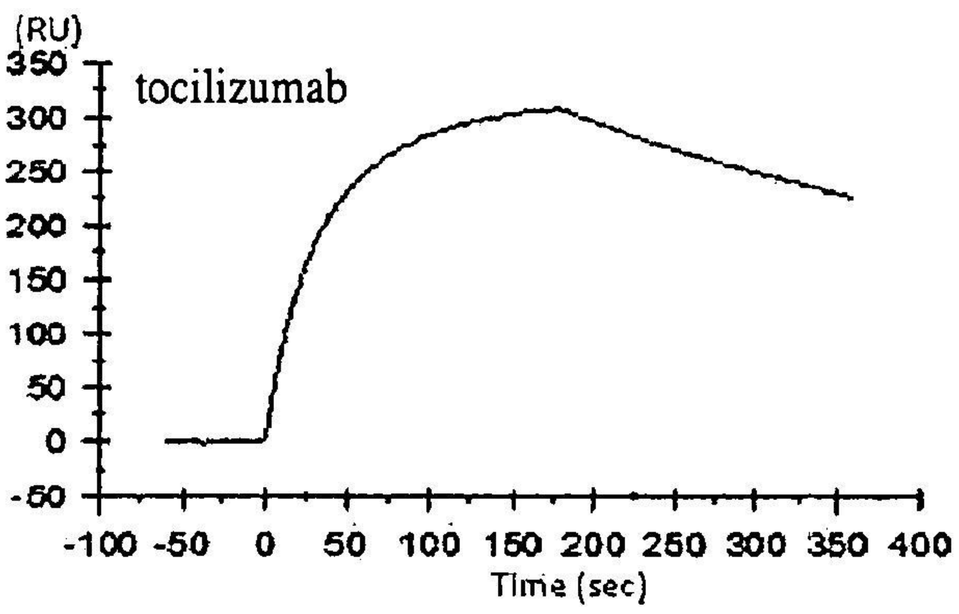
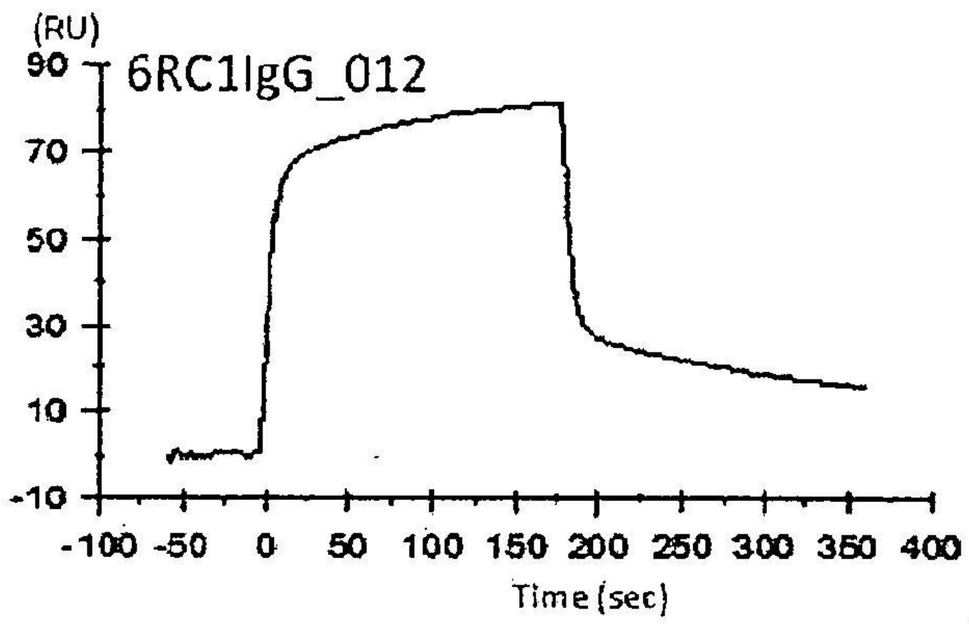
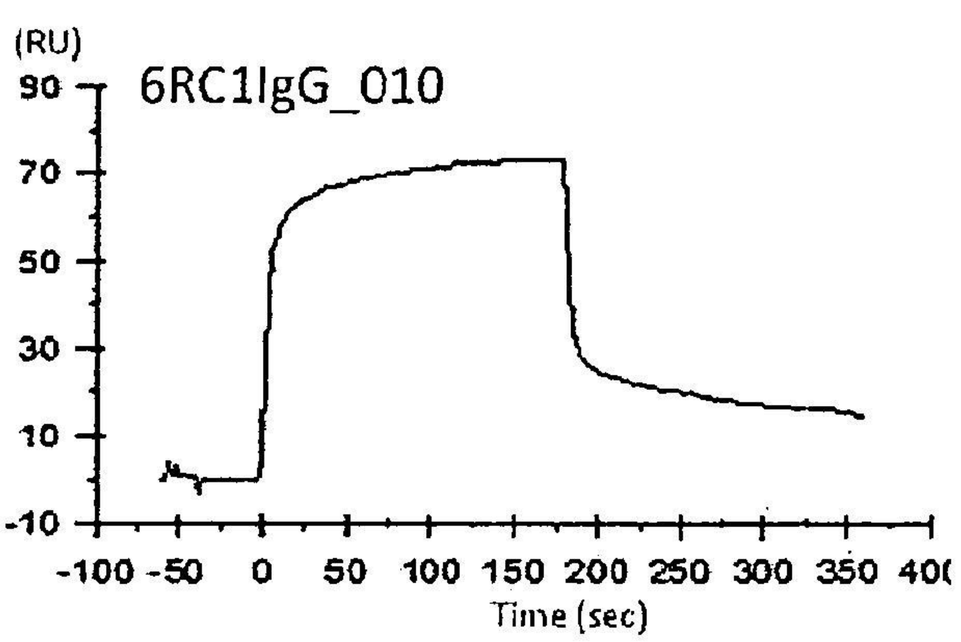

各胺基酸比例
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
Design
Library
30
34
50
53
91
92
93
94
96
VL(kabat編號)
L
R
G
D
H
T
N
A
E
S
Y

圖9


(RU)
tocilizumab
350
300
250
200
150
100
50
0
-50
-100 -50 0 50 100 150 200 250 300 350 400
Time (sec)


(RU)
6RC1IgG_012
90
70
50
30
10
-10
-100 -50 0 50 100 150 200 250 300 350 400
Time (sec)


(RU)
6RC1IgG_010
90
70
50
30
10
-10
-100 -50 0 50 100 150 200 250 300 350 400
Time (sec)

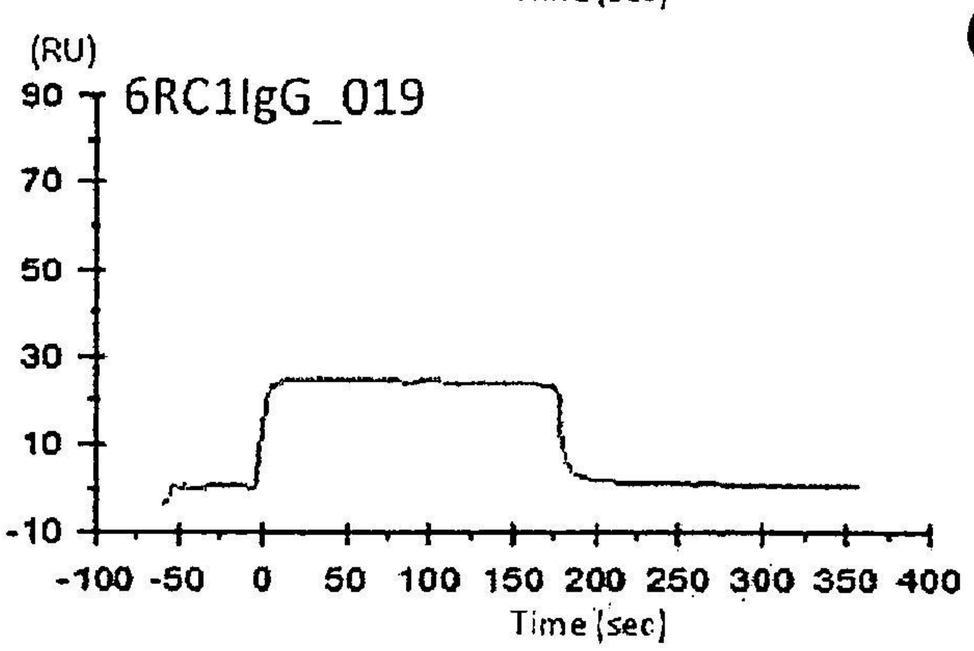

(RU)
6RC1IgG_019
90
70
50
30
10
-10
-100 -50 0 50 100 150 200 250 300 350 400
Time (sec)

