202028238

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202028238 A

(43)公開日： 中華民國 109 (2020) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：108135110 (22)申請日： 中華民國 108 (2019) 年 09 月 27 日

(51)Int. Cl.： *C07K16/28 (2006.01)* *C07K16/30 (2006.01)*
C07K16/46 (2006.01) *C12N1/15 (2006.01)*
C12N1/19 (2006.01) *C12N1/21 (2006.01)*
C12N5/10 (2006.01) *C12N15/13 (2006.01)*
C12P21/08 (2006.01)

(30)優先權：2018/09/28 日本 2018-185120
2019/06/04 日本 2019-104308

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

(72)發明人：何　菽文 HO, SHU WEN SAMANTHA (SG) ；馮舒 FENG, SHU (CN)

(74)代理人：洪澄文

申請實體審查：無　申請專利範圍項數：15 項　圖式數：30　　共 522 頁

(54)名稱

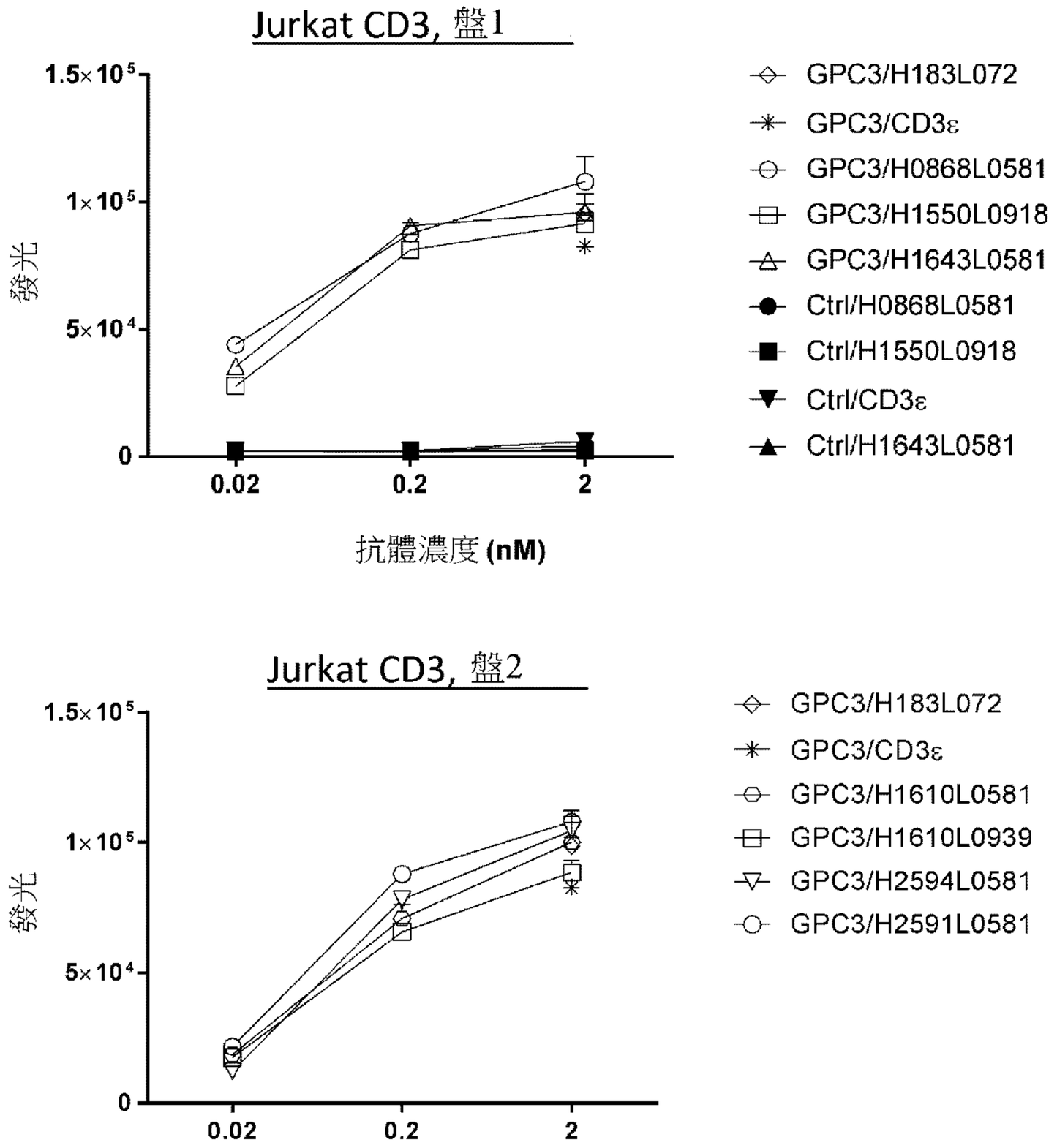
能夠結合 CD3 及 CD137 但不同時結合兩者的抗原結合分子

(57)摘要

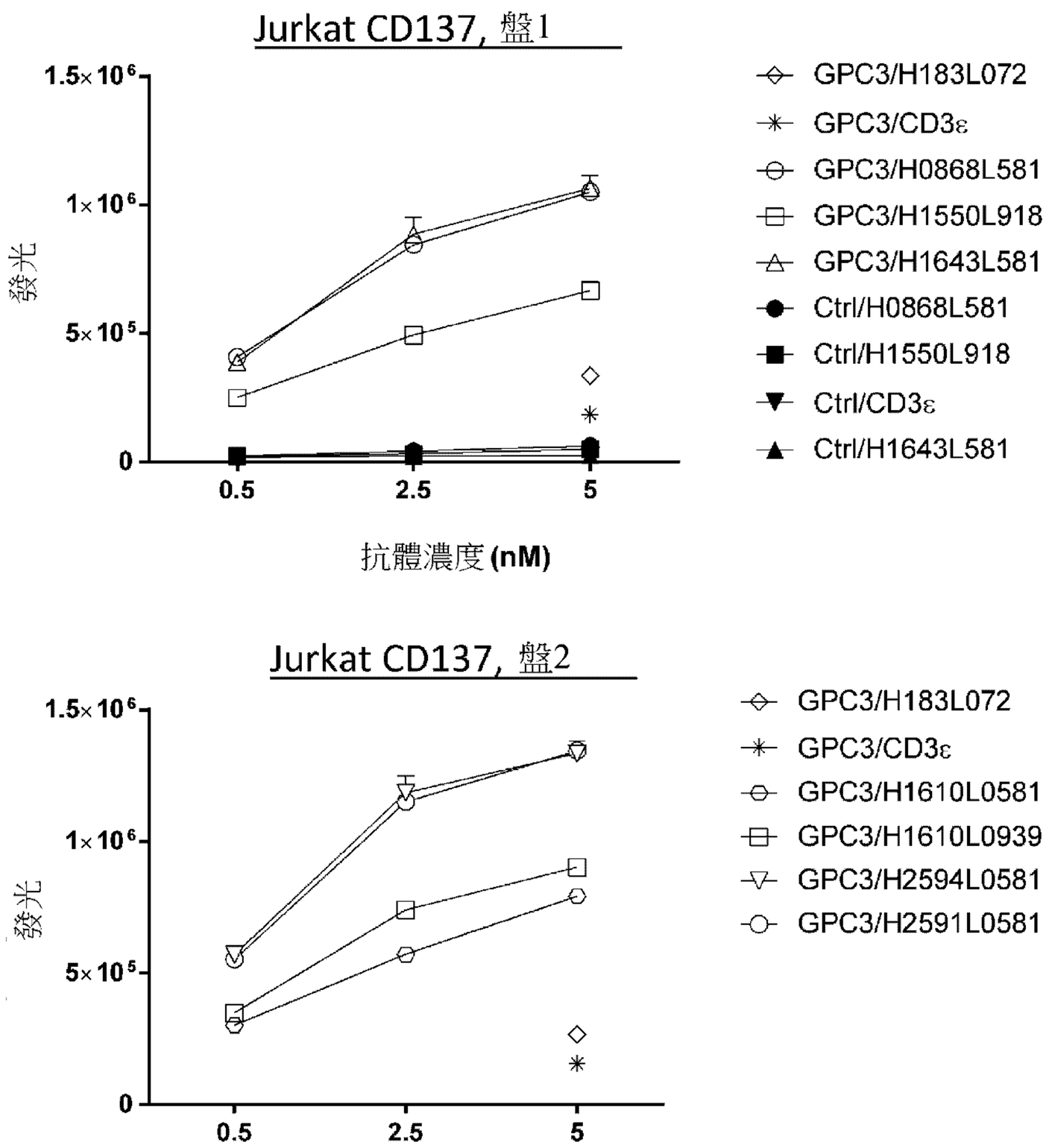
本發明關於結合至 CD3 及 CD137(4-1BB)的抗原結合分子；包含該抗原結合分子的組成物；以及其使用方法。本發明提供抗原結合分子包含: 能夠結合至 CD3 及 CD137(4-1BB)但不同時結合兩者的抗體可變區；以及結合至不同於 CD3 及 CD137 的第三抗原的可變區。該抗原結合分子經由結合至三個不同抗原，展現由這些抗原結合分子所誘發之增強的 T 細胞依賴性細胞毒性活性。

The present invention relates to antigen-binding molecules binding to CD3 and CD137 (4-1BB); compositions comprising the antigen-binding molecule; and methods of using the same. The present invention provides antigen-binding molecules comprising: an antibody variable region that is capable of binding to CD3 and CD137 (4-1BB), but does not bind to CD3 and CD137 at the same time; and a variable region binding to a third antigen different from CD3 and CD137. Such antigen binding molecules exhibit enhanced T-cell dependent cytotoxity activity induced by these antigen-binding molecules through binding to the three different antigens.

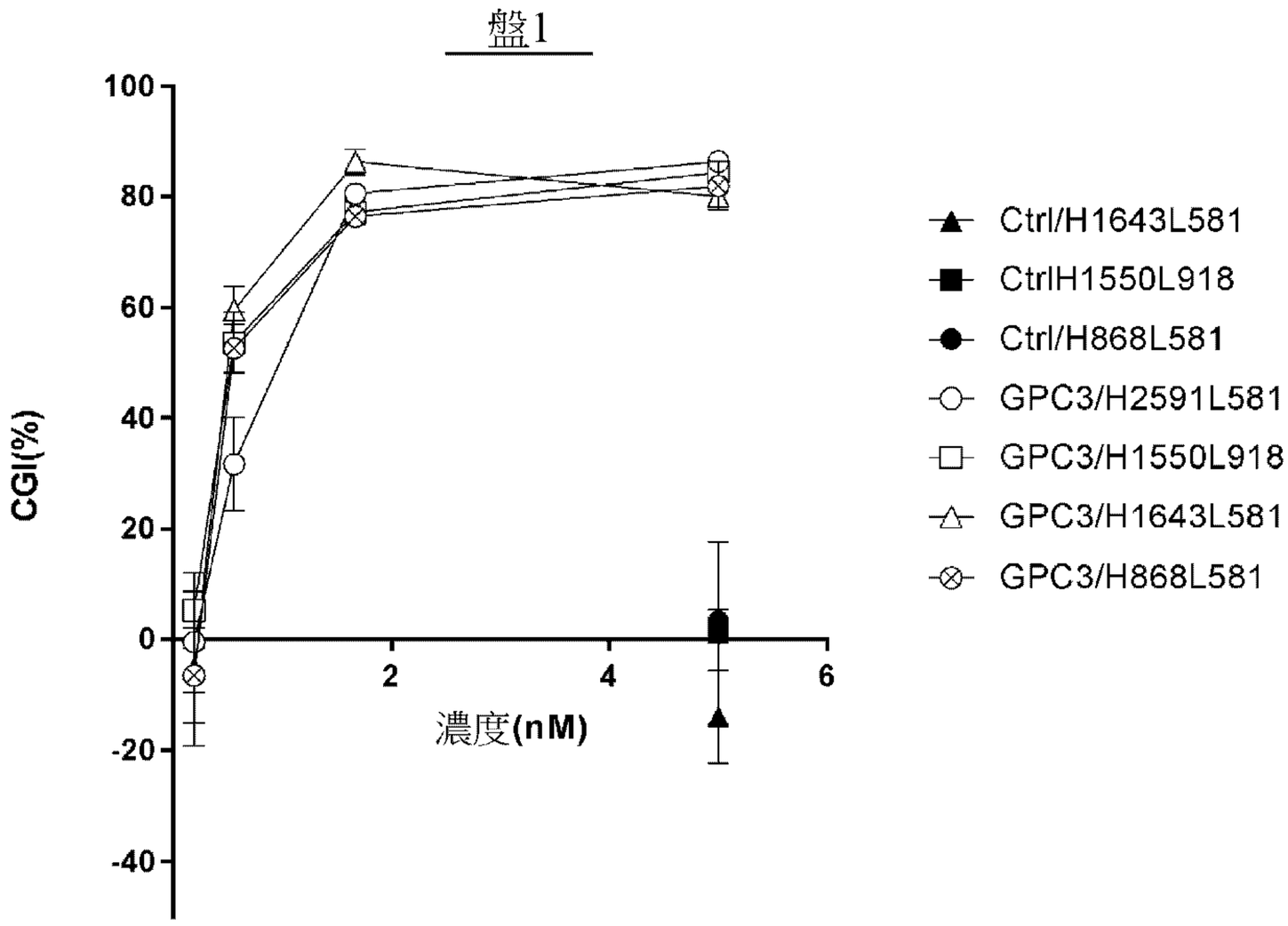
指定代表圖：


Jurkat CD3, 盤1
1.5×10⁵
1×10⁵
5×10⁴
0
發光
0.02
0.2
2
抗體濃度 (nM)
GPC3/H183L072
GPC3/CD3ε
GPC3/H0868L0581
GPC3/H1550L0918
GPC3/H1643L0581
Ctrl/H0868L0581
Ctrl/H1550L0918
Ctrl/CD3ε
Ctrl/H1643L0581
Jurkat CD3, 盤2
1.5×10⁵
1×10⁵
5×10⁴
0
發光
0.02
0.2
2
抗體濃度 (nM)
GPC3/H183L072
GPC3/CD3ε
GPC3/H1610L0581
GPC3/H1610L0939
GPC3/H2594L0581
GPC3/H2591L0581

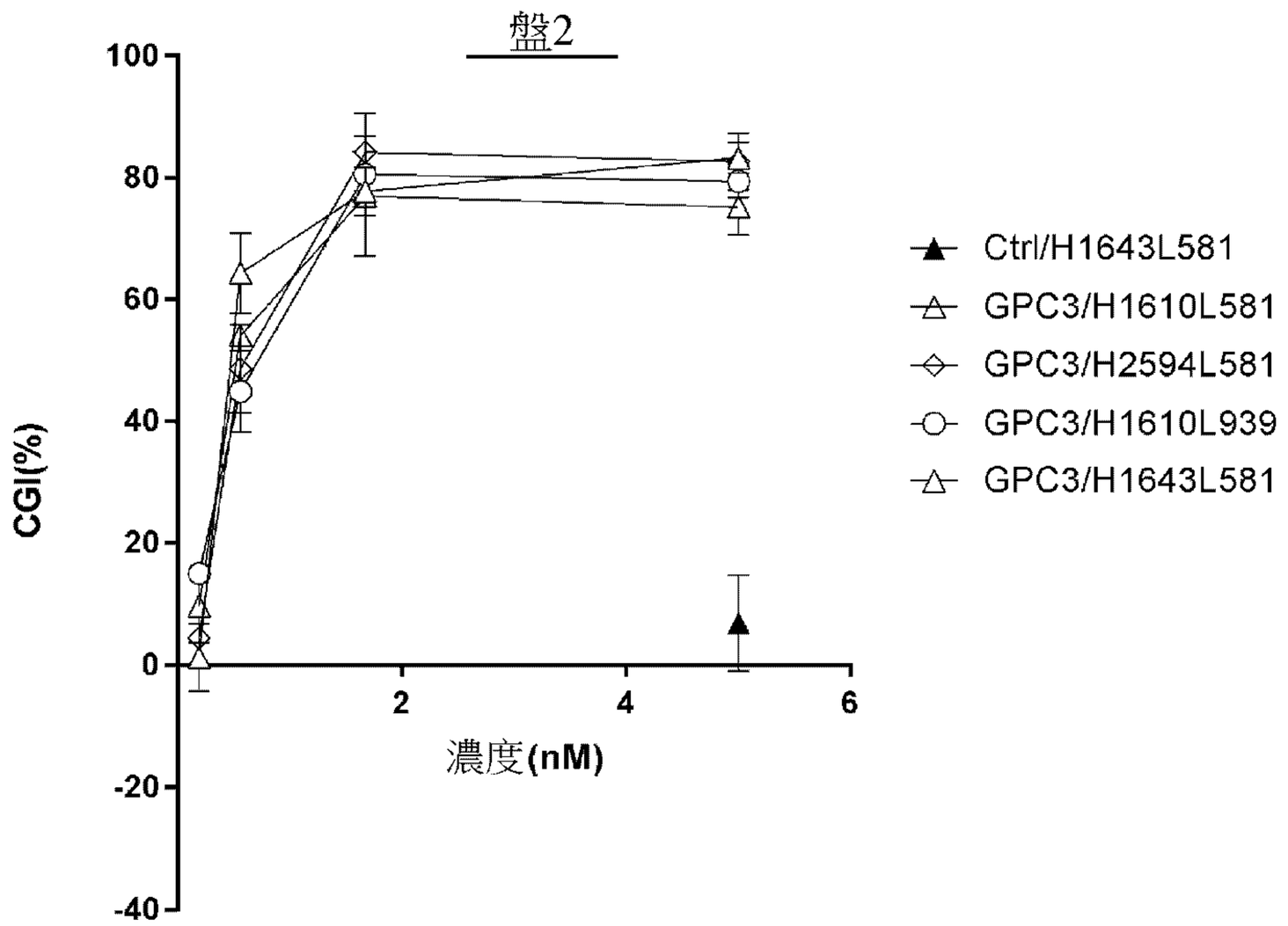
【圖 1.1】


Jurkat CD137, 盤1
1.5×10⁶
1×10⁶
5×10⁵
0
發光
0.5
2.5
5
抗體濃度 (nM)
GPC3/H183L072
GPC3/CD3ε
GPC3/H0868L581
GPC3/H1550L918
GPC3/H1643L581
Ctrl/H0868L581
Ctrl/H1550L918
Ctrl/CD3ε
Ctrl/H1643L581
Jurkat CD137, 盤2
1.5×10⁶
1×10⁶
5×10⁵
0
發光
0.5
2.5
5
抗體濃度 (nM)
GPC3/H183L072
GPC3/CD3ε
GPC3/H1610L0581
GPC3/H1610L0939
GPC3/H2594L0581
GPC3/H2591L0581

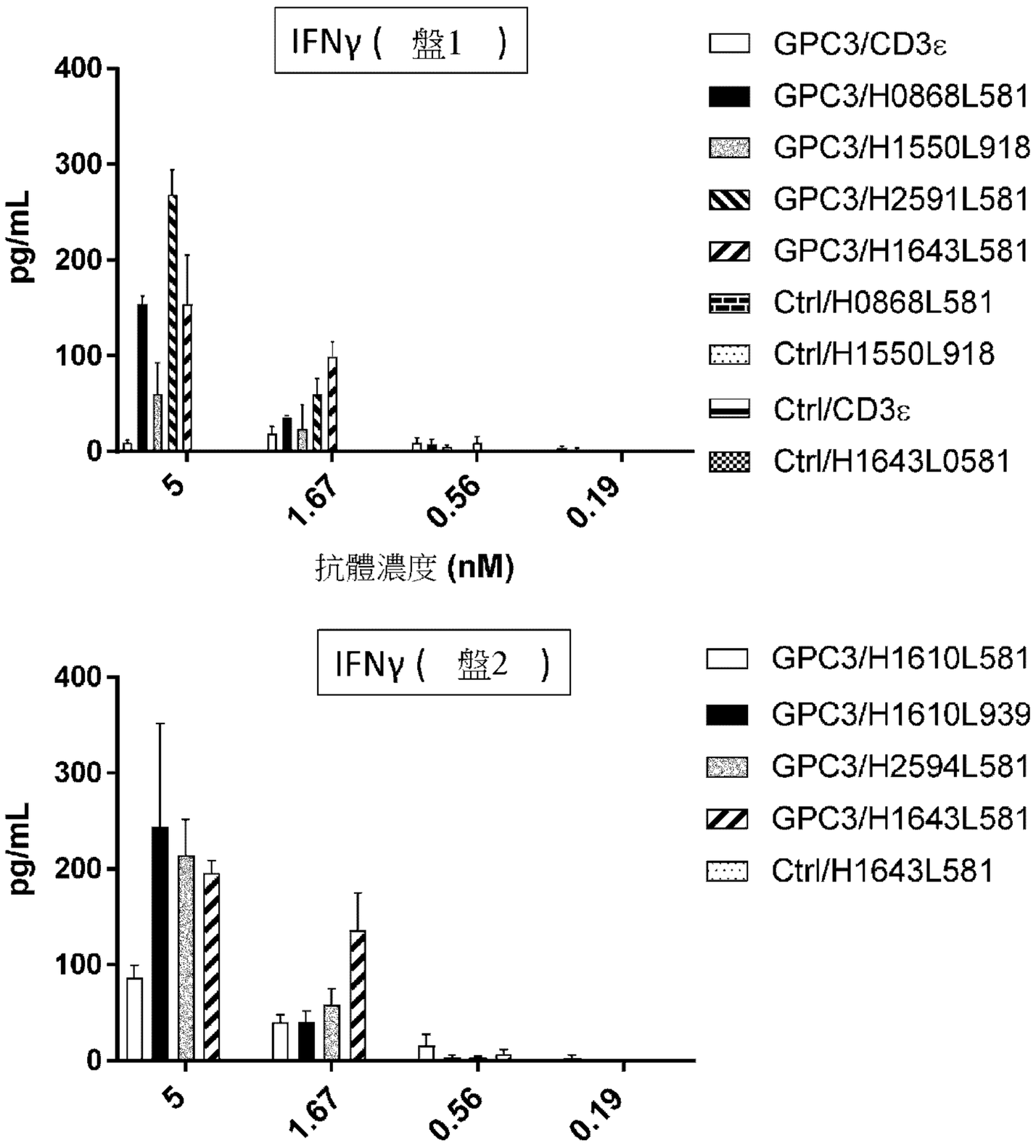
【圖 1.2】


盤1
100
80
60
40
20
0
-20
-40
CGI(%)
2
4
6
濃度(nM)
Ctrl/H1643L581
CtrlH1550L918
Ctrl/H868L581
GPC3/H2591L581
GPC3/H1550L918
GPC3/H1643L581
GPC3/H868L581

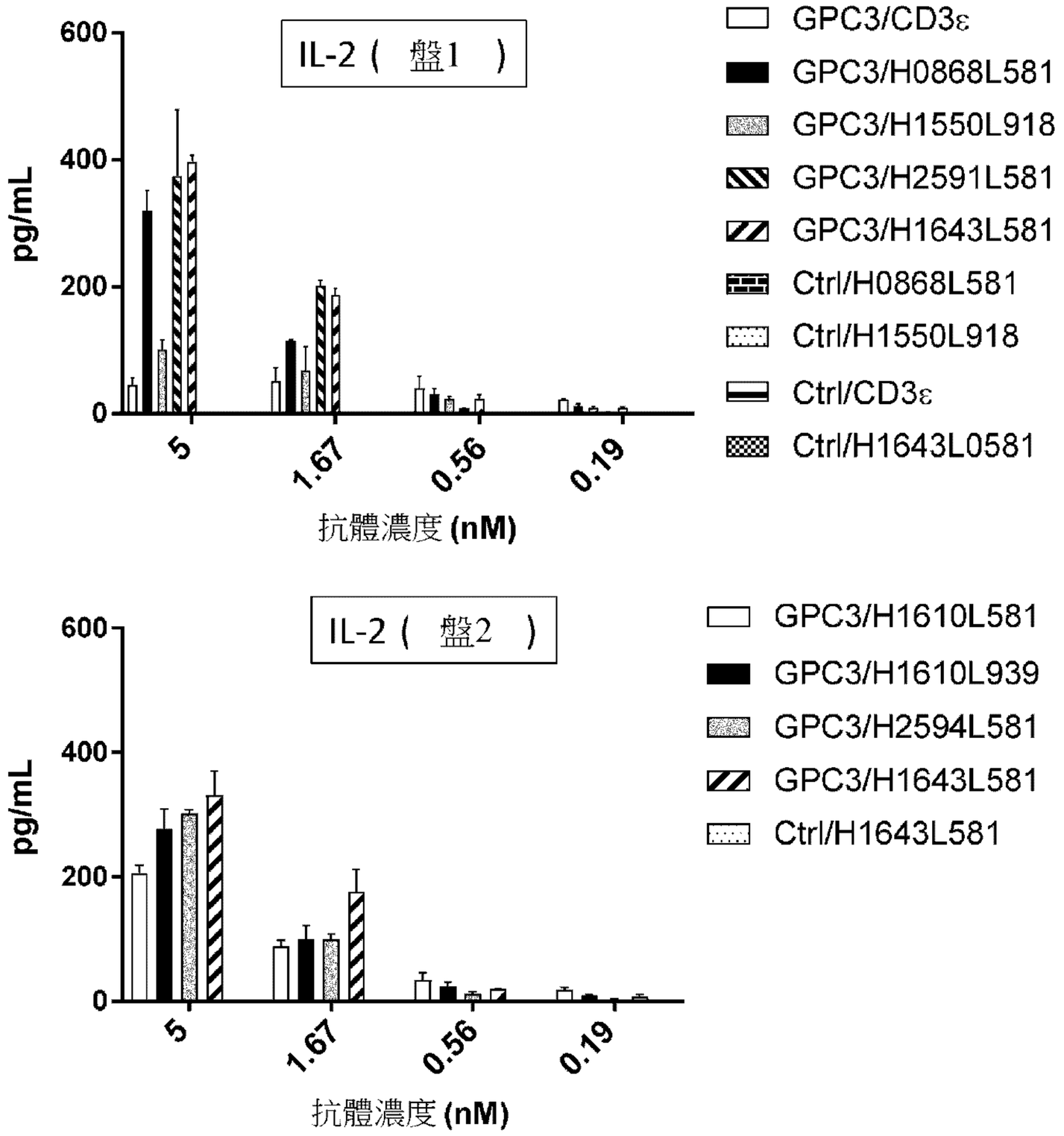
【圖 1.3a】


盤2
100
80
60
40
20
0
-20
-40
CGI(%)
2
4
6
濃度(nM)
Ctrl/H1643L581
GPC3/H1610L581
GPC3/H2594L581
GPC3/H1610L939
GPC3/H1643L581

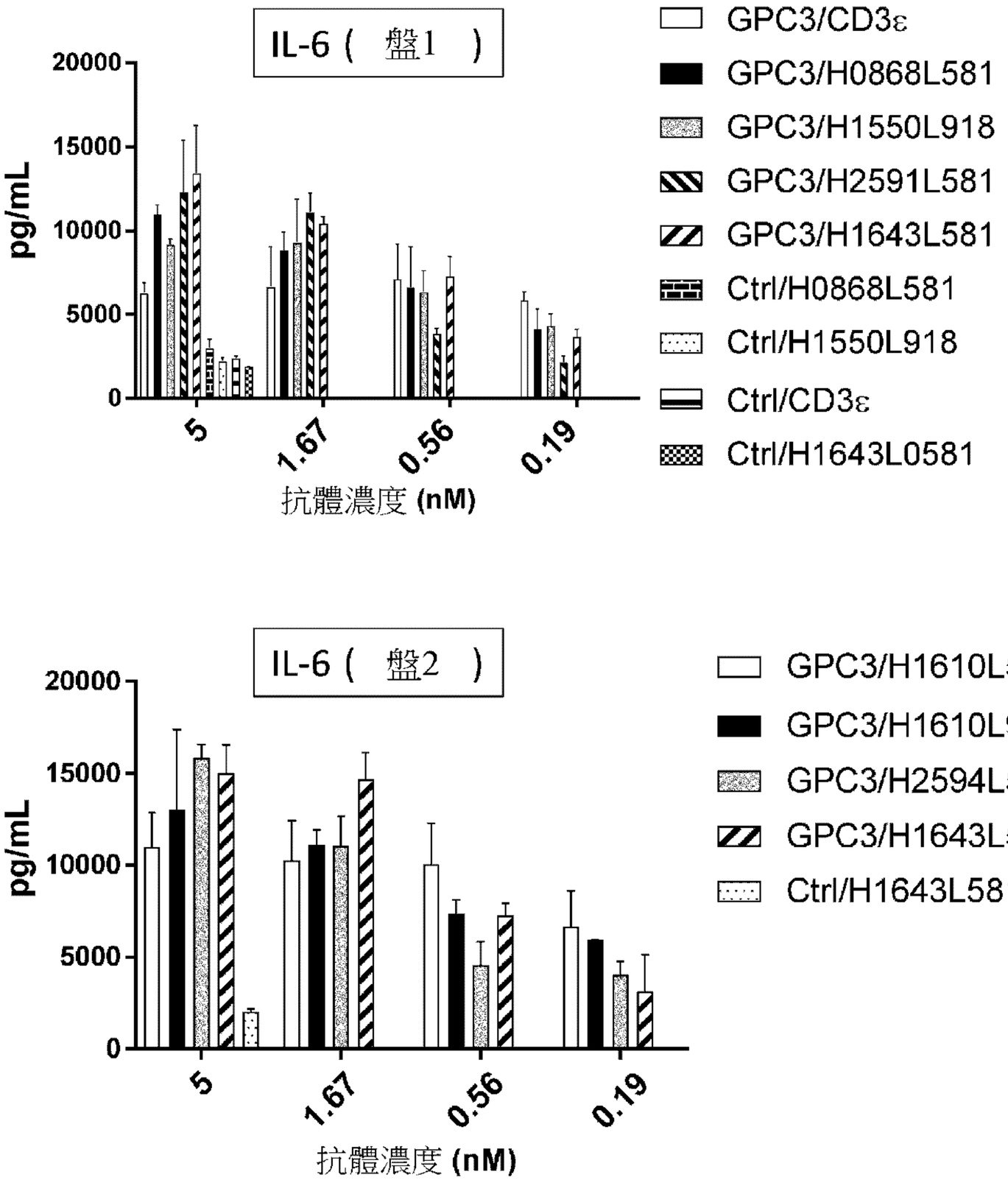
【圖 1.3b】


IFNγ (盤1)
400
300
200
100
0
pg/mL
5
1.67
0.56
0.19
抗體濃度 (nM)
GPC3/CD3ε
GPC3/H0868L581
GPC3/H1550L918
GPC3/H2591L581
GPC3/H1643L581
Ctrl/H0868L581
Ctrl/H1550L918
Ctrl/CD3ε
Ctrl/H1643L0581
IFNγ (盤2)
400
300
200
100
0
pg/mL
5
1.67
0.56
0.19
抗體濃度(nM)
GPC3/H1610L581
GPC3/H1610L939
GPC3/H2594L581
GPC3/H1643L581
Ctrl/H1643L581

【圖 1.3c】


IL-2 (盤1)
pg/mL
600
400
200
0
5
1.67
0.56
0.19
抗體濃度 (nM)
GPC3/CD3ε
GPC3/H0868L581
GPC3/H1550L918
GPC3/H2591L581
GPC3/H1643L581
Ctrl/H0868L581
Ctrl/H1550L918
Ctrl/CD3ε
Ctrl/H1643L0581
IL-2 (盤2)
pg/mL
600
400
200
0
5
1.67
0.56
0.19
抗體濃度 (nM)
GPC3/H1610L581
GPC3/H1610L939
GPC3/H2594L581
GPC3/H1643L581
Ctrl/H1643L581

【圖 1.3d】


IL-6 (盤1)
pg/mL
20000
15000
10000
5000
0
5
1.67
0.56
0.19
抗體濃度 (nM)
GPC3/CD3ε
GPC3/H0868L581
GPC3/H1550L918
GPC3/H2591L581
GPC3/H1643L581
Ctrl/H0868L581
Ctrl/H1550L918
Ctrl/CD3ε
Ctrl/H1643L0581
IL-6 (盤2)
pg/mL
20000
15000
10000
5000
0
5
1.67
0.56
0.19
抗體濃度 (nM)
GPC3/H1610L581
GPC3/H1610L939
GPC3/H2594L581
GPC3/H1643L581
Ctrl/H1643L581

【圖 1.3e】

202028238

【發明摘要】

【中文發明名稱】 能夠結合CD3及CD137但不同時結合兩者的抗原結合分子

【英文發明名稱】 ANTIGEN-BINDING MOLECULES CAPABLE OF BINDING CD3 AND CD137 BUT NOT SIMUTANEOUSLY

【中文】

本發明關於結合至CD3及CD137(4-1BB)的抗原結合分子；包含該抗原結合分子的組成物；以及其使用方法。本發明提供抗原結合分子包含: 能夠結合至CD3及CD137(4-1BB)但不同時結合兩者的抗體可變區；以及結合至不同於CD3及CD137的第三抗原的可變區。該抗原結合分子經由結合至三個不同抗原，展現由這些抗原結合分子所誘發之增強的T細胞依賴性細胞毒性活性。

【英文】

The present invention relates to antigen-binding molecules binding to CD3 and CD137 (4-1BB); compositions comprising the antigen-binding molecule; and methods of using the same. The present invention provides antigen-binding molecules comprising: an antibody variable region that is capable of binding to CD3 and CD137 (4-1BB), but does not bind to CD3 and CD137 at the same time; and a variable region binding to a third antigen different from CD3 and CD137. Such antigen binding molecules exhibit enhanced T-cell dependent cytotoxity activity induced by these antigen-binding molecules through binding to the three different antigens.

【指定代表圖】 圖1

【代表圖之符號簡單說明】 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 能夠結合CD3及CD137但不同時結合兩者的抗原結合分子

【英文發明名稱】 ANTIGEN-BINDING MOLECULES CAPABLE OF BINDING CD3 AND CD137 BUT NOT SIMUTANEOUSLY

【技術領域】

【0001】 本發明關於結合至CD3及CD137 (4-1BB)的抗原結合分子及其使用方法。

【先前技術】

【0002】 由於在血漿中具有高的安定性且產生很少的不良反應，抗體已受到作為藥物之注目(Nat. Biotechnol. (2005) 23, 1073-1078(NPL 1)及Eur J Pharm Biopharm. (2005) 59(3), 389-396(NPL 2))。抗體不僅具有抗原結合功效及促效劑或拮抗劑功效，也誘發由效應子細胞媒介的細胞毒性活性(亦稱為效應子功能)，例如ADCC (antibody dependent cytotoxicity，抗體依賴性細胞毒性)、ADCP (antibody dependent cell phagocytosis，抗體依賴性細胞吞噬作用)、或CDC (complement dependent cytotoxicity，補體依賴性細胞毒性)。特別地，IgG1亞型的抗體顯現對癌細胞的效應子功能。因此，於癌領域中已開發了大量的抗體藥物。

【0003】 為了發揮抗體的ADCC、ADCP或CDC，其Fc區必須結合至存在於效應子細胞(如NK細胞或巨噬細胞)的抗體受體(FcγR)及各種補體組成。人類中， FcγRIa、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa及FcγRIIIb同型異構物(isoform)已報導為FcγR的蛋白質家族，且也已報導其各自的同種異型體(allotype)(Immunol. Lett. (2002) 82, 57-65(NPL 3))。該等同型異構物中，FcγRIa、FcγRIIa及FcγRIIIa於其

細胞內域中，具有稱為ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif，免疫受體酪胺酸活化基序)的域，其轉導活化信號。相對於此，僅有FcγRIIb，於其細胞內域中，具有稱為ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif，免疫受體酪胺酸抑制基序)的域，其轉導抑制信號。該等FcγR的同型異構物皆已知藉由免疫複合物或其類似物經由交聯以轉導信號(Nat. Rev. Immunol. (2008) 8, 34-47(NPL 4))。事實上，當抗體發揮效應子功能對抗癌細胞時，效應子細胞膜上的FcγR分子藉由結合至癌細胞的複數個抗體的Fc區而簇集，藉此經由效應子細胞轉導活化信號。結果，發揮殺細胞功效。就此方面，FcγR的交聯侷限於接近癌細胞的效應子細胞，顯示免疫的活化係局部化(localize)於癌細胞(Ann. Rev. Immunol. (1988). 6. 251-81(NPL 5))。

【0004】 天然發生的免疫球蛋白經由其可變區結合至抗原且經由其恆定區結合至如FcγR、FcRn、FcαR及FcεR的受體及補體。各分子的FcRn (與IgG Fc區交互作用的結合分子)於一對一連結(one-to-one connection)中結合至抗體的各重鏈。因此，二分子的FcRn據報導結合一個IgG型抗體分子。與FcRn等不同，FcγR與抗體鉸鏈區及CH2域交互作用，且僅有一分子的FcγR結合至一個IgG型抗體分子(J. Biol. Chem. (2001) 276, 16469-16477)。對於FcγR及抗體的Fc區之間的結合，已發現抗體的鉸鏈區及CH2域中的一些胺基酸殘基及CH2域之經加成至Asn 297 (EU編號)的糖鏈是重要的(Chem. Immunol. (1997), 65, 88-110(NPL 6)，Eur. J. Immunol. (1993) 23, 1098-1104(NPL 7)，及Immunol. (1995) 86, 319-324(NPL 8))。具有多種FcγR結合性質的Fc區變體先前已藉由著眼於此結合位點被研究，以產生針對活化FcγR具有較高的結合活性的Fc區變體(WO2000/042072(PTL 1)及WO2006/019447(PTL 2))。例如，Lazar等人已藉由以Asn、Leu及Glu分別取代人類IgG的Ser239、Ala330及Ile332 (EU編號)，成功地增加人類IgG針對人類FcγRIIIa (V158)的結合活性達約370倍(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2006) 103,

4005-4010(NPL 9)及WO2006/019447(PTL 2))。就FcγRIIIa對FcγRIIb的比例(A/I比例)而言，此改變的形式具有野生型約9倍的活性。或者，Shinkawa等人已藉由刪除經加成至Asn297 (EU編號)的糖鏈的海藻糖(fucose)，成功地增加針對FcγRIIIa的結合活性達約100倍(J. Biol. Chem. (2003) 278, 3466-3473(NPL 10))。相較於天然發生的人類IgG1，此等方法可劇烈地改良人類IgG1的ADCC活性。

【0005】 天然發生的IgG型抗體典型地經由其可變區(Fab)辨識及結合至一個抗原決定基，因此可結合至僅一個抗原。同時，許多類型的蛋白質已知參與癌或發炎，且該等蛋白質可彼此交叉作用(crosstalk)。例如，一些發炎細胞介素(TNF、IL1及IL6)已知參與免疫疾病(Nat. Biotech., (2011) 28, 502-10(NPL 11))。再者，已知其他受體的活化已知為癌獲得抗藥性的一個基礎機制(Endor Relat Vancer (2006) 13, 45-51(NPL 12))。該情況中，其辨識一個抗原決定基的一般抗體，不能抑制複數個蛋白質。

【0006】 藉由一個分子結合二種或更多種類型抗原的抗體(該等抗體亦稱為雙特異性抗體)已作為抑制複數個靶的分子而被研究。針對二種不同抗原(第一抗原及第二抗原)的結合活性可藉由天然發生的IgG型抗體的修飾而賦予(mAbs. (2012) Mar 1, 4(2))。因此，該抗體不僅具有藉由一個分子中和該二種或更多種類型的抗原的功效，亦具有經由對癌細胞具有細胞毒性活性的細胞的交聯增強抗腫瘤活性的功效。具有加成至抗體的N或C終端的抗原結合位點的分子(DVD-Ig、TCB及scFv-IgG)、具有抗體的二種Fab區的不同序列的分子(共同L-鏈雙特異性抗體及雜合融合瘤)、一種Fab區辨識二種抗原的分子(二合一(two-in-one) IgG及DutaMab)及具有CH3域環作為另一種抗原結合位點(Fcab)的分子先前已經報導為雙特異性抗體分子形式(Nat. Rev. (2010), 10, 301-316(NPL 13)及Peds (2010), 23(4), 289-297(NPL 14))。由於任何該等雙特異性抗體於其Fc區與FcγR交互作用，於其中保留抗體效應子功能。

【0007】 假使由雙特異性抗體辨識的所有抗原為特異性表現於癌的抗原，結合至任何該等抗原的雙特異性抗體顯現針對癌細胞的細胞毒性活性，因此可期望相較於辨識一種抗原的傳統抗體藥物具有更有效率的抗癌功效。然而，在藉由雙特異性抗體所辨識的任一種抗原係表現於正常組織或為表現於免疫細胞的細胞的情況中，由於與FcγR交聯，而發生對該正常組織的損傷或細胞介素的釋放(J. Immunol. (1999) Aug 1, 163(3), 1246-52(NPL 15))。結果，誘發嚴重的不良反應。

【0008】 例如，卡妥索單抗(Catumaxomab)已知為辨識表現於T細胞的蛋白質及表現於癌細胞的蛋白質(癌抗原)的雙特異性抗體。卡妥索單抗分別於二種Fab結合癌抗原(EpCAM)及表現於T細胞的CH3ε鏈。卡妥索單抗經由同時結合至癌抗原及該CH3ε誘發T細胞媒介的細胞毒性活性，且經由同時結合至癌抗原及FcγR誘發NK細胞或抗原呈現細胞(例如，巨噬細胞)媒介的細胞毒性活性。藉由該二種細胞毒性活性的使用，卡妥索單抗藉由腹腔內投藥對惡性腹水顯現高的治療功效，因而已於歐洲核准(Cancer Treat Rev. (2010) Oct 36(6), 458-67(NPL 16))。此外，卡妥索單抗的投藥據報導於某些案例中產生癌細胞反應性抗體，展現出後天性免疫係經誘導(Future Oncol. (2012) Jan 8 (1), 73-85(NPL 17))。由此等結果，因為可期望強的抗腫瘤功效及後天性免疫的誘導，具有T-細胞媒介的細胞毒性活性及經由 FcγR藉由如NK細胞或巨噬細胞的細胞所引起的功效的這種抗體(該等抗體特別指稱三功能抗體)已受到注目。

【0009】 然而，即使癌抗原不存在，該三功能抗體仍同時結合至CD3ε及FcγR，因此甚至於無癌細胞環境，交聯CD3ε表現T細胞至FcγR表現細胞，以大量地製造各種細胞介素。各種細胞介素的製造之這種癌抗原非依賴性誘導使目前的三功能抗體的投藥侷限於腹腔途徑(Cancer Treat Rev. 2010 Oct 36(6), 458-67(NPL 16))。因嚴重的類細胞介素風暴的不良反應，該三功能抗體非常難

以全身性投藥(Cancer Immunol Immunother. 2007 Sep; 56(9): 1397-406 (NPL 18))。

傳統技術的雙特異性抗體能結合至雙抗原，亦即第一抗原癌抗原(EpCAM)及第二抗原CD3ε，同時結合至FcγR，因此考慮到其分子結構，不能規避藉由同時結合至FcγR及第二抗原CD3ε所引起的這種不良反應。

近年來，已藉由使用針對FcγR具有減低的結合活性的Fc區，而提供引起T細胞所媒介的細胞毒性活性且規避不良反應的修飾抗體(WO2012/073985)。

然而，考慮到其分子結構，甚至是這種抗體也未能於結合至癌抗原時作用於二種免疫受體，亦即CD3ε及FcγR。

以癌抗原特異性方式發揮T細胞所媒介的細胞毒性活性及T細胞以外的細胞所媒介的細胞毒性活性二者且規避不良反應的抗體目前尚屬未知。

【0010】 T細胞於腫瘤免疫中扮演重要角色，且已知藉由二種信號活化: 1) T細胞受體(T cell receptor，TCR)對主要組織相容性複合物(major histocompatibility complex，MHC)第I型分子所呈現的抗原性肽的結合及TCR的活化；以及2) T細胞表面的共刺激分子對於抗原呈現細胞的配體的結合及共刺激分子的活化。再者，屬於腫瘤壞死因子(tumor necrosis factor，TNF)超級家族以及TNF受體超級家族的分子的活化，如於T細胞表面的CD137(4-1BB)，，已被描述為對於T細胞活化為重要的(Vinay, 2011, Cellular & Molecular Immunology, 8, 281-284 (NPL 19))。

【0011】 CD137促效劑抗體已顯現出顯示抗腫瘤功效，且此已實驗性地顯示出主要因為CD8陽性T細胞及NK細胞的活化(Houot, 2009, Blood, 114, 3431-8(NPL 20))。亦了解經工程化以具有嵌合抗原受體分子的T細胞(CAR-T細胞) 可增強藥效持續性，前述嵌合抗原受體分子由作為細胞外域的腫瘤抗原結合域以及作為細胞內域的CD3及CD137信號轉導域所組成(Porter, N ENGL J MED, 2011, 365; 725-733(NPL 21))。然而，該等CD137促效劑抗體之起因於其等非特異

性肝毒性的副作用於臨床上及非臨床上已成為問題，而醫藥劑的開發未有進展(Dubrot, Cancer Immunol. Immunother., 201028, 512-22 (NPL 22))。副作用的主因建議為涉及抗體經由抗體恆定域之對Fcγ受體的結合(Schabowsky, Vaccine, 2009, 28, 512-22 (NPL 23))。再者，已報導為了使靶定屬於TNF受體超級家族的受體之促效劑抗體發揮活體內促效劑活性，藉由Fcγ受體表現細胞(FcγRII表現細胞)的抗體交聯為必要的(Li, Proc Natl Acad Sci USA. 2013, 110(48), 19501-6 (NPL 24))。WO2015/156268(PTL 3)描述了，具有含有CD137促效活性的結合域以及對腫瘤特異性抗原的結合域的雙特異性抗體可發揮CD137促效活性且僅於表現該腫瘤特異性抗原的細胞存在下活化免疫細胞，藉此可避免CD137促效抗體的肝毒性不良事件而保留抗體的抗腫瘤活性。WO2015/156268進一步描述抗腫瘤活性可進一步增強，且可藉由與具有含有CD3促效活性的結合域及對腫瘤特異性抗原的結合域的另一雙特異性抗體組合來使用此雙特異性抗體而避免該等不良事件。亦已經報導具有對CD137、CD3及腫瘤特異性抗原(EGFR)的三個結合域的三特異性抗體(WO2014/116846(PTL 4))。然而，發揮藉由T細胞媒介的細胞毒性活性以及T細胞和其他免疫細胞經由CD137以癌抗原特異性方式的活化活性二者，同時規避不良反應的抗體目前尚屬未知。

文獻列單

[專利文獻]

【0012】

[PTL 1]：WO2000/042072

[PTL 2]：WO2006/019447

[PTL 3]：WO2015/156268

[PTL 4]：WO2014/116846

[非專利文獻]

【0013】

[NPL 1]：Nat. Biotechnol. (2005) 23, 1073-1078

[NPL 2]：Eur J Pharm Biopharm. (2005) 59(3), 389-396

[NPL 3]：Immunol. Lett. (2002) 82, 57-65

[NPL 4]：Nat. Rev. Immunol. (2008) 8, 34-47

[NPL 5]：Ann. Rev. Immunol. (1988). 6. 251-81

[NPL 6]：Chem. Immunol. (1997), 65, 88-110

[NPL 7]：Eur. J. Immunol. (1993) 23, 1098-1104

[NPL 8]：Immunol. (1995) 86, 319-324

[NPL 9]：Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2006)103, 4005-4010

[NPL 10]：J. Biol. Chem. (2003) 278, 3466-3473

[NPL 11]：Nat. Biotech., (2011) 28, 502-10

[NPL 12]：Endocr Relat Cancer (2006) 13, 45-51

[NPL 13]：Nat. Rev. (2010), 10, 301-316

[NPL 14]：Peds (2010), 23(4), 289-297

[NPL 15]：J. Immunol. (1999) Aug 1, 163(3), 1246-52

[NPL 16]：Cancer Treat Rev. (2010) Oct 36(6), 458-67

[NPL 17]：Future Oncol. (2012) Jan 8(1), 73-85

[NPL 18]：Cancer Immunol Immunother. 2007 Sep; 56(9): 1397-406

[NPL 19]：Vinary, 2011, Cellular & Molecular Immunology, 8, 281-284

[NPL 20]：Houot, 2009, Blood, 114, 3431-8

[NPL 21]：Porter, N ENGL J MED, 2011, 365; 725-733

[NPL 22]：Dubrot, Cancer Immunol. Immunother., 2010, 28, 512-22

[NPL 23]：Schabowsky, Vaccine, 2009, 28, 512-22

[NPL 24]：Li, Proc Natl Acad Sci USA. 2013, 110(48), 19501-6

【發明內容】

[技術問題]

【0014】 已報導包含腫瘤特異性抗原(EGFR)結合域、CD137結合域及CD3結合域的三特異性抗體(WO2014116846)。然而，由於具有這種分子格式的抗體可同時結合至三種不同抗原，本發明者們推測該等三特異性抗體可能藉由同時結合至CD3及CD137而造成CD3ε表現T細胞及CD137表現細胞(例如，T細胞、B細胞、NK細胞、DC等)之間的交聯。

再者，已報導因為抗體與其等交聯，所以針對CD8及CD3ε的雙特異性抗體在CD8陽性T細胞中誘發彼此的細胞毒性(Wong, Clin. Immunol. Immunopathol. 1991, 58(2), 236-250)。因此，本發明者們推測針對表現於T細胞的分子及CD3ε的雙特異性抗體也會在T細胞中誘發彼此的細胞毒性，因為其等將交聯表現該分子及CD3ε的細胞。

[問題的解決手段]

【0015】 本發明提供結合至CD3及CD137的抗原結合域以及其使用方法。本發明亦提供更有效率地獲得誘發T細胞依賴性細胞毒性的抗原結合分子的方法。

【0016】 本案發明者們已成功地製備包含：能結合至CD3及CD137(4-1BB)但不同時結合至CD3及CD137的抗體可變區；以及結合至不同於CD3及CD137的第三抗原的可變區的抗原結合分子，較佳地特異性地表現於癌組織的分子，以及更佳地為磷脂醯肌醇聚糖-3(GPC3)。藉由改良對CD3及/或CD137的結合活性，發明者們已成功地製備抗原結合分子，其經由結合至三個不同抗原，顯現由該等結合分子所誘發之增強的T細胞依賴性細胞毒性活性。該等抗原結合

分子可使用於免疫療法同時能夠規避於傳統多特異性抗原結合分子對於表現於不同細胞上的抗原所造成的不同細胞之間的交聯，其被認為是當多特異性抗原結合分子作為藥物時造成副作用的原因。

【0017】 更具體地，本發明提供下述者：

[1] 一種抗原結合分子，包含：

能結合至CD3及CD137，但不同時結合至CD3及CD137的抗體可變區；該抗原結合分子以小於5×10^{-6}M、小於5×10^{-7}M、小於5×10^{-8}M或小於3×10^{-8}M的平衡解離常數(KD)結合至CD137；較佳地藉由SPR於下述條件測定:

37°C，pH 7.4，20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% Tween 20、0.005% NaN3；該抗原結合分子係經固定於CM4感測晶片上，抗原作為分析物。

[1A] 如[1]之抗原結合分子，其中該抗原結合分子以介於5×10^{-6}M及3×10^{-8}M之間的平衡解離常數(KD)結合至CD137；較佳地藉由SPR於下述條件測定:

37°C，pH 7.4，20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% Tween 20、0.005% NaN3；該抗原結合分子係經固定於CM4感測晶片上，抗原作為分析物。

[1B] 如[1]至[1A]之抗原結合分子，其中該抗原結合分子以介於2×10^{-6} M及1×10^{-8}M之間的平衡解離常數(KD)結合至CD3；較佳地藉由SPR於下述條件測定:

25°C，pH 7.4，20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% Tween 20、0.005% NaN3；該抗原結合分子係經固定於CM4感測晶片上，抗原作為分析物。

[2] 如[1]至[1B]之抗原結合分子，其中該抗原結合分子結合至

(a)包含SEQ ID NO: 159的胺基酸序列的CD3ε (CD3 epsilon)的細胞外域的至少一、二、三或更多個胺基酸殘基；及/或

(b)包含LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAEC (SEQ ID NO: 152)，較佳地人類 CD137 的LQDPCSN、NNRNQI 及/或GQRTCDI的胺基酸序列的CD137的N-終端區的至少

一、二、三或更多個胺基酸殘基。

[3] 如[1]至[2]之抗原結合分子，其中該抗體可變區為具有1至25個胺基酸改變的抗體可變區，其中該欲改變的胺基酸為環(loop)中的胺基酸、FR3區中的胺基酸或擇自於抗體H鏈可變域中由Kabat編號位置31至35、50至65、71至74及95 至102，以及於L鏈可變域中由Kabat編號位置24至34、50至56及89至97的胺基酸。

[3A] 如[1]至[3]中任一項之抗原結合分子，其中該重鏈可變域(VH)及/或輕鏈可變域(VL)包含選自表1.3(a)至表 1.3(d)的一或多個胺基酸取代，其中該一或多個胺基酸取代對如示表1.3(a)至表1.3(d)所示的CD3及/或 CD137，顯示至少增加0.2、0.3、0.5、0.8、1、1.5或2-倍的結合親和性。在一些實施例中，較佳為該抗體可變區包含:

(a) 重鏈可變域胺基酸序列，於下述每一位置(皆根據Kabat編號)，包含針對該位置的一或多個下述胺基酸殘基:

A、D、E、I、G、K、L、M、N、R、T、W或Y 於胺基酸位置26；

D、F、G、I、M或L，於胺基酸位置27；

D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 28；

F或W於胺基酸位置 29；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 30；

F、I、N、R、S、T或V於胺基酸位置 31；

A、H、I、K、L、N、Q、R、S、T或V於胺基酸位置 32；

W於胺基酸位置 33；

F、I、L、M或V於胺基酸位置 34；

F、H、S、T、V或Y於胺基酸位置 35；

E、F、H、I、K、L、M、N、Q、S、T、W或Y於胺基酸位置 50；

I、K或V於胺基酸位置 51；

K、M、R或T於胺基酸位置 52；

A、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、V、W或Y於胺基酸位置 52b；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 52c；

A、E、F、H、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 53；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 54；

E、F、G、H、L、M、N、Q、W或Y於胺基酸位置 55；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 56；

A、D、E、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T或V於胺基酸位置 57；

A、F、H、K、N、P、R或Y於胺基酸位置 58；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 59；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 60；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 61；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 62；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 63；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 64；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 65；

H或R於胺基酸位置 93；

F、G、H、L、M、S、T、V或Y於胺基酸位置 94；

I或V於胺基酸位置 95；

F、H、I、K、L、M、T、V、W或Y於胺基酸位置 96；

F、Y或W於胺基酸位置 97；

A、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 98；

A、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 99；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 100；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 100a；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 100b；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 100c；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 100d；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 100e；

A、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位

置 100f；

A、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 100g；

A、D、E、G、H、I、L、M、N、P、S、T或V於胺基酸位置 100h；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 100i；

A、D、F、I、L、M、N、Q、S、T或V於胺基酸位置 101；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 102；及/或

(b)輕鏈可變域胺基酸序列，於下述每一位置(皆根據Kabat編號)，包含針對該位置的一或多個下述胺基酸殘基:

A、D、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 24；

A、G、N、P、S、T或V於胺基酸位置 25；

A、D、E、F、G、I、K、L、M、N、Q、R、S、T或V於胺基酸位置 26；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 27；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 27a；

A、I、L、M、P、T或V於胺基酸位置 27b；

A、E、F、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、W或Y於胺基酸位置 27c；

A、E、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 27d；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 27e；

G、N、S或T於胺基酸位置 28；

A、F、G、H、K、L、M、N、Q、R、S、T、W或Y於胺基酸位置 29；

A、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、V、W或Y於胺基酸位置 30；

I、L、Q、S、T或V於胺基酸位置 31；

F、W或Y於胺基酸位置 32；

A、F、H、L、M、Q或V於胺基酸位置 33；

A、H或S於胺基酸位置 34；

I、K、L、M或R於胺基酸位置 50；

A、E、I、K、L、M、Q、R、S、T或V於胺基酸位置 51；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 52；

A、E、F、G、H、K、L、M、N、P、Q、R、S、V、W或Y於胺基酸位置 53；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 54；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V或Y於胺基酸位置 55；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 56；

A、G、K、S或Y於胺基酸位置 89；

Q於胺基酸位置 90；

G於胺基酸位置 91；

A、D、H、K、N、Q、R、S或T於胺基酸位置 92；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 93；

A、D、H、I、M、N、P、Q、R、S、T或V於胺基酸位置 94；

P於胺基酸位置 95；

F或Y於胺基酸位置 96；及

A、D、E、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T或V於胺基酸位置 97。

[4] 如[1]至[3A]中任一項之抗原結合分子，其中該抗體可變區包含下述任一者:

(a1) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 16，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 30，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 44，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 63，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 68， 及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 73；

(a2) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 17，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 31，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 45，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 64，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 69，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 74；

(a3) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 18，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 32，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)，其包含

之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 46，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 63，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 68，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 73；

(a4) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 19，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 33，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 47，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 63，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 68，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 73；

(a5) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 19，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO:33，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 47，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 65，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 70，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 75；

(a6) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 20，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 34，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)，其包含

之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 48，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 63，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 68，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 73；

(a7) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 22，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 36，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 50，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 63，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 68，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 73；

(a8) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 23，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 37，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 51，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 63，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 68，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 73；

(a9) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 23，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 37，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)，其包含

之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 51，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 66，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 71，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 76；

(a10) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 24，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 38，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 52，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 63，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 68，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 73；

(a11) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 25，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 39，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 53，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 66，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 71，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 76；

(a12) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 26，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 40，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)，其包

含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 54，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 66，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 71，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 76；

(a13) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 26，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 40，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 54，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 63，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 68，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 73；

(a14) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO:27，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 41，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 55，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 63，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 68，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 73；

(a15) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 28，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 42，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)，其包

含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 56，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 63，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 68，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 73；

(b1)包含SEQ ID NO: 16的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 30的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 44的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 63的的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 68的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 73的胺基酸序列的LCDR3；

(b2)包含SEQ ID NO: 17的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 31的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 45的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 64的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 69的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 74的LCDR3；

(b3)包含SEQ ID NO: 18的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 32的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 46的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 63的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 68的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 73的LCDR3；

(b4)包含SEQ ID NO: 19的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 33的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 47的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 63的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 68的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 73的LCDR3；

(b5)包含SEQ ID NO: 19的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 33的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 47的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 65的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 70的胺基酸序列的LCDR2，及包含

SEQ ID NO: 75的LCDR3；

(b6)包含SEQ ID NO: 20的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 34的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 48的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 63的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 68的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 73的LCDR3；

(b7)包含SEQ ID NO: 22的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 36的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 50的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 63的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 68的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 73的LCDR3；

(b8)包含SEQ ID NO: 23的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 37的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 51的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 63的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 68的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 73的LCDR3；

(b9)包含SEQ ID NO: 23的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 37的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 51的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 66的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 71的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 76的LCDR3；

(b10)包含SEQ ID NO: 24的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 38的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 52的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 63的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 68的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 73的LCDR3；

(b11)包含SEQ ID NO: 25的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 39的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 53的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 66的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 71的胺基酸序列的LCDR2，及包含

SEQ ID NO: 76的LCDR3；

(b12)包含SEQ ID NO: 26的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 40的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 54的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 66的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 71的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 76的LCDR3；

(b13)包含SEQ ID NO: 26的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 40的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 54的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 63的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 68的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 73的LCDR3；

(b14)包含SEQ ID NO: 27的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 41的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 55的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 63的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 68的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 73的LCDR3；

(b15)包含SEQ ID NO: 28的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 42的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 56的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 63的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 68的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 73的LCDR3；

(c1) 重鏈可變域 (VH)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 2，及輕鏈可變域(VL)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 58；

(c2) 重鏈可變域 (VH)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 3，及輕鏈可變域(VL)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 59；

(c3) 重鏈可變域 (VH)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ

ID NO: 4，及輕鏈可變域(VL)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 58；

(c4) 重鏈可變域 (VH)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 5，及輕鏈可變域(VL)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 58；

(c5) 重鏈可變域 (VH)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 5，及輕鏈可變域(VL)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 60；

(c6) 重鏈可變域 (VH)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 6，及輕鏈可變域(VL)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 58；

(c7) 重鏈可變域 (VH)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 8，及輕鏈可變域(VL)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 58；

(c8) 重鏈可變域 (VH)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 9，及輕鏈可變域(VL)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 58；

(c9) 重鏈可變域 (VH)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 9，及輕鏈可變域(VL)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 61；