圖10

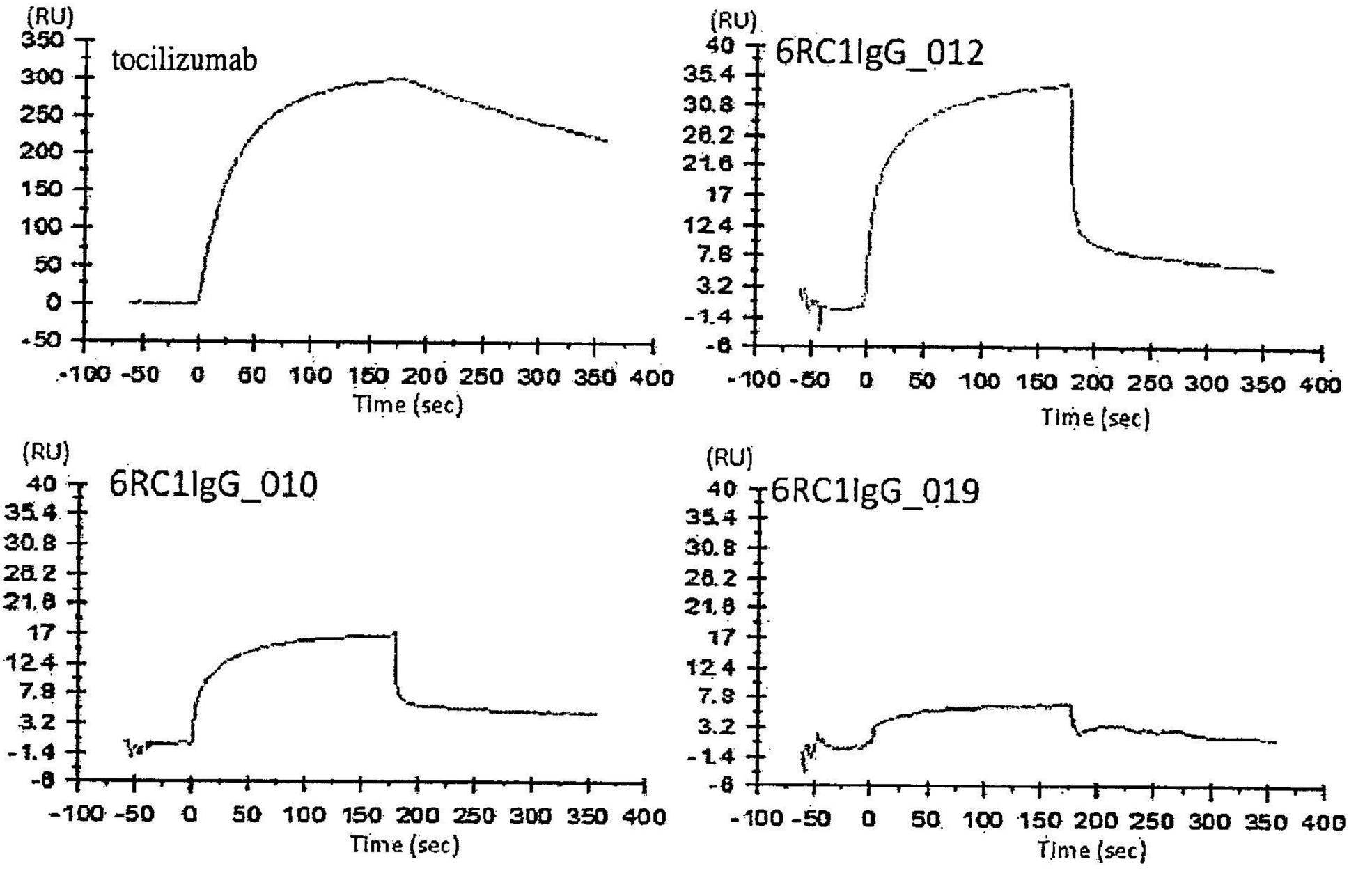
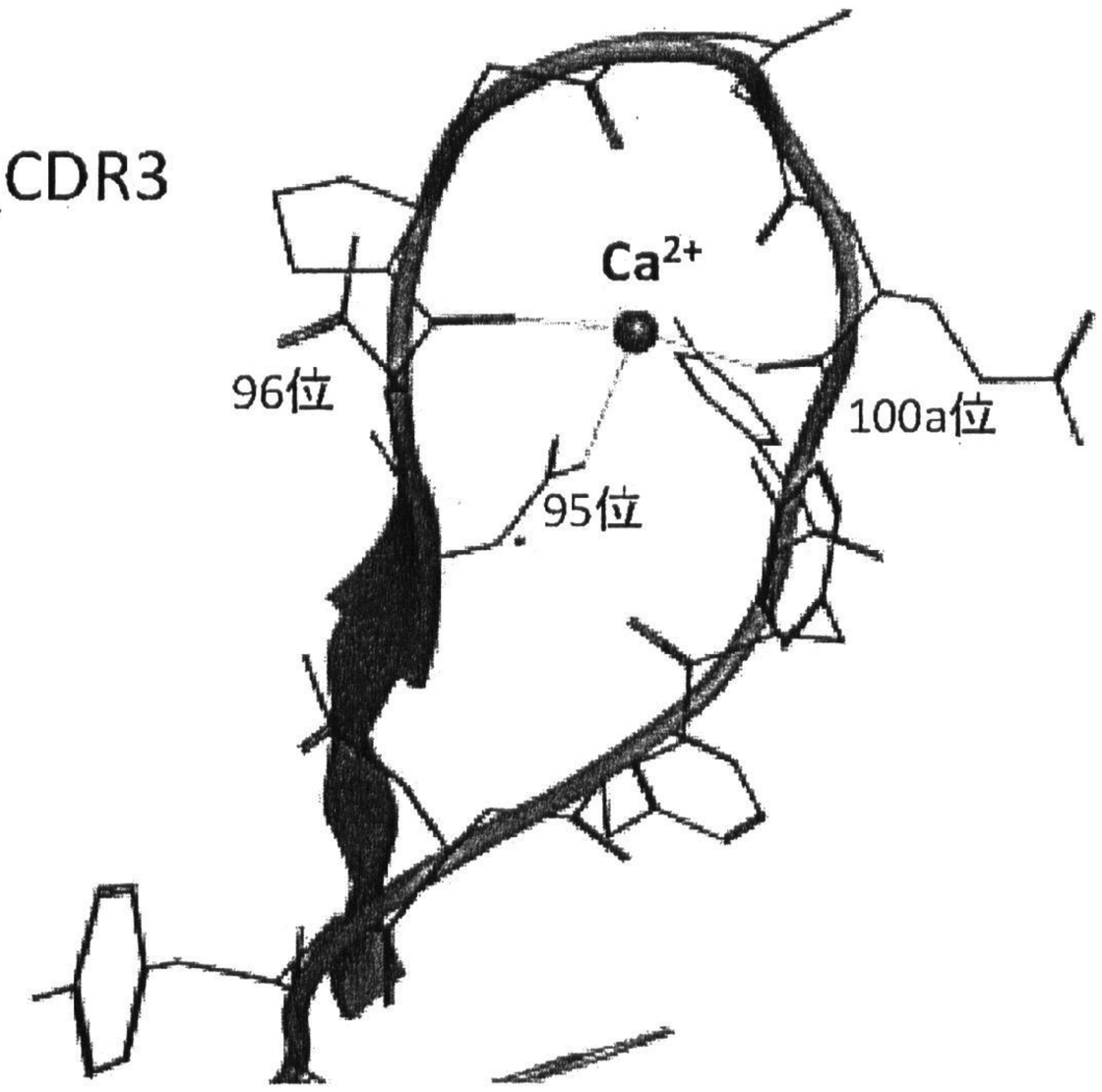

(RU)
tocilizumab
350
300
250
200
150
100
50
0
-50
-100 -50 0 50 100 150 200 250 300 350 400
Time (sec)
(RU)
6RC1IgG_012
40
35.4
30.8
26.2
21.6
17
12.4
7.8
3.2
-1.4
-6
-100 -50 0 50 100 150 200 250 300 350 400
Time (sec)
(RU)
6RC1IgG_010
40
35.4
30.8
26.2
21.8
17
12.4
7.8
3.2
-1.4
-8
-100 -50 0 50 100 150 200 250 300 350 400
Time (sec)
(RU)
6RC1IgG_019
40
35.4
30.8
26.2
21.8
17
12.4
7.8
3.2
-1.4
-6
-100 -50 0 50 100 150 200 250 300 350 400
Time (sec)

圖11

(i)鈣離子存在下之結晶構造



(ii) 鈣離子非存在下之結晶構造

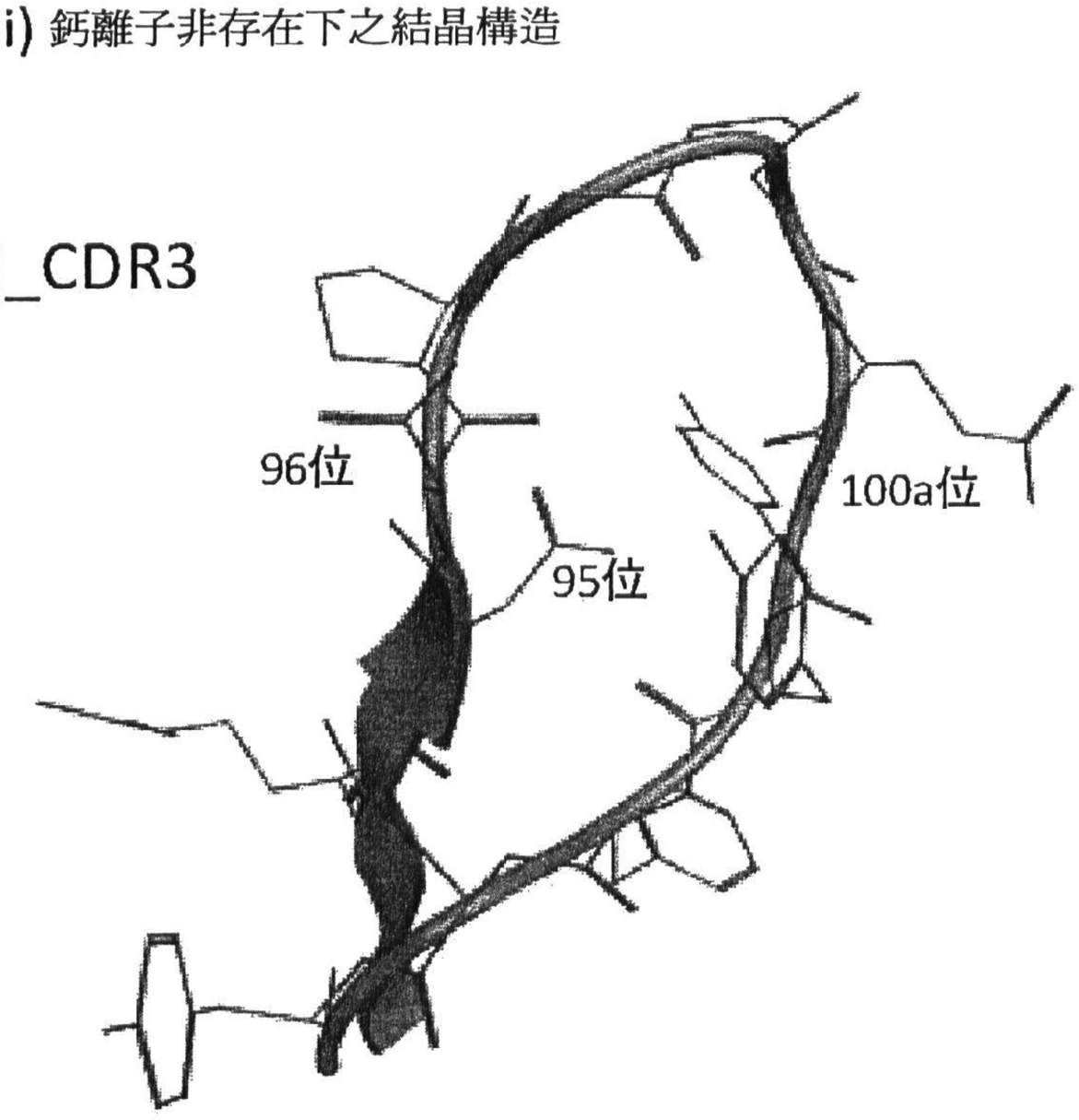
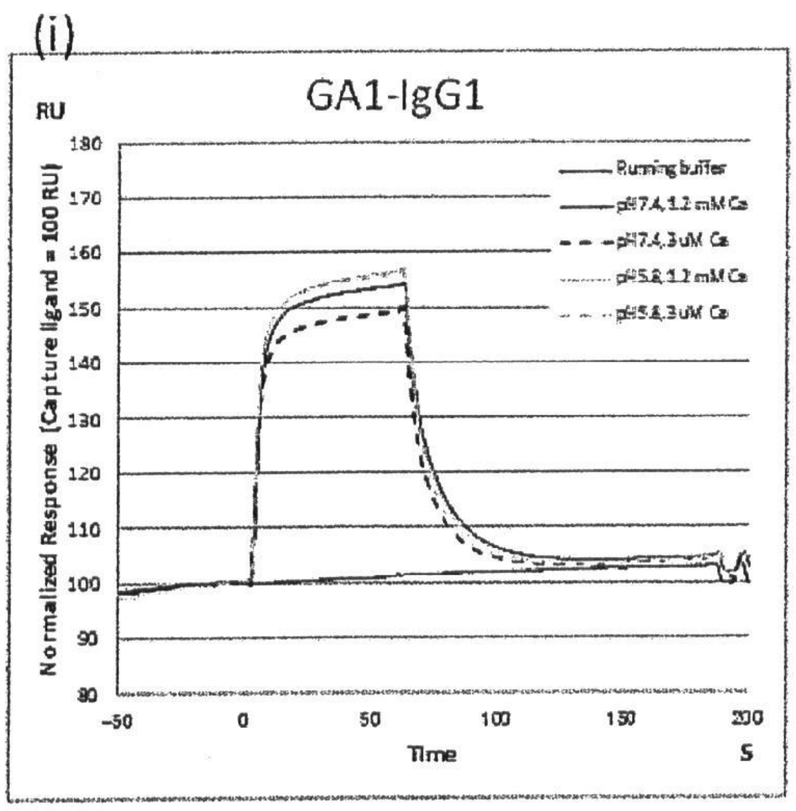
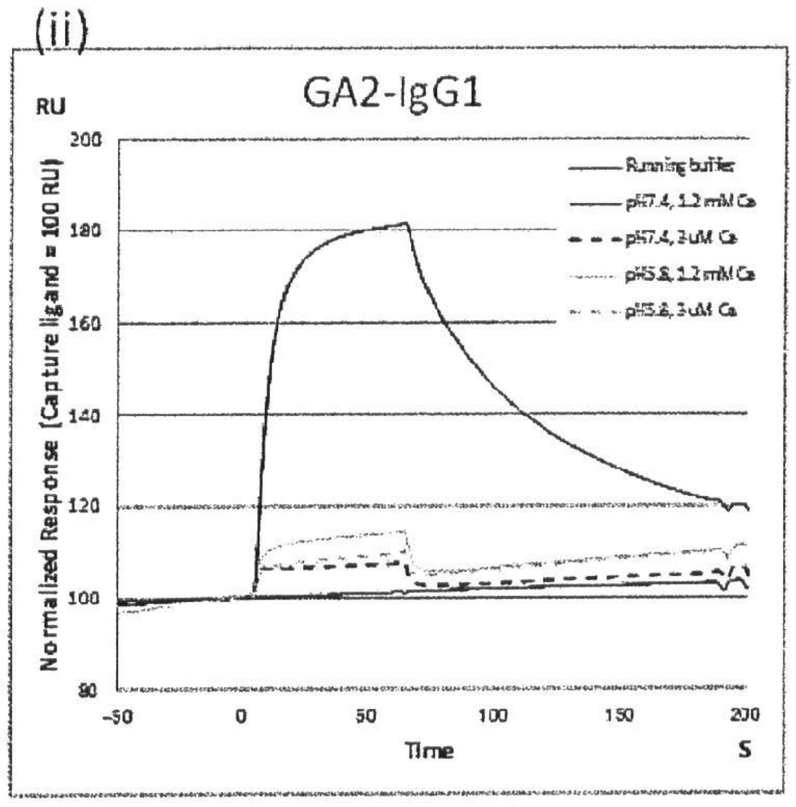
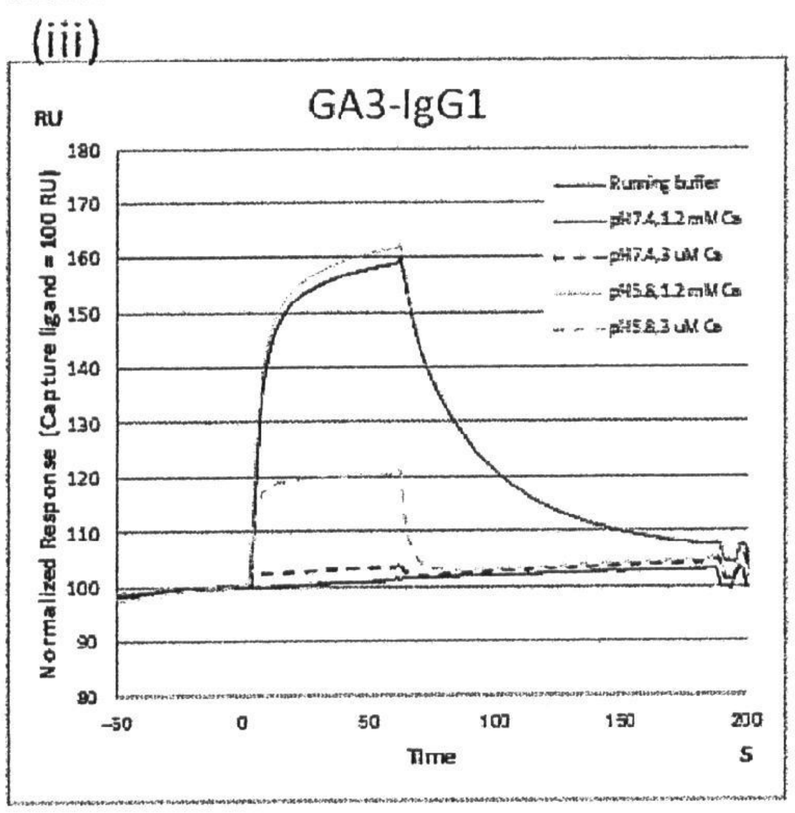