(c10) 重鏈可變域 (VH) ，其包含之胺基酸序列為至少70% 、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 10，及輕鏈可變域(VL)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 58；

(c11) 重鏈可變域 (VH) ，其包含之胺基酸序列為至少70% 、80%或90% 相同於SEQ

ID NO: 11，及輕鏈可變域(VL)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 61；

(c12) 重鏈可變域 (VH) ，其包含之胺基酸序列為至少70% 、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 12，及輕鏈可變域(VL)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 61；

(c13) 重鏈可變域 (VH) ，其包含之胺基酸序列為至少70% 、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 12，及輕鏈可變域(VL)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 58；

(c14) 重鏈可變域 (VH) ，其包含之胺基酸序列為至少70% 、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 13，及輕鏈可變域(VL)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 58；

(c15) 重鏈可變域 (VH) ，其包含之胺基酸序列為至少70% 、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 14，及輕鏈可變域(VL)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 58；

(d1) SEQ ID NO: 2的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 58的輕鏈可變域(VL)；

(d2) SEQ ID NO: 3的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 59的輕鏈可變域(VL)；

(d3) SEQ ID NO: 4的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 58的輕鏈可變域(VL)；

(d4) SEQ ID NO: 5的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 58的輕鏈可變域(VL)；

(d5) SEQ ID NO: 5的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 60的輕鏈可變域(VL)；

(d6) SEQ ID NO: 6的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 58的輕鏈可變域(VL)；

(d7) SEQ ID NO: 8的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 58的輕鏈可變域(VL)；

(d8) SEQ ID NO: 9的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 58的輕鏈可變域(VL)；

(d9) SEQ ID NO: 9的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 61的輕鏈可變域(VL)；

(d10) SEQ ID NO: 10的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 58的輕鏈可變域(VL)；

(d11) SEQ ID NO: 11的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 61的輕鏈可變域(VL)；

(d12) SEQ ID NO: 12的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 61的輕鏈可變域(VL)；

(d13) SEQ ID NO: 12的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 58的輕鏈可變域(VL)；

(d14) SEQ ID NO: 13的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 58的輕鏈可變域(VL)；

(d15) SEQ ID NO: 14的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 58的輕鏈可變域(VL)；

(e) 與(a1)至(d15)的抗體可變區之任一者競爭結合至CD3的抗體可變區；

(f) 與(a1)至(d15)的抗體可變區之任一者競爭結合至CD137的抗體可變區；

(g) 與(a1)至(d15)的抗體可變區之任一者結合至CD3上的相同抗原決定基的抗體可變區；

(h) 與(a1)至(d15)的抗體可變區之任一者結合至CD137上的相同抗原決定基的抗體可變區。

[4A]如[4][c1]至[c15]之抗原結合分子，其中該重鏈可變域 (VH)及/或該輕鏈可變域(VL)包含選自表1.3(a)至表 1.3(d)的一或多個胺基酸取代，其中該一或多個胺基酸取代如表1.3(a)至表1.3(d)所示的CD3及/或 CD137，顯示至少增加0.2、0.3、0.5、0.8、1、1.5或2-倍的結合親和性。

[4B] 如[4A]之抗原結合分子，其中該抗體可變區包含:

(a) 重鏈可變域胺基酸序列，於下述每一位置(皆根據Kabat編號)，包含針對該位置的一或多個下述胺基酸殘基:

A、D、E、I、G、K、L、M、N、R、T、W或Y於胺基酸位置 26；

D、F、G、I、M或L，於胺基酸位置27；

D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 28；

F或W於胺基酸位置 29；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸

位置 30；

F、I、N、R、S、T或V於胺基酸位置 31；

A、H、I、K、L、N、Q、R、S、T或V於胺基酸位置 32；

W於胺基酸位置 33；

F、I、L、M或V於胺基酸位置 34；

F、H、S、T、V或Y於胺基酸位置 35；

E、F、H、I、K、L、M、N、Q、S、T、W或Y於胺基酸位置 50；

I、K或V於胺基酸位置 51；

K、M、R或T於胺基酸位置 52；

A、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、V、W或Y於胺基酸位置 52b；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 52c；

A、E、F、H、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 53；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 54；

E、F、G、H、L、M、N、Q、W或Y於胺基酸位置 55；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 56；

A、D、E、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T或V於胺基酸位置 57；

A、F、H、K、N、P、R或Y於胺基酸位置 58；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 59；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 60；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 61；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 62；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 63；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 64；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 65；

H或R於胺基酸位置 93；

F、G、H、L、M、S、T、V或Y於胺基酸位置 94；

I或V於胺基酸位置 95；

F、H、I、K、L、M、T、V、W或Y於胺基酸位置 96；

F、Y或W於胺基酸位置 97；

A、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 98；

A、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 99；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 100；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 100a；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 100b；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸

位置 100c；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸

位置 100d；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位

置 100e；

A、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位

置 100f；

A、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位

置 100g；

A、D、E、G、H、I、L、M、N、P、S、T或V於胺基酸位置 100h；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸

位置 100i；

A、D、F、I、L、M、N、Q、S、T或V於胺基酸位置 101；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位

置 102；及/或

(b) 輕鏈可變域胺基酸序列，於下述每一位置(皆根據Kabat編號)，包含針對該位

置的一或多個下述胺基酸殘基:

A、D、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 24；

A、G、N、P、S、T或V於胺基酸位置 25；

A、D、E、F、G、I、K、L、M、N、Q、R、S、T或V於胺基酸位置 26；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位

置 27；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸

位置 27a；

A、I、L、M、P、T或V於胺基酸位置 27b；

A、E、F、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、W或Y於胺基酸位置 27c；

A、E、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 27d；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 27e；

G、N、S或T於胺基酸位置 28；

A、F、G、H、K、L、M、N、Q、R、S、T、W或Y於胺基酸位置 29；

A、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、V、W或Y於胺基酸位置 30；

I、L、Q、S、T或V於胺基酸位置 31；

F、W或Y於胺基酸位置 32；

A、F、H、L、M、Q或V於胺基酸位置 33；

A、H或S於胺基酸位置 34；

I、K、L、M或R於胺基酸位置 50；

A、E、I、K、L、M、Q、R、S、T或V於胺基酸位置 51；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 52；

A、E、F、G、H、K、L、M、N、P、Q、R、S、V、W或Y於胺基酸位置 53；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 54；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V或Y於胺基酸位置 55；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 56；

A、G、K、S或Y於胺基酸位置 89；

Q於胺基酸位置 90；

G於胺基酸位置 91；

A、D、H、K、N、Q、R、S或T於胺基酸位置 92；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 93；

A、D、H、I、M、N、P、Q、R、S、T或V於胺基酸位置 94；

P於胺基酸位置 95；

F或Y於胺基酸位置 96；及

A、D、E、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T或V於胺基酸位置 97。

[5] 如 [1]至[4B]中任一項之抗原結合分子，其中該抗原結合分子具有擇自於下示(1)至(3)所組成之群組的至少一個特徵:

(1) 抗原結合分子不同時結合至各自表現於不同細胞上的CD3及CD137；

(2) 抗原結合分子具有針對CD137的促效活性；及

(3) 相較於包含SEQ ID NO: 1 的VH序列及SEQ ID NO: 57的VL序列的參考抗體，抗原結合分子對於結合至人類CD137具有等效於或低10-倍、20-倍、50-倍、100-倍的KD值 ，其中該KD值較佳地係藉由SPR於下述條件測定: 37°C ，pH 7.4 ，20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% Tween 20、0.005% NaN3；抗原結合分子係經固定於CM4感測晶片上，抗原作為分析物。

[6] 如[1]至[5]中任一項之抗原結合分子，更包含能夠結合至不同於CD3及CD137的第三抗原的抗體可變區。

[7] 如[6]之抗原結合分子，其中該第三抗原為特異性地表現於癌組織的分子。

[7A] 如[6]至[7]中任一項之抗原結合分子，其中該第三抗原為磷脂醯肌醇聚糖-3(GPC3)。

[7B] 如[7A]之抗原結合分子，其中能夠結合至磷脂醯肌醇聚糖-3(GPC3)的抗體可變區包含具有SEQ ID NO: 206的胺基酸序列的VH序列及具有SEQ ID NO: 207的胺基酸序列的VL序列。

[7C]如[6]至[7B]中任一項之抗原結合分子，其中該抗原結合分子具有選自下示(1)至(5)所成群組之至少一特徵:

(1) 該抗原結合分子誘發針對表現第三抗原的分子的細胞之T細胞的CD3活化，但不誘發針對表現CD137的細胞之T細胞的CD3活化；

(2) 該抗原結合分子誘發針對表現第三抗原的分子的細胞之T細胞的細胞毒性，但不誘發針對表現CD137的細胞之T細胞的細胞毒性；

(3) 該抗原結合分子於表現第三抗原分子的細胞不存在的情況下，不誘發自PBMC的細胞介素釋放；

(4) 相較於包含SEQ ID NO: 1的VH序列及SEQ ID NO: 57的VL序列的參考抗體，該抗原結合分子針對表現第三抗原分子的細胞之T細胞誘發等效於或大於2-倍、5-倍、10-倍、20-倍或100-倍的CD137活化及/或細胞毒性，當；及/或

(5) 相較於靶定第三抗原及CD3的參考雙特異性抗體，該抗原結合分子針對表現第三抗原分子的細胞之T細胞誘發大於2-倍、5-倍、10-倍、20-倍或100-倍的細胞毒性而不誘發自PBMC的細胞介素(IL-6)釋放，當。

[8]如[1]至[7C]中任一項之抗原結合分子，更包含抗體Fc區。

[9] 如[8]之抗原結合分子，其中該Fc區為相較於天然發生的人類IgG1抗體的Fc區，針對FcγR具有減低的結合活性的Fc區。

[10] 一種醫藥組成物，包含[1]至[9]中任一項之抗原結合分子以及醫藥上可接受的載劑。

[10A]如[10]之醫藥組成物或[1]至[9]抗原結合分子，其係用於治療癌症。

[10B] 一種[10]之醫藥組成物或[1]至[9]抗原結合分子的用途，其係用於製備

用以治療癌症的藥物。

[10C] 一種用於預防、治療或抑制癌症的方法，包含對罹患癌症的哺乳動物個體投藥[10]之醫藥組成物或[5]至[9]抗原結合分子。

[10D] 一種誘發細胞毒性的方法，較佳地於個體中之T細胞依賴性細胞毒性，包含對罹患癌症的哺乳動物個體投藥[10]之醫藥組成物或[5]至[9]之抗原結合分子。

[10E] 一種用於於個體中減低或殺死癌細胞的方法，包含對罹患癌症的哺乳動物個體投藥[10]之醫藥組成物或[5]至[9]抗原結合分子。

[10F] 一種用於延長癌症患者的壽命或存活率的方法，包含對罹患癌症的哺乳動物個體投藥[10]之醫藥組成物或[5]至[9]之抗原結合分子。

[10G] 如[10A]至[10F]中任一項所使用之醫藥組成物或抗原結合分子、用途或方法，其中該癌症係以表現或上調表現(upregulate)第三抗原較佳為磷脂醯肌醇聚糖-3(GPC3)，為特徵。

[11] 一種經單離的多核苷酸，包含編碼[1]至[9]中任一項之抗原結合分子的核苷酸序列。

[12] 一種表現載體，包含[11]之多核苷酸。

[13]一種宿主細胞，係經[11]之多核苷酸或[12]之表現載體轉形或轉染。

[14]一種用於產生多特異性抗原結合分子或多特異性抗體的方法，包含培養[13]之宿主細胞。

[15]一種多特異性抗原結合分子或多特異性抗體，係藉由[14]的方法所產生。

[16] 一種用於獲得或篩選抗體可變區的方法，該抗體可變區能夠結合至CD3及CD137，但不同時結合至CD3及CD137，該方法包含:

(a) 提供包含複數個抗體可變區的庫，

(b) 將步驟(a)提供的庫與作為第一抗原的CD3或CD137接觸，且收集結合至該第一抗原的抗體可變區，

(c) 將步驟(b)所收集的抗體可變區與CD3或CD137中的第二抗原(second antigen out of CD3 and CD137)接觸且收集結合至該第二抗原的抗體可變區，以及

(d) 選擇抗體可變區其為:

(1) 以低於約5×10^{-6} M 或介於5×10^{-6} M及3×10^{-8} M之間的平衡解離常數(KD)結合至CD137，較佳地藉由SPR於下述條件測定: 37°C，pH 7.4，20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% Tween 20、0.005% NaN3；該抗原結合分子係經固定於CM4感測晶片上，抗原作為分析物；及/或

(2) 以介於2×10^{-6} M及1×10^{-8} M之間的平衡解離常數(KD)結合至CD3，較佳地藉由SPR於下述條件測定: 25°C，pH 7.4，20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% Tween 20、0.005% NaN3；該抗原結合分子係經固定於CM4感測晶片上，抗原作為分析物。

[16A] 如[16]的方法，其中自步驟(c)至(d)，更包含於步驟(c)所收集的抗體可變區中導入一或多個胺基酸改變。

[17]如[16]或[16A]中任一項的方法，其中步驟(a)中或自步驟(c)至(d)的抗體可變區，為具有1至25個胺基酸改變的抗體可變區，其中該經改變的胺基酸係環中的胺基酸、FR3區中的胺基酸或選自抗體H鏈可變域中Kabat編號位置31至35、50至65、71至 74及95至102，及L鏈可變域中24至34、50至56及 89至97的胺基酸。

[18] 如[17]的方法，其中該重鏈可變域(VH)及/或輕鏈可變域(VL)包含選自表1.3(a)至表1.3(d)的一或多個胺基酸取代，其中該一或多個胺基酸取代對如表1.3(a)至表1.3(d)所示的CD3及/或 CD137，顯示至少增加0.2、0.3、0.5、0.8、1、1.5或2-倍的結合親和性。在一些實施例中，較佳為該抗體可變區 包含:

(a) 重鏈可變域胺基酸序列，於下述每一位置(皆根據Kabat編號)，包含針對該位

置的一或多個下述胺基酸殘基:

A、D、E、I、G、K、L、M、N、R、T、W或Y於胺基酸位置26；

D、F、G、I、M或L，於胺基酸位置27；

D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置28；

F或W於胺基酸位置29；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置30；

F、I、N、R、S、T或V於胺基酸位置31；

A、H、I、K、L、N、Q、R、S、T或V於胺基酸位置32；

W於胺基酸位置33；

F、I、L、M或V於胺基酸位置34；

F、H、S、T、V或Y於胺基酸位置35；

E、F、H、I、K、L、M、N、Q、S、T、W或Y於胺基酸位置50；

I、K或V於胺基酸位置51；

K、M、R或T於胺基酸位置52；

A、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、V、W或Y於胺基酸位置52b；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置52c；

A、E、F、H、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置53；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置54；

E、F、G、H、L、M、N、Q、W或Y於胺基酸位置55；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位

置56；

A、D、E、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T或V於胺基酸位置57；

A、F、H、K、N、P、R或Y於胺基酸位置58；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置59；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置60；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置61；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置62；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置63；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置64；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置65；

H或R於胺基酸位置93；

F、G、H、L、M、S、T、V或Y於胺基酸位置94；

I或V於胺基酸位置95；

F、H、I、K、L、M、T、V、W或Y於胺基酸位置96；

F、Y或W於胺基酸位置97；

A、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置98；

A、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置99；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置100；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置100a；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置100b；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置100c；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置100d；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置100e；

A、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置100f；

A、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置100g；

A、D、E、G、H、I、L、M、N、P、S、T或V於胺基酸位置100h；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置100i；

A、D、F、I、L、M、N、Q、S、T或V於胺基酸位置101；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置102；

及/或

(b) 輕鏈可變域胺基酸序列，於下述每一位置(皆根據Kabat編號)，包含針對該位

置的一或多個下述胺基酸殘基:

A、D、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置24；

A、G、N、P、S、T或V於胺基酸位置25；

A、D、E、F、G、I、K、L、M、N、Q、R、S、T或V於胺基酸位置26；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置27；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置27a；

A、I、L、M、P、T或V於胺基酸位置27b；

A、E、F、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、W或Y於胺基酸位置27c；

A、E、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置27d；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置27e；

G、N、S或T於胺基酸位置28；

A、F、G、H、K、L、M、N、Q、R、S、T、W或Y於胺基酸位置29；

A、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、V、W或Y於胺基酸位置30；

I、L、Q、S、T或V於胺基酸位置31；

F、W或Y於胺基酸位置32；

A、F、H、L、M、Q或V於胺基酸位置33；

A、H或S於胺基酸位置34；

I、K、L、M或R於胺基酸位置50；

A、E、I、K、L、M、Q、R、S、T或V於胺基酸位置51；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置52；

A、E、F、G、H、K、L、M、N、P、Q、R、S、V、W或Y於胺基酸位置53；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置54；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V或Y於胺基酸位置55；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置56；

A、G、K、S或Y於胺基酸位置89；

Q於胺基酸位置90；

G於胺基酸位置91；

A、D、H、K、N、Q、R、S或T於胺基酸位置92；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置93；

A、D、H、I、M、N、P、Q、R、S、T或V於胺基酸位置94；

P於胺基酸位置95；

F或Y於胺基酸位置96； 及

A、D、E、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T或V於胺基酸位置97。

另一態樣中，本發明關於抗原結合分子，如抗體，其結合至CD137的N終端區的至少一、二、三或更多個胺基酸殘基，該CD137包含LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAEC (SEQ ID NO: 152)的胺基酸序列，較佳為人類CD137的LQDPCSN、NNRNQI 及/或GQRTCDI。

【0018】 在一些實施例中，本發明的抗原結合分子藉由其對於CD3的促效活性可活化T細胞，且其可誘發針對標靶細胞的T細胞的細胞毒性，以及藉由其

對CD137及CD3的共刺激性促效活性強化T細胞活化、存活及分化為記憶T細胞。同時，本發明的抗原結合分子，因其不同時結合至CD3及CD137，可避免由CD137及CD3的交聯所造成的不良事件。

【0019】 在一些實施例中，本發明的抗原結合分子藉由對CD137的促效活性亦可活化表現CD137的免疫細胞及強化對於標靶細胞的免疫反應。

【圖式簡單說明】

【0020】

圖1.1為親和性成熟的GPC3/Dual-Ig變體三特異性抗體的CD3促效活性的測量。平均發光單位 ± 標準偏差(s.d.)的偵測係藉由將SK-pca60細胞株與 NFAT-luc2 Jurkat 報導子細胞，經由選擇的抗體分為盤1(上方圖)及盤2(下方圖) E:T比例5 共培養24小時。抗體以0.02、0.2及2 nM添加。

圖1.2為親和性成熟的GPC3/Dual-Ig變體三特異性抗體的CD137促效活性的測量。平均發光單位 ± 標準偏差(s.d.)的偵測係藉由將SK-pca60細胞株與過表現CD137的 Jurkat NFκB 報導子細胞，經由選擇的抗體分為盤1(上方圖)及盤2(下方圖) E:T比例5 共培養5小時。抗體以0.5、2.5及5 nM添加。

圖1.3a為於經選擇的GPC3/Dual-Ig 三特異性分子(盤1)的存在下，與PBMC共培養之表現GPC3的SK-pca60細胞株的細胞毒性。平均細胞抑制(%)值 ± s.d.係於接近120小時經作圖獲得。

圖1.3b為於經選擇的GPC3/Dual-Ig 三特異性分子(盤2)的存在下，藉由與PBMC共培養之對於表現GPC3的SK-pca60細胞株的細胞毒性。平均細胞抑制(%)值 ± s.d.係於接近120小時經作圖獲得。

圖1.3c為於經選擇的GPC3/Dual-Ig 三特異性分子的存在下，表現GPC3的SK-pca60細胞株與PBMC的共培養物中測得的細胞介素(IFNγ) 的釋放。共培養物

的上清部分係於48小時時間點分析。圖顯示IFNγ的平均濃度± s.d.。抗體係分為盤1(上方圖)及盤2(下方圖)進行評估。

圖1.3d為於經選擇的GPC3/Dual-Ig 三特異性分子的存在下，表現GPC3的SK-pca60細胞株與PBMC的共培養物中測得的細胞介素(IL-2)的釋放。共培養物的上清部分係於48小時時間點分析。圖顯示IL-2的平均濃度± s.d. 。抗體係分為盤1(上方圖)及盤2(下方圖)進行評估。

圖1.3e為於經選擇的GPC3/Dual-Ig 三特異性分子的存在下，表現GPC3的SK-pca60細胞株與PBMC的共培養物中測得的細胞介素(IL-6)釋放。共培養物的上卿部分係於48小時時間點分析。圖顯示IL-6的平均濃度± s.d. 。抗體係分為盤1(上方圖)及盤2(下方圖)進行評估。.

圖2.1為 三特異性抗體(mAb AB)的設計及構築。

圖2.2為所製備的三特異性抗體的命名規則。

Dual Fab圖2.3a為對於GPC3陰性細胞的抗原獨立性Jurkat活化。親代CHO細胞係與 NFAT-luc2 Jurkat報導子細胞共培養，E:T 5進行 24小時。圖描繪不同抗體格式物於0.5、5及50nM培養的平均發光單位± 標準偏差(s.d.)。

圖 2.3b為對於GPC3陰性細胞的抗原獨立性Jurkat活化。過表現CD137的CHO細胞係與 NFAT-luc2 Jurkat報導子細胞共培養，E:T 5進行 24小時。圖描繪不同抗體格式物於0.5、5及50nM培養的平均發光單位± 標準偏差(s.d.)。

圖2.4a為抗原獨立性細胞介素(IFNγ)於PBMC溶液中的釋放。以3.2、16及80nM添加至PBMC溶液的親和性成熟的GPC3/Dual-Ig變體或GPC3/CD137xCD3三特異性抗體的上清部分係於48小時時間點分析。圖顯示IFNγ的平均濃度±s.d.。 抗體分為盤1(上方圖)及盤2(下方圖)進行評估。

圖 2.4b為抗原獨立性細胞介素(TNFα)於PBMC溶液中的釋放。以3.2、16及80nM添加至PBMC溶液的親和性成熟的GPC3/Dual-Ig變體或GPC3/CD137xCD3三特

異性抗體的上清部分係於48小時時間點分析。圖顯示TNFα的平均濃度± s.d.。抗體分為盤1(上方圖)及盤2(下方圖)進行評估。

圖2.4c為抗原獨立性細胞介素(IL-6)於PBMC溶液中的釋放。以3.2、16及80nM添加至PBMC溶液的親和性成熟的GPC3/Dual-Ig變體或GPC3/CD137xCD3三特異性抗體的上清部分係於48小時時間點分析。圖顯示IL-6的平均濃度± s.d.。抗體分為盤1(上方圖)及盤2(下方圖)進行評估。

圖3.1a為人源化CD3/CD137小鼠模型中針對LLC1/hGPC3異體移植物的抗體的活體內功效。Y-軸意指腫瘤體積(mm^3)及X-軸意指腫瘤植入後日數。

圖3.1b為人源化CD3/CD137小鼠模型中針對LLC1/hGPC3異體移植物的抗體的活體內功效。Y-軸意指腫瘤體積(mm^3)及X-軸意指腫瘤植入後日數。

圖3.1c為血漿IL-6濃度。小鼠係於抗體注射後2小採血及使用Bio-Plex Pro Mouse Cytokine Th1 Panel測定血漿IL-6濃度。

圖3.2為huNOG 小鼠模型中針對sk-pca-13a異體移植物的抗體的活體內功效。Y-軸意指腫瘤體積(mm^3)及X-軸意指腫瘤植入後日數。

圖3.3a為於CD137上的H0868L0581 Fab接觸區的抗原決定基。於 CD137胺基酸序列中的抗原決定基定位(Epitope mapping)(自H0868L0581，黑色: 比3.0 Å更接近，條紋: 比4.5 Å更接近)。

圖3.3b為於CD137上的H0868L0581 Fab接觸區的抗原決定基。於晶體結構中的抗原決定基定位 (自H0868L0581，深灰色球: 比3.0 Å更接近，淺灰色棒: 比4.5 Å更接近)。

圖4為顯示C3NP1-27的設計，CD3ε肽抗原經由雙硫鍵連接子經生物素標記的圖。

圖5為顯示以對CD3及CD137的噬菌體(phage)展示所獲得的純株的噬菌體ELISA的結果圖。Y軸意指各純株對CD137-Fc的特異性且X軸意指各純株對CD3的特異性。

圖6為顯示以對CD3及CD137的噬菌體(phage)展示所獲得的純株的噬菌體ELISA的結果圖。Y軸意指於珠粒ELISA中對CD137-Fc的特異性且X軸意指於盤ELISA中對CD3的特異性，如同各純株的第5圖。

圖7為顯示人類CD137胺基酸序列與食蟹猴CD137胺基酸序列的比較數據圖。

圖8為顯示以對CD3及CD137的噬菌體展示所獲得的IgG的ELISA結果圖。Y軸意指各純株對食蟹猴CD137-Fc的特異性且X軸意指各純株對人類CD137的特異性。

圖9為顯示以對CD3及CD137的噬菌體展示所獲得的IgG的ELISA結果圖。Y軸意指對CD3e的特異性。

圖10為顯示以對CD3及CD137的噬菌體展示所獲得的IgG的競爭性ELISA的結果圖。Y軸意指ELISA對生物素-人類CD137-Fc或生物素-人類Fc的反應。過量的人類CD3或人類Fc使用作為競爭者。

圖11A為顯示對CD3及CD137的噬菌體展示淘選輸出匯池(panning output pool)的噬菌體ELISA的結果圖組。Y軸意指對人類CD137的特異性。X軸意指淘選輸出匯池，首次(Primary)為噬菌體展示淘選前的匯池，R1至R6分別意指噬菌體展示淘選回合1至回合6之後的淘選輸出匯池。

圖11B為顯示對於CD3及CD137的噬菌體展示淘選輸出匯池的噬菌體ELISA的結果圖組。

Y軸意指對於食蟹猴CD137的特異性。X軸意指淘選輸出匯池，首次(Primary)為噬菌體展示淘選前的匯池，且 R1至R6分別意指噬菌體展示淘選回合1至回合6之後的淘選輸出匯池。

圖11C為顯示對於CD3及CD137的噬菌體展示淘選輸出匯池的噬菌體ELISA的結果圖組。Y軸意指對於CD3的特異性。 X軸意指淘選輸出匯池。首次(primary)為噬菌體展噬淘選前的匯池，且R1至R6分別意指噬菌體展示淘選回合1至回合6之後的淘選輸出匯池。

圖12.1為顯示以對CD3及CD137的噬菌體展示所獲得的IgG的ELISA結果圖組。Y軸意指對於人類CD137-Fc的特異性以及X軸意指各純株(clone)對於食蟹猴CD137或CD3的特異性。

圖12.2為顯示以對CD3及CD137的噬菌體展示所獲得的IgG的ELISA結果圖組。Y軸意指各純株對人類CD137-Fc的特異性以及X軸意指各純株對人類CD137或CD3的特異性。

圖12.3為顯示以對CD3及CD137的噬菌體展示所獲得的IgG的ELISA結果圖組。Y軸意指對人類CD137-Fc的特異性以及X軸意指各純株對食蟹猴CD137或CD3的特異性。

圖13為顯示以對CD3及CD137的噬菌體展示所獲得的IgG的ELISA結果圖組。Y軸意指對人類CD137-Fc的特異性以及X軸意指各純株對食蟹猴CD137或CD3的特異性。

圖14為顯示以對CD3及CD137的噬菌體展示所獲得的IgG的競爭性ELISA結果圖。Y軸意指ELISA對生物素-人類CD137-Fc或生物素-人類Fc的反應。過量的人類CD3或人類Fc使用作為競爭者。

圖15為顯示以對CD3及CD137的噬菌體展示所獲得的IgG的ELISA結果圖，以鑑定各純株的抗原決定基域。Y軸意指ELISA對人類CD137各域的反應。

圖16為顯示以對CD3及CD137的噬菌體展示親和性成熟所獲得的IgG的ELISA結果圖組。Y軸意指對各純株對人類CD137-Fc的特異性且X軸意指對各純株對食蟹猴CD137或CD3的特異性。

圖17.1為顯示以對CD3及CD137的噬菌體展示所獲得的IgG的競爭性ELISA結果圖組。

Y軸意指ELISA對生物素-人類CD137-Fc或生物素-人類Fc的反應。過量的人類CD3使用作為競爭者。

圖17.2為顯示以對CD3及CD137的噬菌體展示所獲得的IgG的競爭性ELISA結果圖組。

Y 軸意指ELISA對生物素-人類CD137-Fc或生物素-人類Fc的反應。過量的人類CD3使用作為競爭者。

圖17.3為顯示以對CD3及CD137的噬菌體展示所獲得的IgG的競爭性ELISA結果圖組。

Y 軸意指ELISA對生物素-人類CD137-Fc或生物素-人類Fc的反應。過量的人類CD3使用作為競爭者。

圖17.4為顯示以對CD3及CD137的噬菌體展示所獲得的IgG的競爭性ELISA結果圖組。

Y 軸意指ELISA對生物素-人類CD137-Fc或生物素-人類Fc的反應。過量的人類CD3使用作為競爭者。

圖17.5]為顯示以對CD3及CD137的噬菌體展示所獲得的IgG的競爭性ELISA結果圖組。

Y 軸意指ELISA對生物素-人類CD137-Fc或生物素-人類Fc的反應。過量的人類CD3使用作為競爭者。

圖18A為顯示來自經活化B細胞之經由抗-人類GPC3/Dual-Fab抗體的IL-6分泌機制示意圖。

圖18B表示顯示藉由自經活化的B細胞所分泌的IL-6的產生程度，來評估各種抗人類GPC3/Dual Fab抗體的CD137所媒介的促效活性的結果圖。Ctrl是指陰性對照人類IgG1抗體。

圖19A為顯示經由抗人類GPC3/Dual Fab抗體之經活化的Jurkat T細胞中螢光素酶(Luciferase)表現的機制的示意圖。

圖19B為顯示藉由於經活化的Jurkat T細胞中表現的螢光素酶的產生程度，來評

估各種抗人類GPC3/Dual Fab抗體的CD3所媒介的促效活性的結果圖組。Ctrl是指陰性對照人類IgG1抗體。Dual Fab

圖20為顯示於各固定化抗體的存在下，評估自人類PBMC衍生的T細胞的細胞介素(IL-2、IFN-γ及TNF-α)釋放的結果圖組。Y軸意指所分泌的各細胞介素的濃度且X軸意指固定化抗體的濃度。對照抗CD137抗體(B)、對照抗CD3抗體(CE-115)、陰性對照抗體(Ctrl)及雙抗體之一者(H183L072)用於測定。

圖21為顯示評估以各雙特異性抗體之針對GPC3陽性靶細胞(SK-pca60及SK-pca13a)的T-細胞依賴性細胞的細胞毒性(T-cell dependent cellular cytotoxicity，TDCC)的結果圖組。Y軸意指細胞生長抑制(Cell Growth Inhibition，CGI)的比例且X軸意指各雙特異性抗體的濃度。抗GPC3/雙二特異性抗體(dual bi-specific antibody)(GC33/H183L072)、陰性對照/雙二特異性抗體(Ctrl/H183L072)、抗GPC3/抗CD137雙特異性抗體(GC33/B)以及陰性對照/抗CD137雙特異性抗體(Ctrl/B)用於此測定。5倍量的效應子(E)細胞係添加於腫瘤(T)細胞(ET5)。

圖22顯示CE115對於CD3e的細胞-ELISA的結果。

圖23顯示EGFR_ERY22_CE115的分子型示意圖。

圖24顯示EGFR_ERY22_CE115的TDCC(SK-pca113)的結果。

圖25為具有小於0.8的結合量比例的抗體的例示性感測圖(sensorgram)。

圖26為顯示GPC3/CD137xCD3三特異性抗體及抗-GPC3/Dual-Fab抗體的同時結合的Biacore分析的結果圖組。Y軸意指對各抗原的結合反應。一開始，人類CD3(hCD3)用作為分析物，然後hCD3(顯示為虛線)或人類CD137 (hCD137)以及hCD3的混合物(顯示為實線)亦用作為分析物。

圖27為顯示各抗體對CD137陽性CHO細胞或Jurkat細胞的FACS分析結果的感測圖組。圖27(a)及圖27(c)為結合至人類CD137陽性CHO細胞的結果，且圖27(b)及

圖27(d)為結合至親代CHO細胞的結果。於圖27(a)及圖27(b)中，實線顯示抗GPC-3/雙抗體(GC33/H183L072，亦即GPC33/H183L072)且填實顯示對照抗體(Ctrl)的結果。圖27(c)及圖27(d)中，實線、深灰填實以及淺灰填實分別顯示GPC3/CD137xCtrl三特異性抗體、GPC3/CD137xCD3三特異性抗體以及Ctrl/CtrlxCD3三特異性抗體的結果。圖27(e)及圖27(f)為結合至Jurkat CD3陽性細胞的結果。圖27(e)中，實線及填實分別顯示抗GPC3/雙抗體(GC33/H183L072，亦即GPC33/H183L072)及對照抗體(Ctrl)的結果。圖27(f)中，實線、深灰填實以及淺灰填實分別顯示GPC3/CtrlxCD3三特異性抗體、GPC3/CD137xCD3三特異性抗體以及Ctrl/CD137xCtrl三特異性抗體的結果。

圖28表示顯示藉由於經活化的Jurkat T細胞中表現的螢光素酶的產生程度，來評估各種抗體對GPC3陽性靶細胞SK-pca60之CD3所媒介的促效活性的結果。六種三-特異性抗體、抗GPC3/Dual Fab抗體(GPC3/H183L072)及對照/Dual Fab抗體(Ctrl/H183L072)用於此測定。X軸意指各抗體所使用的濃度。

圖29表示顯示藉由於經活化的Jurkat T細胞中表現的螢光素酶的產生程度，來評估各種抗體對人類CD137陽性CHO細胞及親代CHO細胞之CD3所媒介的促效活性的結果。六種三-特異性抗體、抗GPC3/Dual Fab抗體(GPC3/H183L072)及對照/Dual Fab抗體(Ctrl/H183L072)用於此測定。X軸意指各抗體所使用的濃度。

圖30為顯示於各可溶性抗體的存在下，評估自人類PBMC的細胞介素(IL-2、IFN-γ及TFN-α)釋放的結果圖組。Y軸意指所分泌的各細胞介素的濃度且X軸意指所使用的抗體濃度。Ctrl/CD137xCD3三特異性抗體以及對照/Dual Fab抗體(Ctrl/H183L072)用於此測定。

【實施方式】

【0021】 本發明中，「抗體可變區」通常意指包含由四個框架區(framework

region，FR)以及被其側接(flank)的三個互補決定區(complementarity-determining region，CDR)所構成的域的區，且亦包括其部分序列，只要該部分序列具有結合至部分抗原或全抗原的活性。特別地，較佳的是包含抗體輕鏈可變域(VL)及抗體重鏈可變域(VH)的區。本發明的抗體可變區可具有任意序列且可為衍生自任何抗體的可變區，如小鼠抗體、大鼠抗體、兔抗體、山羊抗體、駱駝抗體以及藉由該等非人類抗體的人源化所獲得的人源化抗體，以及人類抗體。「人源化抗體」，也稱為重塑(reshaped)人類抗體，係藉由將例如小鼠抗體之非人類哺乳動物-衍生的抗體的互補決定區(complementarity-determining region，CDR)接枝至人類抗體CDR所獲得。鑑定CDR的方法為所屬技術領域習知的(Kabat et al., Sequence of Proteins of Immunological Interest (1987), National Institute of Health, Bethesda, Md; and Chothia et al., Nature (1989) 342: 877)。前述的一般基因重組方案亦已為所屬技術領域習知(參照歐洲專利公開案 EP 125023及WO 96/02576)。

【0022】 本發明的「不同時結合至CD3及CD137(4-1BB)」的「抗體可變區」意指本發明的抗體可變區無法在與CD3結合的狀態中結合CD137，反之該可變區無法在與CD137結合的狀態中結合CD3。此全文中，用語「不同時結合至CD3及CD137」亦包括將表現CD3的細胞交聯至表現CD137的細胞，或不同時結合至各表現於不同細胞上的CD3及CD137。此用語更包括當CD3及CD137不表現於細胞膜，和可溶性蛋白質一樣，或二者皆位於相同細胞時，可變區可同時結合至CD3及CD137二者，但無法同時結合至CD3及CD137各表現於不同細胞上的情況。這種抗體可變區不特別限制，只要該抗體可變區具有該等功能。其範例可包括藉由改變其部分胺基酸以結合至所期望抗原之衍生自IgG-型抗體可變區的可變區。欲改變的胺基酸係選自於結合至CD3或CD137的抗體可變區中，例如其改變不取消對抗原的結合的胺基酸。

此全文中，用語「表現於不同細胞」僅意指抗原表現於分開的細胞。這種

細胞的組合可為，例如相同類型的細胞，如T細胞與另一T細胞，或可為不同類型的細胞，如T細胞與NK細胞。

【0023】　本發明中，可單獨使用一個胺基酸改變，或可組合使用複數個胺基酸改變。

於組合使用複數個胺基酸改變的情況中，欲組合的改變數不特別限定且可適宜地設定於可實現本發明目的的範圍內。欲組合的改變數為，例如2或更多以及30或更少，較佳為2或更多以及25或更少、2或更多以及22或更少、2或更多以及20或更少、2或更多以及15或更少、2或更多以及10或更少、2或更多以及5或更少、或2或更多以及3或更少。

欲組合的複數個胺基酸改變可僅加成於抗體重鏈可變域或輕鏈可變域或可合適地分布於重鏈可變域及輕鏈可變域二者。

【0024】　可變區中一或多個胺基酸殘基可接受作為欲改變的胺基酸殘基，只要抗原結合活性受到維持。在改變可變區中的胺基酸的情況中，所得的可變區較佳地維持對應的未經改變抗體的結合活性，且較佳地具有，例如改變前的結合活性的50%或更高、更佳地80%或更高，再更佳地100%或更高，但根據本發明的可變區不限定於此。可藉由胺基酸改變增加結合活性，且可為改變前的結合活性的例如2倍、5倍或10倍。

【0025】　對於胺基酸改變較佳的區的範例包括可變區中的溶劑暴露區及環。其中，較佳為CDR1、CDR2、CDR3、FR3及環。具體地，較佳為H鏈可變域中的Kabat編號位置31至35、50至65、71至74及95至102以及L鏈可變域中的Kabat編號位置24至34、50至56及89至97。更佳為H鏈可變域中的Kabat編號位置31、52a至61、71至74及97至101以及L鏈可變域中Kabat編號位置24至34、51至56及89至96。再者，於胺基酸改變的同時可進一步導入增加抗原結合活性的胺基酸。

【0026】 本文所使用的詞語「高度可變區(hypervariable region)」或「HVR」意指其係於序列中為高度可變(「互補性決定區(complementarity determining region)」或「CDR」)及/或形成結構性定義環(「高度可變環」)及/或含有抗原接觸殘基(「抗原接觸物(antigen contact)」)的抗體可變域的區。一般而言，抗體包含6個HVR：3個於VH (H1、H2、H3)以及3個於VL (L1、L2、L3)。

本文中例示性HVR包括：

(a) 發生於胺基酸殘基26至32 (L1)、50至52 (L2)、91至96 (L3)、26至32 (H1)、53至55 (H2)及96至101 (H3)的高度可變環(Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987))；

(b) 發生於胺基酸殘基24至34 (L1)、50至56 (L2)、89至97 (L3)、31至35b (H1)、50至65 (H2)及95至102 (H3)的CDR(Kabat et al., Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National of Health, Bethesda, MD (1991))；

(c) 發生於胺基酸殘基27c至36 (L1)、46至55 (L2)、89至96 (L3)、30至35b (H1)、47至58 (H2)及93至101 (H3)的抗原接觸物(MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996))；

(d) (a)、(b)及/或(c)的組合，包括HVR胺基酸殘基46至56 (L2)、47至56 (L2)、48至56 (L2)、49至56 (L2)、26至35 (H1)、26至35b (H1)、49至65 (H2)、93至102 (H3)及94至102 (H3)。

除非特別指明，本文中，可變域中的HVR殘基及其他殘基(例如，FR殘基)，係根據Kabat et al.編號，如前文。

【0027】 本發明中，「環」意指含有不涉及維持免疫球蛋白β桶形結構的殘基的區。

本發明中，胺基酸改變意指取代、刪除、加成、插入或修飾、或其組合。

本發明中，胺基酸改變可與胺基酸突變交換使用且以其相同意義使用。

【0028】 胺基酸殘基的取代係藉由以另一胺基酸殘基置換來改變，例如下述(a)至(c)：(a) 具有平板結構或螺旋結構的區的多肽骨架結構；(b) 靶位點的電荷或疏水性；以及(c) 側鏈的尺寸。

根據通常的側鏈性質，將胺基酸殘基分類為下述群組：(1) 疏水性殘基：正白胺酸(norleucine)、Met、Ala、Val、Leu及Ile；(2) 中性親水性殘基：Cys、Ser、Thr、Asn及Gln；(3) 酸性殘基：Asp及Glu；(4) 鹼性殘基：His、Lys及Arg；(5) 影響鏈方向的殘基：Gly及Pro；以及(6) 芳族殘基：Trp、Tyr及Phe。

【0029】 各該群組內胺基酸殘基的取代係稱為保守性取代，而一群組的胺基酸殘基藉由另一群組的胺基酸殘基的取代係稱為非保守性取代。

根據本發明的取代可為保守性取代或可為非保守性取代。或者，可組合保守性取代及非保守性取代。

【0030】 胺基酸殘基的改變亦包括：自藉由其改變不取消對抗原的結合的胺基酸的隨機改變所獲得者，於結合至CD3或CD137的抗體可變區中，選擇可結合至CD3及CD137但無法同時結合至該等抗原的可變區；以及將先前已知具有針對所期望抗原的結合活性的肽插入至上述區。

【0031】 本發明的抗體可變區中，上述改變可與所屬技術領域習知的改變組合。例如，可變區的N-終端麩醯胺(glutamine)藉由焦麩醯胺化(pyroglutamylation)為焦麩胺酸的修飾係所述技術領域中具有通常知識者習知的修飾。因此，本發明之於其重鏈的N終端具有麩醯胺的抗體可含有具有此N-終端麩醯胺被修飾為焦麩胺酸的可變區。

【0032】 這種抗體可變區可進一步具有改良，例如抗原結合、藥物動力學、安定性或抗原性的胺基酸改變。可改變本發明的抗體可變區，以具有針對抗原的pH依賴性結合活性，藉此可重複地結合至抗原(WO2009/125825)。

【0033】　再者，根據靶組織-特異性化合物濃度來改變抗原-結合活性的胺基酸改變可加成至例如這種結合至第三抗原的抗體可變區(WO2013/180200)。

【0034】　可變區可進一步被改變，以例如增強結合活性、改良特異性、減低pI、賦予pH依賴性抗原結合性質、改良結合的熱安定性、改良可溶性、改良針對化學修飾的安定性、改良衍生自糖鏈的異質性、避免藉由使用用以減低免疫原性之電腦(*in silico*)預測或活體外(*in vitro*)基於T細胞的測定所鑑定的T細胞抗原決定基、或導入T細胞抗原決定基用以活化調節T細胞(regulatory T cell)(mAbs 3: 243-247, 2011)。

【0035】　本發明的抗體可變區是否「可結合至CD3及CD137」，可藉由所屬技術領域習知的方法來決定。

此可藉由，例如電化學發光方法(electrochemiluminescence method，ECL 方法)來決定(BMC Research Notes 2011, 4: 281)。

具體地，例如，由可結合至CD3及CD137的區，例如欲測試的生物素標記抗原結合分子或其單價抗體(缺乏由一般抗體所帶有的二個Fab區之一者的抗體)的Fab區所構成的低分子抗體與以硫標籤(釕複合物)標記的CD3或CD137混合，且該混合物添加至鏈黴素-固定化盤。此操作中，欲測試的生物素標記抗原結合分子結合至盤中的鏈黴素。由硫標籤發展出光，且可使用Sector Imager 600或2400(MSD K.K.)等偵測發光(luminescence)信號，以藉此確認前述欲測試的抗原-結合分子的區對CD3或CD137的結合。

替代地，可藉由ELISA、FACS (fluorescence activated cell sorting，螢光活化細胞分類)、ALPHAScreen (amplified luminescent proximity homogeneous assay screen，放大發光近似均質測定篩選)、基於表面電漿共振(surface plasmon resonance，SPR)現象的BIACORE方法等(Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006)103 (11), 4005-4010)來進行此測定。

【0036】 具體地，可使用例如基於表面電漿共振(SPR)現象的交互分析儀Biacore (GE Health Japan Corp.)來進行此測定。Biacore分析儀包括任何型號如Biacore T100、T200、X100、A100、4000、3000、2000、1000或C。用於Biacore的任何感測晶片，如CM7、CM5、CM4、CM3、C1、SA、NTA、L1、HPA或Au晶片皆可使用作為感測晶片。用於捕捉本發明的抗原結合分子的蛋白質，如蛋白質A、蛋白質G、蛋白質L、抗人類IgG抗體、抗人類IgG-Fab、抗人類L鏈抗體、抗人類Fc抗體、抗原性蛋白質或抗原性肽，係藉由如胺偶合、雙硫偶合或醛偶合之偶合方法固定化至感測晶片。CD3或CD137係注射於其上作為分析物，以及測定該交互作用以獲得感測圖。此操作中，CD3或CD137的濃度可根據測定樣品的交互作用強度(例如，KD)於數μM至數pM的範圍內選擇。

【0037】 或者，CD3或CD137可取代抗原結合分子而固定化至感測晶片，欲評估的抗體樣品反過來允許與其交互作用。本發明的抗原結合分子的抗體可變區是否具有針對CD3或CD137的結合活性，可基於由該交互作用的感測圖所計算的解離常數(KD)或基於抗原結合分子樣品作用後相較於作用前的層級之感測圖中增加的程度而予以證實。

【0038】 在一些實施例中，本發明之抗體可變區對感興趣抗原(亦即CD3或CD137)的結合活性或親和性，係使用例如Biacore T200儀器(GE Healthcare)或Biacore 8K 儀器(GE Healthcare)於37度C(對於CD137)或25度C(對於CD3)予以評價。抗人類Fc(例如，GE Healthcare)係使用胺偶合套組(例如，GE Healthcare)固定至CM4感測晶片的所有流通槽。抗原結合分子或抗體可變區係經捕捉至抗-Fc感測表面，然後抗原(CD3或CD137)係經注射至流通槽。抗原結合分子或抗體可變區的捕捉程度可為以200 共振單元(RU)為目標。重組人類CD3或CD137可以藉由二倍系列稀釋所製備，以400至25nM注射，接著解離。所有抗原結合分子或抗體可變區及分析物係於含有20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% Tween 20、

0.005% NaN3的ACES pH 7.4中製備。感測器表面於各循環係以3M MgCl2再生。結合親和性係使用例如Biacore T200評估軟體，版本 2.0 (GE Healthcare)或Biacore 8K評估軟體(GE Healthcare)藉由處理及擬合(fitting)數據至1:1結合模型而予以測定。計算KD值用以評估本發明的抗原結合域的特異性結合活性或親和性。

【0039】 藉由使用二種珠粒(捐贈者及接受者)的ALPHA技術基於下述準則來實施ALPHAScreen方法：僅當經由與捐贈者珠粒結合的分子以及與接受者珠粒結合的分子之間的交互作用，而使該二珠粒位於接近時，偵測到發光信號。捐贈者珠粒中的雷射-激發感光劑將環境氧轉換為具激發態的單態氧(singlet oxygen)。單態氧圍繞捐贈者珠粒擴散且觸及位於接近的接受者珠粒，以藉此於珠粒中引起化學發光，其最終發射光。在與捐贈者珠粒結合的分子以及與接受者珠粒結合的分子之間的交互作用不存在時，由捐贈者珠粒所產生的單態氧不觸及接受者珠粒。因此，無化學發光反應發生。

【0040】 在欲觀察其之間交互作用的物質之一者(配體)係固定化至感測晶片的薄金膜。由背部以光照射感測晶片，使得該薄金膜及玻璃之間的界面發生全反射。因此，反射強度(SPR信號)下降的位點形成於反射光的一部分。在欲觀察其之間交互作用的物質之另一者(分析物)係注射至該感測晶片的表面。一旦分析物結合至配體，經固定化之配體分子的質量增加，改變感測晶片表面上的溶劑的折射率。此折射率的變化偏移SPR的位置(相對於此，已結合的分子的解離使信號回至原始位置)。Biacore系統於偏移量的軸作圖，亦即感測晶片表面的質量變化，且展示時間依賴性的質量變化作為測定數據(感測圖)。經捕捉於感測晶片表面之已結合至配體的分析物的量(於分析物的交互作用之前與之後之間感測圖的反應變化量)可由感測圖決定。然而，由於結合量亦取決於配體量，比較必須於所使用的配體量為實質相同的條件下進行。可由感測圖曲線決定動力學，亦即締合速率常數(ka)與解離速率常數(kd)，而可由該等常數之間的比例決

定親和性(KD)。抑制測定也較佳地使用於BIACORE方法。抑制測定的範例描述於Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103(11), 4005-4010。

【0041】 可藉由下述來證實本發明之抗原結合分子是否「不同時結合至CD3及CD137」：證實抗原-結合分子具有針對CD3及CD137二者的結合活性；然後使CD3或CD137預先結合至包含具有此結合活性的可變區的抗原結合分子；以及然後藉由上述方法決定其存在或不存在針對另一者的結合活性。或者，此亦可藉由決定抗原結合分子對固定化至ELISA盤或感測晶片的CD3或CD137的結合，是否藉由另一者添加至溶液受到抑制而證實。一些實施例中，本發明之抗原結合分子對CD3或CD137的結合係藉由抗原結合分子對另一者的結合而受到抑制至少50%、較佳60%或更多、更佳70%或更多、更佳80%或更多、再佳90%或更多、或甚至更佳95%或更多。

【0042】 一態樣中，當一抗原(例如，CD3)被固定化，抗原結合分子對CD3的結合的抑制可於另一抗原(例如，CD137)的存在下，藉由所屬技術領域習知的方法(亦即，ELISA、BIACORE等)予以決定。另一態樣中，當CD137被固定化，抗原結合分子對CD137的結合的抑制亦可於CD3的存在下予以決定。當進行上述二態樣之任一者時，本發明的抗原結合分子係決定為不同時結合至CD3及CD137，若結合受到抑制至少50%、較佳60%或更多、更佳70%或更多、更佳80%或更多、再佳90%或更多、或甚至更佳95%或更多。

一些實施例中，注射作為分析物的抗原濃度高於經固定之另一抗原濃度至少1倍、2倍、5倍、10倍、30倍、50倍或100倍。

較佳方式中，注射作為分析物的抗原濃度為高於欲固定之另一抗原濃度100倍且結合受到抑制至少80%。

一實施例中，計算抗原結合分子的CD3(分析物)結合活性與抗原結合分子的CD137(經固定化)結合活性的KD值的比例(KD(CD3)/KD(CD137)，且為KD值的

比例(KD(CD3)/KD(CD137)的10倍、50倍、100倍或200倍之高於CD137(經固定化)濃度的CD3(分析物)濃度可使用於上述競爭測量。(例如，當KD值的比例為0.1時，可選擇高於1倍、10倍或20倍的濃度。再者，當KD值比例為10時，可選擇高於100倍、500倍、1000倍或2000倍的濃度。)

【0043】 一態樣中，當一抗原(例如，CD3)被固定化，抗原結合分子對CD3的結合信號的衰減可於另一抗原(例如，CD137)的存在下，藉由所屬技術領域習知的方法(亦即，ELISA、ECL等)來決定。另一態樣中，當CD137被固定化，抗原結合分子對CD137的結合信號的衰減亦可於CD3的存在下來決定。當進行上述二態樣之任一者時，本發明的抗原結合分子係決定為不同時結合至CD3及CD137，若結合信號衰減至少50%、較佳60%或更多、更佳70%或更多、更佳80%或更多、再佳90%或更多、或甚至更佳95%或更多。

一些實施例中，注射作為分析物的抗原濃度高於經固定之另一抗原濃度至少1倍、2倍、5倍、10倍、30倍、50倍或100倍。

較佳方式中，注射作為分析物的抗原濃度為高於欲固定之另一抗原濃度100-倍且結合受到抑制至少80%。

一實施例中，計算抗原-結合分子的CD3(分析物)結合活性與抗原結合分子的CD137(經固定化)結合活性的KD值的比例(KD(CD3)/KD(CD137)，且為KD值的比例(KD(CD3)/KD(CD137)的10倍、50倍、100倍或200倍之高於CD137(經固定化)濃度的CD3(分析物)濃度可使用於上述競爭測量。(例如，當KD值的比例為0.1時，可選擇高於1倍、10倍或20倍的濃度。再者，當KD值比例為10時，可選擇高於100倍、500倍、1000倍或2000倍的濃度。)

【0044】 具體地，例如在使用ECL方法的情況中，製備欲測試的生物素標記抗原結合分子、以硫-標籤(釕複合物)標記的CD3以及未標記的CD137。當欲測試的抗原-結合分子可結合至CD3及CD137，但不同時結合至CD3及CD137時，藉

由添加欲測試的抗原結合分子及經標記的CD3的混合物至鏈黴素固定化盤，接著顯光而於未標記CD137的不存在下偵測該硫-標籤的發光信號。相對地，於未標記CD137的存在下，該發光信號降低。可將此發光信號的降低定量以決定相對結合活性。可使用經標記的CD137及未標記的CD3類似地進行此分析。

【0045】 於ALPHAScreen的情況下，於競爭CD137不存在下，欲測試的抗原結合分子與CD3交互作用以產生520至620nm的信號。未標籤的CD137與CD3競爭與欲測試的抗原-結合分子的交互作用。可將競爭結果所引起的螢光減低定量，以藉此決定相對結合活性。使用硫-NHS-生物素等的多肽生物素化已知於所屬技術領域。可藉由合適地採用的方法以GST來標籤CD3，例如涉及：使框架中編碼CD3的多肽與編碼GST的多肽融合；以及使所得融合基因藉由帶有能表現其之載體的細胞等予以表現，接著使用穀胱甘肽(glutathione)管柱純化。較佳地使用，例如適用於基於非線性迴歸分析之一位點競爭模型的軟體GRAPHPAD PRISM (GraphPad Software, Inc., San Diego)，來分析所得信號。可使用標籤的CD137及未標籤的CD3類似地進行此分析。

替代地，可使用用螢光共振能量轉移(fluorescence resonance energy transfer，FRET)的方法。FRET為激發能量藉由電子共振於位於接近的兩個螢光分子之間直接地轉移的現象。當FRET發生時，捐贈者(具有激發態的螢光分子)的激發能量轉移至接受者(位於靠近捐贈者的另一螢光分子)，使得由捐贈者發射的螢光消失(精確而言，螢光的壽命縮短)，且相反地，由接受者發射螢光。藉由使用此現象，可分析是否同時結合至CD3及CD137。例如，當帶有螢光捐贈者的CD3及帶有螢光接受者的CD137同時結合至欲測試的抗原結合分子時，捐贈者的螢光消失而由接受者發射螢光。因此，觀察到螢光波長的變化。這種抗體被證實同時結合至CD3及CD137。另一方面，若CD3、CD137及欲測試的抗原-結合分子的混合物不改變與CD3結合的螢光捐贈者的螢光波長，可認為此欲測試的抗原結合分子

為可結合至CD3及CD137，但不同時結合至CD3及CD137的抗原結合域。

【0046】 例如，允許欲測試的生物素標記抗原結合分子結合至捐贈者珠粒的鏈黴素，而以穀胱甘肽 S 轉移酶(glutathione S transferase，GST)標籤的CD3係允許結合至接受者珠粒。於競爭第二抗原的不存在下，欲測試的抗原結合分子與CD3交互作用以產生520至620nm的信號。未標籤的第二抗原與CD3競爭與欲測試的抗原結合分子的交互作用。可將競爭結果所引起的螢光減低定量，以藉此決定相對結合活性。使用硫-NHS-生物素等的多肽生物素化已知於所屬技術領域。可藉由適當採用的方法以GST來標籤CD3，例如，涉及：使框架中編碼CD3的多核苷酸與編碼GST的多核苷酸融合；以及使所得融合基因藉由帶有能表現其之載體的細胞等予以表現，接著使用穀胱甘肽管柱純化。較佳地使用，例如適用於基於非線性迴歸分析之一位點競爭模型的軟體GRAPHPAD PRISM (GraphPad Software, Inc., San Diego)，來分析所得信號。

【0047】 加標籤不限定於GST標籤且可以任何標籤進行，例如但不限於組胺酸標籤、MBP、CBP、Flag標籤、HA標籤、V5標籤或c-myc標籤。欲測試的抗原結合分子對捐贈者珠粒的結合不限於使用生物素-鏈黴素反應的結合。特別地，當欲測試的抗原結合分子包含Fc時，可能的方法涉及允許欲測試的抗原結合分子經由Fc辨識蛋白質，如捐贈者珠粒的蛋白質A或蛋白質G，而結合。

【0048】 再者，當CD3及CD137不表現於細胞膜，而是作為可溶性蛋白質，或二者同時在相同細胞，可變區可同時結合至CD3及CD137但不可同時結合至各自表現於不同細胞上的CD3及CD137的情況，亦可藉由所屬技術領域習知的方法測定。

具體地，已證實對於偵測同時結合至CD3及CD137的ECL-ELISA為陽性的欲測試的抗原-結合分子亦與表現CD3的細胞及表現CD137的細胞混合。除非抗原-結合分子及該等細胞同時彼此結合，否則欲測試的抗原-結合分子可顯示為不可

同時結合至表現於不同細胞上的CD3及CD137。可藉由例如基於細胞的ECL-ELISA進行此測試。表現CD3的細胞預先固定化至盤。在欲測試的抗原結合分子對其結合之後，對盤添加表現CD137的細胞。僅表現於表現CD137的細胞的不同抗原是使用針對此抗原的硫-標籤標記的抗體來偵測。當抗原結合分子同時結合至個別地表現於二種細胞的二種抗原時，觀察到信號。當抗原結合分子不同時結合至該等抗原時未觀察到信號。

或者，可藉由ALPHAScreen方法來進行此測試。欲測試的抗原結合分子與表現已結合至捐贈者珠粒的CD3的細胞以及表現已結合至接受者珠粒的CD137的細胞混合。當抗原結合分子同時結合至個別地表現於二種細胞的二種抗原時，觀察到信號。當抗原結合分子不同時結合至該等抗原時未觀察到信號。

或者，可藉由八隅體交互作用(Octet interaction)方法來進行此測試。首先，表現以肽標籤加以標籤的CD3的細胞係允許結合至辨識該肽標籤的生物感應器。表現CD137的細胞和欲測試的抗原結合分子置於孔中且分析交互作用。當抗原結合分子同時結合至個別表現於兩個細胞的兩種抗體時，觀察到由欲測試的抗原結合分子和表現CD137的細胞對生物感應器的結合所引起的大波長偏移。當抗原結合分子不同時結合至該等抗原時，觀察到僅由欲測試的抗原結合分子對生物感應器的結合所引起的小波長偏移。

【0049】 不是基於結合活性的該等方法，可進行基於生物活性的測試。例如，表現CD3的細胞以及表現CD137的細胞與欲測試的抗原結合分子混合，並培養。當欲測試的抗原結合分子同時結合至兩種抗原時，個別地表現於兩個細胞的兩種抗原經由欲測試的抗原結合分子互相活化。因此，可偵測到活化信號的變化，如抗原的個別下游磷酸化程度的增加。或者，因為活化而誘發細胞介素產生。因此，可測量所產生的細胞介素的量以藉此證實是否同時結合至兩個細胞。或者，因為活化而誘發針對表現CD137的細胞的細胞毒性。或者，因為活化

而藉由於CD137或CD3的信號轉導途徑的下游受到活化的啟動子，來誘發報導子基因的表現。因此，可測量所產生的細胞毒性或報導子蛋白質的量，以藉此證實是否同時結合至兩個細胞。

【0050】 在實施例中，細胞的細胞毒性為T細胞依賴性細胞毒性(TDCC)。另一實施例中，細胞毒性係朝向於於其表面表現CD3或CD137的細胞。本發明之抗體(或抗原結合分子)的(細胞的)細胞毒性或TDCC可藉由所屬技術領域習知的任何適當方法予以評價。例如，TDCC可藉由實例2.3.2記載的實時細胞生長抑制檢測予以測定。 此檢測中，靶細胞係與T細胞(例如，PBMC)或擴張T細胞(expanded T cell)於測試抗體存在的情況下於96孔盤培養，以及靶細胞的生長係藉由所屬技術領域習知的方法予以偵測，例如，藉由使用適當的分析儀器(例如，xCELLigence Real-Time Cell Analyzer)。細胞生長抑制率(CGI: %)係根據公式: CGI (%) = 100 - (CI_{Ab} × 100 / CI_{NoAb})由細胞指標值(cell index value)予以測定。「CI_{Ab}」表示於特定實驗時間之有抗體的孔的細胞指標值，及「CI_{NoAb}」表示無抗體的孔的平均細胞指標值。當抗體的CGI率高，亦即具有顯著地正值，其可謂該抗體具有TDCC活性。

【0051】 較佳態樣中，T細胞活化可藉由所屬技術領域習知的方法予以檢測，如使用對於其活化反應而表現報導子基因(例如，螢光素酶)的經工程化T細胞株(例如，Jurkat / NFAT-RE Reporter細胞株(T Cell Activation Bioassay, Promega))的方法。此方法中，靶細胞(例如，表現CD3的細胞及表現CD137的細胞)係與T細胞於測試抗體存在的情況下培養，且接著報導子基因的表現產物的程度或活性係藉由適合作為T細胞活化指標的方法予以測定。當報導子基因為螢光素酶基因時，來自於螢光素酶與其基質之間的反應的亮度提升可予以測定，作為T細胞活化的指標。 若如上所述所測定的T細胞活化程度較高，判斷該測試抗體具有較高的T細胞活化活性。在一態樣中，當對於CD3訊號反應而表現報導子基因的重

組T細胞係與表現CD137的細胞於抗原結合分子存在的情況下共培養時，若報導子基因的表現或報導子基因產物的活性多至約50%、30%、20%、10%、5%或1%，其中100%活化係由抗原結合分子同時結合至CD3及CD137所達成的活化程度，則判斷該抗原結合分子不誘發對於表現CD137的細胞的T細胞活化。一態樣中，當對於CD3訊號反應的表現報導子基因的重組T細胞係與表現CD137的細胞於抗原結合分子的存在下共培養時，若報導子基因的表現或報導子基因產物的活性至多約50%、30%、20%、10%、5%或1%，其中100%活化係藉由對於表現第三抗原分子的相同抗原結合分子的抗原結合分子所達成的活化程度，則判斷該抗原結合分子不誘發對於表現CD137的細胞的T細胞活化。

【0052】 在一實施例中，抗原結合分子是否不誘發細胞介素的釋放可藉由，例如，將PBMC與抗原結合分子培養，及使用所屬技術領域習知的方法測量由PBMC釋放至培養上清部分的細胞介素如IL-2、IFNγ及TNFα等。若於已經與抗原結合分子培養的PBMC的上清部分偵測到無顯著程度的細胞介素或無顯著誘發細胞介素表現發生，則判斷該抗原結合分子不誘發細胞介素自PBMC釋放。在一態樣中，「無顯著程度的細胞介素」也意指細胞介素濃度的程度為至多約50%、30%、20%、10%、5%或1%，其中100%為由同時結合CD3及CD137的抗原結合分子所達成的細胞介素濃度。在一態樣中，「無顯著誘發細胞介素表現」也意指細胞介素濃度增加的程度為添加抗原結合分子之前的各細胞介素濃度的至多5倍、2倍或1倍。

【0053】 本發明中，「Fc區」意指包含由抗體分子中的鉸鏈或其部分以及CH2及CH3域所組成的片段的區。IgG類(IgG class)的Fc區意指，但不限於例如從半胱胺酸226(EU編號(本文中亦稱為EU指標))至C終端或脯胺酸230(EU編號)至C終端的區。較佳地可藉由以蛋白質分解酵素如胃蛋白酶部分分解，例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4單株抗體，接著將吸附於蛋白質A管柱或蛋白質G管柱的分液

的再沖提，以獲得Fc區。這種蛋白質分解酵素不特別限定，只要於該酵素之適當設定的反應條件下(例如，pH)，該酵素能分解全抗體以限制性地形成Fab或$F(ab')_2$。其範例可包括胃蛋白酶及木瓜酵素。

【0054】 一些實施例中，「抗原結合分子」不特別限定，只要該分子包含本發明的「抗體可變區」。抗原結合分子可更包含具有長度約5或更多個胺基酸的肽或蛋白質。該肽或蛋白質不特別限定為衍生自有機體的肽或蛋白質，且可為例如由人工設計的序列所組成的多肽。再者，可使用天然多肽、合成多肽、重組多肽等。

【0055】 一些實施例中，本發明的「抗原結合分子」不特別限定於包含「抗體可變區」的分子。某些實施例中，不是包含可變區的抗體且可結合至二種不同抗原的抗原結合分子，例如親和體(Affibody)等，可藉由所屬技術領域中具有通常知識者習知的方法獲得(PLoS One. 2011; 6(10): e25791；PLoS One. 2012; 7(8): e42288；J Mol Biol. 2011 Aug 5; 411 (1): 201-19；Proc Natl Acad Sci USA. 2011 Aug 23; 108(34): 14067-72)。

【0056】 本發明的抗原結合分子的較佳範例可包括包含抗體Fc區的抗原結合分子。

【0057】 衍生自例如天然發生的IgG的Fc區可使用作為本發明的「Fc區」。本文中，天然發生的IgG意指多肽，其含有與自然中發現的IgG的胺基酸相同的胺基酸序列且屬於實質上由免疫球蛋白γ基因所編碼的抗體類型。天然發生的人類IgG意指例如天然發生的人類IgG1、天然發生的人類IgG2、天然發生的人類IgG3或天然發生的人類IgG4。天然發生的IgG也包括自自發性地其衍生的變體等。於Sequences of proteins of immunological interest, NIH出版號No. 91-3242中，基於基因多型性的複數個同種異型體序列被描述為人類IgG1、人類IgG2、人類IgG3及人類IgG4抗體的恆定區，其任一者皆可使用於本發明。特別地，人類IgG1

的序列可具有DEL或EEM作為EU編號位置356至358的胺基酸序列。

【0058】 發現抗體Fc區為例如IgA1、IgA2、IgD1、IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或IgM類型的Fc區。例如，衍生自天然發生的人類IgG抗體的Fc區可使用作為本發明的抗體Fc區。例如，衍生自天然發生的IgG的恆定區的Fc區，具體地，源自天然發生的人類IgG1的恆定區(SEQ ID NO: 208)、源自天然發生的人類IgG2的恆定區(SEQ ID NO: 209)、源自天然發生的人類IgG3的恆定區(SEQ ID NO: 210)或源自天然發生的人類IgG4的恆定區(SEQ ID NO: 211)，可使用作為本發明的Fc區。天然發生的IgG的恆定區也包括自發性自其衍生的變體等。

【0059】 本發明的Fc區特別較佳為針對Fcγ受體具有減低的結合活性的Fc區。本文中，Fcγ受體(本文中也指稱FcγR)意指可結合至IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的Fc區的受體，且意味實質上由Fcγ受體基因編碼的蛋白質家族的任何成員。人類中，此家族包括但不限於：包括同型異構物FcγRIa、FcγRIb及FcγRIc的FcγRI (CD64)；包括同型異構物FcγRIIa(包括同種異型體H131 (H型)及R131 (R型)、FcγRIIb (包括FcγRIIb-1及FcγRIIb-2)及FcγRIIc的FcγRII (CD32)；以及包括同型異構物FcγRIIIa (包括同種異型體V158及F158)及FcγRIIIb(包括同種異型體FcγRIIIb-NA1及FcγRIII-NA2)的FcγRIII (CD16)；以及任何尚未發現的人類FcγR或FcγR同型異構物或同種異型體。FcγR包括衍生自人類、小鼠、大鼠、兔子和猴子的那些。FcγR不限制為該等分子且可衍生自任何有機體。小鼠FcγR包括但不限於，FcγRI (CD64)、FcγRII (CD32)、FcγRIII (CD16)及FcγRIII-2 (CD16-2)、以及任何尚未發現的小鼠FcγR或FcγR同型異構物或同種異型體。這種FcγR受體的較佳範例包括人類FcγRI (CD64)、FcγRIIa (CD32)、FcγRIIb (CD32)、FcγRIIIa (CD16)及/或FcγRIIIb (CD16)。

【0060】 發現FcγR為具有ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif，免疫受體酪胺酸系活化模組)的活化性受體以及具有ITIM (immnoreceptor

tyrosine-based inhibition motif，免疫受體酪胺酸系抑制模組)的抑制性受體的形式。FcγR分類為活化性FcγR (FcγRI、FcγRIIa R、FcγRIIa H、FcγRIIIa及FcγRIIIb)以及抑制性FcγR (FcγRIIb)。

FcγRI的多核苷酸序列及胺基酸序列分別描述於NM_000566.3及NP_000557.1；FcγRIIa的多核苷酸序列及胺基酸序列分別揭示於BC020823.1及AAH20823.1；FcγRIIb的多核苷酸序列及胺基酸序列分別揭示於BC146678.1及AAI46679.1；FcγRIIIa的多核苷酸序列及胺基酸序列分別揭示於BC033678.1及AAH33678.1；FcγRIIIb的多核苷酸序列及胺基酸序列分別揭示於BC128562.1及AAI28563.1 (RefSeq登錄號)。FcγRIIa具有兩類型的基因多型性，其由組胺酸(H型)或精胺酸(R型)取代FcγRIIa的第131個胺基酸(J. Exp. Med, 172, 19-25, 1990)。FcγRIIb具有兩類型的基因多型性，其由異白胺酸(I型)或蘇胺酸(T型)取代FcγRIIb的第232個胺基酸(Arthritis. Reheum. 46: 1242-1254 (2002))。FcγRIIIa具有兩類型的基因多型性，其由纈胺酸(V型)或苯丙胺酸(F型)取代FcγRIIIa的第158個胺基酸(J. Clin. Invest. 100(5): 1059-1071 (1997)。FcγRIIIb具有兩類型的基因多型性(NA1型及NA2型)(J. Clin. Invest. 85: 1287-1295 (1990))。

【0061】 針對Fcγ受體的減低結合活性可藉由習知方法如FACS、ELISA格式、ALPHAScreen (amplified luminescent proximity homogeneous assay screen，放大發光近似均質測定篩選)、或基於表面電漿共振(SPR)現象的BIACORE方法予以證實(Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006)103(11), 4005-4010)。

藉由使用二種珠粒(捐贈者及接受者)的ALPHA技術基於下述準則來實施ALPHAScreen：僅當經由與捐贈者珠粒結合的分子以及與接受者珠粒結合的分子之間的交互作用，而使該二珠粒位於接近時，偵測到發光信號。捐贈者珠粒中的雷射-激發感光劑將環境氧轉換為具激發態的單態氧(singlet oxygen)。單態氧圍繞捐贈者珠粒擴散且觸及位於接近的接受者珠粒，以藉此於珠粒中引起化學

發光，其最終發射光。在與捐贈者珠粒結合的分子以及與接受者珠粒結合的分子之間的交互作用不存在時，由捐贈者珠粒所產生的單態氧不觸及接受者珠粒。因此，無化學發光反應發生。

【0062】 例如，允許生物素標記抗原結合分子結合至捐贈者珠粒，而以穀胱甘肽 S 轉移酶(GST)標籤的Fcγ受體係允許結合至接受者珠粒。於具有突變Fc區的競爭性抗原結合分子的不存在下，具有野生型Fc區的抗原結合分子與Fcγ受體交互作用，以產生520至620nm的信號。未標籤的具有突變Fc區的抗原結合分子和具有野生型Fc區的抗原結合分子競爭與Fcγ受體的交互作用。可將競爭結果所引起的螢光減低定量，以藉此決定相對結合活性。使用硫-NHS-生物素等的抗原結合分子生物素化係已知於所屬技術領域。可藉由適當採用的方法以GST來標籤Fcγ受體，例如，涉及：使框架中編碼Fcγ受體的多核苷酸與編碼GST的多核苷酸融合；以及使所得融合基因藉由帶有能表現其之載體的細胞等予以表現，接著使用穀胱甘肽管柱純化。較佳地使用，例如，適用於基於非線性迴歸分析之一位點競爭模型的軟體GRAPHPAD PRISM(GraphPad Software, Inc., San Diego)來分析所得信號。

【0063】 在欲觀察其之間交互作用的物質之一者(配體)係固定化至感測晶片的薄金膜。由背部以光照射感測晶片，使得該薄金膜及玻璃之間的界面發生全反射。因此，反射強度(SPR信號)下降的位點形成於反射光的一部分。在欲觀察其之間交互作用的物質之另一者(分析物)係注射至該感測晶片的表面。一旦分析物結合至配體，經固定化之配體分子的質量增加，改變感測晶片表面上的溶劑的折射率。此折射率的變化偏移SPR的位置(相對於此，已結合的分子的解離使信號回至原始位置)。Biacore系統於偏移量的軸作圖，亦即感測晶片表面的質量變化，且展示時間依賴性的質量變化作為測定數據(感測圖)。經捕捉於感測晶片表面之已結合至配體的分析物的量(於分析物的交互作用之前與之後之間感

測圖的反應變化量)可由感測圖決定。然而，由於結合量亦取決於配體量，比較必須於所使用的配體量為實質相同的條件下進行。可由感測圖曲線決定動力學，亦即締合速率常數(ka)與解離速率常數(kd)，而可由該等常數之間的比例決定親和性(KD)。抑制測定也較佳地使用於BIACORE方法。抑制測定的範例描述於Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103(11), 4005-4010。

【0064】 本說明書中，針對Fcγ受體的減低結合活性意指基於上述分析方法，相較於包含Fc區的對照抗原結合分子的結合活性，欲測試的抗原結合分子展現例如50%或更低、較佳45%或更低、40%或更低、35%或更低、30%或更低、20%或更低、或15%或更低、特佳為10%或更低、9%或更低、8%或更低、7%或更低、6%或更低、5%或更低、4%或更低、3%或更低、2%或更低、或1%或更低的結合活性。

具有IgG1、IgG2、IgG3或IgG4單株抗體Fc區的抗原結合分子可適當地使用作為對照抗原結合分子。Fc區結構係描述於SEQ ID NO: 212 (RefSeq登錄No. AAC82527.1具有A加成至N終端)、SEQ ID NO: 213 (RefSeq登錄No. AAB59393.1具有A加成至N終端)、SEQ ID NO: 214 (RefSeq登錄No. CAA27268.1具有A加成至N終端)、或SEQ ID NO: 215 (RefSeq登錄No. AAB59394.1具有A加成至N終端)。於使用具有某同型抗體的Fc區的變體的抗原結合分子作為測試物質的情況中，使用具有此某同型抗體的Fc區的抗原結合分子作為對照，以測試變體中的突變對於針對Fcγ受體的結合活性的效果。因此，證實針對Fcγ受體具有減低的結合活性之具有Fc區變體的抗原結合分子係適當地被製備。

【0065】 例如，231A-238S刪除(WO 2009/011941)，C226S、C229S、P238S、(C220S)(J. Rheumatol (2007) 34, 11)，C226S、C229S (Hum. Antibod. Hybridomas (1990) 1(1), 47-54)，C226S、C229S、E233P、L234V、或L235A (Blood (2007) 109, 1185-1192)(該等胺基酸係根據EU編號界定)變體為所屬技術領域習知作為這種

變體。

其較佳範例包括具有衍生自藉由下述組成胺基酸任一者取代的某同型抗體的Fc區的抗原結合分子：根據EU編號界定於位置220、226、229、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、264、265、266、267、269、270、295、296、297、298、299、300、325、327、328、329、330、331及332的胺基酸。Fc區源自的同型抗體不特別限制，且可適當地使用源自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4單株抗體的Fc區。較佳地使用源自天然發生的人類IgG1抗體的Fc區。

例如，亦可適當地使用Fc區的抗原結合分子，其中前述Fc區係藉由組成胺基酸之下述取代群組之任一者的IgG1抗體Fc區所衍生(數字表示根據EU編號界定的胺基酸殘基的位置；位於數字前的一字母胺基酸碼表示取代前的胺基酸殘基；以及位於數字後的一字母胺基酸碼表示取代後的胺基酸殘基)：

(a) L234F、L235E及P331S，

(b) C226S、C229S及P238S，

(c) C226S及C229S，以及

(d) C226S、C229S、E233P、L234V及L235A

或藉由從根據EU編號界定的位置231至238的胺基酸序列刪除所衍生。

【0066】 亦可適當地使用Fc區的抗原結合分子，其中前述Fc區係藉由組成胺基酸之下述取代群組之任一者的IgG2抗體Fc區所衍生(數字表示根據EU編號界定的胺基酸殘基的位置；位於數字前的一字母胺基酸碼表示取代前的胺基酸殘基；以及位於數字後的一字母胺基酸碼表示取代後的胺基酸殘基)：

(e) H268Q、V309L、A330S及P331S，

(f) V234A，

(g) G237A，

(h) V234A及G237A，

(i) A235E及G237A以及

(j) V234A、A235E及G237A

根據EU編號界定。

【0067】 亦可適當地使用具有Fc區的抗原-結合分子，其中前述Fc區係藉由組成胺基酸之下述取代群組之任一者的IgG3抗體Fc區所衍生(數字表示根據EU編號界定的胺基酸殘基的位置；位於數字前的一字母胺基酸碼表示取代前的胺基酸殘基；以及位於數字後的一字母胺基酸碼表示取代後的胺基酸殘基)：

(k) F241A，

(l) D265A，以及

(m) V264A

根據EU編號界定。

【0068】 亦可適當地使用具有Fc區的抗原結合分子，其中前述Fc區係藉由組成胺基酸之下述取代群組之任一者的IgG4抗體Fc區所衍生(數字表示根據EU編號界定的胺基酸殘基的位置；位於數字前的一字母胺基酸碼表示取代前的胺基酸殘基；以及位於數字後的一字母胺基酸碼表示取代後的胺基酸殘基)：

(n) L235A、G237A及E318A，

(o) L235E，以及

(p) F234A及L235A

根據EU編號界定。

【0069】 其之其他較佳範例包括具有Fc區的抗原結合分子，其中前述Fc區係藉由組成胺基酸之下述取代群組之任一者的IgG1抗體Fc區所衍生：根據EU編號界定於位置233、234、235、236、237、327、330及331的胺基酸，藉由於相對的IgG2或IgG4的Fc區中對應的EU編號位置的胺基酸所衍生。

【0070】 其之其他較佳範例包括具有Fc區的抗原結合分子，其中前述Fc

區係藉由組成胺基酸之下述取代群組之任一者的IgG1抗體Fc區所衍生：根據EU編號界定於位置234、235及297的胺基酸，藉由不同的胺基酸。取代後呈現的胺基酸類型並不特別限制。特別較佳為具有於位置234、235及297的一或多個胺基酸由丙胺酸取代的Fc區的抗原結合分子。

【0071】 其之其他較佳範例包括具有Fc區的抗原結合分子，其中前述Fc區係藉由根據EU編號界定的位置265的組成胺基酸取代的IgG1抗體的Fc區所衍生，藉由不同的胺基酸。取代後呈現的胺基酸類型並不特別限制。特別較佳為具有於位置265的胺基酸由丙胺酸取代的Fc區的抗原-結合分子。

【0072】 本發明的「抗原結合分子」的一較佳形式可為，例如包含本發明的抗體可變區的多特異性抗體。

【0073】 藉由將電荷排斥導入至抗體H鏈的第二恆定域(CH2)或第三恆定域(CH3)之間的界面以壓抑H鏈之間的不期望締合的技術(WO2006/106905)可應用於多特異性抗體的締合。

在藉由將電荷排斥導入至CH2或CH3界面以壓抑H鏈之間的不期望締合的技術中，於H鏈恆定域之間的界面彼此接觸的胺基酸殘基的範例可包括於一CH3域中EU編號位置356的殘基、EU編號位置439的殘基、於EU編號位置357的殘基、於EU編號位置370的殘基、於EU編號位置399的殘基及於EU編號位置409的殘基，以及於另一CH3域的夥伴殘基(partner residue)。

【0074】 更具體地，例如，包含兩個H鏈CH3域的抗體可製備為抗體，其中選自第一H鏈CH3域的下述胺基酸殘基對(1)至(3)的一至三對胺基酸殘基帶有相同電荷：(1)於H鏈CH3域的EU編號位置356及439所含有的胺基酸殘基；(2)於H鏈CH3域的EU編號位置357及370所含有的胺基酸殘基；(3)於H鏈CH3域的EU編號位置399及409所含有的胺基酸殘基。

【0075】 抗體可進一步製備為抗體，其中一至三對胺基酸殘基係選自在不

同於第一H鏈CH3域的第二H鏈CH3域中的胺基酸殘基對(1)至(3)的，以對應於第一H鏈CH3域中帶有相同電荷的胺基酸對(1)至(3)且帶有與其對應於第一H鏈CH3域的胺基酸殘基相反電荷。

【0076】 對(1)至(3)中所述的各胺基酸殘基係位於靠近締合H鏈中的夥伴。所屬技術領域中具有通常知識者可使用市售軟體藉由同源模型等找到對應於對(1)至(3)各者中所述的胺基酸殘基的位置如所期望的H鏈CH3域或H鏈恆定域，且可適當地改變該等位置的胺基酸殘基。

【0077】 上述抗體中，「帶電荷的胺基酸殘基」之各者較佳選自，例如，下述群組(a)及(b)之任一者所包括的胺基酸殘基：

(a) 麩胺酸(glutamic acid，E)及天冬胺酸(aspartic acid，D)；以及

(b) 離胺酸(lysine，K)、精胺酸(arginine，R)及組胺酸(histidine，H)。

【0078】 上述抗體中，用語「帶相同電荷」意味，例如，所有的二或更多個胺基酸殘基為群組(a)及(b)之任一者所包括的胺基酸殘基。用語「帶相反電荷」意味，例如，該二或更多個胺基酸殘基中的至少一個胺基酸殘基可為群組(a)及(b)之任一者所包括的胺基酸殘基，而其餘胺基酸殘基為其他群組所包括的胺基酸殘基。

【0079】 較佳實施例中，抗體可具有經由雙硫鍵結交聯的第一H鏈CH3域及第二H鏈CH3域。

根據本發明之欲改變的胺基酸殘基不限制為上述抗體可變區或抗體恆定區中的胺基酸殘基。所屬技術領域中具有通常知識者可使用市售軟體藉由同源模型等找到如多肽變體或雜多倍體之組成界面的胺基酸殘基，且可於該等位置改變胺基酸殘基以調節締合。

【0080】 對本發明的多特異性抗體的締合也可藉由所屬技術領域習知的替代技術進行。存在於一抗體H鏈的可變域的胺基酸側鏈係被較大的側鏈(紐)取

代，且其存在於其他H鏈可變域中的夥伴胺基酸側鏈係被較小的側鏈(扣)取代。鈕可置於扣中以有效率地締合胺基酸序列不同的Fc域的多肽(WO1996/027011；Ridway JB et al., Protein Engineering (1996) 9, 617-621；以及Merchant AM et al., Nature Biotechnology (1998) 16, 677-681)。

【0081】 除了此技術外，所屬技術領域習知的另一替代技術可使用於形成本發明的多特異性抗體。將一抗體H鏈的CH3的一部分轉換為其相應的IgA-衍生序列，且將其他H鏈的CH3中之其互補部分係轉為其相應的IgA-衍生序列。所得之經股-交換工程化域CH3的使用，可經由互補性CH3締合在序列不同的多肽之間引起有效率的締合(Protein Engineering Design & Selection, 23; 195-202, 2010)。藉由使用所屬技術領域習知的此技術，亦可有效率的形成感興趣的多特異性抗體。

【0082】 或者，可藉由，例如使用如WO2011/028952所述的抗體CH1-CL締合及VH-VL締合的抗體製備技術、使用如WO2008/119353及WO2011/131746所述的分開製備的單株抗體(Fab臂交換)製備雙特異性抗體的技術、如WO2012/058768及WO2013/063702所述的控制抗體重鏈CH3域之間的締合的技術，如WO2012/023053所述的製備藉由兩類型的輕鏈及一類型的重鏈所構成的雙特異性抗體的技術、或如Christoph等人(Nature Biotechnology Vol. 31, p. 753-758 (2013))所述的使用兩個各自表現由一個H鏈及一個L鏈所組成的抗體半分子的細菌細胞株來製備雙特異性抗體的技術，來形成多特異性抗體。除該等締合技術外，CrossMab技術，一種將形成結合至第一抗原決定基的可變區的輕鏈以及形成結合至第二抗原決定基的可變區的輕鏈，分別締合至形成結合至第一抗原決定基的可變區的重鏈以及形成結合至第二抗原決定基的可變區的重鏈的習知雜輕鏈締合技術(Scaefer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2011)108, 11187-11192)，亦可用於製備本發明所提供的多特異性或多互補位

(multiparatopic)的抗原結合分子。使用分開製備的單株抗體來製備雙特異性抗體的技術範例可包括涉及藉由將於重鏈CH3域的特別胺基酸取代的單株抗體放置於還原條件下，而促進抗體異源二倍體化，以獲得所期望的雙特異性抗體的方法。對於此方法的較佳胺基酸取代位點範例可包括於CH3域中EU編號位置392的殘基及EU編號位置397的殘基。再者，亦可藉由使用其中於第一H鏈CH3域中選自下述胺基酸殘基對(1)至(3)的一至三對胺基酸殘基帶有相同電荷的抗體，來製備雙特異性抗體：(1)於H鏈CH3域所含有的EU編號位置356及439的胺基酸殘基；(2)於H鏈CH3域所含有的EU編號位置357及370的胺基酸殘基；以及(3)於H鏈CH3域所含有的EU編號位置399及409的胺基酸殘基。亦可藉由使用其中一至三對胺基酸殘基係不同於第一H鏈CH3域之第二H鏈CH3域中選自胺基酸殘基對(1)至(3)，以對應於第一H鏈CH3域中帶有相同電荷的胺基酸殘基對(1)至(3)，且帶有與其對應於第一H鏈CH3域的胺基酸殘基相反電荷的抗體，來製備雙特異性抗體。

【0083】 即使感興趣的多特異性抗體不能有效率地形成，本發明的多特異性抗體可自所製造的抗體當中，藉由分離及純化感興趣的多特異性抗體而獲得。例如，之前報導的方法涉及將胺基酸取代導入至兩種類型的H鏈的可變域，以對其賦予不同的等電點，使得感興趣的兩種類型的同源二倍體及異源二倍化抗體可藉由離子交換層析，來分開純化(WO2007114325)。使用蛋白質A純化由可結合至蛋白質A的小鼠IgG2a H鏈及不可結合至蛋白質A的大鼠IgG2b H鏈所組成的異源二倍體化抗體的方法已報導作為純化異源二倍體的方法(WO98050431及WO95033844)。或者，構成IgG的蛋白質A結合位點的EU編號位置435及436的胺基酸殘基可被胺基酸取代，例如Tyr及His，其提供不同的蛋白質A結合強度，且所得的H鏈係用於改變各H鏈與蛋白質A的交互作用。因此，只有異源二倍化抗體可藉由使用蛋白質A管柱有效率地純化。

【0084】　可組合使用複數個，例如二或更多種該等技術。再者，該等技術可適當地分開應用於欲締合的兩個H鏈。基於，但分開地自因此改變的型，本發明的抗原結合分子可製備為具有與其相同的胺基酸序列的抗原結合分子。

【0085】　可藉由所屬技術領域習知的各種方法進行胺基酸序列的改變。可進行的該等方法的範例可包括但不限於，例如位點導向突變(Hashimoto-Gotoh, T, Mizuno, T, Ogasahara, Y, and Nakagawa, M. (1995) An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis. Gene 152, 271-275; Zoller, MJ, and Smith, M (1983) Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors. Methods Enxymo. 100, 468-500; Kramer, W, Drutsa, V, Jansen, HW, Kramer, B, Pflugfelder, M, and Fritz, HJ (1984) The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction. Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456; Kramer W, and Fritz HJ (1987) Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA Method. Enzymol. 154, 350-367; 及 Kunkel, TA (1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. Proc Natl Acad Sci USA. 82, 488-492)、PCR突變、及匣突變(cassette mutagenesis)的方法。

【0086】　本發明的「抗原結合分子」可為包含於單一多肽鏈構成本發明「抗體可變區」的重鏈及輕鏈二者，但缺乏恆定區的抗體片段。這種抗體片段可為，例如，雙鏈抗體(diabody，Db)、單鏈抗體或sc(Fab')2。

【0087】　Db係藉由兩個多肽鏈構成的二倍體(例如，Holliger P et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993); EP404,097及WO93/11161)。該等多肽鏈可經由短至例如約5個殘基的連接子連接，使得於相同多肽鏈的L鏈可變域(VL)及H鏈可變域(VH)不能彼此配對。

由於此短連接子，編碼於相同多肽鏈的VL及VH不能形成單鏈Fv，且相反

地，係於分別與另一多肽鏈VH及VL二倍體化，以形成兩個抗原結合位點。

【0088】 單鏈抗體的範例包括sc(Fv)2。該sc(Fv)2為具有一條藉由四個可變域構成的鏈的單鏈抗體，亦即兩個VL及兩個VH經由例如肽連接子的連接子連接(J Immunol. Methods (1999) 231(1-2), 177-189)。這兩個VH及VL可衍生自不同的單株抗體。其較佳範例包括雙特異性sc(Fv)2，其辨識存在於相同抗原的兩種類型的抗原決定基，如Journal of Immunology (1994) 152 (11), 5368-5374所述。該sc(Fv)2可藉由所屬技術領域中具有通常知識者通常習知的方法製備。例如，該sc(Fv)2可藉由經由例如肽連接子的連接子連結兩個scFv而製備。

【0089】 本文所述之構成該sc(Fv)2的抗原結合域的配置(configuration)的範例包括其中兩個VH及兩個VL係對齊為VH、VL、VH及VL係經對準(亦即[VH]-連接子-[VL]-連接子-[VH]-連接子-[VL])，以此順序自單鏈多肽的N-終端起始的抗體。兩個VH及兩個VL的順序不特別限制為上述配置且可為任何排列順序。其範例亦可包括下述排例：

[VL]-連接子-[VH]-連接子-[VH]-連接子-[VL]，

[VH]-連接子-[VL]-連接子-[VL]-連接子-[VH]，

[VH]-連接子-[VH]-連接子-[VL]-連接子-[VL]，

[VL]-連接子-[VL]-連接子-[VH]-連接子-[VH]，以及

[VL]-連接子-[VH]-連接子-[VL]-連接子-[VH]。

【0090】 該sc(Fv)的分子形式也詳細地描述於WO2006/132352。基於該文獻的描述，所屬技術領域中具有通常知識者可適當地製備所期望的sc(Fv)2，以製備本發明所揭示的抗原結合分子。

【0091】 本發明的抗原-結合分子可與載劑聚合物如PEG或有機化合物如抗癌劑接合(conjugate)。再者，較佳地可藉由糖基化序列的插入，將糖鏈加成至本發明的抗原結合分子，以產生所期望效果。

【0092】 例如，可藉由基因工程導入的任意肽連接子，或合成化合物連接子(例如，連接子揭示於Protein Engineering, 9(3), 299-305, 1996)可作為連接抗體可變域的連接子。本發明中，較佳為肽連接子。肽連接子的長度不特別限制且可根據目的由所屬技術領域中具有通常知識者適當地選擇。長度較佳為5或更多個胺基酸(上限不特別限制，且通常為30或更少個胺基酸，較佳為20或更少個胺基酸)，特佳為15個胺基酸。當sc(Fv)2含有三個肽連接子時，所使用的所有該等肽連接子可具有相同長度或可具有不同長度。

【0093】 肽連接子的範例可包括

Ser、

Gly-Ser、

Gly-Gly-Ser、

Ser-Gly-Gly、

Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 216)、

Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 217)、

Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 218)、

Ser-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO:219)、

Gly- Gly- Gly- Gly- Gly-Ser (SEQ ID NO: 220)、

Ser- Gly- Gly- Gly- Gly- Gly (SEQ ID NO: 221)、

Gly- Gly- Gly- Gly- Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 222)、

Ser- Gly- Gly- Gly- Gly- Gly-Gly (SEQ ID NO: 223)、

(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 218))n、以及

(Ser-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 219))n，

其中，n為1或更大的整數。

然而，肽連接子的長度或序列可由所屬技術領域中具有通常知識者根據目

的而合適地選擇。

【0094】 合成化合物連接子(化學交聯劑)為通常用於肽的交聯之交聯劑，例如N-羥基琥珀醯亞胺(N-hydroxysuccinimide，NHS)、辛二酸二琥珀醯亞胺酯(disuccinimidyl suberate，DSS)、辛二酸雙(硫琥珀醯亞胺酯)(bis(sulfosuccinimidyl) suberate，BS3)、二硫代雙(丙酸琥珀醯亞胺酯)(dithiobis(succinimidyl propionate)，DSP)、二硫代雙(丙酸硫代琥珀醯亞胺酯)(dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate)，DTSSP)、乙二醇雙(琥珀酸琥珀醯亞胺酯)(ethylene glycol bis(succinimidyl succinate)，EGS)、乙二醇雙(琥珀酸硫代琥珀醯亞胺酯)(ethylene glycol bis(sulfosuccinimidyl succinate)，sulfo-EGS)、酒石酸二琥珀醯亞胺酯(disuccinimidyl tartrate，DST)、酒石酸二硫代琥珀醯亞胺酯(sulfo-DST)、雙[2-(琥珀醯亞胺氧基羰基氧基)乙基]碸(bis[2-(succinimidoxycarbonyloxy)ethyl]sulfonate，BSOCOES)、或雙[2-(硫代琥珀醯亞胺氧基羰基氧基)乙基]碸(bis[2-(sulfosuccinimidoxycarbonyloxy)ethyl]sulfonate，sulfo-BSOCOES)。該等交聯劑為市售可得。

通常需要三個連接子連接四個抗體可變域。所用的所有該等連接子可為相同連接子或可為不同連接子。

【0095】 F(ab')2包含含有恆定區(CH1域及CH2域的一部分)的兩個輕鏈及兩個重鏈，使得於這兩個重鏈之間形成鏈間雙硫鍵。較佳地可藉由以蛋白質分解酵素如胃蛋白酶部分分解例如具有所期望的抗原-結合域的全單株抗體，接著移除吸附於蛋白質A管柱的Fc片段，來獲得構成本說明書所揭示的多肽締合物的F(ab')2。這種蛋白質分解酵素不特別限制，只要該酵素於該酵素適當設定的反應條件(例如，pH)下可分解全抗體，以限制性地形成$F(ab')_2$。其範例可包括胃蛋白酶及無花果蛋白酶(ficin)。

【0096】 除了上述胺基酸改變外，本發明的抗原結合分子可更含有額外改

變。額外改變可選自，例如胺基酸取代、刪除、及修飾、及其組合。

例如，本發明的抗原結合分子可進一步被任意改變，而實質上不改變該分子所冀求的功能。可藉由例如胺基酸殘基的保守性取代來進行這種突變。或者，甚至可實施改變本發明的抗原結合分子所冀求的功能的改變，只要被這種改變所改變的功能係在本發明的目標內。

【0097】 根據本發明的胺基酸序列的改變也包括轉譯後修飾。具體地，轉譯後修飾可意指糖鏈的加成或刪除。例如，具有IgG1-型恆定區之本發明的抗原結合分子可於EU編號位置297具有經糖鏈修飾的胺基酸殘基。使用於修飾的糖鏈結構不特別限制。一般而言，藉由真核細胞表現的抗體於其恆定區涉及糖鏈修飾。因此，藉由下述細胞表現的抗體通常以某個糖鏈修飾：哺乳動物抗體產生細胞；及以包含抗體-編碼DNA的表現載體轉形的真核細胞。

本文中，真核細胞包括酵母菌及動物細胞。例如，CHO細胞或HEK293H細胞為用於以包含抗體-編碼DNA的表現載體轉形的典型動物細胞。另一方面，本發明的抗體也包括於該位置缺乏糖鏈修飾的抗體。具有未經糖鏈修飾的恆定區的抗體可藉由在如大腸桿菌(*E. coli*)之原核細胞中表現編碼該等抗體的基因而獲得。

【0098】 根據本發明之額外改變更具體地可為例如，於Fc區對糖鏈的唾液酸(sialic acid)加成(mAbs. 2010 Sep-Oct; 2(5): 519-27)。

【0099】 當本發明的抗原結合分子具有Fc區，例如，可對其加成改良針對FcRn的結合活性胺基酸取代(J Immunol. 2006 Jan1; 176(1): 346-56; J Biol Chem. 2006 Aug 18; 281(33): 23514-24; Int Immunol. 2006 Dec; 18(12): 1759-69; Nat Biotechnol. 2000 Feb; 28(2):157-9; WO2006/053301; 及WO2009/086320))或改良抗體異質性(heterogeneity)或安定性的胺基酸取代((WO2009/041613))。

【0100】 本發明中，用語「抗體」係以最廣意義使用，且也包括任何抗體，

例如單株抗體(包括全單株抗體)、多株抗體、抗體變體、抗體片段、多特異性抗體(例如雙特異性抗體)、嵌合抗體以及人源化抗體，只要該抗體展現所期望的生物活性。

【0101】 本發明的抗體不被其抗原的類型、其來源等所限制，且可為任何抗體。抗體的來源的範例可包括但不特別限制於，人類抗體、小鼠抗體、大鼠抗體及兔子抗體。

【0102】 可藉由所屬技術領域中具有通常知識者習知的方法來製備抗體。例如，可藉由融合瘤方法(Kohler and Milstein, Nature 256: 495 (1975))或重組方法(美國專利號4,816,567)來製備單株抗體。或者，可自噬菌體展示的抗體庫單離出單株抗體(Clackson et al., Nature 352: 624-628 (1991); 及 Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991))。再者，可自單一B細胞純株單離出單株抗體(N. Biotechnol. 28(5): 253-457 2011))。

【0103】 人源化抗體也稱為重塑(reshaped)人類抗體。具體地，例如，由經非人類動物(例如，小鼠)抗體CDR接枝的抗體所組成的人源化抗體習知於所屬技術領域。用於獲得人源化抗體的一般基因重組方案亦為習知。具體地，例如，重疊延伸PCR (overlap extension PCR)為所屬技術領域習知為用於將小鼠抗體CDR接枝至人類FR的方法。

【0104】 編碼各包含三個CDR及四個FR連接的抗體可變域的DNA以及編碼人類抗體恆定域的DNA可插入至表現載體，使得可變域DNA係與恆定域DNA於框架內融合以製備用於人源化抗體表現的載體。具有插入物的該等載體轉移至宿主以建立重組細胞。然後，培養該重組細胞用於表現編碼人源化抗體的DNA，以產生人源化抗體至培養的細胞的培養物(參照歐洲專利公開號EP239400及國際專利公開號WO1996/002576)。

【0105】 必要時，FR胺基酸殘基可被取代，使得重塑人類抗體的CDR形

成適當的抗原結合位點。例如，可藉由應用用於小鼠CDR接枝至人類FR的PCR方法，來突變FR的胺基酸殘基。

【0106】 可使用具有人類抗體基因所有品系(repertoires)的基因轉殖動物作為免疫動物，藉由DNA免疫來獲得所期望的人類抗體(參照國際專利公開號WO1993/012227、WO1992/0039185、WO1994/002602、WO1994/025585、WO1996/034096、及WO1996/033735)。

【0107】 此外，使用人類抗體庫藉由淘選獲得人類抗體的技術亦為習知。例如，藉由噬菌體展示方法，於噬菌體表面將人類抗體V區表現為單鏈抗體(scFv)。可選擇表現抗原結合scFv的噬菌體。可分析所選擇的噬菌體的基因，以決定編碼抗原結合人類抗體的V區的DNA序列。決定抗原結合scFv的DNA序列後，V區序列可與所期望的人類抗體C區的序列於框架內融合，然後插入至適當的表現載體以製備表現載體。表現載體轉移至上述所列之較佳表現細胞，用於表現編碼人類抗體的基因以獲得人類抗體。該等方法已為所述技術領域所知(參照國際專利公開號WO1992/001047、WO1992/020791、WO1993/006213、WO1993/011236、WO1993/019172、WO1995/001438、及WO1995/015388)。

【0108】 除了噬菌體展示技術外，例如，使用無細胞轉譯系統的技術、於細胞或病毒表面展示抗原結合分子的技術、以及使用乳化的技術已知為使用人類抗體庫藉由淘選獲得人類抗體的技術。例如，涉及藉由移除終止碼等經由核糖體而形成mRNA及轉譯蛋白質的複合物的核糖體展示方法、涉及使用如嘌呤黴素的化合物共價結合轉譯蛋白質至基因序列的cDNA或mRNA展示方法、或涉及使用核酸結合蛋白質形成基因及轉譯蛋白質的複合物的CIS展示方法，可用作為使用無細胞轉譯系統的技術。噬菌體展示方法以及大腸桿菌展示方法、格蘭氏陽性菌展示方法、酵母菌展示方法、哺乳動物細胞展示方法、病毒展示方法等可用作為於細胞或病毒表面展示抗原結合分子的技術。例如，使用內含於乳化

物的基因及轉譯相關分子的活體外病毒展示方法可用作為使用乳化的技術。該等方法已為所屬技術領域所知(Nat Biotechnol. 2000 Dec; 18(12): 1287-92; Nucleic Acids Res. 2006; 34(19): e27; Proc Natl Acad Sci USA. 2004 Mar 2; 101(9): 2806-10; Proc Natl Acad Sci USA. 2004 Jun 22; 101 (25): 9193-8; Protein Eng Des Sel. 2008 Apr; 21(4): 247-55; Pron Natl Acad Sci USA. 2000 Sep 26; 97(20): 10701-5; MAbs. 2010 Sep-Oct; 2 (5): 508-18; 及Methods Mol Biol. 2012; 911: 183-98)。

【0109】 本發明之結合至第三抗原的可變區可為辨識任意抗原的可變區。本發明之結合至第三抗原的可變區可為辨識特異性地表現於癌組織的分子的可變區。

【0110】 本說明書中，「第三抗原」不特別限制且可為任何抗原。抗原的範例包括17-IA、4Dc、6-酮基-PGFIa、8-異-PGF2a、8-側氧基-dG、A1腺苷受體、A33、ACE、ACE-2、活化素、活化素 A、活化素AB、活化素B、活化素C、活化素RIA、活化素RIA ALK-2、活化素RIB ALK-4、活化素 RIIA、活化素 RIIB、ADAM、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17/TACE、ADAM8、ADAM9、ADAMTS、ADAMTS4、ADAMTS5、位址素(Addressin)、脂聯素(adiponectin)、ADP核糖基環化酶-1、aFGF、AGE、ALCAM、ALK、ALK-1、ALK-7、過敏原、α1-抗胰凝乳蛋白酶(alpha 1-antichemotrypsin)、α1-抗胰蛋白酶、α-突觸核蛋白、α-V/β-1拮抗劑、阿米寧(aminin)、澱粉素(amylin)、類澱粉蛋白β、類澱粉蛋白免疫球蛋白重鏈可變區、類澱粉蛋白免疫球蛋白輕鏈可變區、雄性素、ANG、血管收縮素原、血管生成素配體-2、抗-Id、抗凝血酶III、炭疽病、APAF-1、APE、APJ、apo A1、apo 血清類澱粉蛋白A、Apo-SAA、APP、APRIL、AR、ARC、ART、青蒿琥酯(Artemin)、ASPARTIC、心房利尿肽因子(Atrial natriuretic factor)、心房利尿肽、心房利尿肽A及心房利尿肽B、心房利尿肽C、av/b3整合素、Axl、B7-1、B7-2、B7-H、BACE、BACE-1、炭疽桿菌保護抗原(Bacillus anthracis

protective antigen)、Bad、BAFF、BAFF-R、Bag-1、BAK、Bax、BCA-1、BCAM、Bcl、BCAM、BDNF、b-ECGF、β-2-微球蛋白、β內醯胺酶、bFGF、BID、Bik、BIM、BLC、BL-CAM、BLK、B-淋巴球刺激物(B-lymphocyte Stimulator，BIyS)、BMP、BMP-2 (BMP-2a)、BMP-3 (成骨素)、BMP-4 (BMP-2b)、BMP-5、BMP-6 (Vgr-1)、BMP-7 (OP-1)、BMP-8 (BMP-8a)、BMPR、BMPR-IA (ALK-3)、BMPR-IB (ALK-6)、BMPRII (BRK-3)、BMPs、BOK、鈴蟾素(Bombesin)、骨衍生的嗜中性因子、牛生長激素(bovine growth hormone)、BPDE、BPDE-DNA、BRK-2、BTC、B-淋巴球細胞黏附分子、C10、C1-抑制劑、C1q、C3、C3a、C4、C5、C5a (補體5a)、CA125、CAD-8、鈣黏蛋白-3、降鈣素、cAMP、碳酸酐酶-IX、癌胚抗原(carcinoembryonic antigen，CEA)、癌相關抗原、心肌營養素-1、組織蛋白酶A、組織蛋白酶B、組織蛋白酶C/DPPI、組織蛋白酶D、組織蛋白酶E、組織蛋白酶H、組織蛋白酶L、組織蛋白酶O、組織蛋白酶S、組織蛋白酶V、組織蛋白酶X/Z/P、CBL、CCI、CCK2、CCL、CCL1/I-309、CCL11/伊紅趨素(Eotaxin)、CCL12/MCP-5、CCL13/MCP-4、CCL14/HCC-1、CCL15/HCC-2、CCL16/HCC-4、CCL17/TARC、CCL18/PARC、CCL19/ELC、CCL2/MCP-1、CCL20/MIP-3-α、CCL21/SLC、CCL22/MDC、CCL23/MPIF-1、CCL24/Eotaxin-2、CCL25/TECK、CCL26/Eotaxin-3、CCL27/CTACK、CCL28/MEC、CCL3/M1P-1-α、CCL31/LD-78-β、CCL4/MIP-1-β、CCL5/RANTES、CCL6/C10、CCL7/MCP-3、CCL8/MCP-2、CCL9/10/MTP-1-γ、CCR、CCR1、CCR10、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CD1、CD10、CD105、CD11a、CD11b、CD11c、CD123、CD13、CD137、CD138、CD14、CD140a、CD146、CD147、CD148、CD15、CD152、CD16、CD164、CD18、CD19、CD2、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD26、CD27L、CD28、CD29、CD3、CD30、CD30L、CD32、CD33 (p67蛋白質)、CD34、CD37、CD38、CD3E、CD4、CD40、CD40L、

CD44、CD45、CD46、CD49a、CD49b、CD5、CD51、CD52、CD54、CD55、CD56、CD6、CD61、CD64、CD66e、CD7、CD70、CD74、CD8、CD80 (B7-1)、CD89、CD95、CD105、CD158a、CEA、CEACAM5、CFTR、cGMP、CGRP受體、CINC、CKb8-1、閉合蛋白18、CLC、肉毒桿菌毒素(Clostridium botulinum toxin)、艱難梭狀芽孢桿菌毒素(Clostridium difficile toxin)、產氣莢膜梭菌毒素(Clostridium perfringens toxin)、c-Met、CMV、CMV UL、CNTF、CNTN-1、補體因子3(C3)、補體因子D、皮質類固醇-結合球蛋白、群落刺激因子-1受體、COX、C-Ret、CRG-2、CRTH2、CT-1、CTACK、CTGF、CTLA-4、CX3CL1/曲動蛋白(Fractalkine)、CX3CR1、CXCL、CXCL1/Gro-α、CXCL10、CXCL11/I-TAC、CXCL12/SDF-1-α/β、CXCL13/BCA-1、CXCL14/BRAK、CXCL15/Lungkine. CXCL16、CXCL16、CXCL2/Gro-βCXCL3/Gro-γ、CXCL3、CXCL4/PF4、CXCL5/ENA-78、CXCL6/GCP-2、CXCL7/NAP-2、CXCL8/IL-8、CXCL9/Mig、CXCL1O/IP-10、CXCR、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、胱抑素C、細胞角蛋白腫瘤相關抗原(cytokeratin turmor-associated antigen)、DAN、DCC、DcR3、DC-SIGN、衰變加速因子、類δ蛋白質配體4、去(1-3)-IGF-1(腦IGF-1)、Dhh、DHICA氧化酶、Dickkopf-1、地高辛、二肽基肽酶IV、DK1、DNAM-1、去氧核醣核酸酶、Dpp、DPPIV/CD26、Dtk、ECAD、EDA、EDA-A1、EDA-A2、EDAR、EGF、EGFR(ErbB-1)、含有類EGF域的蛋白質7、彈性蛋白酶、彈性蛋白、EMA、EMMPRIN、ENA、ENA-78、內皮唾液酸蛋白、內皮素受體、內毒素、腦啡肽(Enkephalinase)、eNOS、Eot、Eotaxin、Eotaxin-2、eotaxini、EpCAM、Ephrin B2/EphB4、Epha2酪胺酸激酶受體、表皮生長因子受體(EGFR)、ErbB2受體、ErbB3酪胺酸激酶受體、ERCC、EREG、紅血球生成素(EPO)、紅血球生成素受體、E-選擇素、ET-1、Exodus-2、RSV的F蛋白質、F10、F11、F12、F13、F5、F9、因子Ia、因子IX、因子Xa、因子VII、因子VIII、因子VIIIc、Fas、

FcαR、FcεRI、FcγIIb、FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIIa、FcγRIIIb、FcRn、FEN-1、鐵蛋白、FGF、FGF-19、FGF-2、FGF-2受體、FGF-3、FGF-8、FGF-酸性、FGF-鹼性、纖維蛋白、纖維母細胞活化蛋白(FAP)、纖維母細胞生長因子、纖維母細胞生長因子-10、纖網蛋白、FL、FLIP、Flt-3、FLT3配體、葉酸受體、濾泡刺激激素 (FSH)、曲動蛋白(CX3C)、游離重鏈、游離輕鏈、FZD1、FZD10、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、G250、Gas 6、GCP-2、GCSF、G-CSF、G-CSF受體、GD2、GD3、GDF、GDF-1、GDF-15 (MIC-1)、GDF-3 (Vgr-2)、GDF-5 (BMP-14/CDMP-1)、GDF-6 (BMP-13/CDMP-2)、GDF-7 (BMP-12/CDMP-3)、GDF-8 (肌肉生長抑制素)、GDF-9、GDNF、凝溶膠蛋白、GFAP、GF-CSF、GFR-α1、GFR-α2、GFR-α3、GF-β1、gH外膜糖蛋白、GITR、升糖素、升糖素受體、類升糖素肽1受體、Glut4、夫胺酸羧基肽酶II、糖蛋白激素受體、糖蛋白IIb/IIIa(GP IIb/IIIa)、磷脂醯肌醇聚糖-3、GM-CSF、GM-CSF受體、gp130、gp140、gp72、顆粒球-CSF (G-CSF)、GRO/MGSA、生長激素釋放因子、GRO-β、GRO-γ、幽門螺旋桿菌、半抗原(NP-cap或NIP-cap)、HB-EGF、HCC、HCC 1、HCMV gB外膜糖蛋白、HCMV UL、造血生長因子(Hemopoietic growth factor，HGF)、Hep B gp120、肝素酶、肝素共因子II、肝生長因子、炭疽菌保護抗原、肝炎C病毒E2糖蛋白、肝炎E、鐵調素、Her1、Her2/neu (ErbB-2)、Her3 (ErbB-3)、Her4 (ErbB-4)、單純疱疹病毒(HSV)gB糖蛋白、HGF、HGFA、高分子量黑色素瘤相關抗原(High molecular weight melanoma-associated antigen，HMW-MAA)、HIV外膜蛋白如GP120、HIV MIB gp 120 V3環、HLA、HLA-DR、HM1.24、HMFG PEM、HMGB-1、HRG、Hrk、HSP47、Hsp90、HSV gD糖蛋白、人類心肌凝蛋白、人類細胞巨大病毒(human cytomegalovirus，HCMV)、人類生長激素(hGH)、人類血清白蛋白、人類組織型血纖維溶原酶活化子(t-PA)、亨丁頓氏蛋白、HVEM、IAP、ICAM、ICAM-1、ICAM-3、ICE、ICOS、IFN-α、

IFN-β、IFN-γ、IgA、IgA受體、IgE、IGF、IGF結合蛋白、IGF-1、IGF-1 R、IGF-2、IGFBP、IGFR、IL、IL-1、IL-10、IL-10受體、IL-11、IL-11受體、IL-12、IL-12受體、IL-13、IL-13受體、IL-15、IL-15受體、IL-16、IL-16受體、IL-17、IL-17受體、IL-18 (IGIF)、IL-18受體、IL-1α、IL-1β、IL-1受體、IL-2、IL-2受體、IL-20、IL-20受體、IL-21、IL-21受體、IL-23、IL-23受體、IL-2受體、IL-3、IL-3受體、IL-31、IL-31受體、IL-3受體、IL-4、IL-4受體、IL-5、IL-5受體、IL-6、IL-6受體、IL-7、IL-7受體、IL-8、IL-8受體、IL-9、IL-9受體、免疫球蛋白免疫複合物、免疫球蛋白、INF-α、INF-α受體、INF-β、INF-β受體、INF-γ、INF-γ受體、IFN型-I、IFN型-1受體、流感病毒、抑制素、抑制素α、抑制素β、iNOS、胰島素、胰島素A-鏈、胰島素B-鏈、類胰島素生長因子1、類胰島素生長因子2、類胰島素生長因子結合蛋白、整合素、整合素α2、整合素α3、整合素α4、整合素α4/β1、整合素α-V/β-3、整合素α-V/β-6、整合素α4/β7、整合素α5/β1、整合素α5/β3、整合素α5/β6、整合素ασ(αV)、整合素αθ、整合素β1、整合素β2、整合素β3 (GPIIb-IIIa)、IP-10、I-TAC、JE、激肽釋放素(kalliklein)、激肽釋放素11、激肽釋放素12、激肽釋放素14、激肽釋放素15、激肽釋放素2、激肽釋放素5、激肽釋放素6、激肽釋放素L1、激肽釋放素L2、激肽釋放素L3、激肽釋放素L4、激肽釋放酶結合蛋白(kallistatin)、KC、KDR、角質形成細胞生長因子(KGF)、角質形成細胞生長因子-2 (KGF-2)、KGF、類殺手免疫球蛋白受體、Kit配體(KL)、Kit酪胺酸激酶、層黏蛋白5、LAMP、LAPP(澱粉素，胰島類澱粉蛋白多肽)、LAP (TGF-1)、潛在相關肽、潛在性TGF-1、潛在性TGF-1 bp1、LBP、LDGF、LDL、LDL受體、LECT2、左素、瘦素、促黃體素(leutinizing hormone，LH)、路易士-Y抗原、路易士-Y相關抗原、LFA-1、LFA-3、LFA-3受體、Lfo、LIF、LIGHT、脂蛋白、LIX、LKN、Lptn、L-選擇素、LT-a、LT-b、LTB4、LTBP-1、肺界面活性劑、促黃體素、淋巴細胞趨化素(lymphotactin)、淋巴毒素β受體、溶血神經

鞘脂受體、Mac-1、巨噬細胞-CSF (M-CSF)、MAdCAM、MAG、MAP2、MARC、乳腺絲胺酸蛋白酶抑制劑(maspin)、MCAM、MCK-2、MCP、MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-1 (MCAF)、M-CSF、MDC、MDC (67個胺基酸)、MDC (69個胺基酸)、絲胺酸蛋白酶抑制抗體(megsin)、Mer、MET酪胺酸激酶受體家族、金屬蛋白酶、膜糖蛋白OX2、間皮素、MGDF受體、MGMT、MHC (HLA-DR)、微生物蛋白、MIF、MIG、MIP、MIP-1α、MIP-1β、MIP-3α、MIP-3β、MIP-4、MK、MMAC1、MMP、MMP-1、MMP-10、MMP-11、MMP-12、MMP-13、MMP-14、MMP-15、MMP-2、MMP-24、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、單核球吸引劑蛋白、單核球聚落抑制因子、小鼠促性腺激素相關蛋白、MPIF、Mpo、MSK、MSP、MUC-16、MUC18、黏液素(Mud)、穆勒氏抑制物質、Mug、MuSK、髓磷質相關糖蛋白、骨髓前驅細胞抑制劑因子-1(myeloid progenitor inhibitor factor-1，MPIF-1)、NAIP、奈米體、NAP、NAP-2、NCA 90、NCAD、N-鈣黏蛋白、NCAM、腦啡肽酶、神經細胞黏附分子、神經絲胺酸(neroserpin)、神經元生長因子(neuronal growth factor，NGF)、神經營養分子-3、神經營養分子-4、神經營養分子-6、神經氈1、神經秩蛋白、NGF-β、NGFR、NKG20、N-甲硫胺醯基人類生長激素、nNOS、NO、Nogo-A、Nogo受體、來自肝炎C病毒的非結構性蛋白3型(NS3)、NOS、Npn、NRG-3、NT、NT-3、NT-4、NTN、OB、OGG1、抑瘤素M、OP-2、OPG、OPN、OSM、OSM受體、骨誘導因子、骨橋蛋白、OX40L、OX40R、氧化LDL、p150、p95、PADPr、副甲狀腺激素、PARC、PARP、PBR、PBSF、PCAD、P-鈣黏蛋白、PCNA、PCSK9、PDGF、PDGF受體、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、PDGF-D、PDK-1、PECAM、PEDF、PEM、PF-4、PGE、PGF、PGI2、PGJ2、PIGF、PIN、PLA2、胎盤生長激素、胎盤鹼性磷酸酶(placental alkaline phosphatase，PLAP)、胎盤催乳激素、血纖維蛋白溶酶原活化子抑制劑-1、血小板生長因子、plgR、PLP、不同尺寸的多元醇鏈(例如PEG-20、PEG-30、

PEG-40)、PP14、前激肽釋放肽、普里昂蛋白、前降鈣素、計畫性細胞死亡蛋白1、前胰島素、促乳素、前蛋白轉化酶PC9、前鬆弛素、前列腺特異性膜抗原(prostate specific membrane antigen，PSMA)、蛋白質A、蛋白質C、蛋白質D、蛋白質S、蛋白質Z、PS、PSA、PSCA、PsmAr、PTEN、PTHrp、Ptk、PIN、P-選擇素糖蛋白配體-1、R51、RAGE、RANK、RANKL、RANTES、鬆弛素、鬆弛素A-鏈、鬆弛素B-鏈、腎素、呼吸道融合瘤病毒(respiratory syncytial virus，RSV)F、Ret、內質網蛋白4、風濕性因子、RLI P76、RPA2、RPK-1、RSK、RSV Fgp、S100、RON-8、SCF/KL、SCGF、抑硬素、SDF-1、SDF1α、SDF1β、SERINE、血清類澱粉蛋白P、血清白蛋白、sFRP-3、Shh、類志賀毒素II、SIGIRR、SK-1、SLAM、SLPI、SMAC、SMDF、SMOH、SOD、SPARC、神經胺醇1-磷酸酯受體、金黃色葡萄球菌脂磷壁酸、Stat、STEAP、STEAP-II、幹細胞因子(stem cell factor，SCF)、鏈球菌激酶、超氧化歧酶(superoxide dismutase)、配體蛋白聚醣1、TACE、TACI、TAG-72(腫瘤相關糖蛋白-72)、TARC、TB、TCA-3、T-細胞受體α/β、TdT、TECK、TEM1、TEM5、TEM7、TEM8、生腱蛋白、TERT、類睪丸PLAP鹼性磷酸酶、TfR、TGF、TGF-α、TGF-β、TGF-β泛特異性、TGF-βRII、TGF-βRIIb、TGF-βRIII、TGF-βRI (ALK-5)、TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3、TGF-β4、TGF-β5、TGF-I、凝血酶、血小板生成素(thrombopoietin，TPO)、胸腺基質淋巴蛋白質受體(thymic stromal lymphoprotein receptor)、胸腺Ck-1、甲狀腺刺激激素(thyroid stimulating hormone，TSH)、甲狀腺素、甲狀腺素-結合蛋白、Tie、TIMP、TIQ、組織因子、組織因子蛋白酶抑制劑、組織因子蛋白、TMEFF2、Tmpo、TMPRSS2、TNF受體I、TNF受體II、TNF-α、TNF-β、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 ODFR/TRANCE