圖12


(i)
GA1-IgG1
RU
Normalized Response (Capture ligand = 100 RU)
Time
S
Running buffer
pH7.4, 1.2 mM Ca
pH7.4, 3 uM Ca
pH5.8, 1.2 mM Ca
pH5.8, 3 uM Ca


(ii)
GA2-IgG1
RU
Normalized Response (Capture ligand = 100 RU)
Time
S
Running buffer
pH7.4, 1.2 mM Ca
pH7.4, 3 uM Ca
pH5.8, 1.2 mM Ca
pH5.8, 3 uM Ca


(iii)
GA3-IgG1
RU
Normalized Response (Capture ligand = 100 RU)
Time
S
Running buffer
pH7.4, 1.2 mM Ca
pH7.4, 3 uM Ca
pH5.8, 1.2 mM Ca
pH5.8, 3 uM Ca

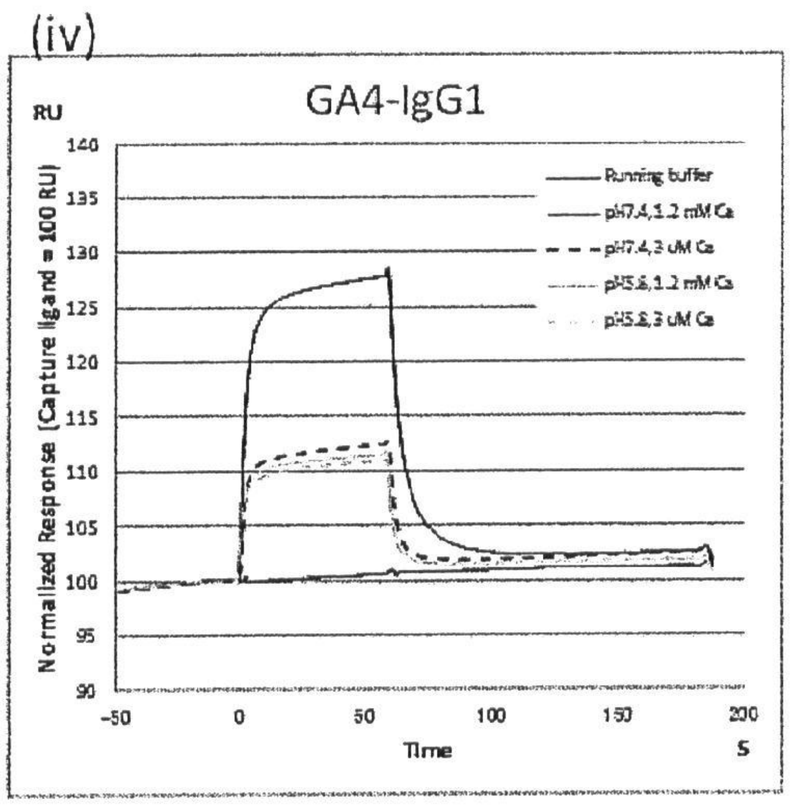
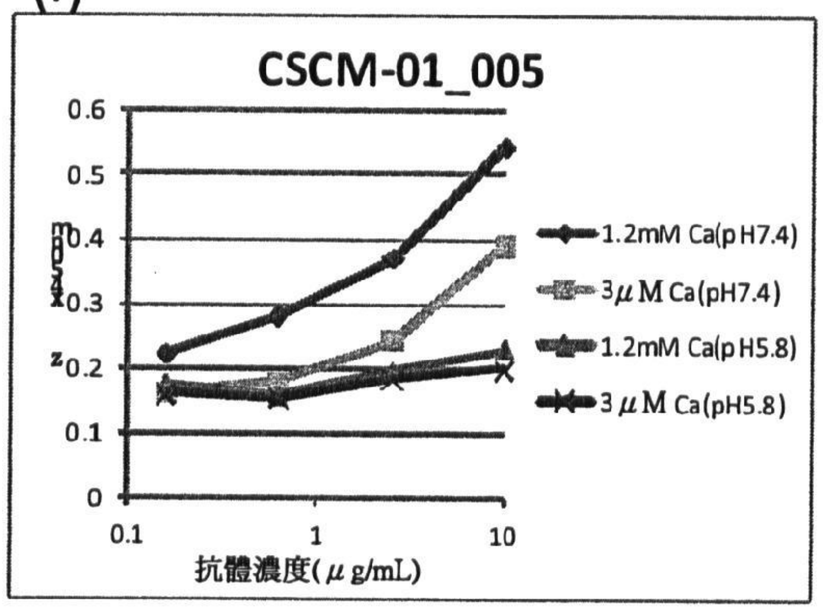
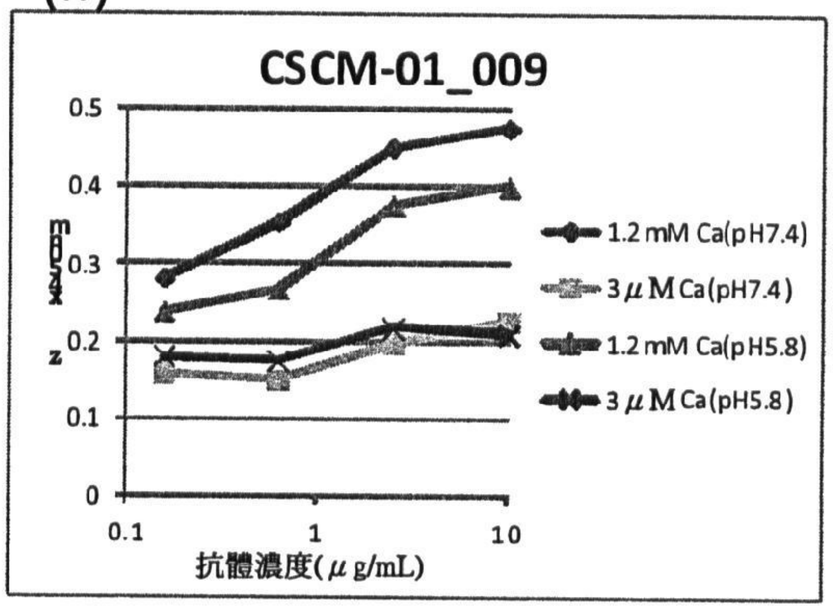