R)、TNFRSF11B (OPG OCIF/TR1)、TNFRSF12 (TWEAK R FN14)、TNFRSF12A、TNFRSF13B (TACI)、TNFRSF13C (BAFF R)、TNFRSF14 (HVEM ATAR/HveA/LIGHT R/TR2)、TNFRSF16 (NGFR p75NTR)、TNFRSF17 (BCMA)、TNFRSF18 (GITR AITR)、TNFRSF19 (TROY TAJ/TRADE)、TNFRSF19L (RELT)、TNFRSF1A (TNF R1 CD20a/p55-60)、TNFRSF1B (TNF RII CD120b/p75-80)、TNFRSF21 (DR6)、TNFRSF22 (DcTRAIL R2 TNFRH2)、TNFRSF25 (DR3 Apo-3/LARD/TR-3/TRAMP/WSL-1)、THFRSF26 (TNFRH3)、TNFRSF3 (LTbR TNF RIII/TNFC R)、TNFRSF4 (OX40 ACT35/TXGP1 R)、TNFRSF5 (CD40 p50)、TNFRSF6 (Fas Apo-1/APT1/CD95)、TNFRSF6B (DcR3 M68/TR6)、TNFRSF7 (CD27)、TNFRSF8 (CD30)、TNFRSF9 (4-1 BB CD137/ILA)、TNFRST23 (DcTRAIL R1 TNFRH1)、TNFSF10 (TRAIL Apo-2配體/TL2)、TNFSF11 (TRANCERANK配體ODF/OPG配體)、TNFSF12 (TWEAK Apo-3配體/DR3配體)、TNFSF13 (APRIL TALL2)、TNFSF13B (BAFF BLYS/TALL1/THANK/TNFSF20)、TNFSF14 (LIGHT HVEM配體/LTg)、TNFSF15 (TL1A/VEG1)、TNFSF18 (GITR 配體 AITR 配體/TL6)、TNFSF1A (TNF-a Conectin/DIF/TNFSF2)、TNFSF1B (TNF-b LTa/TNFSF1)、TNFSF3 (LTb TNFC/p33)、TNFSF4 (OX40 配體 p34TXGP1)、TNFSF5 (CD40 配體 CD154/gp39/HIGM1/IMD3/TRAP)、TNFSF6 (Fas配體Apo-1配體/APT1配體)、TNFSF7 (CD27配體CD70)、TNFSF8 (CD30配體CD153)、TNFSF9 (4-1 BB配體CD137配體)、TNF-α、TNF-β、TNIL-1、毒性代謝物、TP-1、t-PA、Tpo、TRAIL、TRAIL R、TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRANCE、轉鐵蛋白受體、轉形生長因子(transforming growth factor，TGF)如TGF-α及TGF-β、穿膜糖蛋白NMB、轉甲狀腺素蛋白、TRF、Trk、TROP-2、滋胚層糖蛋白、TSG、TSLP、腫瘤壞死因子(tumor necrosis factor，TNF)、腫瘤相關抗原CA125、表現腫瘤相關抗原的路易士Y相關

碳水化合物、TWEAK、TXB2、Ung、uPAR、uPAR-1、尿激酶、VAP-1、血管內皮生長因子(vascular endothelial growth factor，VEGF)、內臟脂肪特異性絲胺酸蛋白酶抑制劑(vaspin)、VCAM、VCAM-1、VECAD、VE-鈣聯素、VE-鈣聯素-2、VEFGR-1 (flt-1)、VEFGR-2、VEGF受體(VEGF receptor，VEGFR)、VEGFR-3 (flt-4)、VEGI、VIM、病毒抗原、VitB12受體、玻璃粘連蛋白受體(Vitronectin receptor)、VLA、VLA-1、VLA-4、VNR整合素、溫韋伯氏因子(von Willebrand Factor，vWF)、WIF-1、WNT1、WNT10A、WNT10B、WNT11、WNT16、WNT2、WNT2B/13、WNT3、WNT3A、WNT4、WNT5A、WNT5B、WNT6、WNT7A、WNT7B、WNT8A、WNT8B、WNT9A、WNT9B、XCL1、XCL2/SCM-1-β、XCL1/淋巴細胞趨化因子、XCR1、XEDAR、XIAP及XPD。

【0111】 特異性地表現T細胞的具體範例包括CD3及T細胞受體。特別地，較佳為CD3。例如於人類CD3的情況中，CD3中本發明的抗原結合分子所結合的位點可為呈現於構成人類CD3的γ鏈、δ鏈、或ε鏈中的任何抗原決定基。特別地，較佳為呈現於人類CD3複合物中ε鏈的細胞外區的抗原決定基。構成CD3的γ鏈、δ鏈、或ε鏈結構的多核苷酸序列係顯示於SEQ ID NO: 224(NM_000073.2)、226 (NM_000732.4)及228 (NM_000733.3)，且其多肽序列係顯示於SEQ ID NO: 225 (NP_000064.1)、227 (NP_000723.1)及229 (NP_000724.1)(RefSeq登錄編號係顯示於括弧內)。

【0112】 本發明的抗原-結合分子所包括的抗原的兩個可變區之一者，結合至不同於上述「CD3」及「CD137」的「第三抗原」。一些實施例中，該第三抗原係衍生自人類、小鼠、大鼠、猴、兔或犬。一些實施例中，該第三抗原為特異性地表現於衍生自人類、小鼠、大鼠、猴、兔或犬的細胞或器官的分子。該第三抗原較佳地為不全身性表現於細胞或器官的分子。該第三抗原較佳地為，例如，腫瘤細胞特異性抗原且亦包括與細胞的惡性改變以及於細胞的惡性

轉形期間於細胞表面或蛋白質分子出現的異常糖鏈一起表現的抗原。其具體範例包括ALK受體(多效生長因子受體)、多效生長因子、KS 1/4胰臟癌抗原、卵巢癌抗原(CA125)、前列腺酸性磷酸、前列腺特異性抗原(prostate-specific antigen，PSA)、黑色素瘤相關抗原p97、黑色素瘤抗原gp75、高分子量黑色素瘤抗原(high-molecular-weight melanoma antigen，HMW-MAA)、前列腺特異性膜抗原、癌胚胎抗原(carcinoembryonic antigen，CEA)、多型性上皮黏蛋白抗原、人類乳脂球抗原、直腸腫瘤相關抗原(例如，CEA、TAG-72、CO17-1A、GICA、CTA-1及LEA)、伯奇氏淋巴瘤抗原38.13、CD19、人類B淋巴瘤抗原CD20、CD33、黑色素瘤特異性抗原(例如，神經節苷酯GD2、神經節苷酯GD3、神經節苷酯GM2及神經節苷酯GM3)、腫瘤特異性移植抗原(tumor-specific transplantation antigen，TSTA)、T抗原、病毒誘發腫瘤抗原(例如，DNA腫瘤病毒及RNA腫瘤病毒的外膜抗原)、大腸CEA、癌胚抗原α-胎兒蛋白(例如，癌胚滋胚層糖蛋白5T4及癌胚膀胱腫瘤抗原)、分化抗原(例如，人類肺癌抗原L6及L20)、纖維肉瘤抗原、人類T細胞白血病相關抗原Gp37、新生兒糖蛋白、鞘磷脂、乳癌抗原(例如，EGFR(epithelial growth factor receptor，表皮生長因子受體))、NY-BR-16、NY-BR-16及HER2抗原(p185HER2)、多型性表皮黏蛋白(polymorphic epithelial mucin，PEM)、惡性人類淋巴球抗原APO-1、分化抗原例如於胎兒紅血球中發現的I抗原、於成人紅血球中發現的原內胚層I抗原、於移植前的胚胎中或於胃癌中發現的I(Ma)、於乳腺上皮細胞中發現的M18、M39、於骨髓細胞中發現的SSEA-1、VEP8、VEP9、Myl、VIM-D5、於大腸直腸癌中發現的D156-22、TRA-1-85(血液群H)、於睪丸及子宮癌中發現的SCP-1、於大腸癌中發現的C14、於肺癌中發現的F3、於胃癌中發現的AH6、Y半抗原、於胚胎癌細胞中發現的Ley、TL5 (血液群A)、於A4312細胞中發現的EGF受體、於胰臟癌中發現E1系列(血液群B)、於胚胎癌細胞中發現的FC10.2、胃癌抗原、於腺癌中發現的CO-514

(血液群Lea)、於腺癌中發現的NS-10、CO-43 (血液群Leb)、於A431細胞EGF受體中發現的G49、於大腸癌中發現的MH2(血液群ALeb/Ley)、於大腸癌中發現的19.9、胃癌黏蛋白、於骨髓細胞中發現的T5A7、於黑色素瘤中發現的R24、於胚胎癌細胞中發現的4.2、GD3、D1.1、OFA-1、GM2、OFA-2、GD2及M1:22:25:8、於4-細胞至8-細胞胚胎中發現的SSEA-3及SSEA-4、皮膚T細胞淋巴瘤相關抗原、MART-1抗原、唾液酸Tn (sialyl Tn，STn)抗原、大腸癌抗原NY-CO-45、肺癌抗原NY-LU-12變體A、腺癌抗原ART1、副腫瘤性相關腦-睪丸癌抗原(致癌神經元抗原MA2及副腫瘤性神經元抗原)、神經致癌性腹抗原2 (neurooncological ventral antigen 2，NOVA2)、血球細胞癌抗原基因520、腫瘤相關抗原CO-029、腫瘤相關抗原MAGE-C1 (癌/睪丸抗原CT7)、MAGE-B1 (MAGE-XP抗原)、MAGE-B2 (DAM6)、MAGE-2、MAGE-4a、MAGE-4b、MAGE-X2、癌-睪丸抗原(NY-EOS-1)、YKL-40、及該等多肽的任何片段，以及其經修飾結構物(前述之經修飾的磷酸基、糖鏈等)、EpCAM、EREG、CA19-9、CA15-3、唾液酸SSEA-1 (SLX)、HER2、PSMA、CEA及CLEC12A。

【0113】 本文中用語「CD137」，亦稱為4-1BB，為腫瘤壞死因子(tumor necrosis factor，TNF)受體家族的成員。屬於TNF超級家族或TNF受體超級家族的因子的範例，包括CD137、CD137L、CD40、CD40L、OX40、OX40L、CD27、CD70、HVEM、LIGHT、RANK、RANKL、CD30、CD153、GITR及GITRL。

【0114】 一態樣中，本發明的抗原結合分子具有選自下述(1)至(4)所組成的群組之至少一特徵：

(1) 可變區結合至包含SEQ ID NO: 159的胺基酸序列的CD3ε (epsilon)的細胞外域，

(2) 抗原結合分子具有針對CD137的促效活性，

(3) 抗原結合分子誘發T細胞針對表現第三抗原的分子的細胞的CD3活化，但

不誘發針對表現CD137的細胞的T細胞的活化，以及

(4) 抗原結合分子於表現第三抗原的分子的細胞不存下不誘發自PBMC的細胞介素釋放。

【0115】 一態樣中，本發明的抗原-結合分子具有選自下述(1)至(4)所成群組之至少一特徵：

(1) 可變區結合至包含SEQ ID NO: 159的胺基酸序列的CD3ε (epsilon)的細胞外域，

(2) 抗原結合分子具有針對CD137的促效活性，

(3) 抗原結合分子誘發T細胞針對表現第三抗原的分子的細胞的細胞毒性，但不誘發針對表現CD137的細胞的T細胞的活化，以及

(4) 抗原結合分子於表現第三抗原的分子的細胞不存下不誘發自PBMC的細胞介素釋放。

一些實施例中，本發明的抗原結合分子具有選自下述(1)至(2)所組成的群組之至少一特徵：

(1) 抗原結合分子不與CD137配體競爭對CD137的結合，以及

(2) 抗原結合分子誘發T細胞針對表現第三抗原的分子的細胞的細胞毒性，但不誘發針對表現CD137的細胞的T細胞的細胞毒性。

【0116】 一態樣中，本發明的「CD137促效劑抗體」或「具有針對CD137的促效活性的抗原結合分子」意指當添加至表現CD137的細胞、組織或活體時，活化表現CD137的細胞至少約5%、具體地至少約10%或更具體地至少約15%的細胞的抗體或抗原結合分子，其中0%活化為表現CD137之非活化細胞的背景程度(例如，IL-6分泌等)。各種具體範例中，使用作為本發明的醫藥組成物的CD137促效劑抗體可活化細胞活性至少約20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、

500%、750%或1000%。

一態樣中，本發明的「CD137促效劑抗體」或「具有針對CD137的促效活性的抗原結合分子」也意指當添加至表現CD137的細胞、組織或活體時，活化表現CD137的細胞至少約5%、具體地至少約10%或更具體地至少約15%的細胞的抗體或抗原-結合分子，其中100%活化為於生理條件下，由等莫耳量的結合夥伴達成的活化程度。各種具體範例中，使用作為本發明的醫藥組成物的CD137促效劑抗體可活化細胞活性至少約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%、750%或1000%。某些實施例中，使用於本文之「結合夥伴」為已知結合至CD137且誘發表現CD137的細胞的活化的分子。另一些實施例中，結合夥伴的範例包括揭示於WO2005/035584A1的Urelumab (CAS註冊No. 934823-49-1)及其變體、揭示於WO012/032433A1的Utomilumab(CAS註冊No. 1417318-27-4)及其變體以及各種已知的CD137促效劑抗體。某些實施例中，結合夥伴的範例包括CD137配體。另一些實施例中，藉由抗CD137促效劑抗體之表現CD137的細胞的活化可使用ELISA決定以特徵化IL6分泌(參照，例如本文中參考實施例5-2)。用作為結合夥伴的抗CD137抗體以及用於測定的抗體濃度可參照參考實施例5-2，其中100%活化為由抗體達成的活化的程度。另一些實施例中，可以30ug/mL，將包含SEQ ID NO: 142的重鏈胺基酸序列以及SEQ ID NO: 144的輕鏈胺基酸序列的抗體用於測定作為結合夥伴(參照，例如本文中參考實施例5-2)。在一些實施例中，抗-CD137促效劑(agonist)抗體所活化之表現CD137的細胞，可例如使用對於CD137訊號反應而表現報導子基因(例如，螢光素酶)的重組T細胞予以測定，以及偵測報導子基因的表現或報導子基因產物的活性作為T細胞活化的指標。當對於CD137訊號反應而表現報導子基因的重組T細胞與抗原分子共培養時，若報導子基因的表現或報導子基因產物的活性係高於陰性對照的10%、

20%、30%、40%、50%、90%、100%或更多時，則判斷該抗原結合分子對於表現CD137的細胞誘發T細胞活化(參照，例如，實施例2.2)。

【0117】 作為非限制性實施例，本發明提供包含Fc區的「CD137促效劑抗體」，其中Fc區對於抑制性Fcγ受體具有增強的結合活性。

【0118】 作為非限制性實施例，CD137促效劑活性可使用B細胞證實，該B細胞已知於其表面表現CD137。作為非限制性實施例，HDLM-2 B細胞株可用作為B細胞。由於IL-6的表現因為CD137的活化而受到誘發，故CD137促效劑活性可藉由所產生的人類介白素-6 (Interleukin-6，IL-6)的量予以評估。此評估中，藉由使用來自非活性B細胞的IL-6的量作為0%背景程度而評估IL-6表現的增加量，來決定所評估的分子具有多少%的CD137促效劑活性是有可能的。

【0119】 一些實施例中，本發明的抗原結合分子誘發T細胞針對表現第三抗原的分子的細胞的CD3活化，但不誘發T細胞針對表現CD137的細胞的CD3活化。可藉由例如於抗原結合分子的存在下，共培養T細胞與表現第三抗原的細胞，且測定T細胞的CD3活化，來決定抗原結合分子是否誘發T細胞針對表現第三抗原的細胞的CD3活化，。T細胞活化可藉由，例如使用對於CD3訊號反應而表現報導子基因(例如，螢光素酶)的重組T細胞，且偵測報導子基因的表現或報導子基因產物的活性作為T細胞的活化指標而予以測定。當對於CD3訊號反應而表現報導子基因的重組T細胞，於抗原-結合分子的存在下與表現第三抗原的細胞共培養時，以依賴於抗原結合分子的劑量的方式偵測到報導子基因的表現或報導子基因產物的活性，指示抗原結合分子誘發T細胞針對表現第三抗原的細胞的活化。類似地，抗原結合分子是否不誘發T細胞針對表現CD137的細胞的CD3活化可藉由，例如於抗原結合分子的存在下共培養T細胞與表現CD137的細胞，且如上所述地測定T細胞的CD3活化而予以決定。當對於CD3訊號反應而表現報導子基因的重組T細胞，於抗原結合分子的存在下與表現CD137的細胞共培養

時，若報導子基因的表現或報導子基因產物的活性不存在或低於偵測界限或低於陰性對照，決定抗原結合分子不誘發T細胞針對表現CD137的細胞的活化。一態樣中，當表現對於CD3訊號反應的報導子基因的重組T細胞於抗原結合分子存在下與表現CD137的細胞共培養時，若報導子基因的表現或該報導子基因產物的活性至多為約50%、30%、20%、10%、5%或1%，其中由同時結合至CD3及CD137的抗原結合分子所達成的活化程度為100%活化，，則決定該抗原結合分子不誘發T細胞針對表現CD137的細胞的活化。一態樣中，當於表現對於CD3訊號反應而表現報導子基因的重組T細胞，於抗原結合分子的存在下與表現CD137的細胞共培養時，若報導子基因的表現或該報導子基因產物的活性至多為約50%、30%、20%、10%、5%或1%，其中由針對表現第三抗原的分子的細胞的相同抗原結合分子所達成的活化程度為100%活化，則決定該抗原結合分子不誘發針對表現CD137的細胞的T細胞活化。

【0120】 一些實施例中，於表現第三抗原的分子的細胞不存在下，本發明的抗原結合分子不誘發自PBMC的細胞介素釋放。可藉由例如將PBMC與抗原結合分子於表現第三抗原的細胞不存在下培養，且使用所屬技術領域習知的方法測定自PBMC釋放至培養上清的細胞介素如IL-2、IFNγ及TFNα，來決定抗原結合分子於表現第三抗原的分子的細胞不存在下是否不誘發細胞介素的釋放。，。若於表現第三抗原的細胞不存在下，偵測到無顯著程度的細胞介素或於已經與抗原結合分子培養之PBMC的培養上清中發生無顯著誘發細胞介素表現，決定抗原結合分子於表現第三抗原的細胞不存在下，不誘發自PBMC的細胞介素釋放。一態樣中，「無顯著程度的細胞介素」也意指細胞介素濃度的程度為約至多50%、30%、20%、10%、5%或1%，其中由同時結合至CD3及CD137的抗原結合分子所達成的細胞介素濃度為100%活化。一態樣中，「無顯著誘發的細胞介素」也意指細胞介素濃度的程度為約至多50%、30%、20%、10%、5%或1%，其中100%

活化為表現第三抗原的分子的細胞存在下所達成的細胞介素濃度。一態樣中，「無顯著誘發的細胞介素表現」也意指細胞介素濃度的程度增加為添加抗原結合分子前之各細胞介素濃度的至多5倍、2倍或1倍。

【0121】 一些實施例中，本發明的抗原結合分子與選自由下述所組成的群組的抗體競爭對CD137的結合或結合至CD137上的相同抗原決定基：

SEQ ID NOSEQ ID NO a1) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1) 包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 16的胺基酸序列，重鏈互補決定區 2 (HCDR2) 包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 30的胺基酸序列，重鏈互補決定區 3 (HCDR3) 包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 44的胺基酸序列，輕鏈互補決定區1 (LCDR1) 包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 63的胺基酸序列，輕鏈互補決定區2 (LCDR2) 包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 68的胺基酸序列，及輕鏈互補決定區 3 (LCDR3) 包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 73的胺基酸序列；SEQ ID NO(a2) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 17的胺基酸序列，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 31的胺基酸序列，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 45的胺基酸序列，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 64的胺基酸序列，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 69的胺基酸序列，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 74的胺基酸序列；

(a3) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 18

的胺基酸序列，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 32的胺基酸序列，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 46的胺基酸序列，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 63的胺基酸序列，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 68的胺基酸序列，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 73的胺基酸序列；

(a4) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 19的胺基酸序列，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 33的胺基酸序列，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 47的胺基酸序列，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 63的胺基酸序列，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 68的胺基酸序列，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 73的胺基酸序列；

(a5) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 19的胺基酸序列，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO:33的胺基酸序列，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 47的胺基酸序列，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 65的胺基酸序列，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 70的胺基酸序列，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 75的胺基酸序列；

(a6) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 20的胺基酸序列，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 34的胺基酸序列，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 48的胺基酸序列，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)包含至少70%、

80%或90%相同於SEQ ID NO: 63的胺基酸序列，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 68的胺基酸序列，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 73的胺基酸序列；

(a7) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 22的胺基酸序列，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 36的胺基酸序列，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 50的胺基酸序列，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 63的胺基酸序列，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 68的胺基酸序列，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 73的胺基酸序列；

(a8) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 23的胺基酸序列，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 37的胺基酸序列，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 51的胺基酸序列，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 63的胺基酸序列，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 68的胺基酸序列，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 73的胺基酸序列；

(a9) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 23的胺基酸序列，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 37的胺基酸序列，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 51的胺基酸序列，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 66的胺基酸序列，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 71的胺基酸序列，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 76的胺基酸序列；

(a10) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 24的胺基酸序列，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 38的胺基酸序列，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 52的胺基酸序列，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 63的胺基酸序列，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 68的胺基酸序列，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 73的胺基酸序列；

(a11) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 25的胺基酸序列，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 39的胺基酸序列，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 53的胺基酸序列，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 66的胺基酸序列，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 71的胺基酸序列，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 76的胺基酸序列；

(a12) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 26的胺基酸序列，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 40的胺基酸序列，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 54的胺基酸序列，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 66的胺基酸序列，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 71的胺基酸序列，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 76的胺基酸序列；

(a13) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 26的胺基酸序列，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 40的胺基酸序列，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)包含至少70%、80%

或90%相同於SEQ ID NO: 54的胺基酸序列，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 63的胺基酸序列，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 68的胺基酸序列，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 73的胺基酸序列；

(a14) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO:27的胺基酸序列，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 41的胺基酸序列，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 55的胺基酸序列，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 63的胺基酸序列，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 68的胺基酸序列，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 73的胺基酸序列；

(a15) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 28的胺基酸序列，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 42的胺基酸序列，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 56的胺基酸序列，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 63的胺基酸序列，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 68的胺基酸序列，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 73的胺基酸序列；

(b1)包含SEQ ID NO: 16的胺基酸序列的的HCDR1，包含SEQ ID NO: 30的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 44的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 63的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 68的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 73的胺基酸序列的LCDR3；

(b2) 包含SEQ ID NO: 17的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 31的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 45的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 64

的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 69的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 74的胺基酸序列的LCDR3；

(b3) 包含SEQ ID NO: 18的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 32的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 46的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 63的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 68的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 73的胺基酸序列的LCDR3；

(b4) 包含SEQ ID NO: 19的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 33的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 47的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 63的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 68的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 73的胺基酸序列的LCDR3；

(b5) 包含SEQ ID NO: 19的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 33的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 47的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 65的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 70的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 75的胺基酸序列的LCDR3；

(b6) 包含SEQ ID NO: 20的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 34的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 48的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 63的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 68的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 73的胺基酸序列的LCDR3；

(b7) 包含SEQ ID NO: 22的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 36的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 50的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 63的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 68的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 73的胺基酸序列的LCDR3；

(b8) 包含SEQ ID NO: 23的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 37的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 51的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 63

的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 68的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 73的胺基酸序列的LCDR3；

(b9) 包含SEQ ID NO: 23的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 37的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 51的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 66的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 71的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 76的胺基酸序列的LCDR3；

(b10) 包含SEQ ID NO: 24的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 38的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 52的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 63的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 68的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 73的胺基酸序列的LCDR3；

(b11) 包含SEQ ID NO: 25的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 39的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 53的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 66的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 71的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 76的胺基酸序列的LCDR3；

(b12) 包含SEQ ID NO: 26的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 40的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 54的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 66的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 71的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 76的胺基酸序列的LCDR3；

(b13) 包含SEQ ID NO: 26的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 40的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 54的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 63的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 68的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 73的胺基酸序列的LCDR3；

(b14) 包含SEQ ID NO: 27的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 41的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 55的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 63

的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 68的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 73的胺基酸序列的LCDR3；

(b15) 包含SEQ ID NO: 28的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 42的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 56的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 63的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 68的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 73的胺基酸序列的LCDR3；

(c1) 重鏈可變域(VH)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 2的胺基酸序列，及輕鏈可變域(VL)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 58的胺基酸序列；

(c2) 重鏈可變域(VH)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 3的胺基酸序列，及輕鏈可變域(VL)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 59；

(c3) 重鏈可變域(VH)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 4的胺基酸序列，及輕鏈可變域(VL)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 58的胺基酸序列；

(c4) 重鏈可變域(VH)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 5的胺基酸序列，及輕鏈可變域(VL)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 58的胺基酸序列；

(c5) 重鏈可變域(VH)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 5的胺基酸序列，及輕鏈可變域(VL)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 60的胺基酸序列；

(c6) 重鏈可變域(VH)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 6的胺基酸序列，及輕鏈可變域(VL)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 58的胺基酸序列；

(c7) 重鏈可變域(VH)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 8的胺基酸序

列，及輕鏈可變域(VL)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 58的胺基酸序列；

(c8) 重鏈可變域(VH)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 9的胺基酸序列，及輕鏈可變域(VL)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 58的胺基酸序列；

(c9) 重鏈可變域(VH)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 9的胺基酸序列，及輕鏈可變域(VL)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 61的胺基酸序列；

(c10) 重鏈可變域(VH)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 10的胺基酸序列，及輕鏈可變域(VL)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 58的胺基酸序列；

(c11) 重鏈可變域(VH)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 11的胺基酸序列，及輕鏈可變域(VL)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 61的胺基酸序列；

(c12) 重鏈可變域(VH)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 12的胺基酸序列，及輕鏈可變域(VL)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 61的胺基酸序列；

(c13) 重鏈可變域(VH)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 12的胺基酸序列，及輕鏈可變域(VL)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 58的胺基酸序列；

(c14) 重鏈可變域(VH)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 13的胺基酸序列，及輕鏈可變域(VL)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 58的胺基酸序列；

(c15) 重鏈可變域(VH)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 14的胺基酸

序列，及輕鏈可變域(VL)包含至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 58的胺基酸序列；

(d1) SEQ ID NO: 2的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 58的輕鏈可變域(VL)；

(d2) SEQ ID NO: 3的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 59的輕鏈可變域(VL)；

(d3) SEQ ID NO: 4的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 58的輕鏈可變域(VL)；

(d4) SEQ ID NO: 5的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 58的輕鏈可變域(VL)；

(d5) SEQ ID NO: 5的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 60的輕鏈可變域(VL)；

(d6) SEQ ID NO: 6的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 58的輕鏈可變域(VL)；

(d7) SEQ ID NO: 8的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 58的輕鏈可變域(VL)；

(d8) SEQ ID NO: 9的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 58的輕鏈可變域(VL)；

(d9) SEQ ID NO: 9的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 61的輕鏈可變域(VL)；

(d10) SEQ ID NO: 10的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 58的輕鏈可變域(VL)；

(d11) SEQ ID NO: 11的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 61的輕鏈可變域(VL)；

(d12) SEQ ID NO: 12的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 61的輕鏈可變域(VL)；

(d13) SEQ ID NO: 12的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 58的輕鏈可變域(VL)；

(d14) SEQ ID NO: 13的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 58的輕鏈可變域(VL)；

(d15) SEQ ID NO: 14的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 58的輕鏈可變域(VL)。

【0122】 測試抗體是否與某抗體共有共同抗原決定基可根據兩個抗體之間對於相同抗原決定基的競爭而予以評估。可藉由交叉封阻測試等來偵測抗體之間的競爭。例如，競爭性ELISA測試為較佳的交叉封阻測試。具體地，於交叉封阻測試中，用於被覆微量滴定盤的孔的CD137蛋白質係於候選競爭抗體的存在或不存在下預培養，然後對其添加本發明的抗CD137抗體。於孔中結合至CD137蛋白質之本發明的抗CD137抗體的量，係不直接相關於競爭結合至相同抗原決定基的候選競爭抗體(測試抗體)的結合活性。亦即，測試抗體對於相同的抗原決定

基的親和性越大，結合至CD137蛋白質被覆孔的本發明之抗CD137抗體的量越低，且結合至CD-137蛋白質被覆孔的測試抗體的量越高。

【0123】 可輕易地藉由事先標記的抗體，來決定結合至孔的抗體量。例如，可使用卵白素/過氧化酶接合物(avidin/peroxidase conjugate)及合適的受質來測定生物素標記的抗體。特別地，使用例如過氧化酶的酵素標記物的交叉封阻測試被稱為「競爭性ELISA測試」。可以能偵測或測量的其他標記物質，來標記抗體。具體地，放射標記、螢光標記等為習知。

【0124】 再者，當測試抗體具有衍生自與本發明的抗CD137抗體的物種不同的物種的恆定區時，可藉由使用辨識該抗體的恆定區的經標記抗體，來測量結合至孔的抗體的量。或者，若抗體衍生自相同物種但屬於不同類別，可使用分辨各類別的抗體，來測定結合至孔的抗體量。

【0125】 相較於候選競爭抗體不存在下所進行的對照試驗中所獲得的結合活性，若候選抗體可封阻抗CD137抗體的結合至少20%，較佳至少20%至50%，以及甚至更佳至少50%，候選競爭抗體為與本發明的抗C137抗體為實質上結合至相同的抗原決定基的抗體或競爭結合至相同的抗原決定基的抗體。

【0126】 另一實施例中，可使用例如習知於所屬技術領域的BIAcore分析或流體細胞術之標準結合測試，由所屬技術領域中具有通常知識者適當地測定測試抗體與另一抗體競爭性或交叉競爭性(cross competitively)結合的能力。

【0127】 測定抗原決定基的空間構形的方法包括，例如，X射線結晶法及二維核磁共振(參照，Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, G. E. Morris (ed.), Vol. 66 (1996))。

【0128】 亦可基於測試抗體及CD137配體對於相同的抗原決定基之間的競爭，來評估測試抗體是否與CD137配體共有共同抗原決定基。可藉由如上述的交叉封阻測試等，來偵測抗體及CD137配體之間的競爭。另一實施例中，可使用

如習知於所屬技術領域的BIAcore分析或流體細胞術之標準的結合測試，由所屬技術領域中具有通常知識者適當地測定測試抗體與CD137配體競爭性或交叉競爭性結合的能力。

【0129】 一些實施例中，本發明的抗原結合分子的較佳範例包括結合至與選自由下述所成的群組的抗體所結合的人類CD137抗原決定基相同的抗原決定基的抗原結合分子：

於人類CD137蛋白質中辨識包含SPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGC序列(SEQ ID NO: 154)的區的抗體，

辨識包含DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGC序列(SEQ ID NO: 149)的區的抗體，

辨識包含LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAEC序列(SEQ ID NO: 152)的區的抗體，以及

辨識包含LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQIC序列(SEQ ID NO: 147)的區的抗體。

【0130】 取決於靶定的癌抗原，所屬技術領域中具有通常知識者可適當地選擇結合至癌抗原的重鏈可變區序列及輕鏈可變區序列，以用於欲包括於癌特異性抗原結合域的重鏈可變區及輕鏈可變區。當由抗原結合域結合的抗原決定基係含有於複數個不同抗原中時，含有抗原結合域的抗原結合分子可結合至具有該抗原決定基的多種抗原。

【0131】 「抗原決定基」意指抗原中的抗原性決定子，且指稱對於本文所揭示的抗原結合分子中的各種結合域所結合的抗原位點。因此，例如，可根據其結構來界定抗原決定基。或者，可根據辨識該抗原決定基的抗原結合分子的抗原結合活性，來界定抗原決定基。當抗原係肽或多肽時，可藉由形成該抗原

決定基的胺基酸殘基，來將抗原決定基具體化。或者，當抗原決定基係糖鏈時，可藉由其特異性糖鏈結構，來具體化抗原決定基。

【0132】 線性抗原決定基為含有其一級胺基酸序列被辨識的抗原決定基的抗原決定基。這種線性抗原決定基於其特異性序列中典型地含有至少3個且最常見至少5個，例如約8至10或6至20個胺基酸。

【0133】 相對於線性抗原決定基，「構形抗原決定基」係其中含有該抗原決定基的一級胺基酸序列不是經辨識的抗原決定基的唯一決定子的抗原決定基(例如，構形抗原決定基的一級胺基酸序列不一定為被抗原決定基-界定抗體所辨識)。相較於線性抗原決定基，構形抗原決定基可含有較大數目的胺基酸。構形抗原決定基-辨識抗體辨識肽或蛋白質的三維結構。例如，當蛋白質分子摺疊且形成三維結構，形成構形抗原決定基的胺基酸及/或多肽主鏈變成對準(aligned)，且使該抗原決定基成為可由抗體辨識。決定構形抗原決定基的方法包括，例如，X射線結晶法、二維核磁共振光譜法、位點特異自旋標記(site-specific spin labeling)及電子順磁共振光譜(electron paramagnetic resonance spectroscopy)，但不限於此，參照，例如，Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology (1996), Vol. 66, Morris (ed)。

【0134】 癌特異性抗原中抗原決定基被抗原結合分子結合的評估方法範例顯示於下文。根據下文範例，靶抗原中抗原決定基被另一結合域結合的評估方法亦可適當地進行。

【0135】 例如，包含用於癌特異性抗原的抗原結合域的測試抗原結合分子是否辨識抗原分子中的線性抗原決定基，例如可如下文所述予以證實。例如，包含形成癌特異性抗原的細胞外域的胺基酸序列的線性肽係經合成用於上述目的。肽可為化學性合成，或藉由使用編碼對應於細胞外域的胺基酸序列的癌特異性抗原的cDNA中的域的基因工程技術所獲得。然後，含有用於癌特異性抗原

的抗原結合域的測試抗原結合分子，係評估其對於包含構成細胞外域的胺基酸序列的線性抗原決定基的結合活性。例如，固定化的線性肽可使用作為抗原，以藉由ELISA評價對於肽的抗原結合分子的結合活性。或者，對於線性肽的結合活性可基於線性肽抑制抗原結合分子對癌特異性抗原表現細胞的結合的程度予以評估。對於線性肽的抗原結合分子的結合活性可由該等測試展現。

【0136】 含有對於抗原的抗原結合域的上述測試抗原結合分子是否辨識構形抗原決定基，可如下文所述予以證實。例如，包含用於癌特異性抗原的抗原結合域的抗原結合分子，在接觸時強力地結合至癌特異性抗原表現細胞，但不實質上結合至包含形成該癌特異性抗原的細胞外域的胺基酸序列之固定化的線性肽。本文中，「不實質上結合」意指相較於對抗原表現細胞的結合活性，使用抗原表現細胞作為抗原ELISA 或螢光活化細胞分選(fluorescence activated cell sorting，FACS)的結合活性為80%或更少，通常為50%或更少，較佳為30%或更少以及特別較佳為15%或更少。

【0137】 ELISA格式中，包含對於抗原表現細胞的抗原結合域的測試抗原結合分子的結合活性，可藉由比較以酵素反應所產生的信號程度予以定量地評估。具體地，測試抗原結合分子係添加至抗原表現細胞被固定化至其上的ELISA盤。然後，使用辨識測試抗原結合分子的經酵素標記的抗體偵測結合至該細胞的測試抗原結合分子。或者，當使用FACS時，製備系列稀釋的測試抗原-結合分子，且可決定對於抗原表現細胞的抗體結合力價，以比較測試抗原結合分子對於抗原表現細胞的結合活性。

【0138】 可使用流式細胞術，來偵測測試抗原結合分子對在懸浮於緩衝液等之細胞的表面上表現的抗原的的結合。習知的流式細胞術包括，例如，下述裝置：

FACSCanto™ II

FACSAria™

FACSArray™

FACSVantage™ SE

FACSClibur™ (所有皆為BD Biosciences的商品名稱)

EPICS ALTRA HyPreSort

Cytomics FC 500

EPICS XL-MCL ADC EPICS XL ADC

Cell Lab Quanta/Cell Lab Quanta SC (所有皆為Beckman Coulter的商品名稱)

【0139】 評估包含抗原結合域的上述測試抗原結合分子對於抗原的結合活性的合適方法包括，例如，下述方法。首先，抗原表現細胞與測試抗原結合分子反應，然後使用FACSCalibur (BD)以經標記FITC的二級染色。使用CELL QUEST軟體(BD)藉由分析獲得的螢光強度，亦即幾何平均值，反應經結合至細胞的抗體定量。亦即，可藉由測量該幾何平均值來測定測試抗原結合分子的結合活性，其係藉由經結合的測試抗原結合分子的定量所表示。

【0140】 包含本發明之抗原結合域的抗原結合分子是否與另一抗原結合分子共有共同的抗原決定基，可基於兩個分子之間對相同決定基的競爭予以評估。抗原結合分子之間的競爭可藉由交叉封阻測試等予以偵測。例如，競爭性ELISA為較佳的交叉封阻測試。

【0141】 具體地，於交叉封阻測試中，被覆微量滴定盤的孔的抗原係於候選競爭抗原結合分子的存在或不存在下預培養，然後對其添加測試抗原結合分子。結合至孔中的抗原之測試抗原結合分子的定量，係非直接地相關於競爭對相同抗原決定基之結合的候選競爭抗原結合分子的結合活性。亦即，競爭抗原結合分子對於相同抗決定基的親和性越大，測試抗原結合分子對於抗原被覆孔的結合活性越低。

【0142】 可輕易地藉由預先標記抗原結合分子，來測量經由抗原結合至孔的測試抗原結合分子的定量。例如，可使用卵白素/過氧化酶接合物和適當的受質，來測量經生物素標記的抗原結合分子。特別地，使用例如過氧化酶的酵素標記的交叉封阻測試係稱為「競爭性ELISA測試」。亦可用能偵測或測量的其他標記物質，來標記抗原結合分子。具體地，放射標記、螢光標記等為習知。

相較於在競爭抗原結合分子不存在下所進行的對照試驗中的結合活性，當候選競爭抗原結合分子可封阻包含抗原結合域的測試抗原結合分子的結合活性至少20%、較佳至少20至50%、及更佳至少50%時，決定該測試抗原結合分子實質上結合至由競爭抗原結合分子所結合的相同抗原決定基，或競爭對相同抗原決定基的結合。

【0143】 當由包含本發明的抗原結合域的抗原結合分子所結合的抗原決定基的結構已經鑑定時，可藉由比較兩個抗原結合分子對於藉由導入胺基酸突變至形成抗原決定基的肽所製備的肽的結合活性，來測試及對照抗原結合分子是否共有共同的抗原決定基。

【0144】 作為測量這種結合活性的方法，例如，測試及對照抗原結合分子對於經導入突變之線性肽的結合活性，可藉由於上述ELISA格式中的比較而測量。除了ELISA方法之外，對於結合至管柱的突變肽的結合活性可藉由使測試及對照抗原結合分子經過管柱，然後定量沖提於沖提物中的抗原結合分子。吸收突變肽至管柱的方法，例如以GST融合肽的形式為習知。

【0145】 或者，當經鑑定的抗原決定基為構形抗原決定基時，測試及對照抗原結合分子是否共有共同的抗原決定基，可藉由下述方法予以評估。首先，製備表現由抗原結合分子所靶定之抗原的細胞以及表現具有經導入突變的抗原決定基的細胞。對藉由懸浮該等細胞於例如PBS之適當的緩衝液中所製備的細胞懸浮物添加測試及對照抗原結合分子。然後，以緩衝液適當地清洗細胞懸浮物，

且對其添加可辨識測試及對照抗原結合分子之經FITC標記的抗體。使用FACSCalibur(BD)，來決定以經標記之抗體染色的細胞的螢光強度及數目。使用適當的緩衝液來稀釋測試及對照抗原結合分子，且以所期望的濃度使用。例如，其等可於10μ/ml至10ng/ml範圍內的濃度使用。使用CELL QUEST軟體(BD)分析所決定的螢光強度，亦即幾何平均值，反應接合至細胞的經標記之抗體的定量。亦即，可藉由測量該幾何平均值，來測定測試及對照抗原結合分子的結合活性，其由所結合之經標記之抗體的定量所表示。

【0146】

一些具體實施例中，本發明的抗原結合分子包含

(a) 重鏈可變域胺基酸序列，於下述每一位置(皆根據Kabat編號)，包含針對該位置的一或多個下述胺基酸殘基:

A、D、E、I、G、K、L、M、N、R、T、W或Y於胺基酸位置 26；

D、F、G、I、M或L，於胺基酸位置27；

D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 28；

F或W於胺基酸位置 29；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 30；

F、I、N、R、S、T或V於胺基酸位置 31；

A、H、I、K、L、N、Q、R、S、T或V於胺基酸位置 32；

W於胺基酸位置 33；

F、I、L、M或V於胺基酸位置 34；

F、H、S、T、V或Y於胺基酸位置 35；

E、F、H、I、K、L、M、N、Q、S、T、W或Y於胺基酸位置 50；

I、K或V於胺基酸位置 51；

K、M、R或T於胺基酸位置 52；

A、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、V、W或Y於胺基酸位置 52b；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 52c；

A、E、F、H、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 53；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 54；

E、F、G、H、L、M、N、Q、W或Y於胺基酸位置 55；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 56；

A、D、E、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T或V於胺基酸位置 57；

A、F、H、K、N、P、R或Y於胺基酸位置 58；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 59；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 60；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 61；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 62；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 63；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸

位置 64；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸

位置 65；

H或R於胺基酸位置 93；

F、G、H、L、M、S、T、V或Y於胺基酸位置 94；

I或V於胺基酸位置 95；

F、H、I、K、L、M、T、V、W或Y於胺基酸位置 96；

F、Y或W於胺基酸位置 97；

A、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置98；

A、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置99；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸

位置100；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸

位置100a；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸

位置100b；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸

位置100c；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸

位置100d；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位

置100e；

A、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位

置100f；

A、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 100g；

A、D、E、G、H、I、L、M、N、P、S、T或V於胺基酸位置 100h；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 100i；

A、D、F、I、L、M、N、Q、S、T或V於胺基酸位置 101；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 102；

及/或

(b)輕鏈可變域胺基酸序列，於下述每一位置(皆根據Kabat編號)，包含針對該位置的一或多個下述胺基酸殘基:

A、D、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 24；

A、G、N、P、S、T或V於胺基酸位置 25；

A、D、E、F、G、I、K、L、M、N、Q、R、S、T或V於胺基酸位置 26；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 27；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 27a；

A、I、L、M、P、T或V於胺基酸位置 27b；

A、E、F、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、W或Y於胺基酸位置 27c；

A、E、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 27d；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 27e；

G、N、S或T於胺基酸位置 28；

A、F、G、H、K、L、M、N、Q、R、S、T、W或Y於胺基酸位置 29；

A、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、V、W或Y於胺基酸位置 30；

I、L、Q、S、T或V於胺基酸位置 31；

F、W或Y於胺基酸位置 32；

A、F、H、L、M、Q或V於胺基酸位置 33；

A、H或S於胺基酸位置 34；

I、K、L、M或R於胺基酸位置 50；

A、E、I、K、L、M、Q、R、S、T或V於胺基酸位置 51；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 52；

A、E、F、G、H、K、L、M、N、P、Q、R、S、V、W或Y於胺基酸位置 53；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 54；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V或Y於胺基酸位置 55；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 56；

A、G、K、S或Y於胺基酸位置 89；

Q於胺基酸位置 90；

G於胺基酸位置 91；

A、D、H、K、N、Q、R、S或T於胺基酸位置 92；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 93；

A、D、H、I、M、N、P、Q、R、S、T或V於胺基酸位置 94；

P於胺基酸位置 95；

F或Y於胺基酸位置 96；及

A、D、E、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T或V於胺基酸位置 97。

【0147】 本發明的抗原結合分子可藉由所屬技術領域中具有通常知識者習知的方法製造。例如，抗體可藉由下文所述的方法製備，但製備本發明的抗體的方法不限於此。宿主細胞及表現載體的許多組合於所屬技術領域中已知用於藉由將編碼多肽之經單離基因轉移至適當宿主之抗體製備。所有該等表現系統可應用於單離本發明的抗原結合分子。於使用真核細胞作為宿主細胞的情況中，可適當地使用動物細胞、植物細胞或真菌細胞。具體地，動物細胞的範例可包括下述細胞：

(1) 哺乳動物細胞如CHO (中國倉鼠卵巢細胞株(Chinese hamster ovary cell line))、COS (猴腎細胞株)、骨髓瘤細胞(Sp2/O、NS0等)、BHK(幼年倉鼠腎細胞株(baby hamster kidney cell line))、HEK293 (帶有經剪切的腺病毒(adenovirus，Ad)5 DNA的人類胚胎腎細胞株)、PER.C6細胞(經腺病毒5型(adenovirus type 5，Ad5)E1A及E1B基因轉形的人類胚胎腎細胞株)、Hela及Vero (Current Protocols in Protein Science (May, 2001, Unit 5.9, Table 5.9.1))；

(2) 兩棲類細胞如蟾蜍卵細胞；及

(3) 昆蟲細胞如sf9、sf21、及Tn5。

抗體也可使用大腸桿菌(*E. coli*)(mAbs 2012 Mar-Apr; 4(2): 217-225)或酵母菌(WO2000023579)製備。使用大腸桿菌製備的抗體為非糖基化。另一方面，使用酵母菌製備的抗體為經糖基化。

【0148】 表現抗體的編碼可變域中具有由感興趣的不同胺基酸所取代之一或多個胺基酸殘基的重鏈之編碼抗體重鏈的DNA，以及編碼輕鏈的DNA。例

如可藉由獲得編碼由所屬技術領域習知的方法所製備之針對某抗原的抗體可變域的DNA，且適當地導入取代使得域中編碼特定胺基酸的密碼子編碼感興趣的不同胺基酸，來獲得編碼於可變域中具有由感興趣的不同胺基酸所取代之一或多個胺基酸殘基的重鏈或輕鏈的DNA。

【0149】 或者，可事先設計編碼其中藉由所屬技術領域習知的方法針對某抗原所製備的抗體可變域中的一或多個胺基酸殘基由感興趣的不同胺基酸所取代的蛋白質的DNA，且可化學性合成以獲得編碼於可變域中具有由感興趣的不同胺基酸所取代的一或多個胺基酸殘基的重鏈的DNA。胺基酸取代位點及取代的類型並不特別限制。用於胺基酸改變的較佳區的範例包括可變區中的溶劑暴露區及環。其等之中，較佳為CDR1、CDR2、CDR3、FR3及環。具體地，較佳為H鏈可變域中Kabat編號位置31至35、50至65、71至74及95至102，以及L鏈可變域中Kabat編號位置24至34、50至56及89至97。更佳為H鏈可變域中Kabat編號位置31、52a至61、71至74及97至101，以及L鏈可變域中Kabat編號位置24至34、51至56及89至96。

胺基酸改變不限制於取代且可為刪除、加成、插入或修改、或其組合。

【0150】 編碼具有於可變域中由感興趣的不同胺基酸所取代的一或多個胺基酸殘基的重鏈的DNA，亦可製備為分開的部分DNA。部分DNA的組合的範例包括，但不限於：編碼可變域的DNA及編碼恆定域的DNA；以及編碼Fab域的DNA及編碼Fc域的DNA。同樣地，編碼輕鏈的DNA亦可製備為分開的部分DNA。

【0151】 該等DNA可藉由下述方法表現：例如，編碼重鏈可變域的DNA，與編碼重鏈恆定域的DNA一起整合至表現載體以構築重鏈表現載體。同樣地，編碼輕鏈可變域的DNA，與編碼輕鏈恆定域的DNA一起整合至表現載體以構築輕鏈表現載體。該等重鏈及輕鏈基因可整合至單一載體。

【0152】 編碼感興趣的抗體的DNA整合至表現載體，以於表現控制區例

如增強子及啟動子的控制下表現。其次，以所得的表現載體將宿主細胞轉形且允許表現抗體。此情況中，可組合使用適當的宿主細胞及表現載體。

【0153】 載體的範例包括M13系列載體、pUC系列載體、pBR322、pBluescript及pCR-Script。除了該等載體之外，例如，亦可使用pGEM-T、pDIRECT或pT7於cDNA次選殖及切割的目的。

【0154】 特別地，表現載體有用於將載體使用於製造本發明的抗體的目的。例如，當宿主為大腸桿菌如JM109、DH5α、HB101、或XL1-Blue時，表現載體不可缺地具有於大腸桿菌中允許有效率表現的啟動子，例如，lacZ啟動子(Ward et al., Nature(1989) 341, 544-546；及FASEB J. (1992) 6, 2422-2427，其全文以參考方式併入本文)、araB啟動子(Better et al., Science (1988) 240, 1041-1043，其全文以參考方式併入本文)、或T7啟動子。這種載體的範例包括上述載體以及pGEX-5X-1(由Pharmacia製造)、「QIAexpress system」(由Qiagene N. V.製造)、pEGFP、以及pET (此情況中，宿主較佳為表現T7 RNA聚合酶的BL21)。

【0155】 載體可含有用於多肽分泌的信號序列。在大腸桿菌的周質(periplasm)中製造的情況，可使用pelB信號序列(Lei, S. P. et al., J. Bacteriol. (1987) 169, 4397，其全文以參考方式併入本文)作為用於多肽分泌的信號序列。可藉由使用，例如，脂染法、磷酸鈣法、或DEAE-葡聚糖法，將載體轉移至宿主細胞。

【0156】 除了用於大腸桿菌的表現載體之外，用於製造本發明的多肽的載體範例包括哺乳動物衍生的表現載體(例如，pcDNA3 (由Invitrogen公司製造)、pEGF-BOS (Nucleic Acids. Res. 1990, 18(17), p. 5322，其全文以參考方式併入本文)、pEF及pCDM8)、昆蟲細胞衍生的表現載體(例如，「Bac-to-BAC桿狀病毒表現系統」(由GIBCOL BRL製造)及pBacPAK8)、植物衍生的表現載體(例如，pMH1及pMH2)、動物病毒衍生的表現載體(例如，pHSV、pMV、及pAdexLew)、反轉錄病毒衍生的表現載體(例如，pZIPneo)、酵母菌衍生的表現載體(例如，

「Pichia Expression Kit」(由Invitrogen公司製造)、pNV11、及SP-Q01)、以及枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)衍生的表現載體(例如，pPL608及pKTH50)。

【0157】 為了於動物細胞例如CHO細胞、COS細胞、NIH3T3細胞、或HEK293細胞中表現的目的，載體不可缺地具有細胞內表現所需要的啟動子，例如，SV40啟動子(Mulligan et al., Nature (1979) 277, 108，其全文以參考方式併入本文)、MMTV-LTR啟動子、EF1α啟動子(Mizushima et al., Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322，其全文以參考方式併入本文)、CAG啟動子(Gene. (1991) 108, 193，其全文以參考方式併入本文)、或CMV啟動子，且更佳地，具有用於篩選經轉形的細胞的基因(例如，藉由藥物(新黴素、G418等)可作用為記號的藥物抗性基因)。具有這種性質的載體的範例包括pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、及pOP13。此外，EBNA1蛋白質可與其共表現用於增加基因套數數目的目的。此情況中，使用具有複製原點OriP的載體(Biotechnol Bioeng. 2001 Oct 20; 75 (20: 197-203；及Biotechnol Bioeng. 2005 Sep 20; 1 (6): 670-7)。

【0158】 意圖安定地表現基因及增加細胞內基因套數的數目的例示性方法涉及以具有作為其互補的DHFR基因的載體(例如，pCHOI)，將核酸合成途徑有缺陷的CHO細胞轉形以及於基因擴增中使用甲胺蝶呤(methotrexate，MTX)。意圖瞬時地表現基因的例示性方法涉及使用於其染色體具有SV40 T抗原基因的COS細胞，以用具有SV40的複製原點的載體(pcD等)將細胞轉形。亦可使用衍生自多瘤病毒、腺病毒、牛乳突病毒(bovine papillomavirus，BPV)等的複製原點。

為了於宿主細胞系統中增加基因套數的數目，表現載體可含有選擇記號如胺基糖苷磷酸轉移酶(aminoglycoside phosphotransferase，APH)基因、胸苷激酶(thymidine kinase，TK)基因、大腸桿菌黃嘌呤鳥糞嘌呤磷酸核糖轉移酶(*E. coli* xanthine guanine phosphoribosyltransferase，Ecogpt)基因、或二氫葉酸還原酶(dihydrofolate reductase，dhfr)基因。

【0159】 可藉由例如，培養經轉形的細胞，然後自分子-轉形細胞中或自其培養溶液分離抗體，來回收抗體。可適當地組合使用例如離心、硫酸銨區分、鹽析、超過濾、C1q、FcRn、蛋白質A及蛋白質G管柱、親和性管柱、離子交換層析、及凝膠過濾層析的方法，來分離及純化抗體。

【0160】 上述技術，例如鈕-至-洞(knobs-into-holes)技術((WO1996/027011；Ridway JB et al., Protein Engineering (1996) 9, 617-621；以及Merchant AM et al., Nature Biotechnology (1998) 16, 677-681)或藉由導入電荷排斥而壓抑H鏈之間的不意圖的締合的技術(WO2006/106905)，可應用於有效率地製備多特異性抗體的方法。

【0161】 本發明更提供用於製造本發明的抗原結合分子的方法，且更具體地提供製造抗原結合分子的方法，前述抗原結合分子包含：能結合至兩種不同抗原(第一抗原及第二抗原)的抗體可變區，但不同時結合至CD3及CD137(此可變區亦指稱為第一可變區)；以及結合至不同於CD3及CD137的第三抗原的可變區(此可變區亦指稱為第二可變區)，該方法包含製備含有該第一可變區的多樣胺基酸序列的抗原結合分子庫的步驟。

【0162】 其範例可包括包含下述步驟的製造方法：

(i) 製備於其等之各自結合至CD3或CD137的抗體可變區中具有至少一個胺基酸改變的抗原結合分子庫，其中該經改變的可變區彼此至少一個胺基酸；

(ii) 由所製備的庫，選擇包含具有針對CD3及CD137的結合活性，但不同時結合至CD3及CD137的可變區的抗原結合分子；

(iii) 培養包含編碼步驟(ii)中所選擇的抗原結合分子的可變區的核酸、以及編碼結合至第三抗原的抗原結合分子的可變區的核酸之宿主細胞，以表現包含能結合至CD3及CD137，但不同時結合至CD3及CD137的抗體可變區以及結合至第三抗原的可變區的抗原結合分子；以及

(iv) 由宿主細胞培養物回收抗原結合分子。

【0163】 此製造方法中，步驟(ii)可為下述選擇步驟：

(v) 從所製備的庫，選擇包含具有針對CD3及CD137的結合活性，但不同時結合至個別表現於不同細胞上的CD3及CD137的可變區的抗原結合分子。

【0164】 步驟(i)中所使用的抗原結合分子不特別限制，只要該等分子各自包含抗體可變區。抗原結合分子可為抗體片段如Fv、Fab、或Fab’，或可為含有Fc區的抗體。

【0165】 欲改變的胺基酸係選擇自，例如其改變不取消於結合至CD3或CD137的抗體可變區中，對抗原的結合的胺基酸。

【0166】 本發明中，可單獨使用一個胺基酸改變，或可組合使用複數個胺基酸改變。

在組合使用複數個胺基酸改變的情況中，欲組合的改變的數目不特別限制，且例如為2或更多及30或更少，較佳為2或更多及25或更少、2或更多及22或更少、2或更多及20或更少、2或更多及15或更少、2或更多及10或更少、2或更多及5或更少、或2或更多及3或更少。

欲組合的複數的胺基酸改變可僅添加至抗體重鏈可變域或輕鏈可變域或可適當地分布於重鏈可變域及輕鏈可變域二者。

【0167】 對於胺基酸改變的較佳區的範例包括可變區中的溶劑暴露區及環。其等之中，較佳為CDR1、CDR2、CDR3、FR3及環。具體地，較佳為H鏈可變域中Kabat編號位置31至35、50至65、71至74及95至102，以及L鏈可變域中Kabat編號位置24至34、50至56及89至97。更佳為H鏈可變域中Kabat編號位置31、52a至61、71至74及97至101，以及L鏈可變域中Kabat編號位置24至34、51至56及89至96。

【0168】 胺基酸殘基的改變也包括：結合至CD3或CD137的抗體可變域中

的上述區中的胺基酸的隨機改變；以及先前已知具有針對CD3或CD137的結合活性的肽對上述區的插入。可從因此而改變的抗原結合分子中，選擇能結合至CD3及CD137，但不能同時結合至該等抗原的可變區，來獲得本發明的抗原結合分子。

【0169】 可根據上述方法，來證實可變區是否能結合至CD3及CD137，但不同時結合至該等抗原，以及進一步地，當CD3及CD137之任一者存在於細胞而另一抗原單獨存在、該等抗原二者各自單獨存在、或該等抗原二者存在於相同細胞，該可變區是否能同時結合至CD3及CD137二者，但無法同時結合至各自表現於不同細胞上的該等抗原。

【0170】 本發明更提供編碼本發明的抗原結合分子的核酸。本發明的核酸可為任何形式，例如DNA或RNA。

【0171】 本發明更提供包含本發明的核酸的載體。根據接受載體的宿主細胞，可適當地由所屬技術領域中具有通常知識者選擇載體的類型。例如，可使用上述任何載體。

【0172】 本發明更關於以本發明的載體轉形的宿主細胞。可由本發明所屬技術領域中具有通常知識者適當地選擇宿主細胞。例如，可使用上述任何宿主細胞。

【0173】 本發明也提供包含本發明的抗原結合分子及醫藥上可接受的載劑的醫藥組成物。可藉由用醫藥上可接受的載劑補充本發明的抗原結合分子，根據所屬技術領域習知的方法，來調配本發明的醫藥組成物。例如，可以有水或其他醫藥上可接受的溶液之無菌溶液或懸浮液的腸胃外注射的形式使用醫藥組成物。例如，醫藥組成物可調配為與抗原結合分子混合於一般接受的醫藥實施所需的單位劑形，與醫學上可接受的載劑或媒劑(media)適當的組合，具體地為無菌水、生理鹽水、植物油、乳化劑、懸浮劑、界面活性劑、安定劑、調味

劑、賦形劑、媒介劑、防腐劑、結合劑等。載劑的具體範例可包括輕無水矽酸、乳糖、結晶纖維素、甘露醇、澱粉、羧甲基纖維素鈣(carmellose calcium)、羧甲基纖維素鈉(carmellose sodium)、羥丙基纖維素(hydroxypropylcellulose)、羥丙基甲基纖維素(hydroxypropylmethylcellulose)、聚乙烯基縮醛二乙基胺基乙酸酯(polyvinyl acetal diethylaminoacetate)、聚乙烯吡咯啶酮(polyvinylpyrrolidone)、明膠、中鏈脂肪酸三甘油酯、聚氧乙烯輕化蓖麻油60 (polyoxyethylene hydrogenated castor oil 60)、多醣、羧甲基纖維素(carboxymethylcellulose)、玉米澱粉及無機鹽類。決定這種製劑中活性成分的量，使得可達成調劑範圍內的適當劑量。

【0174】 可使用媒介劑例如可注射蒸餾水，根據傳統醫藥實施來調配用於注射的無菌組成物。用於注射之水溶液的範例包括生理鹽水、含有葡萄糖及其他佐劑之等張溶液，佐劑例如為D-山梨醇、D-甘露糖、D-甘露醇及氯化鈉。該等溶液可與適當的助溶劑組合使用，例如，醇(具體地，乙醇)或多元醇(例如，丙二醇(propylene glycol)及乙二醇(polyethylene glycol))或非離子性界面活性劑，例如，聚山梨醇酯 80(TM)或HCO-50。

【0175】 油性溶液的範例包括芝麻油及大豆油。該等溶液可與作為助溶劑的苯甲酸苯甲酯(benzyl benzoate)或苯甲醇(benzyl alcohol)組合使用。溶液可進一步與緩衝劑(例如，磷酸鹽緩衝溶液及乙酸鈉緩衝溶液)、舒緩劑(例如，鹽酸普卡因(procaine hydrochloride))、安定劑(例如，苯甲醇及酚)及抗氧化劑混合。由此所製備的注射溶液通常裝填至適當的安瓿(ampule)。本發明之醫藥組成物較佳為腸胃外地投藥。其劑型的具體範例包括注射、鼻內投藥劑、經肺投藥劑、及經皮投藥劑。注射的範例包括靜脈內注射、肌肉內注射、腹腔內注射、及皮下注射，透過這些，醫藥組成物可全身性或局部性投藥。

【0176】 投藥方法可根據患者的年齡及症狀而合適地選擇。含有多肽或編碼多肽的多核苷酸的醫藥組成物的劑量可於，例如，每次劑量為0.0001至1000

mg/kg體重的範圍內選擇。或者，劑量可於，例如，0.001至100000 mg/患者的kg體重的範圍內選擇，然而劑量不一定限制為該等數值。雖然劑量及投藥方法根據患者的體重、年齡、症狀等而變化，所屬技術領域中具有通常知識者可合適地選擇劑量及方法。