(iv)
GA4-IgG1
RU
Normalized Response (Capture ligand = 100 RU)
Time
S
Running buffer
pH7.4, 1.2 mM Ca
pH7.4, 3 uM Ca
pH5.8, 1.2 mM Ca
pH5.8, 3 uM Ca

圖13

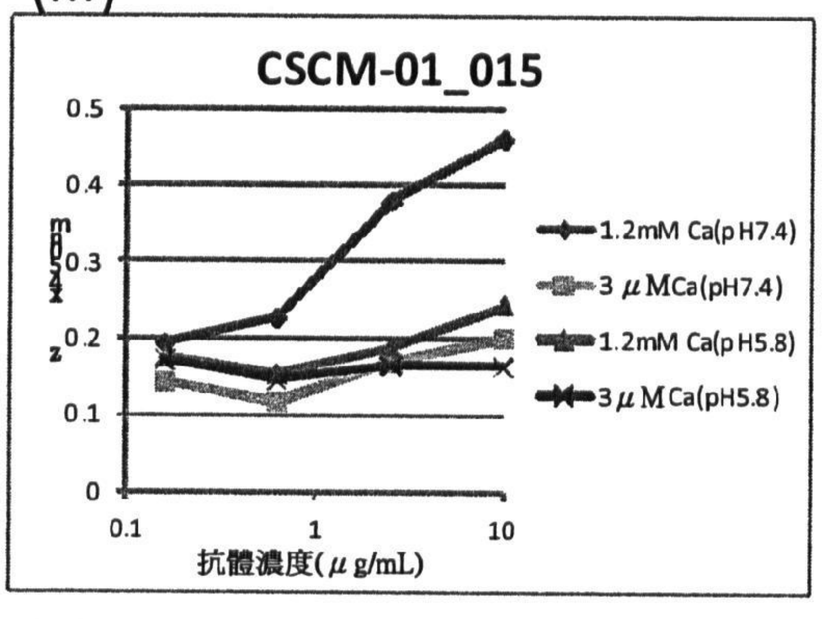
(i)



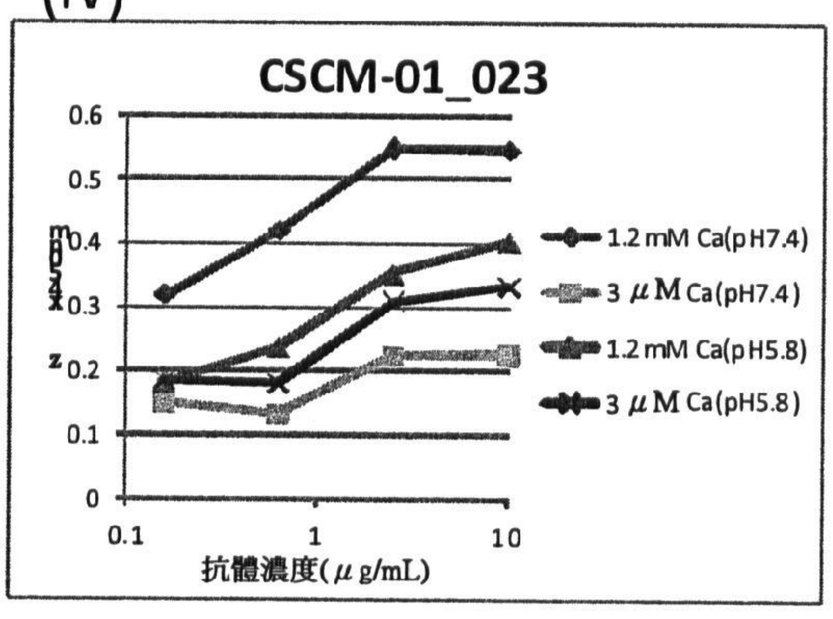
(ii)



(iii)



(iv)



(v)

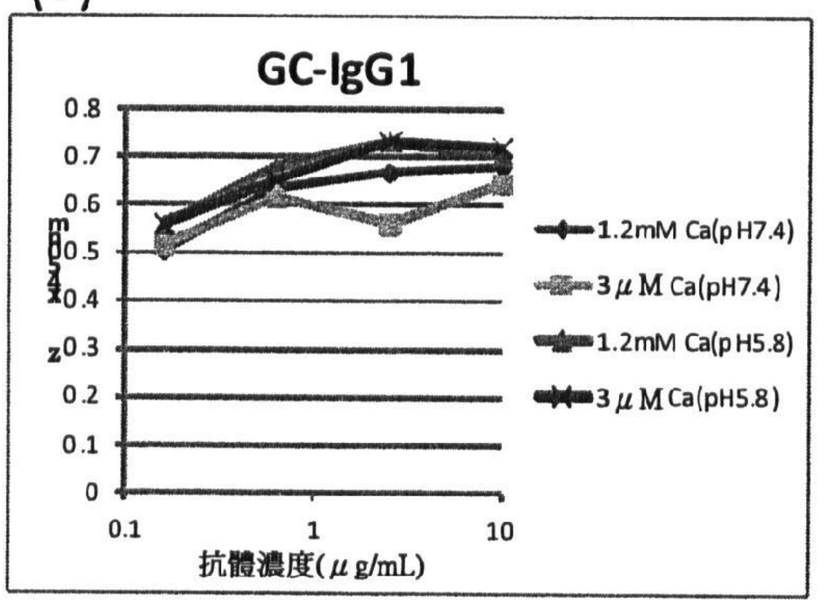
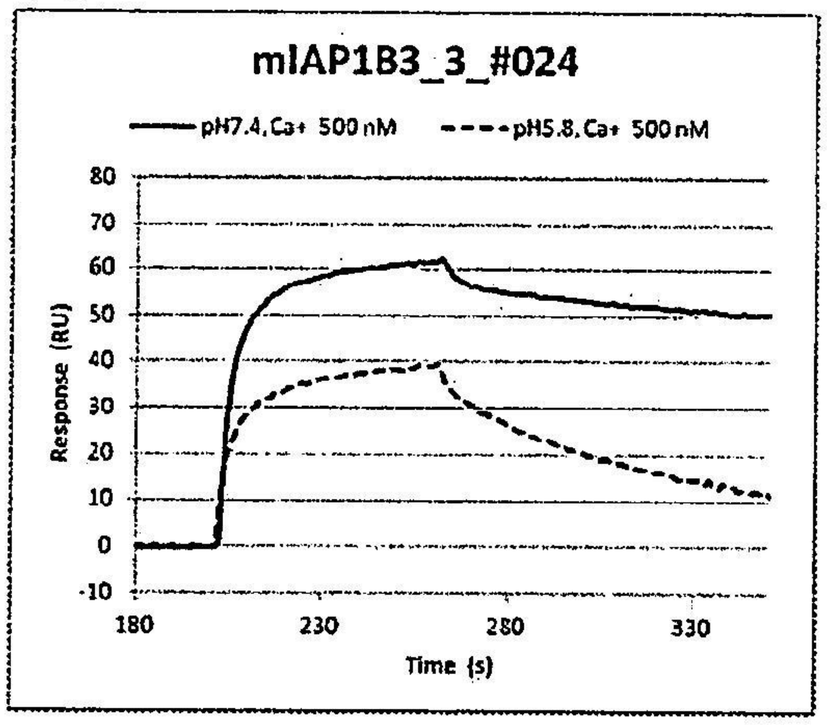
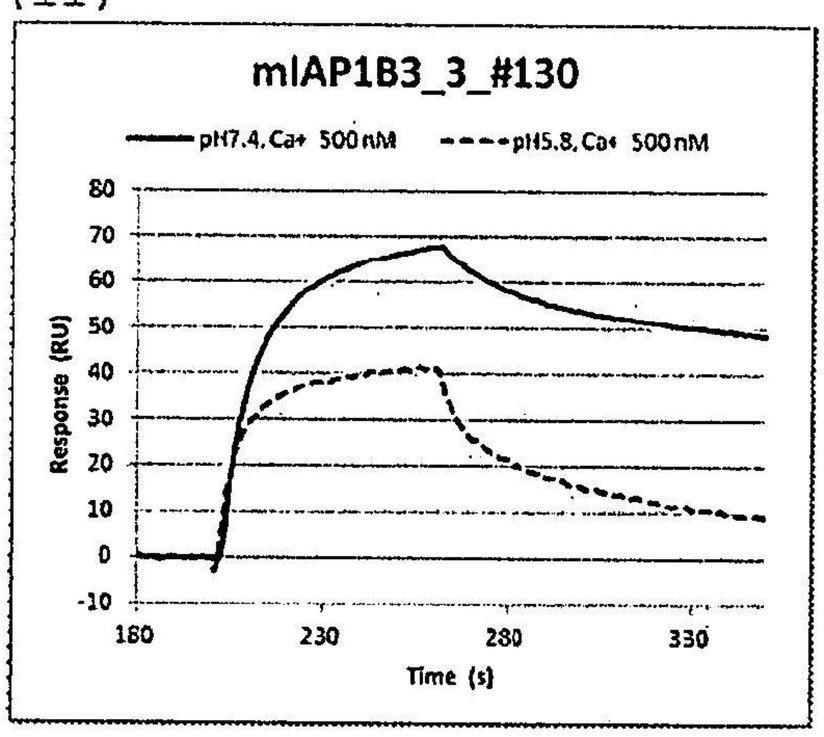