【0177】 本發明也提供包含投藥本發明的抗原結合分子的步驟之治療癌症的方法、用於治療癌症之本發明的抗原結合分子、本發明的抗原結合分子用於癌症的治療劑的製造的用途、以及包含使用本發明之抗原-結合分子的步驟之製造用於癌症的治療劑的製程。

【0178】 使用於本文中之胺基酸的三字母代號及對應的一字母代號係定義如下述：丙胺酸(alanine): Ala及A、精胺酸(arginine): Arg及R、天冬醯胺(asparagine): Asn及N、天冬胺酸(aspartic acid): Asp及D、半胱胺酸(cysteine): Cys及C、麩醯胺(glutamine): Gln及Q、麩胺酸(glutamic acid): Glu及E、甘胺酸(glycine): Gly及G、組胺酸(histidine): His及H、異白胺酸(isoleucine): Ile及I、白胺酸(leucine): Leu及L、離胺酸(lysine): Lys及K、甲硫胺酸(methionine): Met及M、苯丙胺酸(phenylalanine): Phe及F、脯胺酸(proline): Pro及P、絲胺酸(serine): Ser及S、蘇胺酸(threonine): Thr及T、色胺酸(tryptophan): Trp及W、酪胺酸(tyrosine): Tyr及Y、以及纈胺酸(valine): Val及V。

【0179】 所屬技術領域中具有通常知識者應了解本文所述之態樣的一個或二或更多個態樣的組合，也包括於本發明，除非基於本發明所屬技術領域中具有通常知識者的共同技術知識，產生技術矛盾。

【0180】 所有本文引用文獻的全文皆以參考方式併入本文。

【0181】 本發明參考下述實施例進一步說明。然而，本發明不為下述實施例所限制。

[實施例]

【0182】 [實施例1] 由親代Dual-Fab H183L072的親和性成熟變體篩選用以改良對於腫瘤細胞的活體外細胞毒性

1.1. 親和性成熟變體的序列

為了增加親代Dual-Fab H183L072 (重鏈: SEQ ID NO: 1；輕鏈: SEQ ID NO: 57)的結合親和，使用H183L072作為模板藉由於可變區導入單一或多個突變而產生多於1,000個 Dual-Fab變體。以Expi293 (Invitrogen)表現抗體且藉由蛋白質A(Protein A)純化，接著藉由凝膠過濾(gel filtration)，若凝膠過濾為必需的。具有多個突變的15個代表變體的序列係列於表1.1及1.2，以及結合動力學係如下所述使用Biacore T200儀器(GE Healthcare) 於25℃及/或37℃於實施例1.2.2中予以評估。由可變區的單一突變造成之對於人類CD137及人類CD3的親和性改變的倍數係列於表1.3。

【0183】 [表1.1a] 使用於親和性測定的人類CD3及CD137抗原的SEQ ID NO

抗原名稱	SEQ ID NO
人類 CD3eg 連接子	84
人類 CD137 ECD	201

【0184】 [表1.1b] 抗體的名稱及SEQ ID NO、包括VH、VL及CDR 1、2及3的可變區

Ab 名稱	VHR 名稱	VLR 名稱	VHR	VHR_CDR1	VHR_CDR2	VHR_CDR3	VLR	VLR_CDR1	VLR_CDR2	VLR_CDR3
H183/L072	dBBDu183H	dBBDuO72L	001	015	029	043	057	062	067	072
H0868L0581	dBBDu183H0868	dBBDuO72L0581	002	016	030	044	058	063	068	073
H1550L0918	dBBDu183H1550	dBBDuO72L0918	003	017	031	045	059	064	069	074
H1571L0581	dBBDu183H1571	dBBDuO72L0581	004	018	032	046	058	063	068	073
H1610L0581	dBBDu183H1610	dBBDuO72L0581	005	019	033	047	058	063	068	073
H1610L0939	dBBDu183H1610	dBBDuO72L0939	005	019	033	047	060	065	070	075
H1643L0581	dBBDu183H1643	dBBDuO72L0581	006	020	034	048	058	063	068	073
H1647L0581	dBBDu183H1647	dBBDuO72L0581	008	022	036	050	058	063	068	073
H1649L0581	dBBDu183H1649	dBBDuO72L0581	009	023	037	051	058	063	068	073
H1649L0943	dBBDu183H1649	dBBDuO72L0943	009	023	037	051	061	066	071	076
H1651L0581	dBBDu183H1651	dBBDuO72L0581	010	024	038	052	058	063	068	073
H1652L0943	dBBDu183H1652	dBBDuO72L0943	011	025	039	053	061	066	071	076
H1673L0943	dBBDu183H1673	dBBDuO72L0943	012	026	040	054	061	066	071	076
H1673L0581	dBBDu183H1673	dBBDuO72L0581	012	026	040	054	058	063	068	073
H2591L0581	dBBDu183H2591	dBBDuO72L0581	013	027	041	055	058	063	068	073
H2594L0581	dBBDu183H2594	dBBDuO72L0581	014	028	042	056	058	063	068	073
CD3ε	CD3εVH	CD3εVL	077				078			
CD137	CD137VH	CD137VL	079				080			

【0185】 [表1.2a] 抗原的胺基酸序列

抗原名稱	SEQ ID NO	胺基酸序列
人類 CD3eg 連接子	84	QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIG GDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYL RARVGSADDAKKDAAKKDDAKKDDAKKDGSQSIKGNHLVKVYDY QEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDGKMIGFLTEDKKKWNLGSNAKD PRGMYQCKGSQNKSKPLQVYYRMDYKDDDDK
人類 CD137 ECD	201	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQC KGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELT KKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVV CGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQHHHHHHGGGGSGLND IFEAQKIEWHE

【0186】 [表1.2b] 可變區及CDR1、2及3的胺基酸序列

VHR、VLR、CDR的名稱	SEQ ID NO	胺基酸序列
dBBDu183H	001	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSNAWMHWVRQAPG KGLEWVAQIKDKGNAYAAYYAPSVKGRFTISRDDSKNSIYLQMN SLKTEDTAVYYCHYVHYASASTVLPAFGVDAWGQGTTVTVSS
dBBDu183H0868	002	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNVWMHWVRQAPG KGLEWVAQIKDKYNAYAAYYAPSVKGRFTISRDDSKNSIYLQMN SLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAFGVDAWGQGTTVTVSS
dBBDu183H1550	003	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNVWMHWVRQAPG KGLEWVAQIKDKYNAYAAYYAPSVKGRFTISRDDSKNSIYLQMN SLKTEDTAVYYCHYIHYASASTLLPAFGVDAWGQGTTVTVSS
dBBDu183H1571	004	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNVWFHWVRQAPG KGLEWVAQIKDKYNAYATYYAPSVKGRFTISRDDSKNSIYLQMNS LKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAFGVDAWGQGTTVTVSS
dBBDu183H1610	005	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFVFSNVWMHWVRQAPG KGLEWVAQIKDKWNAYAAYYAPSVKGRFTISRDDSKNSIYLQMN SLKTEDTAVYYCHYIHYASASTLLPAEGIDAWGQGTTVTVSS
dBBDu183H1643	006	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNVWFHWVRQAPG KGLEWVAQIKDYYNAYAAYYAPSVKGRFTISRDDSKNSIYLQMNS LKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDAWGQGTTVTVSS
dBBDu183H1647	008	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNTWFHWVRQAPGK GLEWVAQIKDYYNDYAAYYAPSVKGRFTISRDDSKNSIYLQMNSL KTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDAWGQGTTVTVSS
dBBDu183H1649	009	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFVFSNVWFHWVRQAPG KGLEWVAQIKDKYNAYADYYAPSVKERFTISRDDSKNSIYLQMNS LKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDAWGQGTTVTVSS
dBBDu183H1651	010	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFVFSNVWFHWVRQAPG KGLEWVAQIKDKYNAYADYYAPSVEGRFTISRDDSKNSIYLQMN SLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDAWGQGTTVTVSS
dBBDu183H1652	011	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFVFSNVWFHWVRQAPG KGLEWVAQIKDYYNAYADYYAPSVEGRFTISRDDSKNSIYLQMNS LKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDAWGQGTTVTVSS
dBBDu183H1673	012	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFVFSNVWFHWVRQAPG KGLEWVAQIKDKWNAYADYYAPSVKERFTISRDDSKNSIYLQMN SLKTEDTAVYYCHYIHYASASTLLPAEGIDAWGQGTTVTVSS
dBBDu183H2591	013	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNVWFHWVRQAPG KGLEWVAQIKDYYNAYAGYYHPSVKGRFTISRDDSKNSIYLQMN SLKTEDTAVYYCHYVHYAAASTLLPAEGVDAWGQGTTVTVSS
dBBDu183H2594	014	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNVWFHWVRQAPG KGLEWVAQIKDYYNAYAGYYHPSVKGRFTISRDDSKNSIYLQMN SLKTEDTAVYYCHYVHYAAASQLLPAEGVDAWGQGTTVTVSS

VHR、VLR、CDR的名稱	SEQ ID NO	胺基酸序列
dBBDu183H_VHR_CDR1	015	NAWMH
dBBDu183H0868_VHR_CDR1	016	NVWMH
dBBDu183H1550_VHR_CDR1	017	NVWMH
dBBDu183H1571_VHR_CDR1	018	NVWFH
dBBDu183H1610_VHR_CDR1	019	NVWMH
dBBDu183H1643_VHR_CDR1	020	NVWFH
dBBDu183H1647_VHR_CDR1	022	NTWFH
dBBDu183H1649_VHR_CDR1	023	NVWFH
dBBDu183H1651_VHR_CDR1	024	NVWFH
dBBDu183H1652_VHR_CDR1	025	NVWFH
dBBDu183H1673_VHR_CDR1	026	NVWFH
dBBDu183H2591_VHR_CDR1	027	NVWFH
dBBDu183H2594_VHR_CDR1	028	NVWFH
dBBDu183H_VHR_CDR2	029	QIKDKGNAYAAYYAPSVKG
dBBDu183H0868_VHR_CDR2	030	QIKDKYNAYAAYYAPSVKG
dBBDu183H1550_VHR_CDR2	031	QIKDKYNAYAAYYAPSVKG
dBBDu183H1571_VHR_CDR2	032	QIKDKYNAYATYYAPSVKG
dBBDu183H1610_VHR_CDR2	033	QIKDKWNAYAAYYAPSVKG
dBBDu183H1643_VHR_CDR2	034	QIKDYYNAYAAYYAPSVKG
dBBDu183H1647_VHR_CDR2	036	QIKDYYNDYAAYYAPSVKG
dBBDu183H1649_VHR_CDR2	037	QIKDKYNAYADYYAPSVKE
dBBDu183H1651_VHR_CDR2	038	QIKDKYNAYADYYAPSVEG
dBBDu183H1652_VHR_CDR2	039	QIKDYYNAYADYYAPSVEG
dBBDu183H1673_VHR_CDR2	040	QIKDKWNAYADYYAPSVKE
dBBDu183H2591_VHR_CDR2	041	QIKDYYNAYAGYYHPSVKG
dBBDu183H2594_VHR_CDR2	042	QIKDYYNAYAGYYHPSVKG
dBBDu183H_VHR_CDR3	043	VHYASASTVLPAFGVDA
dBBDu183H0868_VHR_CDR3	044	VHYASASTLLPAFGVDA
dBBDu183H1550_VHR_CDR3	045	IHYASASTLLPAFGVDA
dBBDu183H1571_VHR_CDR3	046	VHYASASTLLPAFGVDA
dBBDu183H1610_VHR_CDR3	047	IHYASASTLLPAEGIDA
dBBDu183H1643_VHR_CDR3	048	VHYASASTLLPAEGVDA
dBBDu183H1647_VHR_CDR3	050	VHYASASTLLPAEGVDA
dBBDu183H1649_VHR_CDR3	051	VHYASASTLLPAEGVDA
dBBDu183H1651_VHR_CDR3	052	VHYASASTLLPAEGVDA
dBBDu183H1652_VHR_CDR3	053	VHYASASTLLPAEGVDA
dBBDu183H1673_VHR_CDR3	054	IHYASASTLLPAEGIDA
dBBDu183H2591_VHR_CDR3	055	VHYAAASTLLPAEGVDA
dBBDu183H2594_VHR_CDR3	056	VHYAAASQLLPAEGVDA

VCR、VLR、CDR的名稱	SEQ ID NO	胺基酸序列
dBBDu072L	057	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCQASQELVHMNRNTYLHWYQQKPGQAPRLLIYKVSNRFPGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQGTSVPFTFGQGTKLEIK
dBBDu072L0581	058	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCQPSQEVVHMNRNTYLHWYQQKPGQAPRLLIYKVSNRFPGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQGTSHPFTFGQGTKLEIK
dBBDu072L0918	059	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCQPSQEVVHMNNVVYLHWYQQKPGQAPRLLIYKVSNRFPGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQGTSHPFTFGQGTKLEIK
dBBDu072L0939	060	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCQPSQEVVHMNRNTYLHWYQQKPGQAPRLLIYKVSNVFPGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQGTHHPFTFGQGTKLEIK
dBBDu072L0943	061	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCQPSEEVVHMNRNTYLHWYQQKPGQAPRLLIYKVSNLFPGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQGTHHPFTFGQGTKLEIK
dBBDu072L_VLR_CDR1	062	QASQELVHMNRNTYLH
dBBDu072L0581_VLR_CDR1	063	QPSQEVVHMNRNTYLH
dBBDu072L0918_VLR_CDR1	064	QPSQEVVHMNNVVYLH
dBBDu072L0939_VLR_CDR1	065	QPSQEVVHMNRNTYLH
dBBDu072L0943_VLR_CDR1	066	QPSEEVVHMNRNTYLH
dBBDu072L_VLR_CDR2	067	KVSNRFP
dBBDu072L0581_VLR_CDR2	068	KVSNRFP
dBBDu072L0918_VLR_CDR2	069	KVSNRFP
dBBDu072L0939_VLR_CDR2	070	KVSNVFP
dBBDu072L0943_VLR_CDR2	071	KVSNLFP
dBBDu072L_VLR_CDR3	072	AQGTSVPFT
dBBDu072L0581_VLR_CDR3	073	AQGTSHPFT
dBBDu072L0918_VLR_CDR3	074	AQGTSHPFT
dBBDu072L0939_VLR_CDR3	075	AQGTHHPFT
dBBDu072L0943_VLR_CDR3	076	AQGTHHPFT

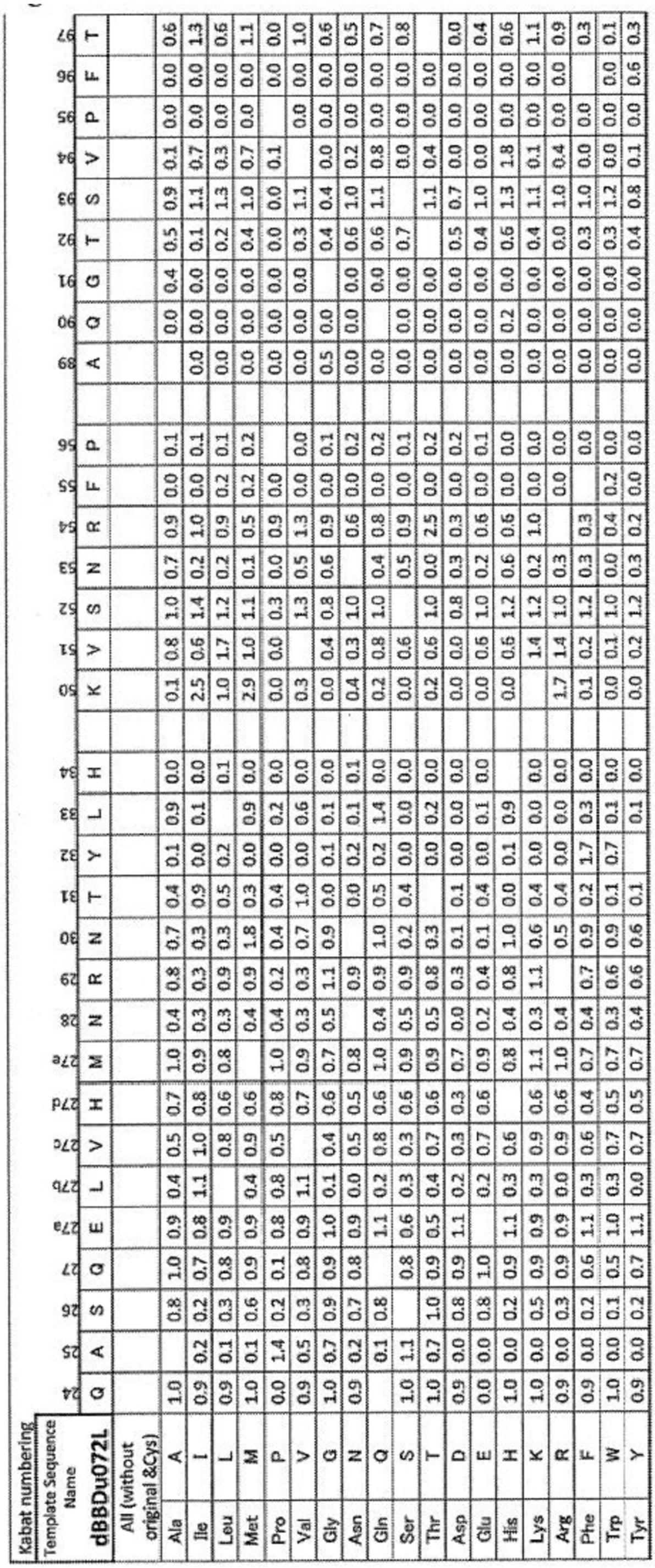
VHR、VLR、CDR的名稱	SEQ ID NO	胺基酸序列
CD3εVH	077	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMHWVRQAPGKGLEWVAQIKDKSQNYATYVAESVKGRFTISRADSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYYCRYVHYAAGYGVDIWGQGTTVTVSS
CD3εVL	078	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQPLVHSNRNTYLHWYQQKPGQAPRLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCGQGTQVPYTFGQGTKLEIK
CD137VH	079	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQSPEKGLEWIGEINHGGYVTYNPSLESRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDYGPGNYDWYFDLWGRGTLVTVSS
CD137VL	080	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPALTFGGGTKVEIK

【0187】 [表1.3a] 重鏈可變區中的單一突變對於CD137的親和性的改變倍數

Kabat numbering Template Sequence Name dBBDu183H		22 G	23 F	24 Y	25 V	26 T	27 F	28 S	29 Y	30 A	31 N	32 A	33 W	34 M	35 H		36 Q	37 I	38 K	39 D	40a K	40b G	41 P	42 A	43 S	44 T	45 V	46 L	47 P	48 A	49 F	50 G	51 V	52 D	52a N	52b G	52c K	53 D	54 A	55 Y	56 A	57 A	58 Y	59 W
All (without original &Cys)																																												
Ala	A	0.4	0.3	0.7		0.4	0.0	0.7	0.9	1.2	0.3		0.0	0.0	0.0		0.0	0.1	0.0	0.0	1.0	0.8	0.8	1.1	1.0	0.8	0.4	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Ile	I	0.3	0.7	0.7	0.4	0.8	0.3	0.7	1.1	1.1	0.3	0.2	0.0	1.4	0.0		0.8		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Leu	L	0.3	0.5	0.9	0.3	0.8	0.3	0.7	1.1	1.1	0.3	0.2	0.0	1.8	0.0		0.8	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Met	M	0.3	0.9	0.7	0.3	0.7	0.3	0.8	0.8	1.1	0.2	0.3	0.0	0.3	0.0		1.5	0.2	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Pro	P	0.1	0.3	0.5	0.3	0.5	0.1	0.9	0.9	1.1	0.4	0.2	0.0	0.3	0.0		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Val	V	0.0	0.3	1.2	0.1	1.2	0.1	0.8	0.9	1.1	0.2	0.5	0.0	0.8	0.5		0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Gly	G	0.0	0.4	1.0	0.3	0.9	0.2	0.8	0.9	1.1	0.3	0.6	0.0	0.4	0.0		0.8	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Asn	N	0.5	0.3	0.6	0.3	0.7	0.2	0.8	0.8	1.1	0.3	0.4	0.0	0.5	0.0		0.5	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Gln	Q	0.5	0.2	0.8	0.3	0.8	0.2	0.9	0.9	1.1	0.3	0.5	0.0	0.6	0.0		0.8	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Ser	S	0.4	0.3	0.7	0.3	0.7	0.2	0.8	0.8	1.1	0.3	0.4	0.0	0.5	0.0		0.5	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Thr	T	0.5	0.3	0.7	0.3	0.8	0.3	0.9	0.9	1.1	0.3	0.5	0.0	0.6	0.0		0.5	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Asp	D	0.8	0.5	0.8	0.4	0.9	0.3	0.9	0.9	1.1	0.4	0.6	0.0	0.7	0.0		0.6	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Glu	E	0.5	0.2	0.8	0.3	0.8	0.2	0.9	0.9	1.1	0.3	0.5	0.0	0.6	0.0		0.6	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
His	H	0.4	0.3	0.8	0.3	0.8	0.3	0.9	0.9	1.1	0.3	0.5	0.0	0.6	0.0		0.6	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Lys	K	0.0	0.2	0.7	0.2	0.7	0.2	0.8	0.8	1.1	0.3	0.5	0.0	0.6	0.0		0.6	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Arg	R	0.3	0.2	0.7	0.2	0.7	0.2	0.8	0.8	1.1	0.3	0.5	0.0	0.6	0.0		0.6	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Phe	F	0.3	0.3	0.8	0.3	0.8	0.3	0.9	0.9	1.1	0.3	0.5	0.0	0.6	0.0		0.6	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Trp	W	0.3	0.4	0.8	0.3	0.8	0.3	0.9	0.9	1.1	0.3	0.5	0.0	0.6	0.0		0.6	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Tyr	Y	0.3	0.4	0.8	0.3	0.8	0.3	0.9	0.9	1.1	0.3	0.5	0.0	0.6	0.0		0.6	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

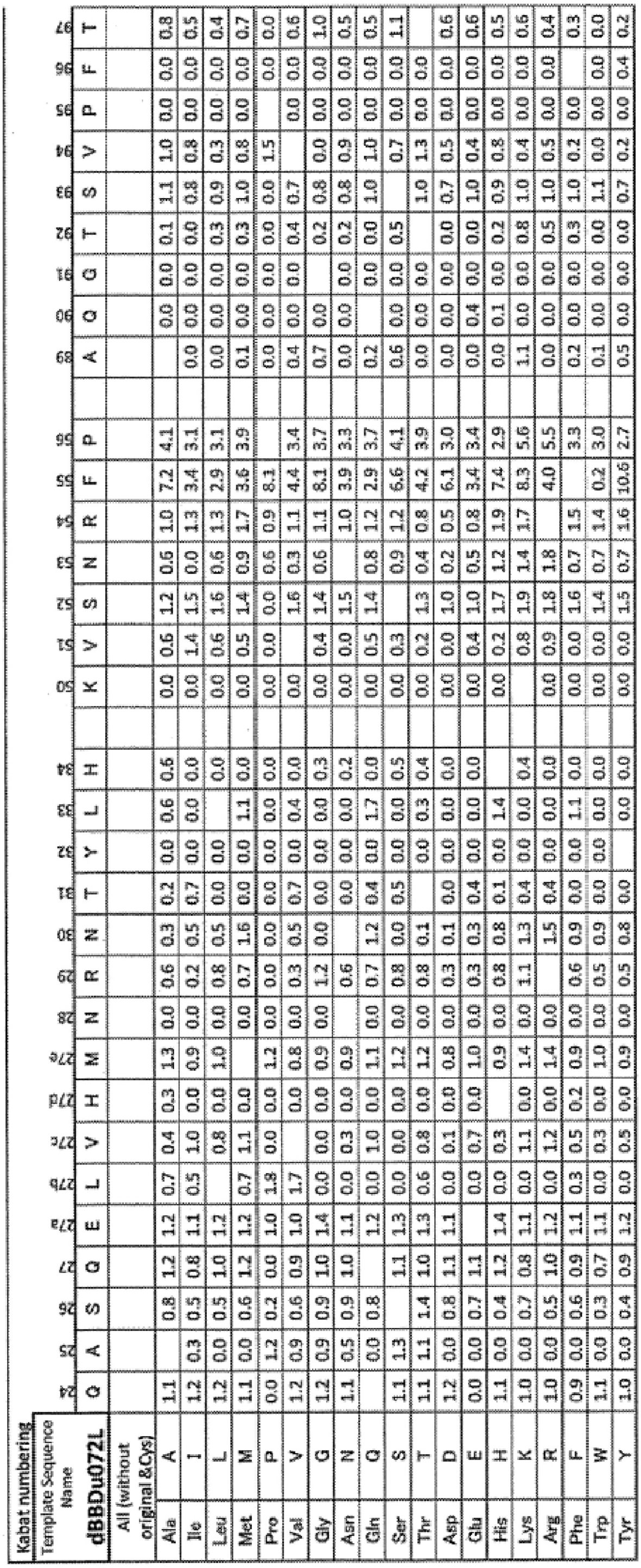
Kabat numbering Template Sequence Name dBBDu183H		1 A	2 S	3 T	4 V	5 L	6 P	7 A	8 F	9 G	10 V	11 D	12 A	13 A	14 I	15 Q	16 I	17 K	18 D	19 K	20 G	21 K	22 G	23 F	24 Y	25 V	26 T	27 F	28 S	29 Y	30 A	31 N	32 A	33 W	34 M	35 H	36 Q	37 I	38 K	39 D	40a K	40b G	41 P	42 A
All (without original &Cys)																																													
Ala	A		0.0	0.0	0.4	0.8	0.5		0.5	0.0	0.0	2.0		1.4																															
Ile	I	0.0	0.0	0.0	2.5	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	1.1	0.0	0.0	0.0																															
Leu	L	0.0	0.0	0.1	3.3		0.0	0.0	1.2	0.0	0.1	0.0	0.0	0.3																															
Met	M	0.0	0.0	0.5	1.3	0.9	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8																															
Pro	P	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0																															
Val	V	0.0	0.0	0.0		0.5	0.0	0.0	0.5	0.0		0.0	0.0	0.0																															
Gly	G	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.6	0.0		0.0	0.0	0.0	1.0																															
Asn	N	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		0.0	0.0	0.0																															
Gln	Q	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6																															
Ser	S	0.0	1.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3		0.0																															
Thr	T	0.0	0.6	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6																															
Asp	D	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0																															
Glu	E	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0																															
His	H	0.0	0.0	0.0		0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5																															
Lys	K	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2																															
Arg	R	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1																															
Phe	F	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0																															
Trp	W	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0																															
Tyr	Y	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5																															

【0188】 [表1.3b] 輕鏈可變區中的單一突變對於CD137的親和性的改變倍數



| Kabat numbering | | |

| Kabat numbering | | |



Kabat numbering																						
Template Sequence Name	dBBDu072L																					
All (without original &Cys)		Q	A	S	T	G	Q	A	H	L	Y	T	K	V	S	N	R	F	P	T		
Ala	A	1.1		1.3	0.4	0.0	0.0	0.0	0.3	0.7	1.1	0.2	0.0	0.4	1.1	0.6	1.0	7.2	4.1	0.8		
Ile	I	1.2	0.3	0.9	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	1.0	0.0	0.0	1.4	1.5	0.0	1.3	3.4	3.1	0.5		
Leu	L	1.2	0.0	1.2	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	0.0	0.0	0.6	1.6	0.6	1.3	2.9	3.1	0.4		
Met	M	1.1	0.0	1.2	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1	0.1	0.0	0.5	1.4	0.9	1.7	3.6	3.9	0.7		
Pro	P	0.0	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5	0.0	0.6	0.9	8.1		0.0		
Val	V	1.2	0.9	0.9	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0		1.6	0.3	1.1	4.4	3.4	0.6		
Gly	G	1.2	0.9	0.7	0.2		0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0	0.4	1.4	0.6	1.1	8.1	3.7	1.0		
Asn	N	1.1	0.5	0.8	0.2	0.0		0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.9	1.5		1.0	3.9	3.3	0.5		
Gln	Q		0.0	1.0	0.0	0.0	0.0		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.4	0.8	1.2	2.9	3.7	0.5		
Ser	S	1.1	1.3	0.7	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.3		0.9	1.2	6.6	4.1	1.1		
Thr	T	1.1	1.1	0.8	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.2	1.3	0.4	0.8	4.2	3.9			
Asp	D	1.2	0.0	1.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.2	0.5	6.1	3.0	0.6		
Glu	E	0.0	0.0	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	1.0	0.5	0.8	3.4	3.4	0.6		
His	H	1.1	0.0	0.8	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.8	0.9	1.2	1.9	7.4	2.9	0.5		
Lys	K	1.0	0.0	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	1.0	1.2	1.7	8.3	5.6	0.6		
Arg	R	1.0	0.0	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	1.0	1.8		4.0	5.5	0.4		
Phe	F	0.9	0.0	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	1.6	0.7	1.5		3.3	0.3		
Trp	W	1.1	0.0	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	1.4	0.7	1.4	0.2	3.0	0.0		
Tyr	Y	1.0	0.0	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	1.5	0.7	1.6	10.6	2.7	0.2		

【0190】 表1.3a至1.3d中，根據Kabat編號的突變位置及於個別位置的原始

胺基酸係示於最上方二列。數值表示當最左欄的各突變的導入至各位置時的親和性改變倍數。

【0191】 1.2. 親和性成熟變體的結合動力學資訊

1.2.1. 人類CD3及CD137的表現及純化

人類CD3複合體(人類CD3eg連接子)的γ(gamma)及ε(epsilon)亞單元(subunit)係藉由29-單體單元(29-mer)連接子連接，且Flag-tag融合至γ亞單元的C終端(SEQ ID NO: 84，表1.1a及1.2a)。此構築體係使用FreeStyle293F細胞株(Thermo Fisher)瞬時地(transiently)表現。表現人類CD3eg 連接子的條件化培養基係使用裝載有Q HP樹脂(GE healthcare)的管柱濃縮後，使用於FLAG-tag親和性層析。收集含有人類CD3eg連接子的分液(fraction)且接著以經1x D-PBS平衡的Superdex 200凝膠過濾管柱(GE healthcare)進行。匯集含有人類CD3eg連接子的分液後儲存於-80°C。

【0192】 於其C終端具有六組胺酸(hexahistidine)(His-tag)及生物素受體肽(BAP)的人類CD137細胞外域(ECD) (SEQ ID NO: 201，表 1.1a及 1.2a) 係使用FreeStyle293F細胞株(Thermo Fisher)瞬時地表現。表現人類CD137 ECD的條件化培養基係使用於HisTrap HP管柱(GE healthcare)且以含有咪唑的緩衝液(Nacalai)沖提。收集含有人類CD137 ECD的分液且接著以經1x D-PBS平衡的Superdex 200凝膠過濾管柱(GE healthcare)進行。匯集含有人類CD137 ECD的分液後儲存於-80°C。

【0193】 1.2.2. 對於人類CD3及CD137的親和性測量

Dual-Fab抗體對人類CD3的結合親和性係使用Biacore T200儀器(GE Healthcare)於25°C評估。抗-人Fc (GE Healthcare)係使用胺偶合套組(GE Healthcare)固定至CM4感測晶片的所有流通槽(flow cell)。抗體係經捕捉至抗-Fc感測器表面，接著將重組人類CD3或CD137注射至流通槽上。所有抗體及分析物係於含有20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% Tween 20、0.005% NaN3的ACES

pH 7.4中製備。感測器表面每次循環以3M MgCl2再生。結合親和性係使用Boacore T200評估軟體，版本2.0(GE Healthcare)藉由處理及擬合數據至1:1結合模型而予以測定。CD137 結合親和性檢測係於相同條件進行，除了溫度設定於37°C。Dual-Fab抗體對重組人類CD3及CD137的結合親和性係示於表1.4。

【0194】 [表1.4]

	CD3			CD137		
	Kon (M-1·s-1)	Koff (s-1)	KD (M)	Kon (M-1·s-1)	Koff (s-1)	KD (M)
H183L072	3.54E+04	1.20E-02	3.40E-07	3.47E+03	1.96E-02	5.66E-06
H0868L0581	1.23E+05	1.94E-02	1.57E-07	1.22E+04	1.36E-03	1.11E-07
H1550L0918	7.20E+04	3.16E-03	4.38E-08	1.09E+04	5.79E-03	5.30E-07
H1571L0581	1.42E+05	1.56E-02	1.10E-07	1.21E+04	1.05E-03	8.68E-08
H1610L0581	6.80E+04	1.42E-03	2.09E-08	1.07E+04	1.10E-03	1.03E-07
H1610L0939	5.00E+04	2.53E-03	5.07E-08	1.30E+04	8.01E-04	6.18E-08
H1643L0581	9.46E+04	2.51E-02	2.65E-07	1.23E+04	6.06E-04	4.94E-08
H1647L0581	4.43E+04	1.01E-01	2.28E-06	9.98E+03	6.47E-04	6.48E-08
H1649L0581	7.50E+04	3.36E-02	4.49E-07	1.29E+04	5.53E-04	4.28E-08
H1649L0943	6.10E+04	4.81E-02	7.89E-07	1.43E+04	4.68E-04	3.28E-08
H1651L0581	7.18E+04	3.71E-02	5.17E-07	1.40E+04	6.03E-04	4.32E-08
H1652L0943	6.23E+04	6.36E-02	1.02E-06	1.29E+04	4.70E-04	3.64E-08
H1673L0581	7.96E+04	1.06E-03	1.33E-08	1.19E+04	9.60E-04	8.04E-08
H1673L0943	5.50E+04	1.16E-03	2.10E-08	1.22E+04	7.22E-04	5.91E-08
H2591L0581	1.02E+05	5.35E-02	5.25E-07	2.04E+04	7.42E-04	3.63E-08
H2594L0581	9.83E+04	5.84E-02	5.93E-07	2.09E+04	1.63E-03	7.81E-08

【0195】 1.3. 雙特異性及三特異性抗體製備

為了評估Dual-Ig變體的功效，以一臂辨識腫瘤抗原(one arm recognizing tumor)及主要為T細胞之其他辨識效應子細胞產生雙特異性或三特異性抗體。靶定腫瘤抗原磷脂醯肌醇聚糖-3(GPC3)的抗-GPC3(重鏈: SEQ ID NO: 206；輕鏈: SEQ ID NO: 207)抗體或陰性對照，鑰孔蟲戚血藍蛋白(Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH))(本文中被稱為Ctrl)抗體係使用作為抗-靶結合臂，而實施例1.1及1.2所記載的抗體係根據記載於(Proc Natl Acad Sci USA. 2013 Mar 26; 110(13): 5145-5150)的方法使用Fab-臂交換(Fab-arm exchange，FAE)而產生。雙特異性抗體或三特異性抗體的分子格式係與傳統的IgG為相同格式。例如，

GPC3/H1643L581為三特異性抗體，其能結合GPC3、CD3及CD137。為了鑑定記載於實施例1.1的何種Dual-Ig三特異性變體有助於改良歸因於CD137活性的細胞毒性，能結合GPC3及CD3的雙特異性抗體(表1.1)之GPC3/CD3ε係被包含以作為對照。產生的所有抗體包含對於Fcγ受體具有減弱的親和性的靜默Fc。

【0196】 [實施例2] 衍生自腫瘤細胞上的親代Dual-Fab H183L072的親和性成熟變體的活體外細胞毒性的評估

2.1. 活體外親和性成熟變體的CD3促效活性的估算

為了評估CD3促效活性作為親和性成熟度的結果，進行 NFAT-luc2 Jurkat 螢光素酶檢測。簡明地，於細胞膜表現人GPC3的4 x 10^3 細胞/孔的SK-pca60 細胞(參考例13)，係使用作為靶細胞且與2.0 x 10^4 細胞/孔的NFAT-luc2 Jurkat細胞(E:T 比例 5)於0.02、0.2及2 nM的三特異性抗體的存在的條件下，共培養24小時。變體分為圖1.1上方圖的盤1及圖1.1下方圖的盤2。24小時後，螢光素酶活性係根據製造商指示以Bio-Glo 螢光素酶檢測系統(Promega, G7940)予以偵測。發光(單位)係使用GloMax(r) Explorer System (Promega #GM3500)予以偵測，且捕捉的值係使用Graphpad Prism 7作圖。親代三特異性抗體GPC3/H183L072及雙特異性抗體GPC3/CD3ε於2nM濃度被包含。圖1.1顯示大多數變體具有類似的CD3促效活性。特別地於2nM，變體具有與親代H183L072類似的活性。圖1.1上方圖顯示盤1的所有變體具有類似的CD3促效活性。圖1.1下方圖顯示H1610L939具有稍微較弱的CD3促效活性而 H2591L581於盤2的變體中具有最強的CD促效活性。

【0197】 2.2. 親和性成熟變體活體外的CD137促效活性的評估

為了評估何種變體可能造成親和性成熟的結果之強力的CD137促效活性，GloResponse(tm) NF-κB-Luc2/CD137 Jurkat細胞株(Promega #CS196004)作為效應子細胞而類似於上述，SK-pca60細胞株(參考例13)係使用作為靶細胞。4.0 x 10^3 細胞/孔SK-pca60細胞(靶細胞)及2.0 x 10^4細胞/孔NF-κB-Luc2/CD137 Jurkat(效應

子細胞)二者係以5的E:T比例添加至白底(white-bottomed)、96-孔檢測盤 (Costar, 3917)的各孔。抗體於攝氏37度以0.5nM、2.5nM 及5nM的濃度添加至各個孔，且於攝氏37度、 5% CO2的條件下培養5小時。根據製造商指示以Bio-Glo螢光速酶檢測系統(Promega, G7940)偵測所表現的螢光素酶。發光(單位)係使用GloMax(r) Explorer System (Promega #GM3500)予以偵測且捕捉的值係使用Graphpad Prism 7作圖。

【0198】 於圖1.2中，抗體變體係分至盤1(圖1.2上方圖)及盤2(圖1.2下方圖)。相較於作為陰性對照的 GPC3/CD3ε，該二盤中的所有變體具有可偵測的CD137促效活性。親和性成熟前的親代抗體，GPC3/H183L072亦於該二盤中使用作為對照。於圖1.2中，所有變體於對CD137親和性成熟後，相較於親代抗體GPC3/H183L072均顯示較強的CD137促效活性。因此，盤1中的GPC3/H1643L581及 GPC3/H868L581(圖 1.2 上 方 圖) 及 盤 2 中 GPC3/H2594L581 及 GPC3/H2591L581(圖1.2下方圖)為造成較強CD137促效活性最主要的變體。而如盤1中的GPC3/H1550L918及盤2中的GPC3/H1610L581及GPC3/H1610L939顯示較弱的CD137活性。

【0199】 合併言之，圖1.1及1.2顯示盤1中的GPC3/H1643L581、GPC3/H868L581及盤2中的GPC3/H2591L581於Jurat細胞中似乎具有類似的強力活性，而GPC3/H1610L939於變體中具有較弱活性。

【0200】 2.3. 親和性成熟變體的活體外細胞毒性的評估

為了延伸CD3、CD137活化對於活體外細胞毒性的觀察，使用人週邊血單核細胞於SK-pca60細胞，對前文記載的親和性成熟變體進行T-細胞依賴性細胞毒性(TDCC)的評估。

【0201】 2.3.1. 冷凍的人PBMC的製備

商業購得的含有PBMC的冷凍管(STEMCELL Technologies.)係置於37°C水

浴以融解細胞。然後細胞分配於含有9mL培養基(用於培養靶細胞的培養基)的15mL falcon管中。接著將細胞懸浮物於室溫以1,200rpm進行離心5分鐘。溫和地吸出上清部分且添加剛加溫的培養基以重新懸浮，並使用作為人PBMC溶液。

【0202】 2.3.2. 使用抗-GPC3親和性成熟Dual-Fab三特異性抗體的TDCC活性的測定

細胞毒性活性係使用xCELLigence實時細胞分析儀(Roche Diagnostics)於PBMC存在的情況下，藉由觀察腫瘤細胞生長抑制率予以估算。圖1.3顯示抗-GPC3親和性成熟Dual-Fab三特異性抗體的TDCC活性。SK-pca60細胞株係使用作為靶細胞。靶細胞係由盤脫附，並藉由調整細胞至3.5 x 10^3 細胞/孔，將細胞以100 μL/孔的等分接種於E-plate 96 (Roche Diagnostics)中，且使用xCELLigence實時細胞分析儀起始細胞生長的測定。24小時後，移除盤且50 μL的將以各濃度(始於 5nM的3-倍系列稀釋，亦即 0.19、0.56、1.67及5nM)製備的各抗體係添加至盤。於室溫反應15分鐘後，於(實施例2.3.1)製備之50 μL的新鮮人PBMC溶液係添加至效應子: 0.5的靶比例(亦即，1.75 x 10^3細胞/孔)以及細胞生長的測定係使用xCELLigence 實時細胞分析儀予以恢復。反應係於5%的二氧化碳氣體於37°C的條件下進行。由於CD137訊號增強T細胞存活且預防活化誘發的細胞死亡，TDCC檢測係以低的E:T比例進行。可能需要延長時間期間以觀察CD137活化所貢獻的優異的細胞毒性。結果，於PBMC添加將近120小時後，細胞生長抑制(CGI)率(%)係使用下述式予以測定。使用於計算之由xCELLigence 實時細胞分析儀所獲得的細胞指標值係經正常化的數值，其中抗體添加前的即刻的細胞指標值(cell index value)係定義為1。

細胞生長抑制率 (%) = (A-B) x 100/ (A-1)

A表示無添加抗體的孔(僅含有靶細胞及人PBMC)的細胞指標值的平均值，B表示標靶孔的細胞指標值的平均值。測定實施三重複(triplicate)。

【0203】 和上述實施例相同，將親和性成熟變體分為2盤且以圖1.3中用於參考的GPC3/H1643L581作為盤內對照。雖然多數變體顯示類似的TDCC活性，但可觀察到於變體之中，H1643L581於二盤中於0.56nM及1.67nM的較低濃度均顯示相對較強的TDCC活性。圖1.3a顯示於0.56nM的濃度下，GPC3/H2591L581為相對較弱而圖 1.3b顯示GPC3/H1610L939為相對較弱。

【0204】 2.3.3. 使用抗-GPC3親和性成熟Dual-Fab三特異性抗體的細胞介素釋放的測定

為了進一步確認抗體的活體內效價，其對它們進行對於細胞介素釋放的評估。自類似於實施例2.3.2所進行的TDCC檢測於48小時獲得上清部分，並且評估細胞介素的存在。由於多數抗體顯示類似於圖1.1中GPC3/CD3ε的CD3促效活性，因此將GPC3/CD3ε添加至此檢測，以評價細胞介素釋放作為與CD137的協同活性的結果。類似地，GPC3/H1643L581係使用作為盤內對照。總細胞介素釋放係使用細胞珠粒陣列(cytometric bead array，CBA)Human Th1/T2 Cytokine kit II (BD Biosciences #551809)予以評估。評估IFNγ (圖1.3c)、IL-2 (圖1.3d)及IL-6 (圖1.3e)。

【0205】 如示於圖1.3c及1.3d，GPC3/H2591L581及GPC3/H1643L581係於盤1中於5nM及1.67nM造成高的IFNγ及 IL-2的最主要2種變體。盤2中，GPC3/H1610L939、GPC3/H2594L581及GPC3/H1643L581於5nM顯示相對強的細胞介素釋放。然而，只有GPC3/H1643L581於1.67nM顯示較強的細胞介素釋放。如圖1.3e所示的IL-6程度，所有變體於盤1顯示與GPC3/CD3ε類似的程度，除了GPC3/H2591L581以外，其於0.56nM及0.19nM顯示較低的IL-6程度。類似地於盤2中，所有變體顯示與GPC3/H1643L581類似的細胞介素釋放程度。合併言之，相較於GPC3/CD3ε，Dual Fab變體顯示改善的 IFNγ及IL-2，但無顯著地增加IL-6程度。

【0206】 合併言之，親和性成熟變體顯示較強的CD137促效活性，其可引

出對於細胞介素釋放反應的TDCC活性。特別地，相對於GPC3/CD3ε，變體顯示改善的IFNγ及IL-2。

【0207】 [實施例3] GPC3/CD3/人 CD137 (2+1)三特異性抗體及抗-GPC3/Dual (1+1) 三特異性抗體的脫靶(off-target)細胞毒性的評價。

3.1. 抗-GPC3/CD137xCD3 (2+1)三特異性抗體的製備

為了研究靶獨立性細胞毒性及細胞介素釋放，藉由利用CrossMab及FAE技術(圖2.1及2.2)產生三特異性抗體。四價類IgG分子，抗體 A (mAb A)其各臂具有二個結合域而於一個分子中造成四個結合域，係如上所述以 CrossMab產生。雙價IgG，抗體 B (mAb B)係與傳統IgG為相同格式。mAb A及mAb B二者的Fc區為FcγR靜默而對於Fcγ受體具有減弱的親和性、去糖基化且可應用於FAE。構築六種三特異性抗體。六種三特異性抗體中各Fv區的靶抗原係示於表2.1。mAb A、mAb B及mAb AB的各個結合域的命名原則係示於圖2.2。mAb A 及 mAb B的配對產生各別的三特異性抗體，mAb AB及其SEQ ID NO係示於表2.2以及表2.3。記載於WO2005/035584A1之抗體CD3D(2)_i121(簡寫為AN121)係使用作為抗-CD3抗體。記載於表2的三特異性抗係藉由如上所述方法予以表現及純化。

【0208】 [表2.1]抗體的各臂的靶

mAb AB的名稱	Fv A1	Fv A2	Fv B
GPC3/CD137xCD3	Anti-CD137	Anti-CD3ε	Anti-GPC3
Ctrl/CD137xCD3	Anti-CD137	Anti-CD3ε	Ctrl

【0209】 [表2.2]表2.1中記載的抗體的各個可變序列的SEQ ID NO

mAb AB的名稱	mAb A對產生mAb AB的名稱	VHA1 (SEQ ID NO.)	VLA1 (SEQ ID NO.)	VHA2 (SEQ ID NO.)	VLA2 (SEQ ID NO.)	mAb B對產生mAb AB的名稱	VHB (SEQ ID NO.)	VLB (SEQ ID NO.)
GPC3/CD137xCD3	CD137xCD3	202	203	204	205	GPC3	206	207
Ctrl/CD137xCtrl	CD137xCtrl	202	203	Ctrl	Ctrl	Ctrl	Ctrl	Ctrl

【0210】 [表2.3]表2.1及2.2中記載的抗體的可變區的胺基酸序列

VH/VL 名稱	胺基酸序列
CD137VH (SEQ ID NO: 202)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQSPE KGLEWIGEINHGGYVTYNPSLESRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARDYGPGNYDWYFDLWGRGTLVTVSS
CD137VL (SEQ ID NO: 203)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQ RSNWPPALTFGGGTKVEIK
CD3VH (SEQ ID NO: 204)	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSNAWMHWVRQAP GKGLEWVAQIKDRANSYNTYYAESVKGRFTISRDDSKNSIYLQ MNSLKTEDTAVYYCRYVHYTTYAGSSFSYGVDAWGQGTTVTV SS
CD3VL (SEQ ID NO: 205)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQPLVHSNRNTYLHWYQQ KPGQAPRLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED VGVYYCGQGTQVPYTFGQGTKLEIK
GPC3VH (SEQ ID NO: 206)	QVQLVQSGAEVKKPGASVTVSCKASGYTFTDYEMHWIRQPP GEGLEWIGAIDGPTPDTAYSEKFKGRVTLTADKSTSTAYMELSSL TSEDTAVYYCTRFYSYTYWGQGTLVTVSS
GPV3VL (SEQ ID NO: 207)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQPLVHSNRNTYLHWYQQ KPGQAPRLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED VGVYYCGQGTQVPYTFGQGTKLEIK

【0211】 3.2. GPC3/CD137xCD3三特異性抗體的結合評價

三特異性抗體對人類CD3及CD137的結合親和性係使用Biacore T200儀器(GE Healthcare)於37°C評估。抗-人Fc抗體(GE Healthcare)係使用胺偶合套組(GE Healthcare)固定至CM4感測晶片的所有流通槽。抗體被捕捉至抗-Fc感測器表面，然後重組人類CD3或CD137係注射於該流通槽。所有抗體及分析物係於含有20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% Tween 20、0.005% NaN3的ACES H7.4中製備。各循環以3M $MgCl_2$再生感測器表面。結合親和性使用Biacore T200評估軟體，版本2.0(GE Healthcare)，藉由處理及擬合數據至1:1結合模型而決定。

【0212】 結合三特異性抗體對人類CD3及CD137的結合親和性係示於表2.4。

【0213】 [表2.4] 表2.1記載的三特異性抗體對於人類CD137或CD3的結合親和性，由Biacore測量

Ab 名稱	CD137			CD3		
	ka ($M^{-1}s^{-1}$)	kd (s^{-1})	KD (M)	ka ($M^{-1}s^{-1}$)	kd (s^{-1})	KD (M)
GPC3/CD137xCD3	5.47E+05	2.06E-02	3.77E-08	8.18E+04	1.61E-03	1.97E-08
Ctrl/CD137xCD3	5.48E+05	1.82E-02	3.31E-08	8.24E+04	1.52E-03	1.85E-08

【0214】 3.3. GPC3/CD137xCD3三特異性抗體及抗-GPC3/Dual-Fab三特異性抗體的脫靶細胞毒性對人類CD137表現細胞的評價

衍生自親代Dual-Fab H183L072的三特異性抗體，GPC3/CD137xCD3、GPC3/CtrlxCD3於2+1格式或GPC3/H183L072於 1+1格式，於靶細胞(SK-pca60 表現GPC3)的存在下造成Jurkat細胞的劑量依賴性活性(參考例15-5；圖28)。 其亦顯示僅格式2+1的三特異性抗體，於表現CHO-的hCD137存在的情況下造成Jurkat細胞活化，但使用GPC3/H183L072的1+1格式的三特異性抗體則無(參考例15-6；圖29)。此暗示2+1格式可有潛力地造成T細胞的腫瘤抗原依賴性活化。

【0215】 為了研究H183L072的親和性成熟是否可產生有潛力的脫靶細胞毒性，親和性成熟變體係接受相同評估，比較對於三特異性2+1抗體格式，其中表現hCD3的Jurkat細胞係與表現hCD137的CHO細胞共培養。5.0 x 10^3 細胞/孔的表現hCD137的CHO(圖2.3b)或親代CHO(圖2.3a)係於0.5、5及50nM濃度的三特異性抗體存在的情況下，與2.5 x 10^4 NFAT-luc2 Jurkat細胞共培養24小時。圖2.3a顯示當與親代CHO細胞共培養時，所有三特異性抗體均無Jurkatc細胞的非特異性活化。然而，觀察到GPC3/CD137xCD3及 Ctrl/CD137xCD3二者於表現hCD137的CHO細胞存在的情況下可活化Jurkat細胞。當呈1+1格式的親和性成熟變體與表現hCD137的CHO細胞共培養時，不造成Jurkat細胞活化。合併言之，此暗示三特異性抗體格式GPC3/CD137xCD3可造成獨立於靶或腫瘤抗原的Jurkat細胞活化，提升脫靶細胞毒性，不同於GPC3/Dual (1+1) 格式者，即便於CD137結合的親和性成熟之後。

【0216】 3.4. GPC3/CD137xCD3 三特異性抗體及GPC3/Dual-Fab三特異性抗體自PBMC的脫靶細胞介素釋放的評估

三特異性抗體對於脫靶毒性的比較也使用人PBMC溶液予以評估。簡明地，如實施例2.3.1所記載而製備的2.0 x 10^5 PBMC係於靶細胞缺乏的情況下與80、16及3.2nM的三特異性抗體培養48小時。由於IL-2不藉由任何抗體偵測，IL-6、IFNγ及TNFα於上清部分的程度係示於表2.4a至2.4c。細胞介素釋放的測定係類似於實施例2.3.3記載的方式進行。類似於實施例2，親和性成熟變體係分為2盤。如圖2.4所示，GPC3/CD137xCD3造成IFNγ (圖2.4a)、 TNFα (圖2.4b)及IL-6 (圖2.4c)自PBMC釋放，而抗-GPC3/Dual-Fab則否。該等結果暗示GPC3/CD137xCD3三特異性格式於靶細胞缺乏的情況下，造成PBMC的非特異性活化。最終地， 數據顯示Dual-Fab三特異性1+1格式可賦予靶特異性效應子細胞活化而無脫靶毒性。

【0217】 [實施例 4] GPC3/CD3ε 雙特異性抗體及抗-GPC3/Dual-Fab (1+1)三特異性抗體的活體內功效的評價

4.1. 抗-GPC3/Dual-Fab、GPC3/CD3ε及GPC3/CD137雙特異性抗體製備

用於活體內功效研究的抗體係如實施例1.3的記載予以產生。除了使用於實施例1的抗-GPC3/Dual-Fab及GPC3/CD3ε之外，於實施例1.3的FAE進行之前，如抗-CD137抗體以雙價型被產生，如同實施例1.1中所產生的抗體(表1.1)，以獲得GPC3/CD137。關於人源化huNOG小鼠研究，抗體包含對於Fcγ受體具有減弱親和性的人Fc。而對於CD137/CD3雙人源化小鼠研究，抗體包含對於Fcγ受體具有減弱親和性的小鼠Fc。

【0218】 4.2. CD137/CD3雙人源化小鼠的產生

人類CD137敲入(knock-in， KI)小鼠株係使用小鼠胚胎幹細胞藉由人類CD137基因組序列置換小鼠內源性Cd137基因組區而產生。將人類CD3 EDG-經置換的小鼠建立為株，其中CD3複合體的所有三種組分– CD3e、CD3d及CD3g –

係經以它們與人對應的部分CD3E、CD3D及CD3G (Scientific Rep. 2018; 8: 46960)予以置換。CD137/CD3雙人源化小鼠株係藉由將人類CD137 KI 小鼠與人類CD3 EDG-置換的小鼠雜交育種(crossbreeding)而建立。

【0219】 4.3. LLC1/hGPC3細胞株的製備

小鼠癌細胞株LL/2(LLC1) (ATCC)係以pCXND3-hGPC3轉染且以500 μg/ml G418實施單一細胞純株(clone)純化。經選擇的純株(LLC1/hGPC3)證實表現hGPC3。

【0220】 4.4. 以hCD3/hCD137小鼠評估抗- GPC3/Dual-Fab三特異性抗體的活體內功效

實施例4.1所製備的抗體係使用腫瘤負荷模型(tumor-bearing model)評價其活體內功效。

對於活體內功效評價，使用實施例4.2建立的CD3/CD137雙人源化小鼠，後文中被稱為「hCD3/hCD137小鼠」。具有穩定的人GPC3表現的LLC1/hGPC3細胞係移植至hCD3/hCD137小鼠，以及經確認腫瘤形成的hCD3/hCD137小鼠藉由投藥GPC3/H1643L0581、GPC3/CD137或GPC3/CD3ε抗體予以治療。

【0221】 更具體地，於使用LLC1/hGPC3模型的GPC3/H1643L0581的藥物功效測試中，實施下述測試。LLC1/hGPC3 (1×10^6 細胞)係移植至hCD3/hCD137小鼠的腹股溝皮下區(inguinal subcutaneous region)。移植日定義為第0日。移植後第9日，根據其體重及腫瘤尺寸將小鼠隨機分組。於隨機分組日，GPC3/H1643L0581、GPC3/CD137或GPC3/CD3ε抗體以6 mg/kg經由尾靜脈靜脈內投藥。組合治療組係以6 mg/kg的GPC3/CD3ε及6 mg/kg的GPC3/CD137抗體予以治療。抗體僅投藥一次。每3至4日以抗腫瘤測試系統 (ANTES version 7.0.0.0)測定腫瘤體積及體重。

【0222】 結果，相較於GPC3/CD3ε組及GPC3/CD137組，於GPC3/

H1643L0581組觀察到較清楚的抗腫瘤活性(圖3.1a)。

另一活體內功效評價中，LLC/hGPC3細胞係移植至hCD3/hCD137小鼠的右側腹(right flank)。於第9日，根據它們的腫瘤體積及體重，將小鼠隨機分組，且靜脈注射媒劑(vehicle)或實施例4.1所製備的抗體。每週測定腫瘤體積二次。對於IL-6分析，小鼠於治療後2小時採血。血漿樣本根據製造商指示，以Bio-Plex Pro Mouse Cytokine Th1 Panel予以分析。如示於圖3.1b及3.1c，相較於GPC3/CD3ε組，GPC3/Dual組顯示較強的抗腫瘤活性及較少的IL-6產生。

【0223】 4.5. 以HuNOG小鼠評估抗-GPC3/Dual-Fab三特異性抗體的活體內功效

實施例4.1所製備的抗-GPC3/Dual-Fab抗體、GPC3/CD3ε雙特異性抗體及GPC3/CD137雙特異性抗體的抗腫瘤活性，係於人肝臟sk-pca-13a癌模型中測試。GPC3/CD3ε雙特異性抗體也與GPC3/CD137雙特異性抗體組合測試。Sk-pca-13a細胞係皮下移植至NOG人源化小鼠。

為了獲得sk-pca-13a細胞株，人GPC3基因係藉由所屬技術領域中具有通常知識者習知的方法整合至人肝臟腺癌細胞株SK-HEP-1 (ATCC No. HTB-52)的染色體中。

【0224】 NOG雌性小鼠係購自 In-Vivo Science。對於人源化，小鼠係經次致死性(sub lethally)照射後之1日後，注射100,000個人臍帶血細胞 (ALLCELLS)。十六週後，sk-pca-13a細胞($1x10^7$細胞)與MatrigelTM Basement Membrane Matrix (Corning)混合且移植至人源化NOG小鼠的右側腹。移植日定義為第0日。於第19日，根據它們的腫瘤體積及體重，將小鼠隨機分組，且靜脈注射媒劑(含有0.05% Tween的PBS)、5 mg/kg GPC3/CD3ε、5 mg/kg GPC3/H1643L0581或 5 mg/kg GPC3/CD3ε及5 mg/kg GPC3/CD137的組合。

【0225】 結果，抗-GPC3/Dual-Fab (GPC3/H1643L0581)顯示較大於

GPC3/CD3ε的抗腫瘤活性(圖3.2)。

【0226】 [實施例 5] H0868L0581/hCD137複合體的X-射線晶體結構分析

5.1. 用於共晶體分析的抗體的製備

H0868L581係經選擇與hCD137蛋白質用於共晶體分析。該雙價抗體係使用Expi293 Expression system (Thermo Fisher Scientific)瞬時地轉染及表現。收集培養上清部分及使用MabSelect SuRe親和性層析法(GE Healthcare)由上清部分純化抗體，接著使用Superdex200 (GE Healthcare)進行凝膠過濾層析。

【0227】 5.2. 人類CD137的細胞外域(24-186)的表現及純化

經由Xa因子可裂解連接子融合至Fc的人類CD137(CD137-FFc, SEQ ID NO: 81)的細胞外域係於凡夫鹼 (kifunensine)的存在下表現於HEK293細胞中。來自培養基的CD137-FFc係藉由親和性層析 (HiTrap MabSelect SuRe管柱， GE Healthcare)及尺寸排除層析 (HiLoad 16/600 Superdex 200 pg管柱， GE healthcare)予以純化。Fc以Xa因子裂解，且所得CD137細胞外域進一步地以串聯連接的凝膠過濾管柱 (HiLoad 16/600 Superdex 200 pg, GE healthcare)及蛋白質A管柱(HiTrap MabSelect SuRe 1ml, GE Healthcare)予以純化，及後續地使用苯甲脒(Benzamidine) Sepharose樹脂(GE Healthcare)予以純化。匯集含有CD137細胞外域的分液且儲存於-80°C。

【0228】 5.3. H0868L0581及抗-CD137對照抗體的Fab片段的製備

用於晶體結構分析的抗體係使用Expi293 Expression system (Thermo Fisher Scientific)瞬時地轉染及表現。收集培養上清部分且使用 MabSelect SuRe親和性層析(GE Healthcare)且接著使用Superdex200 (GE Healthcare)凝膠過濾層析予以純化。H0868L0581及習知抗-CD137對照抗體 (後文中稱為137Ctrl，重鏈SEQ ID NO: 82，輕鏈 SEQ ID NO: 83)的Fab片段係使用以Lys-C (Roche)的限制性分解，接著裝載至蛋白質A管柱 (MabSlect SuRe, GE Healthcare)以移除Fc片段、陽離子

交換管柱 (HiTrap SP HP, GE Healthcare)及凝膠過濾管柱 (Superdex200 16/60, GE Healthcare)等傳統方法而製備。匯集含有Fab片段的分液且儲存於−80°C。