圖14

(i)


mIAP1B3_3_#024
pH7.4, Ca+ 500 nM
pH5.8, Ca+ 500 nM
Response (RU)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
180
230
280
330
Time (s)

(ii)


mIAP1B3_3_#130
pH7.4, Ca+ 500 nM
pH5.8, Ca+ 500 nM
Response (RU)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
180
230
280
330
Time (s)

(iii)

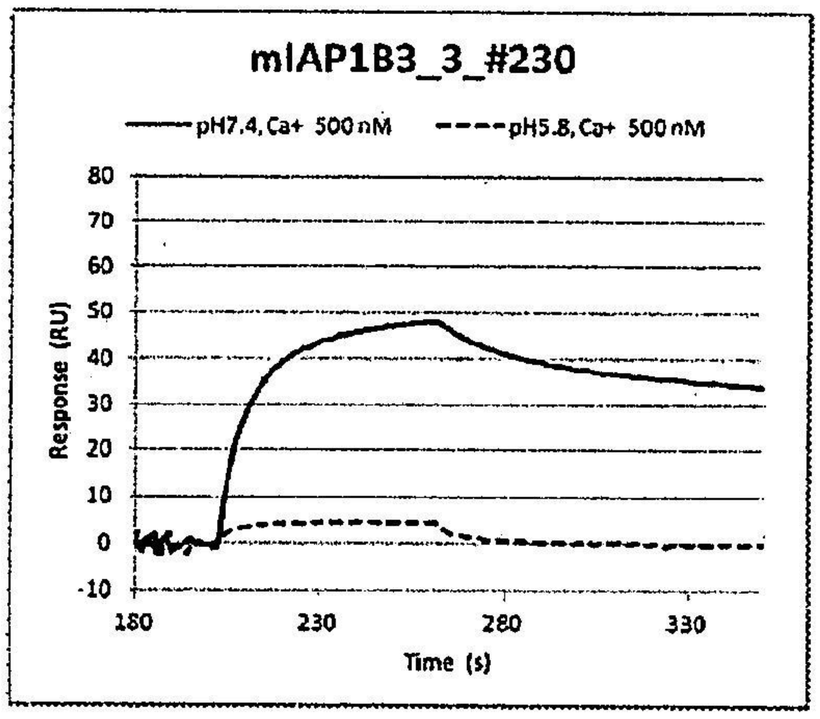
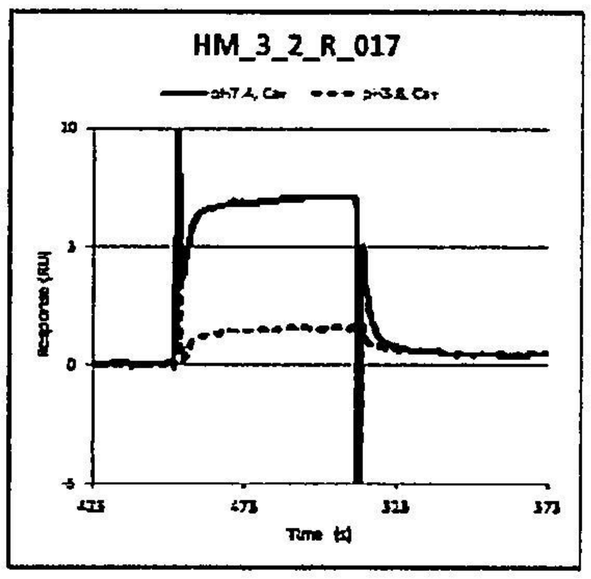
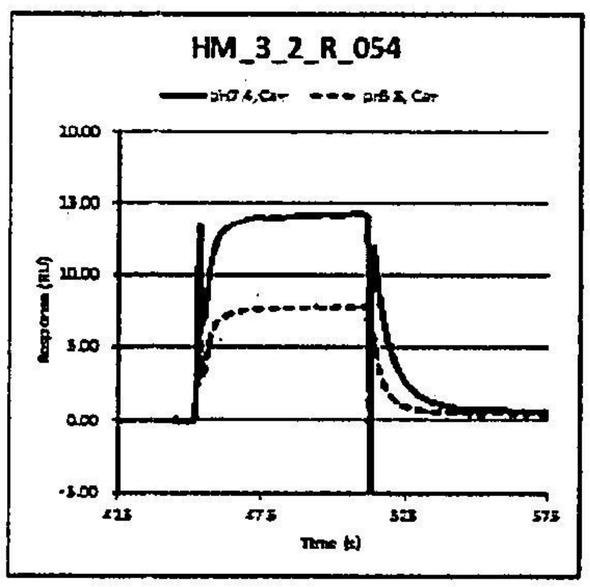

mIAP1B3_3_#230
pH7.4, Ca+ 500 nM
pH5.8, Ca+ 500 nM
Response (RU)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
180
230
280
330
Time (s)

圖15

(i)



(ii)



(iii)