【0229】 5.4. H0868L0581 Fab、137Ctrl及人類CD137複合體的製備

經純化的CD137與用於去糖基化之GST-tag經融合的糖苷內切酶F1(內部的(in-house))混合，接著使用凝膠過濾管柱(HiLoad 16/600 Superdex 200 pg, GE healthcare)及蛋白質A管柱(HiTrap MabSelect SuRe 1ml, GE Healthcare)純化CD137。經純化的CD137與H0868L0581 Fab混合。複合體藉由凝膠過濾管柱(Superdex 200 Increase 10/300 GL, GE healthcare)純化，且後續地經純化的H0868L0581 Fab與CD137複合體係與137Ctrl混合。該三源複合體藉由凝膠過濾層析 (Superdex200 10/300 increase, GE Healthcare)使用經25 mM HEPES pH 7.3、100 mM NaCl平衡的管柱予以純化。

【0230】 5.5. 結晶

經純化的複合體經濃縮至約10 mg/mL，以及於21°C藉由沉滴氣相擴散法(sitting drop vapor diffusion method)進行結晶。貯存溶液由0.1M Tris鹽酸鹽pH8.5、25.0% v/v聚乙二醇單甲基酯 550所組成。

【0231】 5.6 數據收集及結構測定

X-射線繞射數據係於SLS藉由 X06SA測定。測定期間，晶體恆定地置於−178°C氮氣流中以維持其於冷凍狀態，以及使用附於光束線上的Eiger X16M (DECTRIS)收集合計1440個X-射線繞射影像，而一次旋轉晶體0.25°。使用autoPROC程式(Acta. Cryst. 2011, D67: 293-302)、XDS 套裝軟體(Acta. Cryst. 2010, D66: 125-132)及 AIMLESS (Acta. Cryst. 2013, D69: 1204-1214)，由繞射影像所獲得的繞射數據實施決定晶格參數(cell parameter)、索引繞射點及處理繞射數據，以及最終地獲得解析度達3.705 Å的繞射強度數據。晶體學數據統計係示於表2.5。

結構以程式Phaser (J. Appl. Cryst. 2007, 40: 658-674)藉由分子置換予以測定。研究模型衍生自已公開的晶體結構(PDB code: 4NKI及6MI2)。以 Coot程式(Acta Cryst. 2010, D66: 486-501)建立模型且以程式Refmac5(Acta Cryst. 2011, D67: 355-367)及PHENIX(Acta Cryst. 2010, D66: 213-221)予以精化(refined)。對於由77.585-3.705 Å的繞射強度數據的晶體學可信賴因子(reliability factor，R)為22.33%，具有游離R值(free R value)為27.50%。結構精化統計資料係示於表2.5。

【0232】 [表2.5] X-射線數據收集及精化統計資料

數據收集	
空間群	*C2*
單位晶格	
a,b,c (Å)	233.795, 74.019, 81.986
α,β,γ (°)	90.000, 108.858, 90.000
解析度(Å)	77.585–3.705
全反射(total reflection)	99,488
獨特反射(unique reflection)	14,221
完整性(completeness)(最高解析範圍)(%)	99.2 (99.7)
R_{merge} [a] (最高解析度範圍)	0.161 (1.052)
精化	
解析度(Å)	48.822–3.705
反射	14,195
可信賴因子 [b](R_{free}[c]) (%)	22.33 (27.50)
與理想值之 rms 偏差(rms deviation from ideal)	
鍵結長度(Å)	0.003
鍵結角度(°)	0.618

a; $R_{merge} = \sum hkl \sum j |Ij\,(hkl) - \langle I\,(hkl)\rangle| / \sum hkl \sum j |I\,(hkl)|$，其中 $Ij\,(hkl)$及$\langle I\,(hkl)\rangle$分別為測量的強度 *j* 及以 *hkl* 指數反射的平均強度。

b; *R* 因子= $\sum hkl |F_{calc}(hkl)| - |F_{obs}\,(hkl)| / \sum hkl |F_{obs}\,(hkl)|$，其中 F_{obs} 及 F_{calc} 分別為觀測及計算的結構因子振幅。

c; R_{free} 是以 5%的隨機預留反射計算。

【0233】 H0868L0581 Fab及CD137的交互作用位點的鑑定

H0868L0581 Fab、137Ctrl及 CD137的三元複合體的晶體結構係於3.705埃解析予以測定。圖3.3a及3.3b中，H0868L0581 Fab接觸區的抗原決定基係分別定位

(mapped)於CD137胺基酸序列及於晶體結構。抗原決定基包括於晶體結構中含有由H0868L0581 Fab的任何部份在位於4.5 Å距離內的一個或多個分子的CD137的胺基酸殘基。此外，3.0 Å內的抗原決定基係醒目標示於圖3.3a及3.3b中。

【0234】 如示於圖3.3a及3.3b，晶體結構顯示CD137的CRD1中的L24-N30結合於H0868L0581 Fab的重鏈及輕鏈之間所形成的口袋(pocket)中，特別地L24-S29係深埋以使得CD137的N-終端定向朝向口袋的深度。此外，CD137的CRD1中的 N39-I44及CRD2中的 G58-I64係由H0868L0581 Fab的重鏈CDR所辨識。CRD為域的名稱，其由W2015/156268所記載的稱為CRD參照的Cys-Cys所形成的結構予以劃分。

【0235】 發明人鑑定出辨識N-終端區的抗人-CD37抗體，特別地人類CD137的L24-N30，並且也確認了針對此區的抗體可於細胞活化CD137。

【0236】 [參考例1] 由Dual Fab噬菌體展示庫獲得結合至CD3ε肽及人類CD137的Fab域

1.1. 構築具有GLS3000輕鏈的重鏈噬菌體展示庫

參考例12合成的抗體庫片段使用於構築用於噬菌體展示的Dual Fab庫。雙庫係製備為庫其中H鏈係如參考例12所示多樣化而L鏈係固定至原始序列GLS3000(SEQ ID NO: 85)。藉由添加V11L/L78I突變至FR(框架)且進一步多樣化CDR如表27所示(於參考例12)而衍生自CE115HA000 的H鏈庫序列係託付於DNA合成公司DNA2.0, Inc.，以獲得抗體庫片段(DNA片段)。所獲得抗體庫片段係插入至藉由PCR擴增之用於噬菌體展示的噬菌體質粒。選擇GLS3000作為L鏈。所構築的用於噬菌體展示的噬菌體質粒藉由電穿孔轉移至大腸桿菌，以製備帶有抗體庫片段的大腸桿菌。

【0237】 藉由感染編碼FkpA伴侶蛋白基因的助手噬菌體M13KO7TC/FkpA，然後於0.002%阿拉伯糖(arabinose)的存在下於攝氏25度(此噬菌體庫命名為DA

庫)或於0.02%阿拉伯糖的存在下於攝氏20度(此噬菌體庫命名為DX庫)培育隔夜，由帶有所構築的噬菌體質粒的大腸桿菌，來製造展示Fab域的噬菌體庫。M13KO7TC為助手噬菌體，其於助手噬菌體具有於pIII蛋白質的N2域及CT域之間的胰蛋白酶裂解序列的插入物(參照National Publication of International Patent Application No. 2002-514413)。插入物基因至M13KO7TC基因的導入已揭示於其他地方(參照National Publication of International Patent Application No. WO2015016554)。

【0238】 1.2. 以雙重回合選擇獲得結合至CD3ε及人類CD137的Fab域

結合至CD3ε及人類CD137的Fab域係由參考例1.1所構築的Dual Fab庫鑑定出。生物素標記CD3ε肽抗原(胺基酸序列: SEQ ID NO: 86)、經由雙硫鍵連接子生物素標記的CD3ε肽抗原(圖4，稱為C3NP1-27；胺基酸序列: SEQ ID NO: 194，由Genscript合成)、融合至人類IgG1 Fc片段的生物素標記人類CD137(命名為人類CD137-Fc)及融合至人類IgG1 Fc片段的SS-生物素化人類CD137(命名為ss-人類CD137-Fc)使用作為抗原。藉由對融合至人類IgG1 Fc片段的人類CD137使用EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotinylation Kit(PIERCE, Cat. No. 21445)，來製備ss-人類CD137-Fc。生物素化係根據指導手冊進行。

【0239】 噬菌體係由帶有用於噬菌體展示之所構築的噬菌體質粒的大腸桿菌製造。將2.5M NaCl/10%PEG添加至已製造噬菌體的大腸桿菌的培養溶液，及因此沉澱的噬菌體匯池以TBS稀釋以獲得噬菌體庫溶液。接著，BSA(最終濃度：4%)添加至噬菌體庫溶液。淘選方法係參考一般淘選方法，使用固定於磁性珠粒的抗原進行(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; 及Mol. Cell Proteomics (2003) 2(2), 61-9)。使用的磁性珠粒為NeutrAvidin被覆珠粒(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated)或鏈黴素被覆珠粒(Dynabeads M-280

Streptavidin)。為了去除結合至磁性珠粒本身或人類IgG1 Fc區的抗體展示噬菌體，對於磁性珠粒及生物素標記人類Fc進行減去。

【0240】 具體地，噬菌體溶液與250 pmol的人類CD137-Fc及4 nmol的游離人類IgG1 Fc域混合且於室溫培育60分鐘。磁性珠粒以具有游離鏈黴素(Roche)的2%脫脂乳/TBS於室溫封阻60分鐘或更久且以TBS清洗三次，然後與培育的噬菌體溶液混合。於室溫培育15分鐘後，珠粒以TBST(含有0.1% Tween20的TBS；TBS可由Takara Bio Inc.取得)清洗三次後，進一步以1mL的TBS清洗二次。添加5μL的100 mg/mL胰蛋白酶及495μL的TBS且於室溫培育15分鐘，在那之後立即使用磁性底座分開該珠粒，以回收噬菌體溶液。透過於37°C溫和旋轉培養該菌株1小時，以藉由噬菌體感染大腸桿菌。經感染的大腸桿菌接種至225mm × 225mm盤。接著，由經接種的大腸桿菌的培養溶液回收噬菌體，以製備噬菌體庫溶液。

【0241】 此淘選回合1過程中，結合至人類CD137的抗體展示噬菌體係經濃縮。淘選的第二回合中，250pmol的ss-人類CD137-Fc使用作為生物素標記抗原，且以TBSTR進行清洗三次，然後以TBS進行二次。沖提於室溫以25mM DTT進行15分鐘，然後藉由胰蛋白酶分解。

淘選的第三回合及第六回合中，使用62.5 pmol的C3NP1-27作為生物素標記抗原且以TBST進行清洗三次，然後以TBS進行二次。沖提於室溫以25mM DTT進行15分鐘，然後藉由胰蛋白酶分解。

淘選的第四、五及七回合中，使用62.5pmol的ss-人類CD137-Fc作為生物素標記抗原且以TBST進行清洗三次，然後以TBS進行二次。沖提於室溫以25mM DTT進行15分鐘，然後藉由胰蛋白酶分解。

【0242】 1.3. 藉由噬菌體所展示之Fab域對CD3ε或人類CD137的結合

含有噬菌體的培養上清係根據一般方法(Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145)自藉由上述方法所獲得之大腸桿菌的各96個單一菌落回收。含有噬菌體

的培養上清係藉由下述過程進行ELISA：鏈黴素被覆微孔盤(384孔，greiner，Cat#781990)以10μL之含有生物素標記抗原(生物素標記CD3ε肽或生物素標記人類CD137-Fc)的TBS於4°C被覆隔夜或於室溫被覆1小時。盤的各孔以TBST清洗以移除未結合的抗原。然後，孔以80μL的TBS/2%脫脂乳封阻1小時或更久。移除TBS/2%脫脂乳後，所製備的培養上清添加至各孔，且盤於室溫靜置1小時使得噬菌體展示的抗體結合至各孔中含有的抗原。各孔以TBST清洗，然後對各孔添加HRP/抗M13(GE Healthcare 27-9421-010)。盤培育1小時。以TBST清洗後，對孔添加TMB單一溶液(ZYMED Laboratories, Inc.)。各孔中的發色反應藉由添加硫酸終止。然後，呈色係以450nm的吸收為基準測定。結果示於圖5。

如圖5所示，所有純株顯示對人類CD3ε的結合但不顯示對人類CD137的結合，即便經由進行5次對人類CD137的淘選過程。此可能取決於此具有鏈黴素被覆微孔盤之噬菌體ELISA的低敏感度，所以也進行具有鏈黴素被覆珠粒的噬菌體ELISA。

【0243】 1.4. 藉由噬菌體展示的Fab域對人類CD137的結合(噬菌體珠粒ELISA)

首先，鏈黴素被覆磁性珠粒MyOne-T1珠粒以包括0.5x block Ace、0.02% Tween及0.05% ProClin 300的封阻緩衝液清洗三次後，於室溫以此封阻緩衝液封阻60分鐘或更久。以TBST清洗一次後，對磁性珠粒添加0.625pmol的ss-人類CD137-Fc且於室溫培育10分鐘或更久後，將磁性珠粒施用至96孔盤(Corning, 3792黑圓底PS盤)的各孔。12.5μL的Fab展示噬菌體溶液各者與 12.5μL的TBS添加至孔，且使盤於室溫靜置30分鐘使得各Fab結合至各孔中的生物素標記抗原。之後各孔以TBST清洗。對各孔添加以包括0.5x block Ace、0.02% Tween及0.05% ProClin 300的封阻緩衝液稀釋的抗-M13(p8)Fab-HRP。盤培育10分鐘。以TBST清洗3次後，對各孔添加LumiPhos-HRP(Lumigen)。2分鐘後偵測各孔的螢光。結

果示於圖6。

【0244】 一些純株顯示對人類CD137之明顯結合。此結果顯示結合至人類CD3ε及CD137二者的Fab域也由具有噬菌體展示淘選方案的此設計之庫獲得。然而相較於CD3ε肽，對人類CD137的結合仍為弱。人類CD137結合純株各者的VH片段係使用特異性地結合至噬粒載體(SEQ ID NO: 196及197)的引子藉由PCR擴增且分析該DNA序列。結果顯示所有結合純株具有相同的VH序列，其意指只有一個Fab純株結合至人類CD137及CD3ε二者。為了改良此點，於下個試驗也應用雙重回合選擇至噬菌體展示方案。

【0245】 [參考例2] 以雙重回合選擇方法由Dual Fab噬菌體展示庫獲得結合至CD3ε及人類CD137的Fab域

2.1. 構築具有GLS3000輕鏈的重鏈噬菌體展示庫

展示Fab域的噬菌體展示庫係自含有所構築的噬粒，藉由感染編碼FkpA伴侶蛋白(SEQ ID NO: 91)的助手噬菌體M13KO7TC/FkpA的大腸桿菌後，於0.002%阿拉伯糖的存在下於攝氏25度(此噬菌體庫命名為DA庫)或於0.02%阿拉伯糖的存在下於攝氏20度(此噬菌體庫命名為DX庫)隔夜培育所製造。M13KO7TC為助手噬菌體，其於助手噬菌體的pIII蛋白質的N2域及CT域之間具有胰蛋白酶裂解序列的插入(參照日本專利申請公開號2002-514413)。插入基因至M13KO7TC基因的導入已揭示於他處(參照WO2015/046554)。

【0246】 2.2. 以雙重回合選擇獲得結合至CD3ε及人類CD137的Fab域

結合至CD3ε及人類CD137的Fab域係從參考例2.1構築的Fab庫鑑定。生物素標記CD3ε肽抗原(胺基酸序列: SEQ ID NO: 86)、經由雙硫鍵連接子之經生物素標記的CD3ε肽抗原 (C3NP1-27: SEQ ID NO: 194)及經融合至人類IgG1 Fc片段的生物素標記人類CD137(命名為人類CD137-Fc)使用作為抗原。

【0247】 為了製造更多結合至人類CD137及CD3ε的Fab域，也於淘選回合

2及後續的回合中應用雙重回合選擇於噬菌體展示淘選。

噬菌體係由帶有用於噬菌體展示的構築的噬粒的大腸桿菌製造。對已製造噬菌體的大腸桿菌的培養溶液添加2.5M NaCl/10% PEG，因此所沉澱的噬菌體匯池以TBS稀釋以獲得噬菌體庫溶液。其次，對噬菌體展示溶液添加BSA(最終濃度：4%)。淘選方法係參照使用抗原經固定化於磁性珠粒的一般淘選方法進行(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; 及 Mol. Cell Proteomics (2003) 2(2), 61-9)。使用的磁性珠粒為NeutrAvidin被覆珠粒(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated)或鏈黴素被覆珠粒(Dynabeads M-280 Streptavidin)。為了去除結合至磁性珠粒本身或人類IgG1 Fx區的抗體展示噬菌體，進行刪減磁性珠粒及生物素標記人類Fc。

【0248】 具體地，於淘選回合1，磁性珠粒於室溫藉由2%脫脂乳/TBS封阻60分鐘或更久且以TBS清洗三次。DA庫或DX庫的噬菌體溶液添加至經封阻的磁性珠粒且於室溫培育60分鐘或更久後，回收上清。500 pmol的生物素標記人類IgG1 Fc添加至新的磁性珠粒且於室溫培育15分鐘後，添加2%脫脂乳/TBS。於室溫封阻60分鐘或更久之後，磁性珠粒以TBS清洗三次。回收的噬菌體溶液添加至經封阻的磁性珠粒且於室溫培育60分鐘或更久後，回收上清。500 pmol的生物素標記人類CD137-Fc添加至新的磁性珠粒，且於室溫培育15分鐘後添加2%脫脂乳/TBS。於室溫封阻60分鐘或更久之後，磁性珠粒以TBS清洗三次。回收的噬菌體溶液添加至經封阻的磁性珠粒及8 nmol的游離人類IgG1

【0249】 Fc域後，於室溫培育60分鐘。珠粒以TBST(含有0.1% Tween 20的TBS；TBS可自Takara Bio Inc.取得)清洗二次後，進一步以1 mLTBS清洗一次。添加0.5 mL的1 mg/mL胰蛋白酶後，珠粒於室溫懸浮15分鐘，在那之後，立即使用磁性底座分開該珠粒，以回收噬菌體溶液。回收的噬菌體溶液添加至於生長對數期(OD 600: 0.4-0.5)的大腸桿菌菌株ER2738。經由於37°C溫和旋轉培養該菌

株1小時藉由噬菌體感染大腸桿菌菌株。經感染的大腸桿菌接種至225mm × 225mm盤。其次，由經接種的大腸桿菌的培養溶液回收噬菌體以製備噬菌體庫溶液。

【0250】 此淘選回合1過程中，結合至人類CD137的抗體展示噬菌體係經濃縮，所以自淘選過程的次回合進行雙重回合選擇以回收結合至CD3ε及人類CD137二者的抗體展示噬菌體。

【0251】 具體地，於淘選回合2，磁性珠粒係藉由2%脫脂乳/TBS於室溫封阻60分鐘或更久，且以TBS清洗三次。噬菌體溶液添加至經封阻的磁性珠粒且於室溫培育60分鐘或更久後，回收上清。500 pmol生物素標記人類IgG1 Fc添加至新的磁性珠粒，且於室溫培育15分鐘後添加2%脫脂乳/TBS。於室溫封阻60分鐘或更久後，磁性珠粒以TBS清洗三次。回收的噬菌體溶液添加至經封阻的磁性珠粒且於室溫培育60分鐘或更久後，回收上清。500 pmol的生物素標記人類CD137-Fc添加至新的磁性珠粒且於室溫培育15分鐘後，添加2%脫脂乳/TBS。

【0252】 於室溫封阻60分鐘或更久之後，磁性珠粒以TBS清洗三次。回收的噬菌體溶液添加至經封阻的磁性珠粒後，於室溫培育60分鐘。珠粒以TBST(含有0.1% Tween的TBS；TBS可自Takara Bio Inc.取得)清洗三次後進一步以1 mL TBS清洗兩次。使用FabRICATOR(IdeS，IgG鉸鏈區的蛋白酶，GENOVIS)(命名為IdeS沖提運轉期)以回收抗體展示噬菌體。該過程中，添加10單位/μL的Fabricator 20μL與80μL的TBS緩衝液且珠粒於攝氏37度懸浮30分鐘，在那之後立即使用磁性底座分開該珠粒，以回收噬菌體溶液。

【0253】 此淘選過程第1循環中，結合至人類CD1378的抗體展示噬菌體係經濃縮，然後進行至第2循環淘選過程以在噬菌體感染及擴增前，回收也結合至CD3ε的抗體展示噬菌體。500 pmol生物素標記CD3ε添加至新的磁性珠粒且於室溫培育15分鐘後添加2%脫脂乳/TBS。於室溫封阻60分鐘或更久後，磁性珠粒以

TBS清洗三次。回收的噬菌體溶液、50μL的TBS及250μL的8% BSA封阻緩衝液添加至經封阻的磁性珠粒後，於攝氏37度培育30分鐘、於室溫培育60分鐘、於攝氏4度培育隔夜後，於室溫培育60分鐘以將抗體展示噬菌體自人類CD137轉移至CD3ε。

【0254】 珠粒以TBST(含有0.1% Tween 20的TBS；TBS可由Takara Bio Inc.取得)清洗三次後，進一步以1mL的TBS清洗二次。補充0.5mL的1mg/mL胰蛋白酶的珠粒於室溫懸浮15分鐘，在那之後立即使用磁性底座分開該珠粒，以回收噬菌體溶液。自經胰蛋白酶處理的噬菌體溶液回收的噬菌體添加至於對數生長期(OD600: 0.4-0.7)的大腸桿菌菌株ER2738。經由於37°C溫和旋轉培養該菌株1小時藉由噬菌體感染大腸桿菌菌株。經感染的大腸桿菌接種至225mm × 225mm盤。其次，由經接種的大腸桿菌的培養溶液回收噬菌體以回收噬菌體庫溶液。

【0255】 淘選的第三及第四回合中，以TBST增加清洗數達五次後以TBS清洗二次。雙重回合選擇的第2循環中，使用C3NP1-27抗原取代生物素標記CD3ε肽抗原，以及沖提係藉由DTT溶液進行以切斷CD3ε肽及生物素之間的雙硫鍵。明確地，以TBS清洗二次後，添加500μL的25mM DTT溶液且珠粒於室溫懸浮15分鐘，在那之後立即使用磁性底座分開該珠粒，以回收噬菌體溶液。添加0.5mL的1mg/mL胰蛋白酶至回收的噬菌體溶液且於室溫培育15分鐘。

【0256】 2.3. 具有所獲得之Fab域的IgG結合至人類CD137及食蟹猴CD137

於回合3及回合4由各DA及DX庫的各淘選輸出匯池選取96個純株且分析其等的VH基因序列。獲得29個VH序列且全部皆轉為IgG格式。各純株的VH序列係使用特異性地結合至噬粒載體(SEQ ID NO: 196及197)的引子藉由PCR擴增。經擴增的VH序列係整合至已具有人類IgG1 CH1-Fc區的動物表現質體。所製備的質體藉由參考例9的方法使用於動物細胞中表現。GLS3000使用作為輕鏈且其表現質體係如參考例12.2所示方式製備)。

【0257】 所製備的抗體進行ELISA以評估其對於人類CD137(SEQ ID NO: 195)及食蟹猴(亦稱為cyno)CD137(SEQ ID NO: 92)的結合能力。圖7顯示人類與食蟹猴CD137之間的胺基酸序列差異。其等之中有8的不同殘基。

【0258】 首先，20μg的鏈黴素被覆磁性珠粒MyOne-T1珠粒以包括0.5x block Ace、0.02% Tween及0.05% ProClin 300的封阻緩衝液清洗三次後，於室溫以封阻緩衝液封阻60分鐘或更久。以TBST清洗一次後，磁性珠粒施用至白圓底PS盤(Corning, 3605)之各孔且對磁性珠粒添加0.625pmol的生物素標記人類CD137-Fc、生物素標記cyno CD137-Fc或生物素標記人類Fc，且於室溫培育15分鐘或更久。以TBST清洗一次後，50 ng/μL經純化的IgG 之各者25μL添加至孔，且使盤於室溫靜置一小時以使各IgG結合至各孔中的生物素標記抗原。之後，以TBST清洗各孔。

【0259】 經以TBS稀釋的山羊抗-人類kappa輕鏈鹼性磷酸酶接合物(BETHYL, A80-115AP)添加至各孔。盤培育1小時。以TBST清洗後，各樣品轉移至96孔盤(Corning, 3792黑圓底PS盤)且對各孔添加APS-5(Lumigen)。2分鐘後偵測各孔的螢光。測量結果示於表3及圖8。其中，純株DXDU01_3#094、DXDU01_3#072 、 DADU01_3#018 、 DADU01_3#002 、 DXDU01_3#019 及DXDU01_3#051顯示結合至人類及cyno CD137二者。另一方面，DADU01_3#001顯示對人類CD137最強的結合，並未顯示對cynoCD137的結合。

【0260】 [表3]

	RLU			S/N 比率		
	Fc	人類 CD137-Fc	食蟹猴 CD137-Fc	人類 CD137-Fc/Fc	食蟹猴 CD137-Fc/Fc	SEQ ID NO
DADU01_3#031	2122	1633	1783	0.7696	0.8402	
DXDU01_3#053	1935	1469	1555	0.7592	0.8036	
DADU01_3#006	3202	1842	1886	0.5753	0.5890	
DXDU01_3#035	2005	1424	1484	0.7102	0.7401	
DXDU01_3#064	1826	1369	2150	0.7497	1.1774	
DADU01_3#036	1960	1491	2173	0.7607	1.1087	
DXDU01_3#043	2311	1533	1919	0.6633	0.8304	
DXDU01_3#094	2367	24241	19145	***10.2412***	***8.0883***	97
DADU01_3#003	2349	1596	1658	0.6794	0.7058	
DADU01_3#051	2276	1595	1534	0.7008	0.6740	
DADU01_4#089	3578	1970	1894	0.5506	0.5293	
DADU01_3#013	2770	1707	1710	0.6162	0.6173	
DXDU01_3#049	2586	1559	1578	0.6029	0.6102	
DXDU01_3#072	2148	14137	3348	***6.5815***	***1.5587***	98
DADU01_3#042	2570	1779	1600	0.6922	0.6226	
DADU01_3#020	1970	1640	1641	0.8325	0.8330	
DADU01_3#050	2246	1785	1689	0.7947	0.7520	
DADU01_3#018	1899	32770	6205	***17.2565***	***3.2675***	99
DADU01_3#002	1924	39141	10775	***20.3436***	***5.6003***	100
DADU01_3#058	1931	1461	1363	0.7566	0.7059	
DADU01_3#078	1689	1374	1326	0.8135	0.7851	
DADU01_3#044	1992	1647	1606	0.8268	0.8062	
DXDU01_3#019	3264	77805	5093	***23.8373***	***1.5604***	101
DADU01_3#001	1760	95262	1209	***54.1261***	0.6869	102
DADU01_3#071	3389	1927	1860	0.5686	0.5488	
DADU01_3#024	3131	1783	1763	0.5695	0.5631	
DXDU01_3#051	2914	38065	10870	***13.0628***	***3.7303***	103
DADU01_3#004	3053	1918	1802	0.6282	0.5902	
DADU01_3#045	1988	1662	1573	0.8360	0.7912	

【0261】 2.4. 具有所獲得之Fab域的IgG對人類CD3ε的結合

各抗體也進行ELISA以評估其對CD3ε的結合能力。

首先，MyOne-T1鏈黴素珠粒與0.625 pmol生物素標記CD3ε混合且於室溫培育10分鐘後，添加包括0.5x block Ace、0.2% Tween及0.05% ProClin 300/TBS的封阻緩衝液，以封阻磁性珠粒。混合溶液分注至96孔盤(Corning, 3792黑圓底PS盤)之各孔且於室溫培育60分鐘或更久。磁性珠粒以TBS清洗一次後，100ng經純化的IgG添加至各孔中的磁性珠粒，且使盤於室溫靜置一小時使各IgG結合至各孔中的生物素標記抗原。

【0262】 之後，以TBST清洗各孔。以TBS稀釋的山羊抗-人類kappa輕鏈鹼

性磷酸酶接合物(BETHYL, A80-115AP)添加至各孔。盤培育1小時。以TBST清洗後，對各孔添加APS-5(Lumigen)。2分鐘後偵測各孔的螢光。測量結果示於表4及圖9。所有純株顯示對CD3ε肽的明顯結合。該等數據證明結合至CD3ε、人類CD137及cyno CD137二者的Fab域可有效率地藉由設計的Dual Fab抗體噬菌體展示庫，以相較於參考例1進行的傳統噬菌體淘選過程具有較高點擊率的雙回合選擇過程所獲得。

【0263】 [表4]

	RLU		S/N 比率
	未被覆	CD3 肽	CD3肽/未被覆
DADU01_3#031	1505	142935	70.13
DXDU01_3#053	2082	148836	120.32
DADU01_3#006	3843	127079	107.42
DXDU01_3#035	3302	119726	103.03
DXDU01_3#064	3901	171861	147.52
DADU01_3#036	1562	159897	139.65
DXDU01_3#043	1147	168793	143.65
DXDU01_3#094	2473	164780	140.72
DADU01_3#003	3104	151738	115.65
DADU01_3#051	2489	135224	109.85
DADU01_4#089	1366	150267	127.67
DADU01_3#013	4688	136821	111.78
DXDU01_3#049	3205	141259	114.94
DXDU01_3#072	2168	176615	147.67
DADU01_3#042	4271	135203	108.86
DADU01_3#020	1454	197301	153.18
DADU01_3#050	1564	166509	132.05
DADU01_3#018	2293	181896	148.73
DADU01_3#002	2954	173838	156.47
DADU01_3#058	2618	136587	118.05
DADU01_3#078	1754	146653	124.49
DADU01_3#044	1091	196612	180.88
DXDU01_3#019	1919	190761	161.12
DADU01_3#001	1840	198383	146.41
DADU01_3#071	4237	144562	109.60
DADU01_3#024	3782	152018	129.38
DXDU01_3#051	1904	169289	144.69
DADU01_3#004	2310	166261	141.26
DADU01_3#045	1730	154444	127.85

【0264】 2.5. 具有所獲得之Fab域的IgG對CD3ε及人類CD137同時結合的評估

選擇六種抗體(DXDU01_3#094(#094)、DADU01_03#018(#018)、DADU01_3#002(#002)、DXDU01_3#019(#019)、DXDU01_3#051(#051)及DADU01_3#001(#001))進一步評估。描述於WO2005/035584A1的抗-人類CD137抗體(SEQ ID NO: 93用於重鏈及SEQ ID NO: 94用於輕鏈)使用作為對照抗體。經純化的抗體進行ELISA以評估其等對於CD3ε及人類CD137同時的結合能力。

首先，MyOne-T1鏈黴素珠粒與0.625 pmol生物素標記人類CD137-Fc或生物素標記人類Fc混合，且於室溫培育10分鐘後，添加2%脫脂乳/TBS以封阻磁性珠粒。混合溶液分注至96孔盤(Corning, 3792黑圓底PS盤)之各孔且於室溫培育60分鐘或更久。之後，磁性珠粒以TBS清洗一次，100ng經純化的IgG與62.5、6.25或0.625 pmol 的游離CD3ε肽或62.5 pmol的游離人類Fc或TBS混合後，添加至各孔中的磁性珠粒，且使盤於室溫靜置一小時使各IgG結合至各孔中的生物素標記抗原。之後，以TBST清洗各孔。以TBS稀釋的山羊抗-人類kappa輕鏈鹼性磷酸酶接合物(BETHYL, A80-115AP)添加至各孔。盤培育1小時。以TBST清洗後，對各孔添加APS-5(Lumigen)。2分鐘後偵測各孔的螢光。測量結果示於圖10及表5。

【0265】 [表5]

	生物素-人類 C137-Fc		
	游離 CD3e 62.5 pmol	游離 Fc 62.5 pmol	信號降低
B	182548	184279	0.94%
#001	15125	80997	81.33%
#002	9966	154791	93.56%
#018	9024	116919	92.28%
#019	12850	171835	92.52%
#051	10804	128260	91.58%
#094	9664	108313	91.08%

【0266】 於所有測試抗體中觀察到藉由游離CD3ε肽抑制結合至人類CD137-Fc但未見於對照抗-CD137抗體，以及藉由游離Fc域未見抑制。此結果顯示該等所獲得的抗體在CD3ε肽的存在下不能結合至人類CD137-Fc，換言之，該等抗體不同時結合至人類CD137及CD3ε。因此其證實可結合至二種不同抗原CD137及CD3ε，但不同時結合的Fab域成功地以設計的庫及噬菌體雙重回合選擇獲得。

【0267】 [參考例3] 以雙重回合替代選擇或四重回合選擇自Dual Fab庫獲得結合至CD3ε、人類CD137及食蟹猴CD137的Fab域

3.1. 改良獲得結合至食蟹猴CD137的Fab域的效率的淘選方案

結合至CD3ε、人類CD137及食蟹猴CD137的Fab域係成功地於參考例2獲得，但結合至食蟹猴CD137為較弱於結合至人類CD137。一個改良此之可考慮方案為以雙重回合選擇的替代淘選，其中於不同淘選回合使用不同抗原。藉由此方法，對CD3ε、人類CD137及食蟹猴CD137二者的選擇壓力可以較佳的抗原組合置於各回合中的Dual Fab庫，CD3ε與人類CD137、CD3ε與食蟹猴CD137或人類CD137與食蟹猴CD137。另一改良方案為三重或四重回合選擇，其中發明人可

於一次淘選回合中使用所有必要的抗原。

【0268】 參考例2的雙重回合選擇過程中，使用隔夜培育以使抗體展示噬菌體自第1抗原轉移至第2抗原。此方法運行良好，但當隊第1抗原的親和性較強於第2抗原時，轉移可能幾乎不會發生(例如當此雙庫中第1抗原為CD3ε時)。為了處理此狀況，也進行以鹼性溶液的結合噬菌體沖提。運轉名稱及各淘選過程的條件係描述於表6。

【0269】 結合至CD3ε、人類CD137及食蟹猴CD134的Fab域係從參考例1.1構築的Dual Fab庫鑑定。生物素標記CD3ε肽抗原(胺基酸序列: SEQ ID NO: 86)、經由雙硫鍵連接子經生物素標記的CD3ε肽抗原(稱為C3NP1-27；胺基酸序列: SEQ ID NO: 194)、融合至人類IgG1 Fc片段的生物素標記人類CD3ε及融合至人類IgG1 Fc片段的生物素標記人類CD3δ的異源二倍體(命名為CD3ed-Fc，胺基酸序列: SEQ ID: 95, 96)、融合至人類IgG1 Fc片段的生物素標記人類CD137(命名為人類CD137-Fc)、融合至人類IgG1 Fc片段的生物素標記食蟹猴CD137(命名為cyno CD137-Fc)及生物素標記食蟹猴CD137(命名為cyno CD137-Fc)使用作為抗原。

【0270】 [表6]

運轉期名稱	回合	淘選	循環1		循環2		循環3		循環4	
			抗原	沖提	抗原	沖提	抗原	沖提	抗原	沖提
DU05	回合1	雙重	人類 CD137-Fc	IdeS	C3NP1-27	DTT				
	回合2	雙重	食蟹猴 CD137-Fc	IdeS	C3NP1-27	DTT				
	回合3	雙重	人類 CD137-Fc	IdeS	C3NP1-27	DTT				
	回合4	雙重	食蟹猴 CD137-Fc	IdeS	C3NP1-27	DTT				
MP09	回合1	雙重	食蟹猴 CD137-Fc	IdeS	CD3ed-Fc	IdeS				
	回合2	雙重	人類 CD137-Fc	IdeS	食蟹猴 CD137	胰蛋白酶				
	回合3	四重	人類 CD137-Fc	IdeS	CD3ed-Fc	IdeS	食蟹猴 CD137-Fc	IdeS	CD3ed-Fc	IdeS
	回合4	四重	食蟹猴 CD137-Fc	IdeS	CD3ed-Fc	IdeS	人類 CD137-Fc	IdeS	CD3ed-Fc	IdeS
MP11	回合1	雙重	食蟹猴 CD137-Fc	IdeS	CD3ed-Fc	IdeS				
	回合2	四重	人類 CD137-Fc	IdeS	CD3ed-Fc	IdeS	食蟹猴 CD137-Fc	IdeS	CD3ed-Fc	IdeS
	回合3	四重	食蟹猴 CD137-Fc	IdeS	CD3ed-Fc	IdeS	人類 CD137-Fc	IdeS	CD3ed-Fc	IdeS
DS01	回合1	單一	人類 CD137-Fc	胰蛋白酶						
	回合2	雙重	CD3 肽	TEA	人類 CD137-Fc	胰蛋白酶				
	回合3	雙重	CD3 肽	TEA	人類 CD137-Fc	胰蛋白酶				
	回合4	雙重	CD3 肽	TEA	食蟹猴 CD137-Fc	胰蛋白酶				
	回合5	雙重	CD3 肽	TEA	人類 CD137-Fc	胰蛋白酶				
	回合6	雙重	CD3 肽	TEA	食蟹猴 CD137-Fc	胰蛋白酶				

【0271】 3.2. 以雙重回合選擇及替代淘選獲得結合至CD3ε、人類CD137及食蟹猴CD137的Fab域

以雙重回合選擇和替代淘選進行命名為運轉期DU05的淘選條件以獲得結

合至CD3ε、人類CD137及食蟹猴CD137的Fab域，如表6所示。

人類CD137-Fc係使用於奇數回合及食蟹猴CD137-Fc係使用於偶數回合。雙重回合選擇的詳細淘選條件係如參考例2所示。於DU05運轉其中，係自淘選的第2回合進行雙重回合選擇。

【0272】 3.3. 以鹼性沖提雙重回合選擇及替代淘選獲得結合至CD3ε、人類CD137及食蟹猴CD137的Fab域

以示於參考例2的不同抗原的前述雙重回合中，由於IdeS或DTT裂解抗原與生物素之間的連接子區，抗體展示噬菌體係經沖提為與其第1抗原複合，所以第1抗原也帶入雙重回合選擇的第2循環且與第2抗原競爭。為了壓制此帶入的第1抗原，也進行以鹼性緩衝液沖提，其誘發結合抗體自抗原的解離，且於傳統噬菌體淘選中為非常普遍的方法(命名為運轉期DS01)。

淘選回合1的詳細淘選過程係與參考例2所示者相同。回合1中，進行以生物素標記CD137-Fc的傳統淘選。

淘選回合1中，結合至人類CD137的Fab展示噬菌體係累積所以自淘選回合2進行鹼沖提雙重回合選擇以獲得結合至CD3ε、人類CD137及食蟹猴CD137的Fab域。

【0273】 具體地，於淘選回合2，磁性珠粒以2%脫脂乳/TBS於室溫封阻60分鐘或更久且以TBS清洗三次。噬菌體溶液添加至經封阻的磁性珠粒且於室溫培育60分鐘或更久，回收上清。500 pmol的生物素標記人類IgG1 Fc添加至新的磁性珠粒且於室溫培育15分鐘後，添加2%脫脂乳/TBS。於室溫封阻60分鐘或更久後，磁性珠粒以TBS清洗三次。回收的噬菌體溶液添加至經封阻的磁性珠粒且於室溫培育60分鐘或更久後，回收上清。500 pmol的生物素標記CD3ε肽添加至新的磁性珠粒且於室溫培育15分鐘後，添加2%脫脂乳/TBS。

【0274】 於室溫封阻60分鐘或更久後，磁性珠粒以TBS清洗三次。回收的

噬菌體溶液添加至經封阻的磁性珠粒且於室溫培育60分鐘。珠粒以TBST(含0.1% Tween 20的TBS；TBS可由Takara Bio Inc.取得)清洗三次後，進一步以1mL的TBS清洗二次。使用0.1M三乙基胺(TEA, Wako 202-02646)回收抗體展示噬菌體。該過程中，添加 500μL的0.1M TEA且珠粒於室溫懸浮10分鐘，在那之後立即使用磁性底座分開該珠粒，以回收噬菌體溶液。添加100μL的1M Tris-HCl (pH 7.5)以中和噬菌體溶液15分鐘。

【0275】 淘選過程的第1循環中，結合至CD3ε的抗體展示噬菌體係經濃縮後移至第2循環淘選過程，以於噬菌體感染及擴增之前回收也結合至CD137的抗體展示噬菌體。500 pmol的生物素標記人類CD137-Fc添加至新的磁性珠粒且於室溫培育15分鐘後，添加2%脫脂乳/TBS。於室溫封阻60分鐘或更久後，磁性珠粒以TBS清洗三次。回收的噬菌體溶液、50μL的TBS及250μL的8% BSA封阻緩衝液係添加至經封阻的磁性珠粒後，於室溫培育60分鐘。

【0276】 珠粒以TBST(含0.1% Tween 20的TBS；TBS可由Takara Bio Inc.取得)清洗三次後，進一步以1mL的TBS清洗二次。補充0.5 mL的1mg/mL胰蛋白酶的珠粒於室溫懸浮15分鐘，在那之後立即使用磁性底座分開該珠粒，以回收噬菌體溶液。自胰蛋白酶處理的噬菌體溶液回收的噬菌體添加至對數生長期(OD600: 0.4-0.7)的大腸桿菌菌株ER2738。經由於37°C溫和旋轉培養該菌株1小時藉由噬菌體感染大腸桿菌。經感染的大腸桿菌接種至225mm × 225mm盤。其次，自經接種的大腸桿菌的培養溶液回收噬菌體，以回收噬菌體庫溶液。

【0277】 淘選第四及第6回合中的雙重回合選擇中的第2循環，使用生物素標記食蟹猴CD137-Fc取代生物素標記人類CD137-Fc。於淘選回合4至回合6，250 pmol的生物素標記人類或食蟹猴CD137-Fc係使用於雙重回合選擇的第2循環。

【0278】 3.4. 以四重回合選擇獲得結合至CD3ε、人類CD137及食蟹猴CD137的Fab域

前述雙重回合選擇中，僅有二種不同抗原可使用於淘選一回合。為了打破此限制，也進行四重回合選擇(命名為運轉期MP09及MP11，示於表6)。

MP09及MP11二者的淘選回合1及MP09的淘選回合2，進行雙重回合選擇。

【0279】 具體地，磁性珠粒藉由2%脫脂乳/TBS於室溫封阻60分鐘或更久且以TBS清洗三次。噬菌體溶液添加至經封阻的磁性珠粒且於室溫培育60分鐘或更久後，回收上清。500 pmol的生物素標記人類IgG1 Fc添加至新的磁性珠粒且於室溫培育15分鐘後，添加2%脫脂乳/TBS。於室溫封阻60分鐘或更久後，磁性珠粒以TBS清洗三次。回收的噬菌體溶液添加至經封阻的磁性珠粒且於室溫培育60分鐘或更久後，回收上清。268 pmol的生物素標記食蟹猴CD137-Fc添加至新的磁性珠粒且於室溫培育15分鐘後，添加2%脫脂乳/TBS。

【0280】 於室溫封阻60分鐘或更久後，磁性珠粒以TBS清洗三次。回收的噬菌體溶液添加至經封阻的磁性珠粒後，於室溫培育60分鐘或更久。珠粒以TBST(含0.1% Tween 20的TBS；TBS可由Takara Bio Inc.取得)清洗三次後，進一步以1mL的TBS清洗二次。使用FabRICATOR(IdeS, IgG鉸鏈區的蛋白酶, GENOVIS)(命名為IdeS沖提運轉期)回收抗體展示噬菌體。該過程中，添加10單位/μL Fabricator 20μL與80μLTBS，且珠粒於攝氏37度懸浮30分鐘，在那之後立即使用磁性底座分開該珠粒，以回收噬菌體溶液。

【0281】 此淘選過程的第1循環中，結合至食蟹猴CD137的抗體展示噬菌體係經濃縮後移至第2循環淘選過程，以於噬菌體感染及擴增之前回收也結合至CD3ε的抗體展示噬菌體。為了自噬菌體溶液移除IdeS蛋白酶，添加40μL的助手噬菌體M13KO7 (1.2E+13pfu)及200μL的10% PEG-2.5M NaCl，且因此沉澱之噬菌體匯池係以TBS稀釋以獲得噬菌體庫溶液。500 pmol的生物素標記CD3ed-Fc添加至新的磁性珠粒且於室溫培育15分鐘後，添加2%脫脂乳/TBS。於室溫封阻60分鐘或更久後，磁性珠粒以TBS清洗三次。回收的噬菌體溶液及500μL的8%

BSA封阻緩衝液添加至經封阻的磁性珠粒後，於室溫培育60分鐘。

【0282】 珠粒以TBST(含0.1% Tween 20的TBS；TBS可由Takara Bio Inc.取得)清洗三次後，進一步以1mL的TBS清洗二次。添加10單位/μL Fabricator 20μL與80μLTBS且珠粒於攝氏37度懸浮30分鐘，在那之後立即使用磁性底座分開該珠粒，以回收噬菌體溶液。添加5μL的100 mg/mL胰蛋白酶及395μL的TBS且於室溫培育15分鐘。自經胰蛋白酶處理的噬菌體溶液回收的噬菌體添加至於對數生長期(OD600: 0.4-0.7)的大腸桿菌菌株ER2738。經由於37°C溫和旋轉培養該菌株1小時藉由噬菌體感染大腸桿菌。經感染的大腸桿菌接種至225mm × 225mm盤。其次，自經接種的大腸桿菌的培養溶液回收噬菌體以回收噬菌體庫溶液。

【0283】 於MP09的淘選運轉期的第二回合中，生物素標記人類CD137-Fc使用作為第1循環淘選抗原及具有藉由胰蛋白酶沖提的生物素標記食蟹猴CD137使用作為第2循環淘選抗原，如表6所示。

【0284】 MP09運轉期的淘選回合3及回合4，以及MP11運轉期的淘選回合2及回合3中進行四重淘選。

【0285】 MP09的淘選回合3及MP11運轉期的淘選回合2中，磁性珠粒係藉由2%脫脂乳/TBS於室溫封阻60分鐘或更久且以TBS清洗三次。噬菌體溶液添加至經封阻的磁性珠粒且於室溫培育60分鐘或更久後，回收上清。500 pmol的生物素標記人類IgG1 Fc添加至新的磁性珠粒且於室溫培育15分鐘後，添加2%脫脂乳/TBS。於室溫封阻60分鐘或更久後，磁性珠粒以TBS清洗三次。回收的噬菌體溶液添加至經封阻的磁性珠粒且於室溫培育60分鐘或更久後，回收上清。250 pmol的生物素標記人類CD137-Fc添加至新的磁性珠粒且於室溫培育15分鐘後，添加2%脫脂乳/TBS。

【0286】 於室溫封阻60分鐘或更久後，磁性珠粒以TBS清洗三次。回收的噬菌體溶液添加至經封阻的磁性珠粒後，於室溫培育60分鐘。珠粒以TBST(含

0.1% Tween 20的TBS；TBS可由Takara Bio Inc.取得)清洗三次後，進一步以1mL的TBS清洗二次。使用FabRICATOR(IdeS, IgG鉸鏈區的蛋白酶, GENOVIS)(命名為IdeS沖提運轉期)回收抗體展示噬菌體。該過程中，添加10單位/μL Fabricator 20μL與80μLTBS，且珠粒於攝氏37度懸浮30分鐘，在那之後立即使用磁性底座分開該珠粒，以回收噬菌體溶液。

【0287】 為了自噬菌體溶液移除IdeS蛋白酶，添加40μL的助手噬菌體M13KO7 (1.2E+13pfu)及200μL的10% PEG-2.5M NaCl，且因此沉澱之噬菌體匯池係以TBS稀釋以獲得噬菌體庫溶液。250 pmol的生物素標記CD3ed-Fc添加至新的磁性珠粒且於室溫培育15分鐘後，添加2%脫脂乳/TBS。於室溫封阻60分鐘或更久後，磁性珠粒以TBS清洗三次。回收的噬菌體溶液及500μL的8% BSA封阻緩衝液添加至經封阻的磁性珠粒後，於室溫培育60分鐘。珠粒以TBST(含0.1% Tween 20的TBS；TBS可由Takara Bio Inc.取得)清洗三次後，進一步以1mL的TBS清洗二次。添加10單位/μL Fabricator 20μL與80μLTBS且珠粒於攝氏37度懸浮30分鐘，在那之後立即使用磁性底座分開該珠粒，以回收噬菌體溶液。

【0288】 四重回合選擇的第3循環中，添加40μL的助手噬菌體M13KO7 (1.2E+13pfu)及200μL的10% PEG-2.5M NaCl，且因此沉澱之噬菌體匯池係以TBS稀釋以獲得噬菌體庫溶液。250 pmol的生物素標記食蟹猴CD137-Fc添加至新的磁性珠粒且於室溫培育15分鐘後，添加2%脫脂乳/TBS。於室溫封阻60分鐘或更久後，磁性珠粒以TBS清洗三次。回收的噬菌體溶液及500μL的8% BSA封阻緩衝液添加至經封阻的磁性珠粒後，於室溫培育60分鐘。珠粒以TBST(含0.1% Tween 20的TBS；TBS可由Takara Bio Inc.取得)清洗三次後，進一步以1mL的TBS清洗二次。添加10單位/μL Fabricator 20μL與80μLTBS且珠粒於攝氏37度懸浮30分鐘，在那之後立即使用磁性底座分開該珠粒，以回收噬菌體溶液。

【0289】 四重回合選擇的第4循環中，添加40μL的助手噬菌體M13KO7

(1.2E+13pfu)及200μL的10% PEG-2.5M NaCl，且因此沉澱之噬菌體匯池係以TBS稀釋以獲得噬菌體庫溶液。500 pmol的生物素標記CD3ed-Fc添加至新的磁性珠粒且於室溫培育15分鐘後，添加2%脫脂乳/TBS。於室溫封阻60分鐘或更久後，磁性珠粒以TBS清洗三次。回收的噬菌體溶液及500μL的8% BSA封阻緩衝液添加至經封阻的磁性珠粒後，於室溫培育60分鐘。

【0290】 珠粒以TBST(含0.1% Tween 20的TBS；TBS可由Takara Bio Inc.取得)清洗三次後，進一步以1mL的TBS清洗二次。添加10單位/μL Fabricator 20μL與80μLTBS且珠粒於攝氏37度懸浮30分鐘，在那之後立即使用磁性底座分開該珠粒，以回收噬菌體溶液。添加5μL的100 mg/mL胰蛋白酶及395μL的TBS且於室溫培育15分鐘。由經胰蛋白酶處理的噬菌體溶液回收的噬菌體添加至於對數生長期(OD600: 0.4-0.7)的大腸桿菌菌株ER2738。經由於37°C溫和旋轉培養該菌株1小時藉由噬菌體感染大腸桿菌。經感染的大腸桿菌接種至225mm × 225mm盤。其次，由經接種的大腸桿菌的培養溶液回收噬菌體以回收噬菌體庫溶液。

【0291】 MP09的淘選回合4及MP11運轉期的淘選回合3中，生物素標記人類CD137-Fc使用作為第1循環抗原及生物素標記食蟹猴CD137-Fc使用作為第3循環抗原。

【0292】 3.5. 藉由噬菌體展示之Fab域對人類及食蟹猴CD137的結合(噬菌體ELISA)

Fab展示噬菌體溶液係經由參考例3.2、3.3及3.4的淘選過程製備。首先，20μg的鏈黴素被覆磁性珠粒MyOne-T1珠粒以包括0.4% block Ace、1%BSA、0.02% Tween及0.05% ProClin 300的封阻緩衝液清洗三次後，於室溫以此封阻緩衝液封阻60分鐘或更久。以TBST清洗一次後，磁性珠粒施用至96孔盤(Corning, 3792黑圓底PS盤)的各孔且對磁性珠粒添加0.625pmol的生物素標記人類CD137-Fc、生物素標記食蟹猴CD137-Fc或生物素標記CD3ε肽，且於室溫培育15分鐘或更久。

【0293】 以TBST清洗一次後，250nL的Fab展示噬菌體溶液之各者與24.75μL的TBS添加至孔，且使盤於室溫靜置一小時使各Fab結合至各孔中的生物素標記抗原。之後各孔以TBST清洗。對各孔添加以TBS稀釋的抗-M13(p8)Fab-HRP。盤培育10分鐘。以TBST清洗後，對各孔添加LumiPhos-HRP(Lumigen)。2分鐘後偵測各孔的螢光。結果示於圖11。

【0294】 於各淘選輸出噬菌體溶液中，觀察到對各抗原的結合，人類CD137、食蟹猴CD137及CD3ε。此結果顯示以鹼沖提的雙重回合選擇如前述以IdeS方法的雙重回合選擇同樣運作良好，以及具有替代淘選的雙重回合選擇也運作良好而獲得結合至三種不同抗原的Fab域。儘管該等方法收集結合至三種不同抗原的Fab域，但對食蟹猴CD137的結合相較於對人類CD137的結合為弱。另一方面，MP09及MP11運轉期中，於相同回合點觀察到對CD3ε、人類CD137及食蟹猴CD137的結合，且其等對食蟹猴CD137的結合係較高於其他運轉期。此結果展現四重回合選擇可更有效率地濃縮結合至三種不同抗原的Fab域。

【0295】 3.6. 具有所獲得之Fab域的IgG的製備

由各淘選輸出匯池選取96個純株且分析其等之VH基因序列。選擇32個純株因為其等之VH序列於所有經分析的匯池中出現多過二次。其等之VH基因藉由PCR擴增且轉為IgG格式。各純株的VH序列使用特異性地結合至庫中的H鏈的引子(SEQ ID NO: 196及197)藉由PCR擴增。經擴增的VH片段整合至已具有人類IgG1 CH1-Fc區的動物表現質體。所製備的質體藉由參考例9的方法使用於動物細胞中表現。該等樣品稱為經轉為IgG的純株。GLS3000使用作為輕鏈。

【0296】 各淘選輸出匯池的VH基因也轉為IgG格式。噬粒載體庫由各淘選輸出匯池DU05、DS01及MP11的大腸桿菌製備，且以NheI及SalI限制酵素分解以直接抽出VH基因。所抽出的VH片段整合至已具有人類IgG1 CH1-Fc區的動物表現質體。所製備的質體導入至大腸桿菌且由各淘選輸出匯池選取192或288個菌

落以及分析其等之VH序列。MP09及11運轉期中，儘可能選取具有不同VH序列的純株。由各大腸桿菌菌落所製備的質體藉由參考例9的方法使用於動物細胞中表現。該等樣品稱為經轉為IgG的團塊(bulk)。GLS3000使用作為輕鏈。

【0297】 3.7. 評價所獲得的抗體針對其CD3ε、人類CD137及食蟹猴CD137的結合活性

所製備之經轉為IgG抗體的團塊係進行ELISA以評估其對於CD3ε、人類CD137及食蟹猴CD137的結合能力。

【0298】 首先，經鏈黴素被覆微孔盤(384孔，Greiner)以20μL的含有生物素標記CD3ε肽、生物素標記人類CD137-Fc或生物素標記食蟹猴CD137的TBS於室溫被覆1或多個小時。藉由以TBST清洗盤的各孔以移除未結合至盤的生物素標記抗原後，孔以20μL的封阻緩衝液(2%脫脂乳/TBS)封阻一或多個小時。自各孔移除封阻緩衝液。以2%脫脂乳/TBS稀釋二倍之含有IgG的哺乳動物細胞上清各者20μL添加至孔，且使盤於室溫靜置一小時以使各IgG結合至各孔中的生物素標記抗原。之後，以TBST清洗各孔。以TBS稀釋的山羊抗-人類kappa輕鏈鹼性磷酸酶接合物(BETHYL, A80-115AP)添加至各孔。盤培育1小時。以TBST清洗後，各孔中的溶液之經添加Blue Phos Microwell Phosphatase Substrate System (KPL)的發色反應，係藉由添加Blue Phos Stop Solution (KPL)終止。然後，藉由測量於615 nm的吸收度測量顏色發展。測量結果示於圖12。

【0299】 顯示結合至CD3ε、人類CD137及食蟹猴CD137二者的許多IgG純株係自各淘選過程獲得，所以其證實具有替代淘選的雙重回合選擇、以鹼沖提的雙重選擇及四重回合選擇二者皆如預期的運作良好。尤其是，相較於其他二個淘選條件，來自結合至人類CD137的四重回合選擇的所有純株之多數顯示相等程度之對食蟹猴CD137的結合。該等淘選條件中，可能獲得較少顯示結合至CD3ε及人類CD137二者的純株，其主因在於彼此具有相同VH序列而於此運轉期中盡

可能地有目的地不被選取。選擇顯示對各蛋白質顯示較佳結合且彼此具有不同V序列的54個純株且進一步評估。

【0300】 3.8. 評價經純化IgG抗體針對其CD3ε、人類CD137及食蟹猴CD137的結合活性

評估經純化的IgG抗體的結合能力。使用參考例3.5中的32個經轉為IgG的純株以及參考例3.6中所選擇之經轉為IgG的54個團塊。

【0301】 首先，20μg的鏈黴素被覆磁性珠粒MyOne-T1珠粒以包括0.4% block Ace、1% BSA、0.02% Tween及0.05% ProClin 300的封阻緩衝液清洗三次後，於室溫以此封阻緩衝液封阻60分鐘或更久。以TBST清洗一次後，磁性珠粒施用至白圓底PS盤(Corning, 3605)之各孔且對磁性珠粒添加0.625pmol的生物素標記CD3ε、2.5 pmol的人類CD137-Fc、2.5 pmol的生物素標記食蟹猴CD137-Fc或0.625pmol的生物素標記人類Fc，且於室溫培育15分鐘或更久。

【0302】 以TBST清洗一次後，50 ng/μL經純化的IgG 之各者25μL添加至孔，且使盤於室溫靜置一小時以使各IgG結合至各孔中的生物素標記抗原。之後各孔以TBST清洗。以TBS稀釋的山羊抗-人類kappa輕鏈鹼性磷酸酶接合物(BETHYL, A80-115AP)添加至各孔。盤培育1小時。以TBST清洗後，各樣品轉移至96孔盤(Corning, 3792黑圓底PS盤)且對各孔添加APS-5 (Lumigen)。2分鐘後偵測各孔的螢光。測量結果示於圖13。許多純株顯示相同程度對人類及食蟹猴CD137二者的結合，且亦顯示對CD3ε的結合。

【0303】 3.9. 評估具有所獲得Fab域IgG對CD3ε及人類CD137的同時結合

選擇參考例3.7中顯示對CD3ε、人類CD137及食蟹猴CD137明顯結合的37個抗體進一步評估。也評估參考例2.3中所獲得的7個抗體(該7個純株如同表7重新命名)。經純化的抗體進行ELISA以評估其等同時對CD3ε及人類CD137的結合能力。參考例2.5中所述之命名為B的抗-人類CD137抗體使用作為對照抗體。

【0304】 [表7]

舊名稱	新名稱
DXDU01_3_#094	dBBDu121
DXDU01_3_#072	dBBDu122
DADU01_3_#018	dBBDu123
DADU01_3_#002	dBBDu124
DXDU01_3_#019	dBBDu125
DADU01_3_#001	dBBDu126
DXDU01_3_#051	dBBDu127

【0305】 首先，20μg的鏈黴素被覆磁性珠粒MyOne-T1珠粒以包括0.4% block Ace、1%BSA、0.02% Tween及0.05% ProClin 300的封阻緩衝液清洗三次後，於室溫以此封阻緩衝液封阻60分鐘或更久。以TBST清洗一次後，磁性珠粒施用至黑圓底PS盤(Corning, 3792)之各孔。添加1.25 pmol的生物素標記人類CD137-Fc且於室溫培育10分鐘。之後，磁性珠粒以TBS清洗一次。1250 ng的經純化的IgG與125、12.5或1.25 pmol的游離CD3ε肽或TBS混合後，添加至各孔中的磁性珠粒，且使盤於室溫靜置一小時以使各IgG結合至各孔中的生物素標記抗原。之後各孔以TBST清洗。以TBS稀釋的山羊抗-人類kappa輕鏈鹼性磷酸酶接合物(BETHYL, A80-115AP)添加至各孔。盤培育10分鐘。以TBST清洗後，對各孔添加APS-5 (Lumigen)。2分鐘後偵測各孔的螢光。測量結果示於圖14及表8。

【0306】 [表8]

	生物素-人類 CD137-Fc		
	游離 CD3e (pmol/孔)		信號降低
	0	125	
dBBDu133	16927	2373	85.98%
dBBDu139	9436	1924	79.61%
dBBDu140	19960	1923	90.37%

dBBDu142	13665	1786	86.93%
dBBDu149	3915	1962	49.89%
dBBDu165	75488	1954	97.41%
dBBDu167	25731	1937	92.47%
dBBDu171	7394	1819	75.40%
dBBDu172	7589	2241	70.47%
dBBDu173	6544	2041	68.81%
dBBDu178	6777	2126	68.63%
dBBDu179	61009	2625	95.70%
dBBDu181	3241	1990	38.60%
dBBDu182	9081	2178	76.02%
dBBDu183	34000	2369	93.03%
dBBDu184	16701	1888	88.70%
dBBDu186	34783	2497	92.82%
dBBDu189	27434	2193	92.01%
dBBDu191	12863	2230	82.66%
dBBDu193	18193	2278	87.48%
dBBDu195	9715	2361	75.70%
dBBDu196	33099	2222	93.29%
dBBDu197	54367	2111	96.12%
dBBDu199	40880	2372	94.20%
dBBDu202	12055	1930	83.99%
dBBDu204	43663	1879	95.70%
dBBDu205	45191	2194	95.15%
dBBDu206	6967	1697	75.64%
dBBDu207	7466	1844	75.30%
dBBDu209	12051	1779	85.24%
dBBDu211	7284	1732	76.22%

dBBDu214	12852	1701	86.76%
dBBDu217	19093	2416	87.35%
dBBDu222	7188	3236	54.98%
dBBDu166	3437	1844	46.35%
dBBDu174	4804	1884	60.78%
dBBDu175	3257	1755	46.12%
dBBDu121	3609	1826	49.40%
dBBDu122	2698	1882	30.24%
dBBDu123	2746	1840	32.99%
dBBDu124	6621	2116	68.04%
dBBDu125	61364	2058	96.65%
dBBDu126	116289	2613	97.75%
dBBDu127	3232	2198	31.99%
Du115/DUL008	86183	2620	96.96%
Du103/DUL050	5273	5297	-0.46%
B	99359	98110	1.26%
空白	1860	1850	0.54%

【0307】 除了對照抗-CD137抗體B以外，所有經測試的純株之對人類CD137的結合都受到過量的游離CD3ε所抑制，其展現所獲得之具有Dual Fab庫的抗體不同時結合至CD3ε及人類CD137。

【0308】 3.10. 具有所獲得之Fab域的IgG的人類CD137抗原決定基對CD3ε及人類CD137的評估

選擇參考例3.8中的21個抗體進一步評估(表10)。經純化的抗體進行ELISA以評估其人類CD137的結合抗原決定基。

為了分析抗原決定基，經片段化人類CD137以及域藉由稱為CRD參考物的Cys-Cys所形成的結構分割抗體的Fc區的融合蛋白(表9)係描述於

WO2015/156268。經片段化人類CD137-Fc融合蛋白包括示於表9的胺基酸序列，由編碼全長人類CD137-Fc融合蛋白的多核苷酸(SEQ ID NO: 90)藉由PCR得到個別基因片段，藉由所屬技術領域習知的方法併入質體載體用以於動物細胞表現。經片段化人類CD137-Fc融合蛋白藉由如WO2015/156268揭示的方法純化成抗體。

【0309】 [表9]

經片段化人類CD 137的名稱	經片段化人類 CD137的胺基酸序列	包括的域	SEQ ID NO
全長	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQ	CRD1,2,3,4	90
CRD1	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQIC	CRD1	147
CRD2	SPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAEC	CRD2	148
CRD3	DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGC	CRD3	149
CRD4	KDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQ	CRD4	150
CRD1-3	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGC	CRD1,2,3	151
CRD1-2	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAEC	CRD1,2	152
CRD2-4	SPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQ	CRD2,3,4	153
CRD2-3	SPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGC	CRD2,3	154
CRD3-4	DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQ	CRD3,4	155

【0310】 首先，20μg的鏈黴素被覆磁性珠粒MyOne-T1珠粒以包括0.4% block Ace、1% BSA、0.02% Tween及0.05% ProClin 300的封阻緩衝液清洗三次後，於室溫以封阻緩衝液封阻60分鐘或更久。以TBST清洗一次後，磁性珠粒施用至黑圓底PS盤(Corning, 3792)之各孔。添加1.25 pmol的生物素標記人類CD137-Fc、人類CD137域1-Fc、人類CD137域1/2-Fc、人類CD137域2/3-Fc、人類CD137域2/3/4-Fc、人類CD137域3/4-Fc及人類Fc且於室溫培育10分鐘。之後，磁性珠粒以TBS清洗一次。1250 ng的經純化的IgG添加至各孔中的磁性珠粒，且使盤於室溫靜置一小時以使各IgG結合至各孔中的生物素標記抗原。之後各孔以TBST清洗。以TBS稀釋的山羊抗-人類kappa輕鏈鹼性磷酸酶接合物(BETHYL, A80-115AP)添加至各孔。盤培育10分鐘。以TBST清洗後，對各孔添加APS-5 (Lumigen)。2分鐘後偵測各孔的螢光。測量結果示於圖15。

【0311】 各純株辨識人類CD137的不同抗原決定基域。抗體辨識僅有域1/2(例如，dBBDu183、dBBDu205)、域1/2及域2/3二者(例如，dBBDu193、dBBDu202、dBBDu222)、域2/3、2/3/4及3/4二者(例如，dBBDu139、dBBDu217)、廣的人類CD137域(dBBDu174)且其不結合至各分開的人類CD137域(例如，dBBDu126)。此結果展現出以此經設計的庫及雙重回合選擇過程可獲得針對多個人類CD137抗原決定基的許多雙結合抗體。

【0312】 dBBDu126的結合CD-137的抗原決定基區無法由此ELISA所決定，但是可猜測其將辨識其中人類及食蟹猴具有不同殘基的位置，因為dBBDu126不能如參考例2.3所述地與食蟹猴CD137交叉反應。如圖7所示，人類於食蟹猴之間有8個不同位置，且藉由對食蟹猴CD137/人類CD137/融合分子的結合測試及結合複合物的晶體結構分析，75E(人類中75G)係經鑑定為干擾dBBDu126結合至食蟹猴CD137的狀況。晶體結構也解明dBBDu126主要辨識人類CD137的CDR3區。

【0313】 [表10]

純株名稱	SEQ ID NO
dBBDu126	102
dBBDu183	104
dBBDu179	105
dBBDu196	106
dBBDu197	107
dBBDu199	108
dBBDu204	109
dBBDu205	110
dBBDu193	111
dBBDu217	112
dBBDu139	113
dBBDu189	114
dBBDu167	115
dBBDu173	116
dBBDu174	117
dBBDu181	118
dBBDu186	119
dBBDu191	120
dBBDu202	121
dBBDu222	122
dBBDu125	101

【0314】 [參考例4] 以設計的輕鏈庫自Dual Fab庫之結合至CD3ε及人類CD137的抗體域的親和性成熟

4.1. 具有所獲得之重鏈的輕鏈庫的構築

參考例3中獲得結合至CD3ε及人類CD137二者的許多抗體，但其對於人類CD137的親和性仍弱，因此進行改良其等親和性的親和性成熟。

【0315】 13個VH序列，dBBDu_179、183、196、197、199、204、205、167、186、189、191、193及222選擇用於親和性成熟。其等之中，dBBDu_179、

183、196、197、199、204及205具有相同的CDR3序列及不同的CDR1或2序列，因此該等7個噬粒係經混合以製造輕鏈Fab庫。dBBDu_191、193及222三個噬粒也經混合以製造輕鏈Fab庫，然而其等具有不同的CDR3序列。輕鏈庫的清單示於表11。

【0316】 [表11]

庫名稱	VH
庫 2	dBBDu_179,183,196,197,199,204,205
庫 3	dBBDu_167
庫 4	dBBDu_186
庫 5	dBBDu_189
庫 6	dBBDu_191,193,222

【0317】 描述於參考例12之經合成的抗體VL庫片段，係以SEQ ID NO: 198及199的引子藉由PCR方法擴增。經擴增的VL片段藉由SfiI及KpnI限制酵素分解且導入至已具有各13個VH片段的噬粒載體。用於噬菌體展示之所構築的噬粒係藉由電穿孔轉移至大腸桿菌，以製備帶有抗體庫片段的大腸桿菌。

【0318】 展示Fab域的噬菌體庫係自帶有所構築的噬粒藉由感染編碼FkpA伴侶蛋白基因的助手噬菌體M13KO7TC/FkpA後，於0.002%阿拉伯糖的存在下於攝氏25度隔夜培育而製造。M13KO7TC為助手噬菌體，其於助手噬菌體的pIII蛋白質的N2域及CT域之間具有胰蛋白酶裂解序列的插入(參照日本專利申請公開號2002-514413)。插入基因至M13KO7TC基因的導入已揭示於他處(參照WO2015/046554)。

【0319】 4.2. 以雙重回合選擇獲得結合至CD3ε及人類CD137的Fab域

結合至CD3ε、人類CD137及食蟹猴CD137的Fab域係鑑定自參考例4.1所構築的Dual Fab庫。經由雙硫鍵連接子經生物素標記的CD3ε肽抗原(C3NP1-27)、融合至人類IgG1 Fc片段的生物素標記人類CD137(命名為人類CD137-Fc)及融合至人類

IgG1 Fc片段的生物素標記食蟹猴CD137(命名為食蟹猴CD137-Fc)使用作為抗原。

【0320】 噬菌體由帶有用於噬菌體展示所構築的噬粒的大腸桿菌製造。對已製造噬菌體的大腸桿菌的培養溶液添加2.5M NaCl/10% PEG，因此所沉澱的噬菌體匯池以TBS稀釋以獲得噬菌體展示庫溶液。其次，對噬菌體展示溶液添加BSA(最終濃度：4%)。淘選方法係參照使用抗原經固定化於磁性珠粒的一般淘選方法進行(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; 及 Mol. Cell Proteomics (2003) 2(2), 61-9)。使用的磁性珠粒為NeutrAvidin被覆珠粒(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated)或鏈黴素被覆珠粒(Dynabeads M-280 Streptavidin)。

【0321】 具體地，噬菌體溶液與100 pmol的人類CD137-Fc及4 nmol的游離人類IgG1 Fc域混和且於室溫培育60分鐘。磁性珠粒以具有游離鏈黴素(Roche)的2%脫脂乳/TBS於室溫封阻60分鐘或更久，且以TBS清洗三次後，與培育的噬菌體溶液混合。於室溫培育15分鐘後，珠粒以TBST(含有0.1% Tween 20 的TBS；TBS可由Takara Bio Inc.取得)清洗三次10分鐘後，進一步以1mL的TBS清洗二次10分鐘。使用FabRICATOR (IdeS，對於IgG鉸鏈區的蛋白酶，GENOVIS)(命名為IdeS沖提運轉期)以回收抗體展示噬菌體。

【0322】 該過程中，添加10單位/μL Fabricator 20μL與80μLWBT緩衝液且珠粒於攝氏37度懸浮10分鐘，在那之後立即使用磁性底座分開該珠粒，以回收噬菌體溶液。添加5μL的100 mg/mL胰蛋白酶及400μL的TBS且於室溫培育15分鐘。回收的噬菌體溶液添加至於對數生長期(OD600: 0.4-0.5)的大腸桿菌菌株ER2738。經由於37°C溫和旋轉培養該菌株1小時藉由噬菌體感染大腸桿菌。經感染的大腸桿菌接種至225mm × 225mm盤。其次，由經接種的大腸桿菌的培養溶液回收噬菌體以製備噬菌體庫溶液。

【0323】 此淘選回合1過程中，結合至人類CD137的抗體展示噬菌體係經

濃縮。淘選的第2回合中，160 pmol的C3NP1-27使用作為生物素標記抗原且以TBST進行七次清洗2分鐘後，以TBS清洗三次2分鐘。沖提以25 mM DTT於室溫進行15分鐘後，藉由胰蛋白酶分解。

【0324】 淘選的第3回合中，16或80 pmol的生物素標記食蟹猴CD137-Fc使用作為抗原且以TBST進行七次清洗10分鐘後，以TBS清洗三次10分鐘。沖提以IdeS與回合1同樣方式進行。

【0325】 淘選的第4回合中，16或80 pmol的生物素標記人類CD137-Fc使用作為抗原且以TBST進行七次清洗10分鐘後，以TBS清洗三次10分鐘。沖提以IdeS與回合1同樣方式進行。

【0326】 4.3. 具有所獲得之Fab域的IgG對人類CD137及食蟹猴CD137的結合

各淘選輸出匯池的Fab基因係轉為IgG格式。所製備的哺乳動物表現質體導入大腸桿菌且自各淘選輸出匯池選取96個菌落，以及分析其等之VH及VL序列。分別地，庫2中的VH序列之多數已濃縮至dBBDu_183以及庫6中的VH序列之多數已濃縮至dBBDu_193。由各大腸桿菌菌落所製備的質體藉由參考例9的方法使用於動物細胞中表現。

【0327】 所製備的IgG抗體進行ELISA以評估其對於CD3ε、人類CD137及食蟹猴CD137的結合能力。

【0328】 首先，經鏈黴素被覆微孔盤(384孔，Greiner)以20μL的含有生物素標記CD3ε肽、生物素標記人類CD137-Fc或生物素標記食蟹猴CD137的TBS於室溫被覆1或多個小時。藉由以TBST清洗盤的各孔以移除未結合至盤的生物素標記抗原後，孔以20μL的封阻緩衝液(2%脫脂乳/TBS)封阻一或多個小時。自各孔移除封阻緩衝液。經以1%脫脂乳/TBS稀釋二倍之含有IgG的哺乳動物細胞上清10ng/μL各者20μL添加至孔，且使盤於室溫靜置一小時以使各IgG結合至各孔

中的生物素標記抗原。之後，以TBST清洗各孔。以TBS稀釋的山羊抗-人類kappa輕鏈鹼性磷酸酶接合物(BETHYL, A80-115AP)添加至各孔。盤培育1小時。以TBST清洗後，各孔中的溶液經添加Blue Phos Microwell Phosphatase Substrate System (KPL)的發色反應，係藉由添加Blue Phos Stop Solution (KPL)終止。然後，藉由測量於615 nm的吸收度測量顏色發展。測量結果示於圖16。

【0329】 自各淘選過程獲得顯示結合至CD3ε、人類CD134及食蟹猴CD137二者的許多IgG純株。選擇顯示較佳結合的96個純株且進一步評估。

【0330】 4.4. 具有所獲得之Fab域的IgG對CD3ε及人類CD137同時結合的評估

選擇參考例4.3中顯示對CD3ε、人類CD137及食蟹猴CD137二者明顯結合的96個抗體進一步評估。經純化的抗體進行ELISA以評估其等對於CD3ε及人類CD137同時結合能力。

【0331】 首先，20μg的鏈黴素被覆磁性珠粒MyOne-T1珠粒以包括0.5x block Ace、0.02% Tween及0.05% ProClin 300的封阻緩衝液清洗三次後，於室溫以此封阻緩衝液封阻60分鐘或更久。以TBST清洗一次後，磁性珠粒施用至黑圓底PS盤(Corning, 3792)之各孔。添加0.625pmol的生物素標記人類CD137-Fc且於室溫培育10分鐘。之後以TBS清洗磁性珠粒一次。250 ng經純化的IgG 與62.5、6.25及0.625 pmol的游離CD3ε或62.5 pmol的游離人類IgG1 Fc域混合後，添加至各孔中的磁性珠粒，且使盤於室溫靜置一小時以使各IgG結合至各孔中的生物素標記抗原。之後各孔以TBST清洗。以TBS稀釋的山羊抗-人類kappa輕鏈鹼性磷酸酶接合物(BETHYL, A80-115AP)添加至各孔。盤培育10分鐘。以TBST清洗後，對各孔添加APS-5 (Lumigen)。2分鐘後偵測各孔的螢光。測量結果示於圖17及表12。多數經測試的純株對人類CD137的結合藉由過量的游離CD3ε肽受到抑制，其展現所獲得之具有Dual Fab庫的抗體不同時結合至CD3ε及人類CD137。

【0332】 [表12]

	生物素-人類 CD137-Fc		
	游離 CD3e 62.5 pmol	游離 Fc 62.5 pmol	信號降低
dBBDu183/L057	2732	9025	69.73%
dBBDu183/L058	2225	11115	79.98%
dBBDu183/L059	2134	100126	97.87%
dBBDu183/L060	2169	37723	94.25%
dBBDu183/L061	2118	2723	22.22%
dBBDu183/L062	2777	27880	90.04%
dBBDu183/L063	2943	28858	89.80%
dBBDu183/L064	2206	13474	83.63%
dBBDu183/L065	2725	6024	54.76%
dBBDu183/L066	2325	34020	93.17%
dBBDu183/L067	2936	19722	85.11%
dBBDu197/L068	2786	105219	97.35%
dBBDu183/L069	2463	31769	92.25%
dBBDu183/L070	3267	92395	96.46%
dBBDu183/L071	2297	8670	73.51%
dBBDu183/L072	2840	54764	94.81%
dBBDu183/L073	2876	6724	57.23%
dBBDu196/L074	2724	12891	78.87%
dBBDu183/L075	2568	8029	68.02%
dBBDu196/L076	2188	5037	56.56%
dBBDu179/L077	3147	8018	60.75%
dBBDu167/L078	2378	27120	91.23%
dBBDu167/L079	2269	5869	61.34%
dBBDu167/L080	2236	95870	97.67%
dBBDu167/L081	2508	44240	94.33%
dBBDu167/L082	2398	177750	98.65%
dBBDu167/L083	2164	78935	97.26%

dBBDu167/L084	2182	18392	88.14%
dBBDu167/L085	2202	8724	74.76%
dBBDu167/L086	2627	135762	98.06%
dBBDu167/L087	2168	106703	97.97%
dBBDu167/L088	2040	2163	5.69%
dBBDu167/L089	2424	10161	76.14%
dBBDu167/L090	2595	181795	98.57%
dBBDu167/L091	11345	124409	90.88%
dBBDu167/L092	2924	123122	97.63%
dBBDu167/L093	4934	139388	96.46%
dBBDu167/L094	4374	140938	96.90%
dBBDu167/L095	2207	112225	98.03%
dBBDu186/L096	37273	84887	56.09%
dBBDu186/L097	9006	114399	92.13%
dBBDu186/L098	15908	114905	86.16%
dBBDu186/L099	2367	19583	87.91%
dBBDu186/L100	88856	102097	12.97%
dBBDu186/L101	2340	37392	93.74%
dBBDu186/L102	2427	2685	9.61%
dBBDu186/L103	21977	74203	70.38%
dBBDu186/L104	2165	2145	-0.93%
dBBDu186/L105	13426	89231	84.95%
dBBDu186/L106	3088	9857	68.67%
dBBDu186/L107	2104	2047	-2.78%
dBBDu186/L108	50796	83558	39.21%
dBBDu189/L109	3000	76770	96.09%
dBBDu189/L110	3836	119618	96.79%
dBBDu189/L111	2568	49623	94.82%
dBBDu189/L112	4768	91051	94.76%
dBBDu189/L113	3357	89648	96.26%
dBBDu189/L114	2158	2512	14.09%

dBBDu189/L115	4058	141183	97.13%
dBBDu189/L116	3149	109316	97.12%
dBBDu189/L117	2625	102489	97.44%
dBBDu189/L118	2446	19372	87.37%
dBBDu189/L119	20377	88058	76.86%
dBBDu189/L120	3778	113755	96.68%
dBBDu189/L121	3300	37197	91.13%
dBBDu189/L122	3949	141349	97.21%
dBBDu189/L123	4950	22574	78.07%
dBBDu189/L124	3282	111075	97.05%
dBBDu189/L125	6494	121498	94.66%
dBBDu189/L126	9750	75082	87.01%
dBBDu193/L127	2471	6084	59.39%
dBBDu193/L128	3197	120777	97.35%
dBBDu193/L129	2773	5310	47.78%
dBBDu193/L130	3055	124130	97.54%
dBBDu193/L131	15481	109233	85.83%
dBBDu193/L132	10414	115982	91.02%
dBBDu193/L133	2388	33076	92.78%
dBBDu193/L134	3046	109154	97.21%
dBBDu193/L135	2284	54304	95.79%
dBBDu193/L136	2092	113254	98.15%
dBBDu193/L137	2458	6602	62.77%
dBBDu193/L138	8165	100690	91.89%
dBBDu193/L139	2077	2190	5.16%
dBBDu222/L140	2721	22972	88.16%
dBBDu193/L141	2166	5582	61.20%
dBBDu193/L142	12085	103522	88.33%
dBBDu193/L143	2338	50082	95.33%
dBBDu193/L144	1952	2366	17.50%
dBBDu193/L145	2739	2820	2.87%

【0333】 4.5. 具有所獲得之Fab域的IgG對CD3ε、人類CD137及食蟹猴CD137的親和性評估

參考例4.4所獲得之各IgG對人類CD3ed、人類CD137及食蟹猴CD137的結合係使用Biacore T200確認。根據參考例4.4的結果選擇16個抗體。感測晶片CM3 (GE Healthcare)藉由胺偶合與合適量的當然蛋白質A (sure protein A)(GE Healthcare)固定化。所選擇的抗體藉由晶片捕捉而允許對作為抗原之人類CD3ed、人類CD137及食蟹猴CD137的交互作用。所使用的運行緩衝液為20 mmol/l ACE、150 mmol/l NaCl、0.05% (w/v) Tween 20，pH 7.4。所有測量於25°C施行。抗原使用運行緩衝液稀釋。

【0334】 關於人類CD137，所選擇的抗體於抗原濃度4000、1000、250、62.5及15.6 nM評價其結合。稀釋的抗原溶液及作為空白之運行緩衝液，以流速30μL/min 裝載180秒而允許各濃度的抗原與捕捉於感測晶片的抗體交互作用。然後，運行緩衝液以流速30μL/min運行300秒且觀察抗原自抗體的解離。其次，為了再生感測晶片，10 mmol/L甘胺酸-HCl，pH 1.5，以流速30μL/min 裝載10秒且50 mmol/L NaOH以流速30μL/min 裝載10秒。

【0335】 關於食蟹猴CD137，所選擇的抗體於抗原濃度4000、1000及250nM評價其結合。稀釋的抗原溶液及作為空白之運行緩衝液，以流速30μL/min 裝載180秒而允許各濃度的抗原與捕捉於感測晶片的抗體交互作用。然後，運行緩衝液以流速30μL/min運行300秒且觀察抗原自抗體的解離。其次，為了再生感測晶片，10 mmol/L甘胺酸-HCl，pH1.5，以流速30μL/min 裝載10秒且50 mmol/L NaOH以流速30μL/min 裝載10秒。

【0336】 關於人類CD3ed，所選擇的抗體於抗原濃度1000、250及62.5 nM評價其結合。稀釋的抗原溶液及作為空白之運行緩衝液，以流速30μL/min 裝載120秒而允許各濃度的抗原與捕捉於感測晶片的抗體交互作用。然後，運行緩衝液以流速30μL/min運行且觀察抗原自抗體的解離。其次，為了再生感測晶片，

10 mmol/L甘胺酸-HCl，pH1.5，以流速30μL/min 裝載30秒且50 mmol/L NaOH以流速30μL/min 裝載30秒。

【0337】　如締合速率常數ka (1/Ms)及解離速率常數kd (1/s)之動力學參數，係基於由測量所獲得的感測圖譜計算。解離常數KD (M)係由該等常數計算。各參數係使用Biacore T200評估軟體(GE Healthcare)計算。結果示於表13。

【0338】　[表13]

Hch 名稱	Lch 名稱	SEQ ID NO	人類 CD 137		
			ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
dBBDu_183	dBBDu_L063	123	2.05E+03	3.58E-03	1.74E-06
dBBDu_183	dBBDu_L072	124	1.76E+03	4.25E-03	2.41E-06
dBBDu_167	dBBDu_L091	125	2.72E+03	1.85E-02	6.79E-06
dBBDu_186	dBBDu_L096	126	2.46E+02	5.58E-04	2.27E-06
dBBDu_186	dBBDu_L098	127	2.31E+02	5.34E-04	2.31E-06
dBBDu_186	dBBDu_L106	128	1.30E+02	4.47E-04	3.44E-06
dBBDu_189	dBBDu_L116	129	7.07E+02	2.91E-03	4.12E-06
dBBDu_189	dBBDu_L119	130	1.48E+02	4.02E-04	2.71E-06
dBBDu_183	dBBDu_L067	131	1.38E+03	4.51E-03	3.26E-06
dBBDu_186	dBBDu_L100	132	3.91E+02	7.46E-04	1.91E-06
dBBDu_186	dBBDu_L108	133	3.35E+02	8.10E-04	2.41E-06
dBBDu_189	dBBDu_L112	134	1.18E+03	3.13E-03	2.66E-06
dBBDu_189	dBBDu_L126	135	1.34E+03	6.88E-04	5.13E-07
dBBDu_167	dBBDu.L094	136	1.21E+03	1.02E-02	8.43E-06
dBBDu_193	dBBDu.L127	137	4.40E+02	1.45E-03	3.30E-06
dBBDu_193	dBBDu.L132	138	4.71E+02	2.11E-03	4.48E-06

Hch 名稱	Lch 名稱	SEQ ID NO	食蟹猴 CD 137		
			ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
dBBDu_183	dBBDu_L063	123	1.47E+03	4.57E-03	3.12E-06
dBBDu_183	dBBDu_L072	124	1.22E+03	5.93E-03	4.87E-06
dBBDu_167	dBBDu_L091	125	2.43E+03	1.01E-02	4.17E-06
dBBDu_186	dBBDu_L096	126	1.09E+01	2.23E-03	2.05E-04
dBBDu_186	dBBDu_L098	127	8.84E+00	1.19E-03	1.34E-04
dBBDu_186	dBBDu_L106	128	2.05E+01	1.26E-03	6.13E-05
dBBDu_189	dBBDu_L116	129	7.44E+02	8.23E-03	1.11E-05
dBBDu_189	dBBDu_L119	130	3.42E+01	1.22E-03	3.57E-05
dBBDu_183	dBBDu_L067	131	1.31E+03	8.13E-03	6.20E-06
dBBDu_186	dBBDu_L100	132	2.95E+01	2.08E-03	7.04E-05
dBBDu_186	dBBDu_L108	133	2.25E+02	3.61E-03	1.61E-05
dBBDu_189	dBBDu_L112	134	4.98E+03	2.86E-02	5.76E-06
dBBDu_189	dBBDu_L126	135	8.07E+02	2.47E-03	3.06E-06
dBBDu_167	dBBDu.L094	136	1.08E+04	7.48E-02	6.92E-06
dBBDu_193	dBBDu.L127	137	1.12E+02	3.16E-03	2.81E-05
dBBDu_193	dBBDu.L132	138	8.06E+00	6.10E-03	7.57E-04

Hch 名稱	Lch 名稱	SEQ ID NO	人類 CD 3ed		
			ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
dBBDu_183	dBBDu_L063	123	5.69E+04	1.57E-02	2.76E-07
dBBDu_183	dBBDu_L072	124	3.61E+04	7.85E-03	2.17E-07
dBBDu_167	dBBDu_L091	125	5.24E+04	2.16E-02	4.13E-07
dBBDu_186	dBBDu_L096	126	1.12E+04	1.02E-01	9.11E-06
dBBDu_186	dBBDu_L098	127	1.11E+04	2.09E-02	1.88E-06
dBBDu_186	dBBDu_L106	128	1.03E+04	3.18E-02	3.09E-06
dBBDu_189	dBBDu_L116	129	2.08E+04	4.34E-03	2.09E-07
dBBDu_189	dBBDu_L119	130	1.25E+04	2.58E-02	2.06E-06
dBBDu_183	dBBDu_L067	131	8.89E+04	1.93E-02	2.17E-07
dBBDu_186	dBBDu_L100	132	1.62E+04	5.46E-02	3.36E-06
dBBDu_186	dBBDu_L108	133	1.36E+04	4.08E-02	3.01E-06
dBBDu_189	dBBDu_L112	134	3.03E+04	1.00E-02	3.31E-07
dBBDu_189	dBBDu_L126	135	1.09E+04	2.81E-02	2.57E-06
dBBDu_167	dBBDu.L094	136	6.02E+04	2.10E-02	3.49E-07
dBBDu_193	dBBDu.L127	137	1.26E+04	1.91E-02	1.51E-06
dBBDu_193	dBBDu.L132	138	9.89E+03	2.01E-02	2.03E-06

【0339】 [參考例5] 製備抗-人類GPC3/Dual Fab三特異性抗體及評估其人類CD137促效活性

5.1. 製備抗-人類GPC3/抗-人類CD137雙特異性抗體及抗-人類GPC3/Dual-Fab三特異性抗體

帶有人類IgG1恆定區的抗-人類GPC3/抗-人類CD137雙特異性抗體及抗-人類GPC3/Dual-Fab三特異性抗體係由下述過程製造。描述於WO2005/035584 A1之編碼抗-人類CD137抗體(SEQ ID NO: 93為H鏈，及SEQ ID NO: 94為L鏈)的基因 (簡寫為B)使用作為對照抗體。抗體的抗-人類GPC3側共有重鏈可變區H0000 (SEQ ID NO: 139)及輕鏈可變區GL4 (SEQ ID NO: 140)。

【0340】 描述於參考例4及表13的16個Dual-Fab使用作為候選雙-Ig抗體。

對於該等分子，使用由Schaefer等人所報導的CrossMab技術(Schaefer, Proc. Natl. Acad. Sci., 2011, 108, 11187-11192)調控H和L鏈之間的締合且有效率地獲得雙特異性抗體。更具體地，該等抗體係藉由交換針對人類GPC3的Fab的VH及VL域而製造。對於異源性締合的促進，鈕-進入-孔(Knobs-into-Holes)技術使用於抗體H鏈的恆定區。鈕-進入-孔技術為一種藉由經由H鏈的異源二倍體化的促進，而能製備感興趣的異源二倍體抗體的技術，該H鏈的二倍體化係藉由以較大側鏈(鈕)取代存在於H鏈之一者的CH3區的胺基酸側鏈以及以較小的側鏈(孔)取代存在於H鏈之一者的CH3區的胺基酸，使得鈕將被置入孔(Burmeister, Nature, 1994, 372, 379-383)。

【0341】 以下，已被導入鈕修飾的恆定區將被指稱為Kn，以及孔修飾已被導入的恆定區將被指稱為Hl。再者，使用描述於WO2011/108714的修飾以減低Fcγ結合。具體地，位置234、235及297 (EU編號)的胺基酸取代為Ala的修飾被導入。位置446的Gly及位置447的Lyc (EU編號)自抗體H鏈的C終端被移除。組胺酸標籤添加至Kn Fc區的C終端，且FLAG標籤添加至Hl Fc區的C終端。藉由導入上述修飾所製備的抗-人類GPC3 H鏈為GC33(2)H-G1dKnHS (SEQ ID NO: 141)。所製備的抗-人類CD137 H鏈為BVH-G1dHIFS (SEQ ID NO：142)。抗體L鏈GC33(2)L-k0 (SEQ ID NO: 143)及BVL-k0 (SEQ ID NO: 144)通常分別使用於抗-人類GPC3側及抗-CD137側。雙抗體的H鏈和L鏈也示於表13。分別地，各雙抗體純株的VH融合至G1dH1FS (SEQ ID NO: 156) CH區，且各雙抗體純株的VL融合至k0 (SEQ ID NO: 157) CL區，相同於BVH-G1H1FS及BVL-k0。具有示於表15的組合的抗體係經表現以獲得感興趣的雙特異性抗體。具有公認不相干者的抗體使用作為對照(簡寫為Ctrl)。該等抗體係藉由瞬時表現於FreeStyle293細胞(Invitrogen)予以表現且根據「參考例9」純化。

【0342】 5.2. 評價抗-人類GPC3/Dual Fab三特異性抗體的活體外GPC3-依

賴性CD137促效功效

人類CD137的促效活性係使用ELISA套組(R&D systems, DY206)基於細胞介素產生而予以評估。為了避免抗-人類GPC3/Dual-Fab抗體的CD3ε結合域的功效，使用不表現CD3ε也不表現GPC3，但組成性地(constitutively)表現CD137的B細胞株HDLM-2。HDLM-2以8×10^5細胞/mL的密度，懸浮於含有20% FBS的RPMI-1640培養基。表現GPC3的小鼠癌細胞株CT26-GPC3 (參考例13)以4×10^5細胞/mL的密度懸浮於相同培養基。混合相同體積的各細胞懸浮液，經混合的細胞懸浮液以體積200 ul/孔接種至96-孔盤。抗-GPC3/Ctrl抗體、抗GPC-3/抗CD-137抗體及8個參考例5.1所製備的抗-GPC3/Dual-Fab抗體各者以30μg/ml、6μg/ml、1.5μg/ml、0.24μg/ml添加。細胞於37°C及5% CO_2的條件培養3日。收集細胞上清，以及於該上清所含有的人類IL-6的濃度係以Human IL-6 DuoSet ELISA(R&D systems, DY206)以估算HDLM-2活化。ELISA係由套組製造商(R&D systems)所提供的指示實施。

【0343】 其結果(圖18及表14)，8個抗-GPC3/Dual Fab抗體中的七個顯示取決於抗體濃度之HDLM-2以及抗-GPC3/抗-CD137的IL-6製造的活化。表14中，相較於Ctrl的促效活性意指在Ctrl的存在下，hIL-6的分泌超過背景的增加程度。基於該結果，認為該等Dual-Fab抗體對人類CD137具有促效活性。

【0344】 [表14]

	hIL-6 (pg/mL)		相較於B之促效活性		相較於Ctrl之促效活性	
抗體 (μg/mL)	30	6	30	6	30	6
Ctrl	906.060814	1012.42048			0.00%	0.00%
B	4344.80386	4524.76696	100.00%	100.00%	379.53%	346.93%
L063	1129.89262	967.744207	6.51%	−1.27%	24.70%	−4.41%
L072	1447.54151	1125.01544	15.75%	3.21%	59.76%	11.12%
L091	944.057133	934.684418	1.10%	−2.21%	4.19%	−7.68%
L096	1736.82678	1681.25602	24.16%	19.04%	91.69%	66.06%
L098	1753.61596	1501.11166	24.65%	13.91%	93.54%	48.27%
L106	1573.01967	1476.44391	19.40%	13.21%	73.61%	45.83%
L116	1566.84383	1303.26238	19.22%	8.28%	72.93%	28.73%
L119	1606.92382	1255.50299	20.38%	6.92%	77.35%	24.01%

【0345】 [參考例6]評價抗-人類GPC3/Dual-Fab三特異性抗體的人類CD3ε促效活性

6.1. 製備抗-人類GPC3/抗-人類CD3ε雙特異性抗體及抗-人類GPC3/Dual Fab三特異性抗體

帶有人類IgG1恆定區的抗-人類GPC3/Ctrl雙特異性抗體及抗-人類GPC3/Dual Fab三特異性抗體係製備於參考例5.1，及抗-人類GPC3/抗-人類CD3ε雙特異性抗體也以相同構築方式製備。參考例10中所製造的CE115 VH(SEQ ID NO: 145)及CE115 VL(SEQ ID NO: 146)使用於抗-人類CD3ε抗體重鏈及輕鏈。抗體具有的組合示於表15。該等抗體藉由瞬時表現於FreeStyle293細胞(Invitrogen)予以表現且根據「參考例9」純化。

【0346】 [表15]

抗體名稱	Hch 基因1	Lch 基因1	Hch 基因1	Lch 基因1
GPC3 ERY22-B	GC33(2)H-G1dKnHS	GC33(2)L-k0	BVH-G1dHIFS	BVL-k0
GPC3 ERY22-dBBDu_183/L063	GC33(2)H-G1dKnHS	GC33(2)L-k0	dBBDu_183VH-G1dHIFS	L063VL-k0
GPC3 ERY22-dBBDu_183/L072	GC33(2)H-G1dKnHS	GC33(2)L-k0	dBBDu_183VH-G1dHIFS	L072VL-k0
GPC3 ERY22-dBBDu_167/L091	GC33(2)H-G1dKnHS	GC33(2)L-k0	dBBDu_167VH-G1dHIFS	L091VL-k0
GPC3 ERY22-dBBDu_186/L096	GC33(2)H-G1dKnHS	GC33(2)L-k0	dBBDu_186VH-G1dHIFS	L096VL-k0
GPC3 ERY22-dBBDu_186/L098	GC33(2)H-G1dKnHS	GC33(2)L-k0	dBBDu_186VH-G1dHIFS	L098VL-k0
GPC3 ERY22-dBBDu_186/L106	GC33(2)H-G1dKnHS	GC33(2)L-k0	dBBDu_186VH-G1dHIFS	L106VL-k0
GPC3 ERY22-dBBDu_189/L116	GC33(2)H-G1dKnHS	GC33(2)L-k0	dBBDu_189VH-G1dHIFS	L116VL-k0
GPC3 ERY22-dBBDu_189/L119	GC33(2)H-G1dKnHS	GC33(2)L-k0	dBBDu_189VH-G1dHIFS	L119VL-k0
GPC3 ERY22-dBBDu_183/L067	GC33(2)H-G1dKnHS	GC33(2)L-k0	dBBDu_183VH-G1dHIFS	L067VL-k0
GPC3 ERY22-dBBDu_186/L100	GC33(2)H-G1dKnHS	GC33(2)L-k0	dBBDu_186VH-G1dHIFS	L100VL-k0
GPC3 ERY22-dBBDu_186/L108	GC33(2)H-G1dKnHS	GC33(2)L-k0	dBBDu_186VH-G1dHIFS	L108VL-k0
GPC3 ERY22-dBBDu_189/L112	GC33(2)H-G1dKnHS	GC33(2)L-k0	dBBDu_189VH-G1dHIFS	L112VL-k0
GPC3 ERY22-dBBDu_189/L126	GC33(2)H-G1dKnHS	GC33(2)L-k0	dBBDu_189VH-G1dHIFS	L126VL-k0
GPC3 ERY22-dBBDu_167/L094	GC33(2)H-G1dKnHS	GC33(2)L-k0	dBBDu_167VH-G1dHIFS	L094VL-k0
GPC3 ERY22-dBBDu_193/L127	GC33(2)H-G1dKnHS	GC33(2)L-k0	dBBDu_193VH-G1dHIFS	L127VL-k0
GPC3 ERY22-dBBDu_193/L132	GC33(2)H-G1dKnHS	GC33(2)L-k0	dBBDu_193VH-G1dHIFS	L132VL-k0
GPC3 ERY22-CE115	GC33(2)H-G1dKnHS	GC33(2)L-k0	CE115VH-G1dHIFS	CE115VL-k0
GPC3 ERY22-Ctrl	GC33(2)H-G1dKnHS	GC33(2)L-k0	CtrlVH-G1dHIFS	CtrlVL-k0

【0347】 6.2. 評價抗-人類GPC3/Dual-Fab三特異性抗體的活體外GPC3-依賴性CD3促效活性

針對人類CD3的促效活性藉由使用GloResponseTM NFAT-luc2 Jurkat細胞株(Promega, CS#176401)作為效應子細胞予以評估。Jurkat細胞為衍生自人類急性T細胞白血病的人類T淋巴細胞的不死化細胞株，且於其本身表現人類CD3。NFAT luc2_jurkat細胞中，螢光素的表現係藉由來自CD3活化的信號而誘發。於細胞膜表現人類GPC3的SK-pca60細胞株(參考例13)使用作為靶細胞。

【0348】 5.00E+03 SK-pca60細胞(靶細胞)及3.00E+04 NFAT-luc2 Jurkat細胞(效應子細胞)二者添加於白底96孔分析盤(Costar, 3917)之各孔後，具有濃度0.1、1或10 mg/mL各抗體10μL添加於各孔且於5% CO2的存在下於攝氏37度培育

24小時。所表現的螢光素以Bio-Glo螢光素酶測試系統(Promega, G7940)根據隨附的指示偵測。2104 EnVIsion使用於偵測。結果示於圖19。

【0349】 多數的Dual Fab純株顯示明顯的CD3ε促效活性，且其中一些顯示與CD115抗-人類CD3ε抗體同等程度的活性。此展現對Dual Fab域的添加CD137結合活性不會誘發CD3ε促效活性的損失，且Dual Fab域顯示不僅結合至二種不同抗原，人類CD3ε及CD137，也顯示僅藉由一種域之人類CD3ε及CD137二者的促效活性。

【0350】 具有重鏈dBBDu_186的一些Dual-Fab域相較於其他者顯示較弱的CD3ε促效活性。該等抗體於參考例4.5的biacore分析也顯示對人類CD3ε較弱的親和性。此展現來自此Dual Fab庫的Dual-Fab的CD3ε促效活性僅依賴於其對人類CD3ε的親和性，此意指CD3ε促效活性保留於此庫設計中。

【0351】 [參考例7] 評價PBMC T細胞細胞介素釋放測試中Dual-Fab抗體的人類CD3ε/人類CD137協同性活性

7.1. 抗體製備

描述於WO2005/035584A1的抗-CD137抗體(簡寫為B)、描述於參考例5.1的Ctrl抗體及描述於參考例7的抗-CD3ε CE115抗體使用作為單一抗原特異性對照。選擇Dual-Fab，描述於表13的H183L072(重鏈：SEQ ID NO: 104，輕鏈：SEQ ID NO: 124)用於進一步評估且藉由瞬時表現於FreeStyle293細胞(Invitrogen)予以表現且根據「參考例9」純化。

【0352】 7.2. PBMC T細胞測試

為了研究Dual-Fab抗體對於CD3ε及CD137活化的協同功效，使用流式細胞珠粒陣列(CBA)人類Th1/T2細胞介素套組II(BD Biosciences #551809)評估總細胞介素釋放。關於CD137活化，由自冷凍購得(STEMCELL)的冷凍人類周邊血液單核細胞(peripheral blood mononuclear cell，PBMC)單離的T細胞評估IL-2(介白素

-2)、IFNγ(干擾素γ)及TNFα(腫瘤壞死因子-α)。

【0353】 7.2.1. 製備冷凍人類PBMC及單離T細胞

含有PBMC的冷凍管置於37°C水浴以融解細胞。然後細胞分注於含有9mL培養基(使用於培養靶細胞的培養基)之15mL falcon 管。然後細胞懸浮液以1,200rpm於室溫進行離心5分鐘。溫和吸取上清且添加新鮮溫熱培養基用以再懸浮且使用作為人類PBMC溶液。使用Dynabeads Untouched Human T細胞套組(Invitrogen #11344D)依照製造商指示單離T細胞。

【0354】 7.2.2. 細胞介素釋放測試

參考例7.1所製備的30μg/mL及10μg/mL的抗體被覆於maxisorp 96-孔盤(Thermofisher #442404)隔夜。對含有抗體的各孔添加1.00E+05 T細胞且於37°C培育72小時。盤以1,200rpm離心5分鐘且收集上清。根據製造商指示進行CBA且結果示於圖20。

【0355】 僅有Dual-Fab，H183L072抗體顯示藉由T細胞的IL-2分泌。抗CD-137 (B)及抗-CD3ε抗體(CE115)單獨皆未造成自T細胞的IL-2誘發。此外，抗-CD137抗體單獨也未造成任何細胞介素的偵測。相較於抗-CD3ε抗體，Dual-Fab抗體造成增加的TNFα程度及IFNγ的類似分泌。該等結果建議Dual-Fab抗體可引出CD3ε及CD137二者對於T細胞功能活化的協同活化。

【0356】 [參考例8] 評價抗-GPC3/Dual-Fab三特異性抗體的細胞毒性

8.1. 抗-GPC3/Dual-Fab及抗-GPC3/CD137雙特異性抗體製備

根據描述於(Proc Natl Acad Sci USA. 2013 Mar 26;110(13): 5145-5450)的方法，使用Fab-臂交換(FAE)將描述於參考例6的抗-GPC3或Ctrl抗體以及Dual-Fab(H183L072)或抗-CD137抗體用以產生四種抗體，抗-GPC3/Dual-Fab、抗-GPC3/CD137、Ctrl/H183L072及Ctrl/CD137抗體。所有四種抗體的分子格式係與傳統IgG相同格式。抗-GPC3/H183L072為能結合GPC3、CD3及CD137的三特異

性抗體，抗-GPC3/CD137為能結合GPC3及CD137的雙特異性抗體，以及Ctrl/H183L072與Ctrl/CD137係使用作為對照。產生的所有四種抗體由對Fcγ受體具有減弱的親和性的靜默Fc所組成。

【0357】 8.2. T細胞依賴性細胞的細胞毒性(T-cell dependent cellular cytotoxicity，TDCC)測試

細胞毒性活性係如參考例10.5.2所述地使用xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (Roche Diagnostics)藉由細胞生長抑制性的比率評價。1.00E+04 SK-pca60或SK-pca13a，二者皆為表現GPC3的轉染細胞株，使用作為靶(簡寫為T)細胞(分別為參考例13及10)，且與如參考例7.2.1所述地製備的5.00E+04冷凍人類PBMC效應子(簡寫為E)細胞共培育。其意指5-倍量的效應子細胞添加於腫瘤細胞，本文描述為ET 5。抗-GPC3/H183L072抗體及GPC3/CD137抗體以0.4、5及10nM添加，而Ctrl/H183L072抗體及Ctrl/CD137抗體以10nM添加於各孔。類似參考例10.5.2所述地進行細胞毒性活性的測量。反應以5%二氧化碳氣體於37°C的條件實施。添加PBMC 72小時後，使用描述於參考例10.5.2的方程式測定細胞生長抑制(Cell Growth Inhibition，CGI)比率(%)且作圖於如圖21所示的圖。於參考例6.2中於Jurkat細胞顯示CD3活化的抗-GPC3/H183L072Dual-Fab抗體，而不是不顯示CD3活化的對照/H183L072Dual-Fab抗體，及抗-GPC3/CD137抗體於二種靶細胞株中於所有濃度造成GPC3-表現細胞的強力的細胞毒性活性，建議Dual-Fab三特異性抗體可造成細胞毒性活性。

【0358】 [參考例9] 抗體表現載體的製備及抗體的純化

藉由所屬技術領域中具有通常知識者習知的方法，使用QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene Corp.)、PCR或In fusion Advantage PCR cloning kit (Takara Bio Inc.)等，來進行胺基酸取代或IgG轉化以構築表現載體。所得的表現載體藉由所屬技術領域中具有通常知識者習知的方法定序。所製備

的質體瞬時轉移至人類胚胎腎癌細胞衍生的HEK293H株(Invitrogen Corp.)或FreeStyle 293細胞(Invitrogen Corp.)以表現抗體。藉由所屬技術領域中具有通常知識者習知的方法，使用rProtein A Sepharose (TM) Fast Flow(GE Healthcare Japan Corp.)自所獲得的培養上清純化各抗體。至於經純化的抗體的濃度，使用分光度計測量280nm的吸收，且抗體濃度藉由使用由PACE (Protein Science 1995; 4: 2411-2423)所獲得的值計算的吸光係數(extinction coefficient)來計算。

【0359】 [參考例10] 抗-人類及抗-食蟹猴CD3ε抗體CE115的製備

10.1. 使用以表現人類CD3的細胞及表現食蟹猴CD3的細胞予以免疫的大鼠的融合瘤的製備

各SD大鼠(雌性，於起始免疫為6週齡，Charles River Laboratories Japan, Inc.)以表現人類CD3εγ或食蟹猴CD3εγ的Ba/F3細胞予以免疫，如下所述：於第0日(首次免疫日期定義為第0日)，5×10^7 個表現人類CD3εγ的Ba/F3細胞與弗氏完全佐劑(Difco Laboratories, Inc.)一起腹腔內投藥至大鼠。於第14日，5×10^7 個表現食蟹猴CD3εγ的Ba/F3細胞與弗氏不完全佐劑(Difco Laboratories, Inc.)一起腹腔內投藥至大鼠。然後以交替方式，每隔週總計四次腹腔內投藥5×10^7 個表現人類CD3εγ的Ba/F3細胞與表現食蟹猴CD3εγ的Ba/F3細胞。最終投藥CD3εγ後一週(第49日)，對其靜脈內投藥表現人類CD3εγ的Ba/F3細胞作為追加。其三日後，大鼠的脾臟細胞使用PEG1500(Roche Diagonostics K.K)根據常規方法與小鼠骨髓瘤細胞SP2/0融合。融合細胞，亦即融合瘤，培育於含有10% FBS的RPMI1640培養基(後文中，指稱為10% FBS/RPMI1640)。

【0360】 融合後的那日，(1) 融合細胞係懸浮於半流體培養基(Stemcell Technologies, Inc.)。融合瘤選擇性培養也純株化(colonize)。

【0361】 融合後九或十日，選取融合瘤純株且以1菌落/孔接種於含有HAT選擇培養基(10% FBS/RPMI1640，2 vol% HAT 50x 濃縮物(Sumiotmo Dainippon

Pharma Co., Ltd.)及5 vol% BM-Condimed HI (Roche Diagonostics K.K)的96-孔盤。3或4日培育後，回收各孔中的培養上清，且測量培養上清中的大鼠IgG濃度。確認含有大鼠IgG的培養上清係使用表現人類CD3εγ的黏附Ba/F3細胞或不表現人類CD3εγ的黏附Ba/3細胞藉由細胞-ELISA，來篩選製造特異性結合至人類CD3εγ的抗體的純株(圖22)。純株也使用表現食蟹猴CD3εγ的黏附Ba/F3細胞藉由細胞-ELISA，來評估與猴CD3εγ的交叉反應性(圖22)。

【0362】 10.2. 製備抗-人類及抗-食蟹猴CD3ε嵌合抗體

自各融合瘤細胞使用RNeasy Mini Kits (Qiagen N.V.)抽出總RNA，且使用SMART RACE cDNA Amplification Kit (BD Biosciences)合成cDNA。所製備的cDNA使用於PCR以將抗體可變區基因插入至選殖載體。各DNA片段的核苷酸序列係使用BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Inc.)及DNA定序儀ABI PRISM 3700 DNA Sequencer (Applied Biosystem, Inc.)根據其所包含的指示手冊中所述的方法來決定。CE115 H鏈可變域(SEQ ID NO: 162)及CE115 L鏈可變域(SEQ ID NO: 163)的CDR及FR係根據Kabat編號決定。

【0363】 編碼含有連接至人類抗體IgG1鏈恆定域的大鼠抗體H鏈可變域的嵌合抗體H鏈的基因，以及編碼含有連接至人類抗體κ鏈恆定域的大鼠抗體L鏈可變域的嵌合抗體L鏈的基因整合至用於動物細胞的表現載體。所製備的表現載體係用於CE115嵌合抗體的表現及純化(參考例9)。

【0364】 10.3. 製備EGFR_ERY22_CE115

其次，針對癌抗原(EGFR)的IgG係使用作為骨架以製備具有一個Fab以CD3ε-結合域取代之形式的分子。此操作中，使用針對FcgR(Fcγ受體)具有減弱活性的靜默Fc，如上所述情況，作為骨架IgG的Fc。構成西妥昔單抗(cetuximab)的可變區的西妥昔單抗-VH(SEQ ID NO: 164)及西妥昔單抗-VL(SEQ ID NO: 165)係使用作為EGFR-結合域。藉由刪除C-終端的Gly及Lys由IgG1衍生的G1d，藉由導入

D356K和H435R突變由G1d衍生的A5、及藉由導入K493E突變由G1d衍生的B3，使用作為抗體H鏈恆定區，且根據參考例9的方法各與西妥昔單抗-VH組合以製備西妥昔單抗-VH-G1d (SEQ ID NO: 166)、西妥昔單抗-VH-A5 (SEQ ID NO: 167)及西妥昔單抗-VH-B3 (SEQ ID NO: 168)。當抗體H鏈恆定域係指定為H1，對應至具有西妥昔單抗-VH作為可變域的抗體H鏈的序列係由西妥昔單抗-VH-H1表示。

【0365】 此全文中，胺基酸的改變係由，例如，D356K表示。第1個字元(其對應於D356K中的D)意指表示改變前的胺基酸殘基的一字元編碼的字元。接於該字元之後的數字(其對應於D356K中的356)意指此經改變殘基的EU編號位置。最後的字元(其對應於D356K中的K)意指表示改變後的胺基酸殘基的一字元編碼的字元。

【0366】 EGFR_ERY22_CE115 (圖23)藉由針對EGFR的Fab的VH域及VL域之間的交換而製備。具體地，藉由所屬技術領域中具有通常知識者一般習知的方法，如PCR，使用具有如前述方法相同方式添加之合適序列的引子，製備具有編碼EGFR ERY22_Hk (SEQ ID NO: 169)、EGFR ERY22_L (SEQ ID NO: 170)、CE115_ERY22_Hh (SEQ ID NO: 171)、或CE115_ERY22_L (SEQ ID NO: 172)的各多核苷酸插入物的一系列表現載體。

【0367】 表現載體以下述組合轉移至FreeStyle 293-F細胞，其中各感興趣分子係瞬時表現：

感興趣的分子：EGFR_ERY22_CE115

由表現載體中插入的多核苷酸所編碼的多肽：EGFR ERY22_Hk、EGFR ERY22_L、CE115_ERY22_Hh及CE115_ERY22_L

【0368】 10.4. EGFR_ERY22_CE115的純化

所獲得之培養上清添加至抗FLAG M2管柱(Sigma-Aldrich Corp.)，且清洗該

管柱，接著以0.1 mg/mL FLAG肽(Sigma-Aldrich Corp.)沖提。含有感興趣的分液添加至HisTrap HP管柱(GE Healthcare Japan Corp.)，且清洗該管柱，接著以咪唑的濃度梯度沖提。含有感興趣分子的分液藉由超過濾濃縮。然後，此分液添加至Superdex 200管柱(GE Healthcare Japan Corp.)。自沖提物僅回收單體分液以獲得經純化的感興趣分子各者。

【0369】 10.5. 使用人類周邊血液單核細胞測量細胞毒性活性

10.5.1. 人類周邊血液單核細胞(PBMC)溶液的製備

50mL的周邊血液使用預先填充有100μL的1,000單位/mL的肝素溶液的注射管(Novo-Heparin 5,000單位注射用，Novo Nordisk A/S)自各健康志願者(成人)收集。周邊血液以PBS(-)稀釋2-倍後分為四個等分，然後將其添加至預先填充15 mL的Ficoll-Paque PLUS且事先經離心的 Leucosep淋巴球分離管(Cat. No. 227290, Greiner Bio-One GmbH)。分離管離心後(2,150rpm，10分鐘，室溫)，分離出單核細胞分液層。單核細胞分液中的細胞以含有10% FBS的Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma-Aldrich Corp；後文中稱為10% FBS/D-MEM)清洗一次。然後，細胞以10% FBS/D-MEM調整為細胞密度4×10^6細胞/mL。由此所製備的細胞溶液於後續測試中使用作為人類PBMC溶液。

【0370】 10.5.2. 測量細胞毒性活性

細胞毒性活性係使用xCELLigence實時細胞分析儀(Roche Diagnostics)基於細胞生長抑制率而評估。所使用的靶細胞為藉由強迫SK-HEP-1細胞株表現EGFR所建立的SK-pca13a細胞株。SK-pca13a自盤解離且以100 μL/孔(1×10^4細胞/孔)接種至E-Plate 96孔盤(Roche Dianostics)，使用xCELLigence實時細胞分析儀以開始活細胞測試。於次日， 從xCELLigence實時細胞分析儀將盤取出，且50μL之經調整至各濃度(0.004、0.04、0.4及4nM)的各抗體添加至盤。於室溫反應15分鐘後，對其添加於前述段落10.5.1所製備的人類PBMC溶液50μL (2×10^5細胞/孔)。此盤

重新裝載至xCELLigence實時細胞分析儀以開始活細胞測試。反應於5% CO_2及37°C的條件實施。添加人類PBMC72小時後，根據下文給定的表現由細胞指標值決定細胞生長抑制率(%)。此計算中，在添加定義為1的抗體之前立即對細胞指標值進行校正後的數值使用作為細胞指標值。

細胞生長抑制率(%) = (A-B) × 100/(A-1)，其中

A表示無補充抗體(僅有靶細胞及人類PBMC)的孔的平均細胞指標值，且B表示補充有各抗體的孔的平均細胞指標值。測試進行三重複。

【0371】 含有CE115的EGFR_ERY22_CE115的細胞毒性活性係以自人類血液所製備的PBMC作為效應子細胞來測量。因此，確認非常強的活性(圖24)。

【0372】 [參考例11] 用於製備結合至CD3及第二抗原的抗體的抗體改變

11.1. 能結合至第二抗原的肽的插入位點及長度的研究

進行研究以獲得能經由一可變區(Fab)結合至癌抗原及經由其他可變區結合至第一抗原CD3及第二抗原，但不能同時結合至CD3及第二抗原的雙結合Fab分子。根據參考例9，GGS肽插入至該CD3ε-結合抗體CE115的重鏈環以製備於一個Fab具有EGFR-結合域以及於其他Fab具有CD3-結合域的各異源二倍體化抗體。

【0373】 具體地，製備在CDR2的K52B及S52c之間具有GGS插入的EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_CE31 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L (SEQ ID NO: 169/170/173/172)、於此位置具有GGSGGS肽(SEQ ID NO: 175)插入的EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_CE32 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L (SEQ ID NO: 169/170/174/172)以及於此位置具有GGSGGSGGS肽(SEQ ID NO: 177)插入的EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_CE33 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L(SEQ ID NO: 169/170/176/172)。類似地，製備於FR3的D72及D73（環）之間具有GGS插入的EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_CE34 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L (SEQ ID NO:

169/170/178/172)，於此位置具有GGSGGS肽(SEQ ID NO: 175)插入的EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_CE35 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L (SEQ ID NO: 169/170/179/172)及於此位置具有GGSGGSGGS肽 (SEQ ID NO: 177)插入的EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_CE36 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L (SEQ ID NO: 169/170/180/172)。此外，製備於CDR3的A99及Y100之間具有GGS插入的EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_CE37 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L (SEQ ID NO: 169/170/181/172)、於此位置具有GGSGGS肽插入的EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_CE38 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L(SEQ ID NO: 169/170/182/172)以及於此位置具有GGSGGSGGS肽插入的EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_CE39 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L(SEQ ID NO: 169/170/183/172)。

【0374】 11.2. 確認GGS-肽插入的CE115抗體對CD3ε的結合

所製備的抗體各者針對CD3ε的結合活性係使用Biacore T100確認。生物素化CD3ε抗原決定基肽經由鏈黴素固定化至CM5晶片，且對其注射所製備的抗體作為分析物並分析其結合親和性。

【0375】 結果示於表16。CE35、CE36、CE37、CE38及CE39對於CD3ε的結合親和性係相等於親代抗體CE115。此表示結合至第二抗原的肽可插入其等之環。於GGSGGSGGS-插入的CE36或CE39中不減低結合親和性。此表示對該等位點知多達至少9個胺基酸的肽的插入不影響針對CD3ε的結合活性。

【0376】 [表16]

樣品	ka	kd	KD	插入位置	連接子
CE115_M	1.5E+05	9.8E-03	6.7E-08		
CE31	2.3E+05	3.5E-02	1.5E-07	K52b-S52c	GS3
CE32	8.5E+04	1.8E-02	2.1E-07	K52b-S52c	GS6
CE33	4.9E+05	1.1E-01	2.3E-07	K52b-S52c	GS9
CE34	1.1E+05	1.3E-02	1.2E-07	D72-D73	GS3
CE35	1.3E+05	1.1E-02	8.7E-08	D72-D73	GS6
CE36	1.2E+05	1.2E-02	9.9E-08	D72-D73	GS9
CE37	2.2E+05	2.0E-02	9.4E-08	A99-Y100	GS3
CE38	2.0E+05	1.7E-02	8.7E-08	A99-Y100	GS6
CE39	1.6E+05	1.4E-02	9.1E-08	A99-Y100	GS9

【0377】 該等結果顯示能結合CD3及第二抗原，但不同時結合至該等抗原的抗體可藉由使用這種經插入肽的CE115，以獲得結合至第二抗原的抗體來製備。

此全文中，可根據所屬技術領域中具有通常知識者習知的方法，如定點突變(Kunkel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1985)82, 488-492)或重疊延長PCR (overlap extension PCR)，藉由隨機改變用於插入或取代的肽的胺基酸序列，且根據前述方法比較各經改變的形式的結合活性等，來決定允許感興趣的活性發揮的插入或取代位點，甚至在胺基酸序列及此位點的胺基酸類型及長度的改變後，來製備庫。

【0378】 [參考例12] 設計用於獲得結合至CD3及第二抗原的抗體的庫

12.1. 用於獲得結合至CD3及第二抗原的抗體庫(亦稱為Dual Fab庫)

於選擇CD3 (CD3ε)作為第一抗原的情況中，用於獲得結合至CD3 (CD3ε)及任意第二抗原的抗體的方法包括下述6種方法：

1. 涉及將結合至第二抗原的肽或多肽插入至結合至第一抗原的Fab域的方法(此方法包括示於WO2016076345A1的實施例3或4的肽插入(或，以及說明於Angew Chem Int Ed Engl. 2013 Aug 5; 52(32): 8295-8的G-CSF插入方法)，其中結