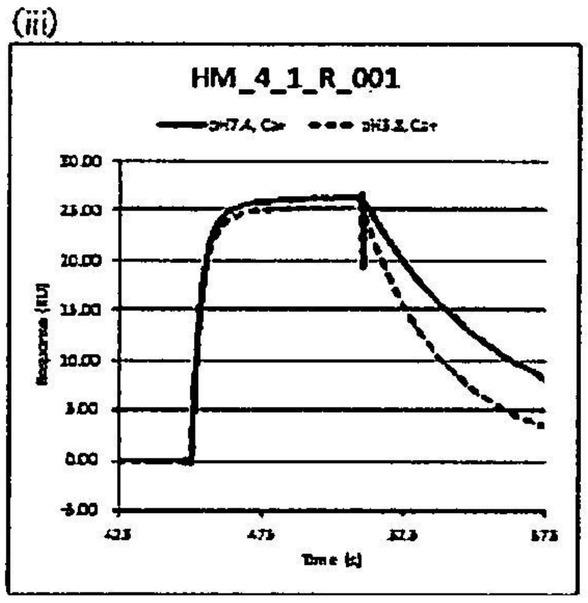


圖16

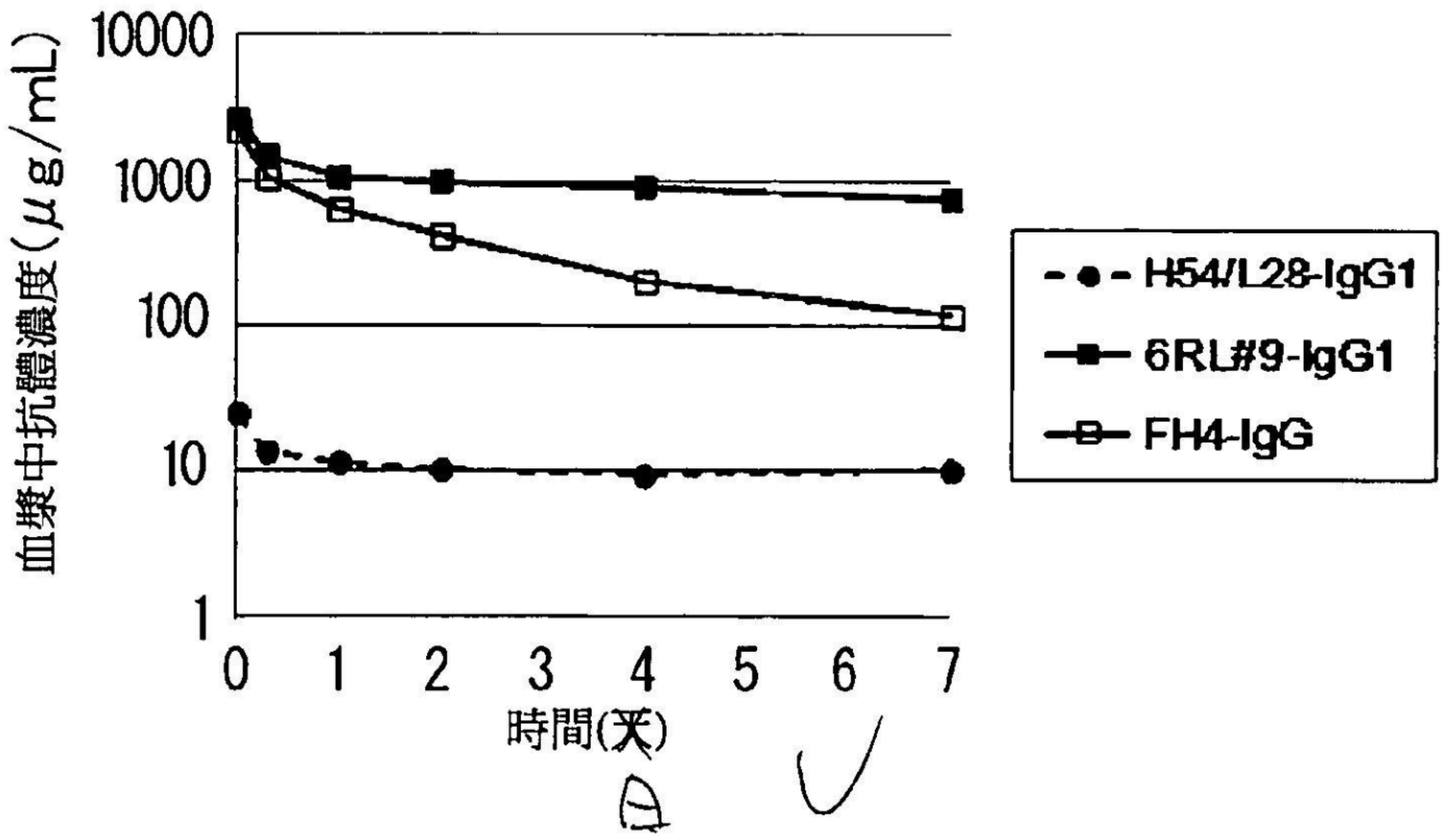


圖17

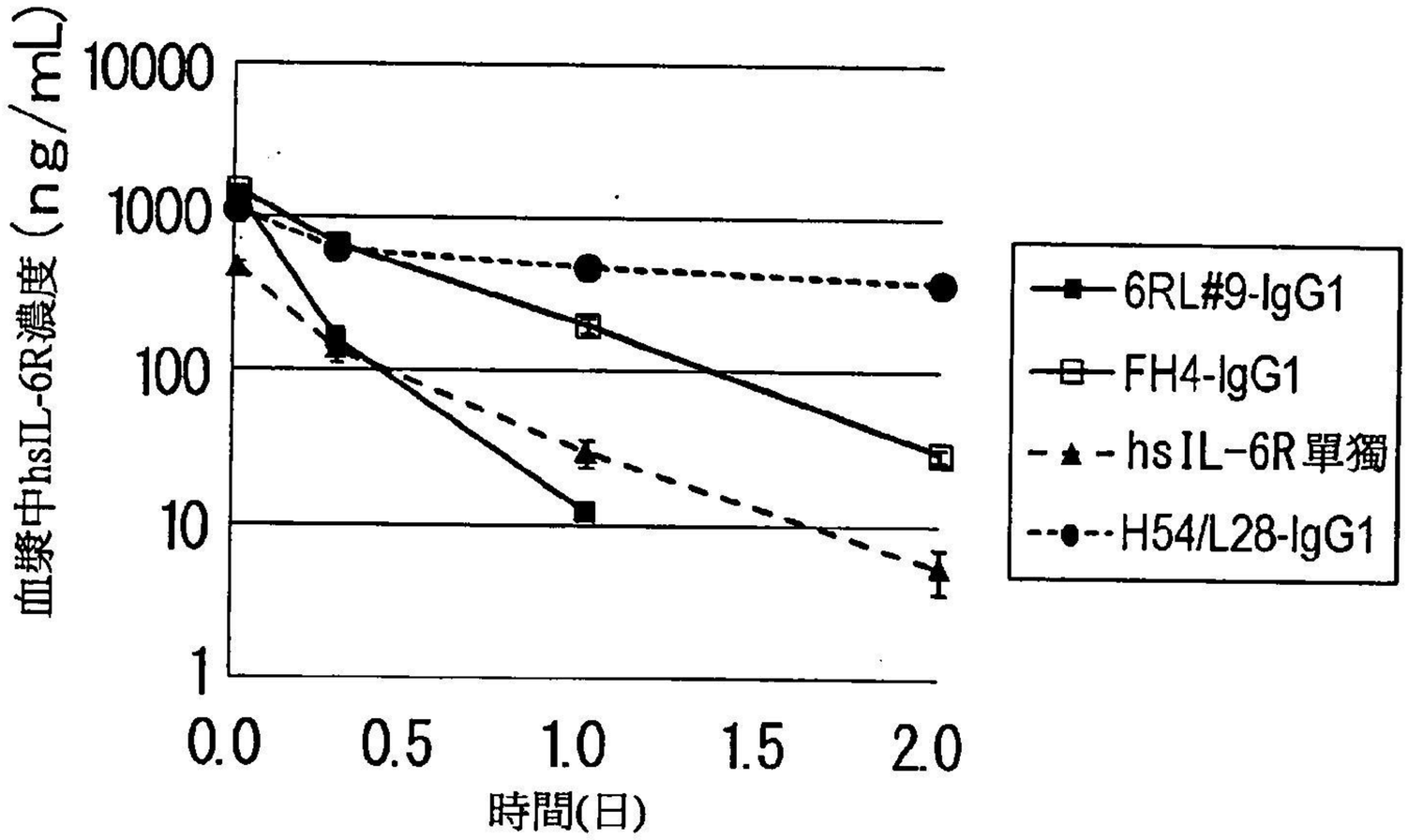

血漿中hsIL-6R濃度(ng/mL)
10000
1000
100
10
1
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
時間(日)
6RL#9-IgG1
FH4-IgG1
hsIL-6R單獨
H54/L28-IgG1

圖18

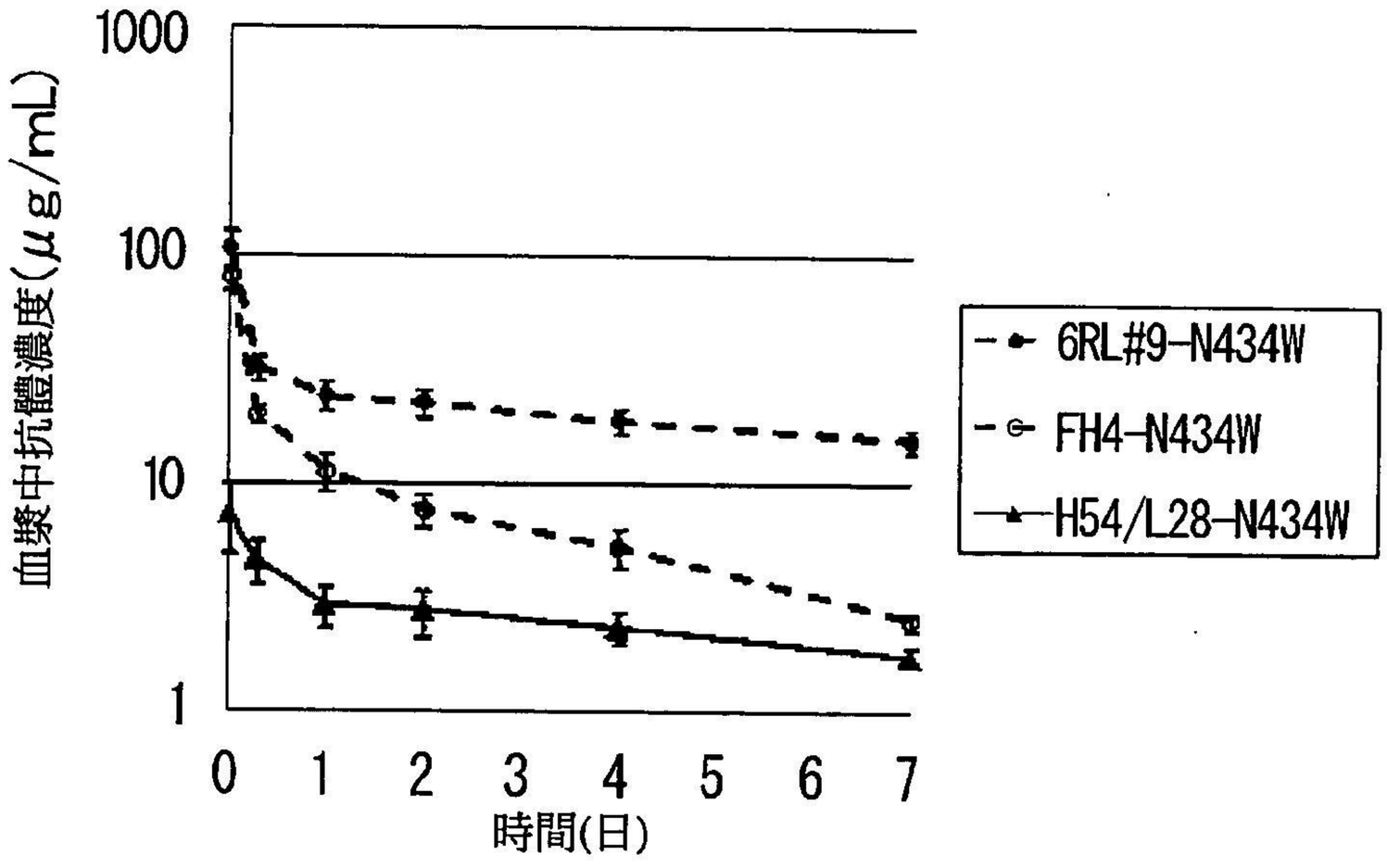
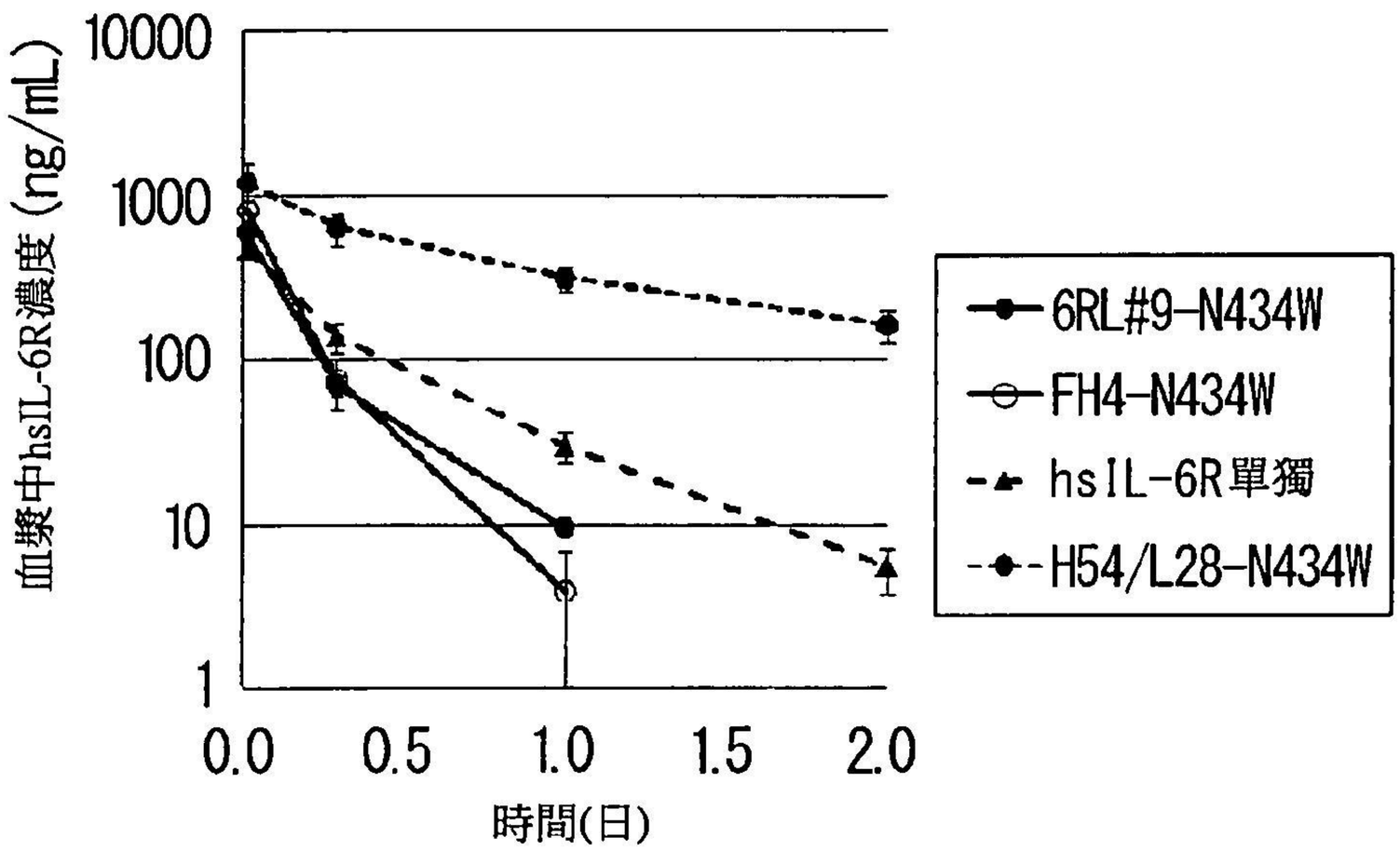

血漿中抗體濃度(μg/mL)
1000
100
10
1
0
1
2
3
4
5
6
7
時間(日)
6RL#9-N434W
FH4-N434W
H54/L28-N434W

圖19


10000
1000
100
10
1
血漿中hsIL-6R濃度(ng/mL)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
時間(日)
6RL#9-N434W
FH4-N434W
hsIL-6R單獨
H54/L28-N434W