合肽或多肽可自肽或多肽-展示庫獲得，或可使用天然存在的蛋白質的全體或一部份；

2.涉及製備抗體庫而使得各種胺基酸呈現位置允許如WO201607635A1的實施例5所示之Fab環的較長長度(延長)的改變，且藉由使用針對該抗原的結合活性作為指標而自抗體庫獲得具有針對任意的第二抗原的結合活性的Fab的方法；

3.涉及藉由使用由之前已知結合至CD3的Fab域藉由定點突變所製備的抗體，來鑑定維持結合活性的胺基酸，且自抗體庫獲得具有針對任意第二抗原的結合活性的Fab，其中該經鑑定的胺基酸藉由使用針對該抗原的結合活性作為指標而呈現的方法；

4.進一步涉及製備抗體庫使得各種胺基酸呈現位置允許Fab環的較長長度(延長)的改變，且藉由使用針對該抗原的結合活性作為指標而自抗體庫獲得具有針對任意的第二抗原的結合活性的Fab的方法3；

5.進一步涉及改變抗體使得糖基化序列(例如，NxS及NxT其中x為P以外的胺基酸)呈現添加至其可由糖鏈受體辨識的糖鏈(例如，對其添加高-甘露糖-型糖鏈且藉此可為高-甘露糖受體所辨識；已知高-甘露糖-型糖鏈可藉由於抗體表現時添加幾夫鹼(kifunensine)而獲得(mAbs. 2012 Jul-Aug; 4(4): 475-87))的方法1、2、3或4；以及

6.進一步涉及對其添加經由共價鍵各結合至第二抗原的域(由TLR促效劑所典型化的多肽、糖鏈及核酸)，藉由插入Cys、Lys或非天然胺基酸至環或發現可改變為各種胺基酸的位點或以Cys、Lys或非天然胺基酸取代該等位點 (此方法係藉由藥物接合物典型化的方法且為用於經由共價鍵結合至Cys、Lys或非天然胺基酸的方法(揭示於mAbs 6: 1, 34-45; January/February 2014; WO2009/134891 A2; 及Bioconjug Chem. 2014 Feb 19; 25(2): 351-61)) 的方法1、2、3或4。

結合至第一抗原及第二抗原，但不同時結合至該等抗原的雙結合Fab係藉由

使用該等方法知任何者而獲得，且可藉由所屬技術領域中具有通常知識者習知的方法，例如，常見L鏈、CrossMab、或Fab臂交換，與結合至任意的第三抗原的域組合。

【0379】 12.2. 使用定點突變製備CD3(CD3ε)-結合抗體的單胺基酸改變抗體(one-amino acid alteration antibody)。

VH域CE115HA000 (SEQ ID NO: 184)及VL域GLS3000 (SEQ ID NO: 185)選擇作為用於CD3 (CD3ε)-結合抗體的模板序列。根據參考例9，各域於推定參與抗原結合的位點接受胺基酸改變。而且，pE22Hh(衍生自天然IgG1 CH1的序列和藉由L234A、L235A、N297A、D356C、T366S、L368A及Y407V的改變、C-終端GK序列的刪除、以及DYKDDDDK序列(SEQ ID NO: 200)的加成的後續序列；SEQ ID NO: 186)使用作為H鏈恆定域，且κ鏈(SEQ ID NO: 187)使用作為L鏈恆定域。改變位點示於表17。對於CD3 (CD3ε)-結合活性評估，獲得作為單臂抗體的單胺基酸改變抗體各者(缺乏一個Fab域的天然發生的IgG抗體)。具體地，於H鏈改變的情況，連接至恆定域pE22Hh的經改變H鏈和Kn010G3(具有C220S、Y349C、T336W及H435R改變之由位置216至C終端的天然發生的IgG1胺基酸序列；SEQ ID NO: 188)使用作為H鏈，以及於3’側連接至κ鏈的GLS3000使用作為L鏈。於L鏈改變的情況，於3’側連接至κ鏈的經改變L鏈使用作為L鏈，且於3’側連接至pE22Hh的CE115HA000和Kn010G3使用作為H鏈。該等序列於FreeStyle 293細胞中表現及純化(其應用參考例9的方法)。

【0380】 [表17]

H 鏈改變位點

| 域 | FR1 | | | | | | | | | | | CDR1 | | | | | | | | | | |

【0381】 12.3. 評估單胺基酸改變抗體對CD3的結合

於段落12.2中構築、表現且純化的一胺基酸改變形式各者，使用Biacore T200(GE Healthcare Japan Corp.)評估。合適量的CD3ε同源二倍體蛋白質藉由胺偶合方法固定化至感測晶片 CM4 (GE Healthcare Japan Corp.)。然後，具有合適濃度的抗體係注射至其作為分析物且允許於感測晶片上與CD3ε同源二倍體蛋白質交互作用。然後，感測晶片係藉由注射10 mmol/L甘胺酸-HCl (pH 1.5)再生。測試於25°C進行，以及HBS-EP+ (GE Healthcare Japan Corp.)使用作為運行緩衝液。由測試結果，使用用於測試中所獲得的已結合量及感測圖的單一循環動力學模型(1:1結合RI+0)來計算該解離常數K_D(M)。使用Biacore T200評估軟體(GE Healthcare Japan Corp.)計算各參數。

【0382】 12.3.1. H鏈的改變

表18顯示經結合之各H鏈改變形式的量和經結合之對應的未改變抗體CE115HA000的量的比例結果。具體地，當包含經結合的CE115HA000的抗體的量定義為X，且經結合的H鏈單胺基酸改變形式的量定義為Y，使用Z(經結合的量的比例)=Y/X值。如圖25所示，於感測圖中對於小於0.8的Z觀察到非常小量的結合，建議解離常數K_D(M)無法正確地計算。表19顯示各H鏈改變形式對CE115HA000的解離常數K_D(M)的比例(=CE115HA000的KD值/改變形式的KD值)。

當示於表18的Z為0.8或更大時，認為改變形式相對於對應的未改變抗體CE115HA000係維持結合。因此，設計抗體庫使得該等胺基酸呈現可作為Dual Fab庫。

【0383】 [表18]

| 域 | FR1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | CDR1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | FR2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

【0384】 [表19]

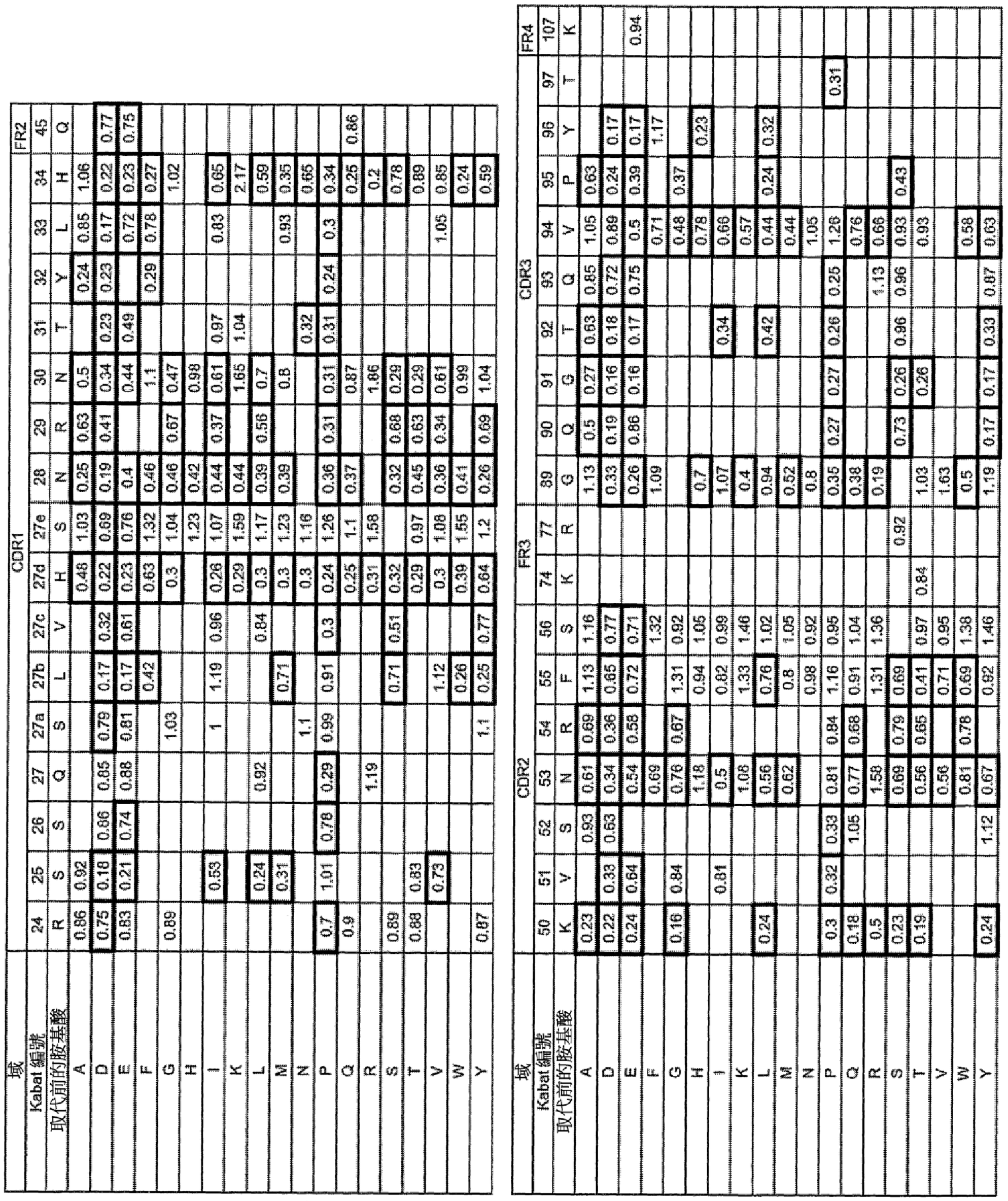
| 域 | FR1 | | | | | | | | | | | CDR1 | | | | | | | | | | | FR2 | | | | | | | | | | | CDR2 | | | | | | | | | | | FR3 | | | | | | | | | | | | CDR3 | | | | | | | | | | | FR4 | | | | | | | | | | |
|---|---|---

【0385】 12.3.2. L鏈改變

表20顯示經結合之各L鏈改變形式的量與經結合之對應的未改變抗體GLS3000的量的比例結果。具體地，當含有經結合的GLS3000的抗體的量定義為X以及經結合的L鏈單胺基酸改變形式的量定義為Y，使用Z(經結合的量的比例)=Y/X的值。如示於圖25，於感測圖中對於小於0.8的Z觀察到非常小量的結合，建議解離常數K_D(M)無法正確地計算。表21顯示各H鏈改變形式對GLS3000的解離常數K_D(M)的比例。

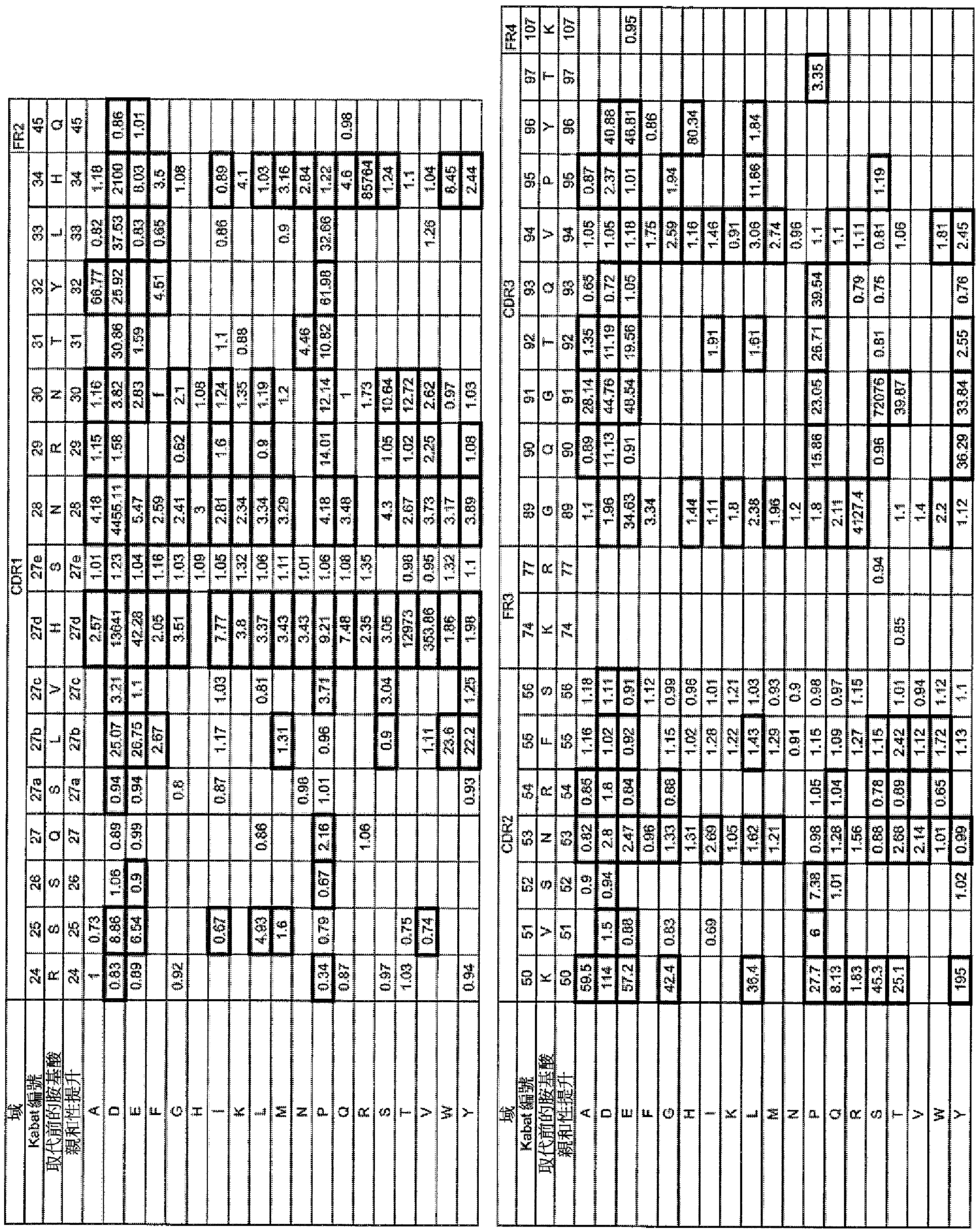
當示於表20的Z為0.8或更大時，認為改變形式相對於對應的未改變抗體GLS3000係維持結合。因此，設計抗體庫使得該等胺基酸呈現可作為Dual Fab庫。

【0386】 [表20]



| 域 | | |

【0387】 [表21]



| 域 | CDR1 | | | | | | | | | | | | | | FR2 | | | | | | | | | | | | | |

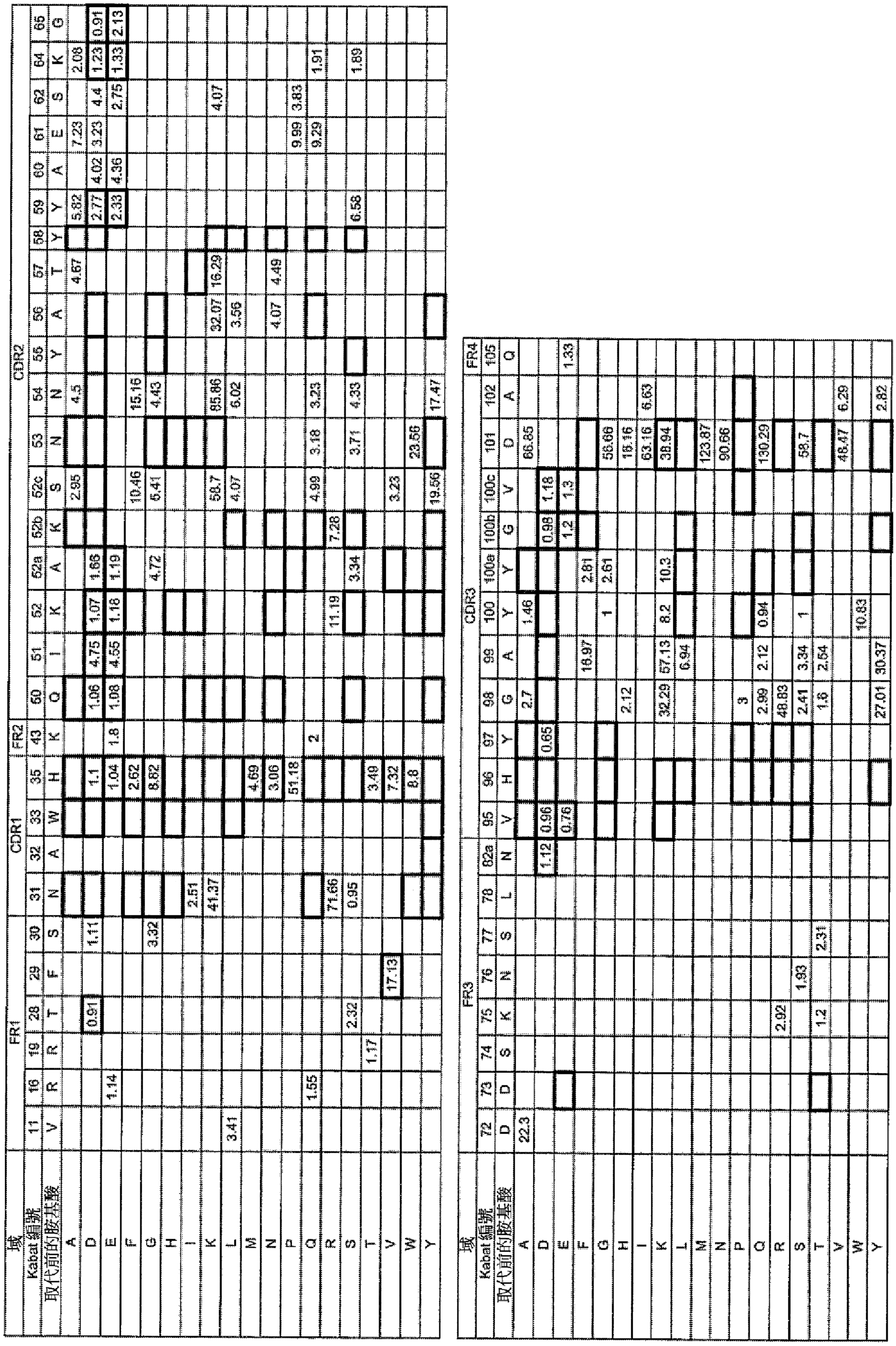
【0388】　12.4. 評估單胺基酸改變抗體對ECM (extracellular matrix，細胞外基質)的結合

ECM (細胞外基質)係細胞外組份且位在活體內各種位點。因此，強力地結合至ECM的抗體已知於血液中具有較差的動力學(較短的半衰期)(WO2012093704 A1)。因此，不增強ECM結合的胺基酸係較佳選擇作為呈現於抗體庫中的胺基酸。

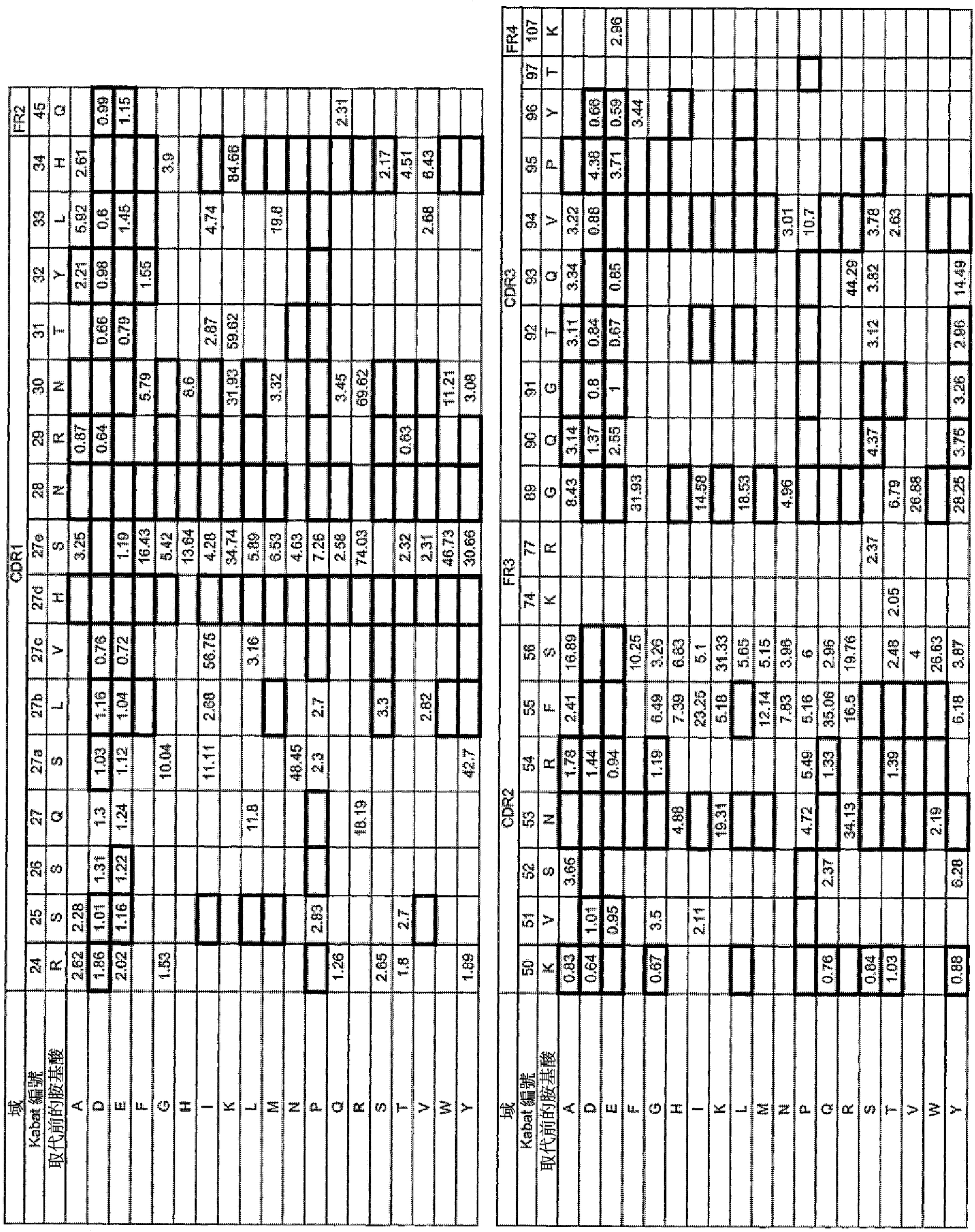
【0389】　藉由描述於參考例1.2的方法獲得為H鏈或L鏈改變形式的各抗體。其次，其ECM結合係根據參考例14的方法評估。改變形式各者的ECM結合值(ECL反應)係除以由相同盤中或相同執行日所獲得的抗體MRA (H鏈：SEQ ID NO: 189，L鏈：SEQ ID NO: 190)的ECM結合值，且所得值係示於表22 (H鏈)及表23 (L鏈)。如示於表22及23，確認一些改變具有增強ECM結合的傾向。

示於表22 (H鏈)及表23 (L鏈)的值中，考慮藉由複數的改變之增強ECM結合的功效，有效值多至10倍係適用至Dual Fab庫。

【0390】 [表22]


域
Kabat 編號
取代前的胺基酸
A
D
E
F
G
H
I
K
L
M
N
P
Q
R
S
T
V
W
Y
FR1
CDR1
FR2
CDR2
FR3
CDR3
FR4

【0391】 [表23]



【0392】 12.5. 研究用於增強庫的多樣性之肽的插入位點及長度

參考例11顯示可使用GGS序列，來將肽插入至各位點而不取消結合至CD3(CD3ε)。若環延長對於Dual Fab庫係可能的，所得庫可包括更多類型的分子

(或具有較大的多樣性)且允許獲得結合至多樣第二抗原的Fab域。因此，考慮到由肽插入所引起的假定結合活性的減低，V11L/D72A/L78I/D101Q改變以增強針對CD3ε的結合活性係加成至CE115HA000序列，其進一步連接至pE22Hh。藉由插入GGS連接子至此序列來製備分子，如參考例11，且評估其CD3結合。GGS序列係插入至Kabat編號位置99及100之間。以單臂抗體表現抗體分子。具體地，上述含有GGS連接子的H鏈及Kn010G3 (SEQ ID NO: 188)使用作為H鏈，且連接至κ鏈(SEQ ID NO: 187)的GLS3000 (SEQ ID NO: 185)使用作為L鏈。該等序列根據參考例9表現及純化。

【0393】 12.6. 確認經插入GGS肽的CD115抗體對CD3的結合

經插入GGS肽的改變抗體對CD3ε的結合係使用Biacore藉由揭示於參考例11的方法予以確認。如示於表24，結果展現GGS連接子可插入至環。特別地，GGS連接子能插入至H鏈CDR3區，其對於抗原結合為重要的，且維持對CD3ε的結合，如任何3-、6-或9-胺基酸插入之一者的結果。雖然此研究係使用GGS連接子進行，抗體庫中除GGS以外的各種胺基酸呈現是可接受的。

【0394】 [表24]

插入的胺基酸序列 (99-100)	CD3_KD [M]
GGS	6.31E-08
GGSGGS (SEQ ID NO:175)	3.46E-08
GGSGGS (SEQ ID NO:175)	3.105E-08
GGSGGGS (SEQ ID NO:191)	4.352E-08
GGSGGGS (SEQ ID NO:191)	3.429E-08
GGGSGGGS (SEQ ID NO:192)	4.129E-08
GGGSGGGS (SEQ ID NO:192)	3.753E-08
GGSGGSGGS (SEQ ID NO:177)	4.39E-08
GGSGGSGGS (SEQ ID NO:177)	3.537E-08
無插入	6.961E-09
CE115HA000	1.097E-07

【0395】 12.7. 研究使用NNS核苷酸序列對於庫之H鏈CDR3的插入

段落12.6顯示可使用GGS連接子插入3、6或9個胺基酸，且推知可藉由使用

由噬菌體展示方法典型化的通常抗體獲得方法製備具有3-、6-或9-胺基酸插入的庫，以獲得結合至第二抗原的抗體。因此，進行研究是否6-胺基酸插入至CDR3可維持對CD3的結合，即使各種胺基酸使用NNS核苷酸序列(其允許每種類型的胺基酸呈現)呈現於6-胺基酸插入。考慮到假定結合活性減低，使用NNS序列設計引子使得6個胺基酸插入至具有比CE115HA000還高的CD3ε-結合活性的CE115HA340序列(SEQ ID NO: 193)的CDR3的位置99及100之間(Kabat編號)。以單臂抗體表現抗體分子。

【0396】 具體地，上述的改變H鏈及Kn010G3 (SEQ NO ID: 188)使用作為H鏈，且連接至κ鏈(SEQ ID NO: 185)的GLS3000 (SEQ ID NO: 187)採用作為L鏈。該等序列根據參考例9表現及純化。所獲得的改變抗體藉由描述於參考例12.6的方法評估其結合。結果示於表25。結果展現維持針對CD3 (CD3ε)的結合活性，即使各種胺基酸呈現於以胺基酸延長的位點。表26顯示藉由描述於參考例10的方法進一步評估於非特異性結合的增強的存在或不存在。因此，若CDR3的延長環係富含具有正電荷側鏈的胺基酸，則對ECM的結合係增強的。因此，期望於環中應不呈現三個或更多個具有正電荷側鏈的胺基酸。

【0397】 [表25]

		CDR 3																			
VH	CD3_KD[M]	9					1	0													
CE115HA340	2.0E-08	5	6	7	8	9	0	a	b	c	d	e	f	g	h	i	k	1	1	1	2
CE115HA340	2.7E-08	V	H	Y	A	A	X	X	X	X	X	X	Y	Y	G	V	-	-	D	A	
NNS6f17	7.4E-08	.	.	.	.	.	W	G	E	G	V	V	.	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f27	3.8E-08	.	.	.	.	.	V	W	G	S	V	W	.	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f29	9.0E-08	.	.	.	.	.	I	Y	Y	P	T	N	.	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f47	3.1E-08	.	.	.	.	.	H	F	M	W	W	G	.	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f50	7.1E-08	.	.	.	.	.	L	T	G	G	L	G	.	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f51	3.1E-08	.	.	.	.	.	G	F	L	V	L	W	.	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f52	5.2E-08	.	.	.	.	.	Y	M	L	G	L	G	.	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f54	2.9E-08	.	.	.	.	.	F	E	W	V	G	W	.	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f55	3.1E-08	.	.	.	.	.	A	G	R	W	L	A	.	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f56	2.1E-08	.	.	.	.	.	R	E	A	T	R	W	.	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f58	4.4E-08	.	.	.	.	.	S	W	Q	V	S	R	.	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f59	2.0E-07	.	.	.	.	.	L	L	V	Q	E	G	.	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f62	6.1E-08	.	.	.	.	.	N	G	G	T	R	H	.	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f63	6.9E-08	.	.	.	.	.	G	G	G	G	W	V	.	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f64	7.8E-08	.	.	.	.	.	L	V	S	L	T	V	.	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f67	3.6E-08	.	.	.	.	.	G	L	L	R	A	A	.	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f68	4.5E-08	.	.	.	.	.	V	E	W	G	R	W	.	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f71	5.1E-08	.	.	.	.	.	G	W	V	L	G	S	.	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f72	1.5E-07	.	.	.	.	.	E	G	I	W	W	G	.	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f73	2.6E-08	.	.	.	.	.	W	V	V	G	V	R	.	.	.	.	.	.	.	.	

【0398】 [表26]

				CDR 3																			
H鏈	ECL反應		比例	9					1	0													
	ECM 3 μg/ml	MRA	ECM vs MRA	5	6	7	8	9	0	a	b	c	d	e	f	g	h	i	k	1	1	2
CE115HA340	394	448	0.9	V	H	Y	A	A	X	X	X	X	X	X	Y	Y	G	V	-	-	D	A
NNS6f17	409	448	0.9	.	.	.	.	.	W	G	E	G	V	V	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f27	3444	448	7.7	.	.	.	.	.	V	W	G	S	V	W	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f29	481	448	1.1	.	.	.	.	.	I	Y	Y	P	T	N	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f47	94137	448	210.3	.	.	.	.	.	H	F	M	W	W	G	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f50	385	564	0.7	.	.	.	.	.	L	T	G	G	L	G	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f51	20148	564	35.7	.	.	.	.	.	G	F	L	V	L	W	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f52	790	564	1.4	.	.	.	.	.	Y	M	L	G	L	G	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f54	1824	564	3.2	.	.	.	.	.	F	E	W	V	G	W	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f55	14183	564	25.1	.	.	.	.	.	A	G	R	W	L	A	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f56	6534	564	11.6	.	.	.	.	.	R	E	A	T	R	W	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f58	2700	564	4.8	.	.	.	.	.	S	W	Q	V	S	R	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f59	388	564	0.7	.	.	.	.	.	L	L	V	Q	E	G	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f62	554	564	1.0	.	.	.	.	.	N	G	G	T	R	H	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f63	624	564	1.1	.	.	.	.	.	G	G	G	G	W	V	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f64	603	564	1.1	.	.	.	.	.	L	V	S	L	T	V	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f67	1292	564	2.3	.	.	.	.	.	G	L	L	R	A	A	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f68	2789	564	4.9	.	.	.	.	.	V	E	W	G	R	W	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f71	618	564	1.1	.	.	.	.	.	G	W	V	L	G	S	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f72	536	564	0.9	.	.	.	.	.	E	G	I	W	W	G	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f73	2193	564	3.9	.	.	.	.	.	W	V	V	G	V	R	.	.	.	.	.	.	.	.

【0399】 12.8. Dual Fab庫的設計與構築

基於描述於參考例12的研究，用於獲得結合至CD3及第二抗原的抗體的抗體庫(Dual Fab庫)係如下述設計：

步驟1：選擇維持結合至CD3 (CD3ε)的能力的胺基酸(以確保CD115HA000結合至CD3的量的80%或更多)；

步驟2：選擇ECM結合相較於改變前保持於MRA的10倍以內者的胺基酸；及

步驟3：插入6個胺基酸至H鏈CDR3中位置99及100(Kabat編號)之間。

可僅藉由施行步驟1而將Fab的抗原-結合位點多樣化而。因此，所得之庫可使用於鑑定結合至第二抗原的抗原結合分子。可僅藉由施行步驟1及3而將Fab的

抗原-結合位點多樣化。因此，所得之庫可使用於鑑定結合至第二抗原的抗原結合分子。甚至無步驟2的庫設計允許對所獲得之分子測試及評估ECM結合。

【0400】 因此，對於Dual Fab庫，藉由對FR(framework，框架)加成V11L/L78I突變且如表27所示地進一步將CDR多樣化而衍生自CE115HA000的序列使用作為H鏈，且如表28所示地藉由將CDR多樣化而衍生自GLS3000的序列使用作為L鏈。該等抗體庫片段可藉由所屬技術領域中具有通常知識者所習知的一般DNA合成方法來合成。Dual Fab庫可製備為(1)H鏈如表27所示地被多樣化而L鏈係固定為原始序列GLS3000或具有如參考例12所述之增強的對CD3ε結合的L鏈的庫；(2)H鏈固定為原始序列(CE115HA000)或具有如參考例1所述之具有增強的CD3ε結合的H鏈而L鏈如表28所示地被多樣化的庫，以及(3)H鏈如表27所示地被多樣化而L鏈如表28所示地被多樣化的庫。藉由對FR(框架)加成V11L/L78I突變且如表27所示地進一步將CDR多樣化而衍生自CE115HA000的序列係委託DNA合成公司DNA2.0公司，以獲得抗體庫片段(DNA片段)。所獲得的抗體庫片段插入至用於藉由PCR擴增之噬菌體展示的噬粒。選擇GLS3000作為L鏈。所構築之用於噬菌體展示的噬粒藉由電穿孔法轉移至大腸桿菌，以製備帶有抗體展示片段的大腸桿菌。

基於表28，發明人設計如表29所示之用於GLS300的新多樣化庫。L鏈庫序列衍生自GLS3000且如表29(DNA庫)所示地被多樣化。DNA庫係藉由DNA合成公司構築。然後，將含有各種GLS3000衍生序列的L鏈庫以及含有各種CE115HA000衍生序列的H鏈庫插入噬粒，以構築噬菌體展示庫。

【0401】 [表27]

		CDR 1				CDR 2															CDR 3														
		3	1	2	3	4	5	0	1	2	a	b	c	3	4	5	6	7	8	9	5	6	7	8	9	1	0	a	b	c	d	e	f	g	h	i	1	2
Kabat編號	取代前	N	I	A	W	M	H	S	I	K	D	K	S	N	A	Y	H	Y	G	A	V	H	Y	G	A	G	V	A	K	S	T	Y	Y	G	V	D	A
	庫		N																																		
			S																																		

【0402】 [表28]

域	Kabat編號	取代前	庫
CDR1	2 4 5 6 7 a b c d e 8 9 0 1 2 3	R	R A E G Q Y L Y L A
		S	S D E P T Y Y I I
		S	S Q D E P T Y Y I I
		S	S Q D E P T Y Y I I
		S	S Q E I L V H S N R N T Y L V
		S	S Q E I L V H S N R N T Y L V
		S	S Q E I L V H S N R N T Y L V

【0403】 [表29]

區		CDR1																CDR2																CDR3											
		2	4	R	R	A	E	G	Q	S	T	Y						5	0	K	K													9	0	Q	Q	E							
			5	S	S	A	T												1	V	V															1	G	G								
		3	6	S	S	D		E											2	S	S	A	Q	Y											2	T	T	S							
			7	Q	Q		E												3	Q	Q	A	S												3	Q	Q	A	S						
			8	S	S	A	T												4	V	V	A	D	N	S	T									4	V	V	A	D	N	S	T			
			9	R	R	N	N	T											5	P	P														5	P	P								
			a	S	S	E													6	Y	Y	F													6	Y	Y	F							
			b	L	L														7	T	T														7	T	T								
			c	V	V	L																																							
			d	H	H																																							
			e	S	S	A	G	I	L	M	N		Q	T	V																													
				N	N	F	H	M	Q	Y																																			
				R	R																																							
				N	N																																							
				S	S	A	Q	Y																																					
				V	V																																							
				K	K																																							
				S	S	A	Q	Y																																					
				N	N																																							
				R	R																																							
				F	F																																							
				S	S	G	H	I	L	M	N		Q	T	V	Y																													
				L	L																																							
				H	H	A	G	T	V																																			
				K	K																																							
				V	V

【0404】 [參考例13] 實驗細胞株

人類GPC3基因係藉由所述技術領域具有通常知識者習知的方法整合至小鼠直腸癌細胞株CT-26 (ATCC No.: CRL-2638)，以獲得高表現CT26-GPC3細胞株。使用QIFI kit(Dako)藉由製造商的建議方法測量人類GPC3 (2.3×10^5/細胞)的表現程度。為了維持人類GPC3基因，藉由對CT26-GPC3以200μg/mL添加Geneticin(GIBCO)，將該等重組細胞株培養於ATCC-建議的培養基。培養後，使用2.5 g/L胰蛋白酶-1mM EDTA(nacalai tesque)將該等細胞脫離後，使用於各實驗。轉染細胞株於本文指稱為SKpca60a。

人類CD137基因係藉由所屬技術領域中具有通常知識者習知的方法整合至中國倉鼠卵巢細胞株CHO-DG44的染色體，以獲得高表現CHO-hCD137細胞株。使用PE抗-人類CD137(4-1BB)抗體(BioLegend, Cat. No. 309803)藉由製造商指示，藉由FACS分析來測量人類CD137的表現程度。

NCI-H446及Huh7細胞株係分別維持於RPMI 1640(Gibco)及DMEM(低葡萄糖)。二種培養基皆補充有10%胎牛血清(Bovegen Biologicals)、100 單位/mL 的青黴素及100 μg/mL的鏈黴素，且細胞以5%CO_2培養於37°C。

【0405】 [參考例14] 評估抗體對ECM(細胞外基質)的結合

各抗體對ECM(細胞外基質)的結合係參照WO2012093704 A1藉由下述步驟評估：ECM 酚紅游離(BD Matrigel#356237)以TBS稀釋至2 mg/mL且以 5μL/孔滴加至冰上冷卻之用於ECL測試的盤(L15XB-3, MSD K.K., high bind)的各孔的中心。之後，盤以盤封加蓋且於4°C靜置隔夜。經ECM固定化的盤回至室溫。以150 μL/孔對其添加ECL封阻緩衝液(補充有0.5% BSA及0.05% Tween 20的PBS)，且盤於室溫靜置2小時或更久，或於4°C隔夜。其次，各抗體樣品以PBS-T(補充有0.05% Tween 20的PBS)稀釋至9 μg/mL。二次抗體以ECLDB(補充有0.1% BSA及0.01% Tween 20的PBS)稀釋至2 μg/mL。20 μL的抗體溶液及30μL的二次抗體溶液添加

至含有以10 μL/孔分注的ECLDB的圓底盤的各孔，且於室溫攪拌1小時同時遮蔽光。藉由倒置含有ECL緩衝液的ECM盤以移除ECL封阻緩衝液。對此盤，以50 μL/孔添加上述抗體及二次抗體的混合溶液。之後，盤於室溫靜置1小時同時遮蔽光。藉由將盤倒置以移除樣品後，以150 μL/孔對其添加READ緩衝液(MSD K.K.)，接著藉由使用Sector Imager 2400 (MSD K.K.)的硫-標籤的發光信號偵測。

[參考例15] 抗-GPC3/CD3/人類CD137 三特異性抗體及抗-GPC3/Dual-Fab抗體的脫靶細胞毒性的評估。

(15-1)抗-GPC3/CD3/人類CD137三特異性抗體的製備

為了研究靶獨立性細胞毒性及細胞介素釋放，藉由利用CrossMab及FAE技術(圖2.1)產生三特異性抗體。四價的類IgG分子，其中各臂具有二個結合域而於一個分子中造成四個結合域的抗體A(mAb A)，係如上所述以CrossMab產生。二價IgG，抗體 B (mAb B)係與傳統IgG為相同格式。mAb A 及 mAb B二者的Fc區為對於Fcγ受體具有減弱親和性及去糖基化的FcγR靜默且可應用於FAE。構築六種的三特異性抗體。六種的三特異性抗體中的各Fc區的靶抗原係示於表30。mAb A、mAb B及mAb AB的各結合域的命名原則係示於圖 2.2。mAb A及 mAb B的配對產生六種的三特異性抗體之各者，mAb AB及其SEQ ID NO係分別示於表31及表32。已記載於WO2005/035584A1的抗體CD3D(2)_i121 (簡寫為 AN121)係使用作為抗-CD3ε抗體。所有六種的三特異性抗體係藉由上述記載的方法予以表現及純化。

【0406】 [表 30] 抗體各臂的靶

mAb AB的名稱	Fv A1	Fv A2	Fv B
GPC3/CD137xCD3	Anti-CD137	Anti-CD3ε	Anti-GPC3
GPC3/CD137xCtrl	Anti-CD137	Ctrl	Anti-GPC3
GPC3/CtrlxCD3	Ctrl	Anti-CD3ε	Anti-GPC3
Ctrl/CD137xCD3	Anti-CD137	Anti-CD3ε	Ctrl
Ctrl/CD137xCtrl	Anti-CD137	Ctrl	Ctrl
Ctrl/CtrlxCD3	Ctrl	Anti-CD3ε	Ctrl

【0407】 [表31]

mAb AB 的名稱	mAb A對產生 mAb AB的名稱	VHA1 (SEQ ID NO)	VLA1 (SEQ ID NO)	VHA2 (SEQ ID NO)	VLA2 (SEQ ID NO)	mAb B對產生 mAb AB的名稱	VHB (SEQ ID NO)	VLB (SEQ ID NO)
GPC3/CD137xCD3	CD137xCD3	85	86	87	88	GPC3	89	90
GPC3/CD137xCtrl	CD137xCtrl	85	86	Ctrl	Ctrl	GPC3	89	90
GPC3/CtrlxCD3	CtrlxCD3	Ctrl	Ctrl	87	88	GPC3	89	90
Ctrl/CD137xCD3	CD137xCD3	85	86	87	88	Ctrl	Ctrl	Ctrl
Ctrl/CD137xCtrl	CD137xCtrl	85	86	Ctrl	Ctrl	Ctrl	Ctrl	Ctrl
Ctrl/CtrlxCD3	CtrlxCD3	Ctrl	Ctrl	87	88	Ctrl	Ctrl	Ctrl

【0408】 [表32]

VH或VL的名稱	SEQ ID NO	胺基酸序列
CD137 VHA1	85	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWS WIRQSPEKGLEWIGEINHGGYVTYNPSLESRVTISVD TSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDYGPGNYDWY FDLWGRGTLVTVSS
CD137 VLA1	86	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFT LTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPALTFGGGTKVEIK
CD3 VHA2	87	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSNAWMH WVRQAPGKGLEWVAQIKDRANSYNTYYAESVKGRF TISRDDSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYYCRYVHYTTYA GSSFSYGVDAWGQGTTVTVSS
CD3 VLA2	88	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQPLVHSNRNTY LHWYQQKPGQAPRLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCGQGTQVPYTFGQGTK LEIK
GPC3 VHB	89	QVQLVQSGAEVKKPGASVTVSCKASGYTFTDYEMH WIRQPPGEGLEWIGAIDGPTPDTAYSEKFKGRVTLT ADKSTSTAYMELSSLTSEDTAVYYCTRFYSYTYWGQ GTLVTVSS
GPC3 VLB	90	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQPLVHSNRNTY LHWYQQKPGQAPRLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCGQGTQVPYTFGQGTK LEIK

(15-2) GPC3/CD3/人類 CD137三特異性抗體的結合的評價

三特異性抗體對CD3及CD137的結合親和性係使用Biacore T200儀器(GE Healthcare)於37°C予以評估。抗人類Fc抗體 (GE Healthcare)係使用胺偶合套組(GE Healthcare)固定至CM4感測晶片的所有流通槽。抗體經捕捉於抗-Fc感測器表面，然後將重組人類CD3或CD137注射至流通槽。所有抗體及分析物係於含有20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% Tween 20、0.005% NaN3的ACES pH 7.4中

製備。各循環以3M $MgCl_2$再生感測器表面。結合親和性使用Biacore T200評估軟體，版本2.0(GE Healthcare)，藉由處理及擬合數據至1:1結合模型而決定。

三特異性抗體對重組人類CD3及CD137的結合親和性係示於表33。.

【0409】 [表 33]

Ab 名稱	CD137			CD3		
	ka ($M^{-1}s^{-1}$)	kd (s^{-1})	KD (M)	ka ($M^{-1}s^{-1}$)	kd (s^{-1})	KD (M)
GPC3/CD137xCD3	5.47E+05	2.06E-02	3.77E-08	8.18E+04	1.61E-03	1.97E-08
GPC3/CD137xCtrl	5.72E+05	2.04E-02	3.57E-08	無結合		
GPC3/CtrlxCD3	無結合			8.50E+04	1.51E-03	1.78E-08
Ctrl/CD137xCD3	5.48E+05	1.82E-02	3.31E-08	8.24E+04	1.52E-03	1.85E-08
Ctrl/CD137xCtrl	5.59E+05	1.79E-02	3.21E-08	無結合		
Ctrl/CtrlxCD3	無結合			8.37E+04	1.47E-03	1.75E-08

(15-3) GPC3/CD137xCD3三特異性抗體及抗-GPC3/Dual-Fab對人類CD137及CD3的同時結合的評價

進行Biacore串聯阻斷測試以特徵化三特異性抗體或Dual-Fab抗體對於CD3及CD137二者的同時結合。測試係於Biacore T200 儀器(GE Healthcare)於25°C於含有20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% Tween 20、0.005% NaN3的ACES pH 7.4ACES pH 7.4的緩衝液中實施。抗-人類Fc抗體(GE Healthcare)係使用胺偶合套組 (GE Healthcare)固定至CM4感測晶片的所有流通槽。抗體經捕捉於抗-Fc感測器表面，然後將8 μM CD3注射至流通槽，接著於8 μM CD3存在的情況下同樣的注射8 μM CD137。對於第二次注射的結合反應增加，表示結合至不同抗體對位(paratope)而因此為同時結合的交互作用；而對於第二次注射的結合反應無增強或減低，則表示結合至相同或重疊或相鄰的抗體對位，因此為非同時結合的交互作用。

【0410】 此測試的結果示於圖26，其中GPC3/CD137xCD3三特異性抗體而非抗 -GPC3/Dual-Fab抗體顯示對CD3及CD137同時結合的特徵。

【0411】 (15-4) GPC3/CD137xCD3三特異性抗體及抗-GPC3/Dual-Fab抗體對於表現人類CD137的CHO細胞或Jurkat細胞的結合的評價

圖27顯示藉由FACS分析所測定之三特異性抗體及Dual-Fab抗體對於參考例13所產生的hCD137轉染株、親代CHO細胞的結合，或對於表現於Jurkat細胞(參考例6-2)上的hCD3的結合。簡明地，三特異性抗體及Dual-Fab抗體係於室溫與各細胞株培育2小時後以FACS緩衝液(2% FBS、2mM EDTA於PBS中)清洗。然後添加 Goat F(ab')2 抗-人類 IgG、小鼠 ads-PE (Southern Biotech, Cat. 2043-09)且於 4°C 培育30分鐘後以FACS緩衝液清洗。於FACS Verse (Becton Dickinson)進行數據獲得，接著使用FlowJo軟體 (Tree Star)分析。

【0412】 圖27顯示相對於Ctrl抗體(灰色填充)， 50 nM的抗

-GPC3/H183L072 (黑色線)抗體結合至特異性地位於hCD137轉染株上的hCD137(圖27a)，但未觀察到對於CHO親代株的結合(圖27b)。類似地，相對於Ctrl/CtrlxCD3三特異性對照抗體(淡灰色填充)，2 nM的抗-GPC3/CD137xCD3 (深灰色填充)及抗-GPC3/CD137xCtrl (黑色線)三特異性抗體顯示特異性結合至轉染株上的hCD137(圖27c)。於CHO親代細胞未觀察到非特異性結合(圖27d)。

【0413】 相對於其個別的對照組(淡灰色填充)，圖27e中的50 nM的抗-GPC3/H183L072 (黑色線)抗體二者及圖27f中的GPC3/CD137xCD3 (深灰色填充)或 GPC3/CD137xCtrl (黑色線)三特異性抗體顯示結合表現於Jurkat細胞上的CD3。

【0414】 (15-5) GPC3/CD137xCD3三特異性抗體及抗-GPC3/Dual-Fab三特異性抗體之T細胞的CD3活化對於人類GPC3表現細胞的評估

為了研究三特異性抗體及抗-GPC3/Dual-Fab抗體的二種格式是否可以靶依賴性方式活化效應子細胞，根據參考例6-2記載進行NFAT-luc2 Jurkat螢光素酶測試。使用 5.00E+03 SK-pca60細胞(參考例13)作為靶細胞且與 w 2.50E+04 NFAT-luc2 Jurkat細胞於0.1、1及10 nM的三特異性抗體或Dual-Fab抗體存在的情況下共培養24小時。24小時後，以Bio-Glo 螢光素酶檢測系統(Promega, G7940)根據製造商指示偵測螢光素酶活性。使用GloMax(r) Explorer System (Promega #GM3500)偵測發光(單位)且捕捉的值使用Graphpad Prism 7予以作圖。如示於圖28，只有包含抗-GPC3及 抗-CD3二者的結合的三特異性抗體如GPC3/CD137xCD3、GPC3/CtrlxCD3或抗-GPC3/H183L072於靶細胞存在的情況下造成Jurkat細胞的劑量依賴性活化。應注意的是，抗-GPC3/H183L072抗體如同GPC3/CD137xCD3或GPC3/CtrlxCD3抗體，可引發類似程度的Jurkat活化，即便於參考例(15-4)中藉由FACS分析抗-GPC3/H183L072抗體對於Jurkat細胞的結合為較弱的。總結，三特異性抗體及 抗-GPC3/Dual-Fab抗體二者均可造成效應子

細胞的靶依賴性活化(target dependent activation)。.

【0415】 (15-6) GPC3/CD137xCD3三特異性抗體及抗-GPC3/Dual-Fab抗體之T細胞的CD3活化對於人類CD137表現細胞的評估。

為了研究三特異性抗體格式及抗-GPC3/Dual-Fab抗體二者是否可造成hCD137表現細胞對表現hCD3的效應子細胞之交聯，如參考例(15-5)記載，將5.00E+03 hCD137 表現 CHO與 2.50E+04 NFAT-luc2 Jurkat細胞於0.1、1及10 nM的三特異性抗體存在的情況下共培養24小時。圖29顯示當與親代CHO細胞共同培養時，所有三特異性細胞均未非特異性活化Jurkat細胞。然而，觀察到GPC3/CD137xCD3及Ctrl/CD137xCD3三特異性抗體二者於表現hCD137的CHO細胞存在的情況下均可活化Jurkat細胞。抗-GPC3/H183L072抗體當與表現hCD137的CHO細胞共培養時，不造成Jurkat細胞的活化。10nM的抗-GPC3/H183L072抗體顯示的發光強度約為10nM的GPC3/CD137xCD3三特異性抗體的發光強度的約0.96%，以及1 nM的抗-GPC3/H183L072抗體顯示的發光強度約為1 nM的GPC3/CD137xCD3 三特異性抗體的發光強度的約1.93%。當與參考例15-5所評價的針對GPC3陽性細胞的CD3活化相比較時，當使用10 nM或1 nM的抗GPC3/H183L072抗體時，檢測到針對CD137陽性細胞的發光強度約為1.36%或1.89%，儘管相較於針對GPC3陽性細胞的發光，具有10 nM和1 nM的GPC3/CD137xCD3三特異性抗體分別對CD137陽性細胞顯示約127.77%和107.22%的發光。

合併言之，此暗示了三特異性格式GPC3/CD137xCD3，其同時結合至CD3及CD137，可造成獨立於靶或腫瘤抗原結合之針對hCD137表現細胞的Jurkat細胞活化，引起脫靶細胞毒性，不同於不同時結合至CD3及CD137的抗-GPC3/Dual-Fab格式。示於參考例8、15-5及15-6的結果證實僅有不同時結合至CD及CD137的抗體可特異性地殺死抗原表現細胞。

【0416】 (15-7) Ctrl/CD137xCD3 三特異性抗體及Ctrl/Dual-Fab抗體自PBMC的脫靶細胞介素釋放的評估

三特異性抗體格式及Dual-Fab 抗體對於脫靶毒性的比較亦使用人類PBMC溶液予以評估。簡明地，如參考例(7-2-1)記載所製備的2.00E+05 PBMC於缺乏靶細胞的情況下，與 80、16及3.2 nM的三特異性抗體或Dual-Fab抗體共培養48小時。使用如參考例(7-2-2)記載的細胞介素釋放檢測測定上清部分的IL-2、IFNγ及TNFα。如示於圖30， Ctrl/CD137xCD3三特異性抗體可造成IL-2、IFNγ及TNFα自PBMC釋放，而非Ctrl/Dual-Fab抗體。80 nM 的Ctrl/Dual-Fab抗體顯示80 nM的Ctrl/CD137xCD3三特異性抗體的IL-2濃度約為50%，而當使用16 nM的抗體時，IL-2的濃度低於10%。至於IFNγ 及TNFα，在每種抗體濃度下，Ctrl/Dual-Fab抗體的IL-2濃度顯示低於Ctrl/CD137xCD3三特異性抗體的10%。

該等結果暗示Ctrl/CD137xCD3三特異性格式於靶細胞缺乏的情況下造成PBMC的非特異性活化。最終地，數據顯示Dual-Fab格式可賦予靶特異性效應子細胞活化而無脫靶毒性。

[產業可利用性]

【0417】 本發明提供可結合至CD3及CD137(4-1BB)但不同時結合至CD3及CD137的抗原分子。本發明的抗原結合分子經由結合至該三個不同抗原，展現由該等抗原結合分子所誘發之增強的T細胞依賴性細胞毒性活性

【符號說明】

無。

序列表

〈110〉 日本商中外製藥股份有限公司

〈120〉 能夠結合 CD3 及 CD137 但不同時結合兩者的抗原結合分子

〈150〉 JP 2018-185120
〈151〉 2018-09-28

〈150〉 JP 2019-104308
〈151〉 2019-06-04

〈160〉 229

〈170〉 PatentIn version 3.5

〈210〉 1
〈211〉 128
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 1

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

Ala	Gln	Ile	Lys	Asp	Lys	Gly	Asn	Ala	Tyr	Ala	Ala	Tyr	Tyr	Ala	Pro
	50					55					60				

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

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

Tyr Cys His Tyr Val His Tyr Ala Ser Ala Ser Thr Val Leu Pro Ala
100 105 110

Phe Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

〈210〉 2
〈211〉 128
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 2

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Phe Ser Asn Val
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Tyr Asn Ala Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ala Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys His Tyr Val His Tyr Ala Ser Ala Ser Thr Leu Leu Pro Ala
100 105 110

Phe Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

〈210〉 3
〈211〉 128
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Phe Ser Asn Val
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Tyr Asn Ala Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ala Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys His Tyr Ile His Tyr Ala Ser Ala Ser Thr Leu Leu Pro Ala
100 105 110

Phe Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

〈210〉 4
〈211〉 128
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 4

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Phe Ser Asn Val
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Tyr Asn Ala Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys His Tyr Val His Tyr Ala Ser Ala Ser Thr Leu Leu Pro Ala
100 105 110

Phe Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

〈210〉 5
〈211〉 128
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 5

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Asn Val
            20                  25                  30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Trp Asn Ala Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ala Pro
    50                  55                  60

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

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

Tyr Cys His Tyr Ile His Tyr Ala Ser Ala Ser Thr Leu Leu Pro Ala
            100                 105                 110

Glu Gly Ile Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

〈210〉 6
〈211〉 128
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 6

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Phe Ser Asn Val
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Tyr Tyr Asn Ala Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ala Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys His Tyr Val His Tyr Ala Ser Ala Ser Thr Leu Leu Pro Ala
100 105 110

Glu Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 7
<400> 7
000

<210> 8
<211> 128

〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 8

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Phe Ser Asn Thr
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Tyr Tyr Asn Asp Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ala Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys His Tyr Val His Tyr Ala Ser Ala Ser Thr Leu Leu Pro Ala
100 105 110

Glu Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

〈210〉 9
〈211〉 128
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉

〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 9

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Asn Val
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Tyr Asn Ala Tyr Ala Asp Tyr Tyr Ala Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys His Tyr Val His Tyr Ala Ser Ala Ser Thr Leu Leu Pro Ala
100 105 110

Glu Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

〈210〉 10
〈211〉 128
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 10

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Asn Val
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Tyr Asn Ala Tyr Ala Asp Tyr Tyr Ala Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys His Tyr Val His Tyr Ala Ser Ala Ser Thr Leu Leu Pro Ala
100 105 110

Glu Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

〈210〉 11
〈211〉 128
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 11

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Asn Val
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Tyr Tyr Asn Ala Tyr Ala Asp Tyr Tyr Ala Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys His Tyr Val His Tyr Ala Ser Ala Ser Thr Leu Leu Pro Ala
100 105 110

Glu Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

〈210〉 12
〈211〉 128
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 12

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Asn Val
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Trp Asn Ala Tyr Ala Asp Tyr Tyr Ala Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys His Tyr Ile His Tyr Ala Ser Ala Ser Thr Leu Leu Pro Ala
100 105 110

Glu Gly Ile Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

〈210〉 13
〈211〉 128
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 13

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Phe Ser Asn Val
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Tyr Tyr Asn Ala Tyr Ala Gly Tyr Tyr His Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys His Tyr Val His Tyr Ala Ala Ala Ser Thr Leu Leu Pro Ala
100 105 110

Glu Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 14
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 14

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Phe Ser Asn Val
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Tyr Tyr Asn Ala Tyr Ala Gly Tyr Tyr His Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys His Tyr Val His Tyr Ala Ala Ala Ser Gln Leu Leu Pro Ala
100 105 110

Glu Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

〈210〉 15
〈211〉 5
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 15

Asn Ala Trp Met His
1 5

〈210〉 16
〈211〉 5
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 16

Asn Val Trp Met His
1 5

〈210〉 17
〈211〉 5

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 17

Asn Val Trp Met His
1 5

<210> 18
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 18

Asn Val Trp Phe His
1 5

<210> 19
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 19

Asn Val Trp Met His
1 5

<210> 20
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 20

Asn Val Trp Phe His
1 5

<210> 21
<400> 21
000

<210> 22
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 22
Asn Thr Trp Phe His
1 5

<210> 23
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 23
Asn Val Trp Phe His
1 5

<210> 24
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 24

Asn Val Trp Phe His
1 5

<210> 25
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 25

Asn Val Trp Phe His
1 5

<210> 26
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 26

Asn Val Trp Phe His
1 5

<210> 27
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 27

Asn Val Trp Phe His
1 5

<210> 28
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 28

Asn Val Trp Phe His
1 5

<210> 29
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 29

Gln Ile Lys Asp Lys Gly Asn Ala Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ala Pro Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 30
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 30

Gln Ile Lys Asp Lys Tyr Asn Ala Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ala Pro Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 31
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 31

Gln Ile Lys Asp Lys Tyr Asn Ala Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ala Pro Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 32
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 32

Gln Ile Lys Asp Lys Tyr Asn Ala Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Pro Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 33

〈211〉 19
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 33

Gln Ile Lys Asp Lys Trp Asn Ala Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ala Pro Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

〈210〉 34
〈211〉 19
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 34

Gln Ile Lys Asp Tyr Tyr Asn Ala Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ala Pro Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

〈210〉 35
〈400〉 35
000

〈210〉 36
〈211〉 19
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉

<223> 人工合成的序列

<400> 36

Gln Ile Lys Asp Tyr Tyr Asn Asp Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ala Pro Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 37
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 37

Gln Ile Lys Asp Lys Tyr Asn Ala Tyr Ala Asp Tyr Tyr Ala Pro Ser
1 5 10 15

Val Lys Glu

<210> 38
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 38

Gln Ile Lys Asp Lys Tyr Asn Ala Tyr Ala Asp Tyr Tyr Ala Pro Ser
1 5 10 15

Val Glu Gly

〈210〉 39
〈211〉 19
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 39

Gln Ile Lys Asp Tyr Tyr Asn Ala Tyr Ala Asp Tyr Tyr Ala Pro Ser
1 5 10 15

Val Glu Gly

〈210〉 40
〈211〉 19
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 40

Gln Ile Lys Asp Lys Trp Asn Ala Tyr Ala Asp Tyr Tyr Ala Pro Ser
1 5 10 15

Val Lys Glu

〈210〉 41
〈211〉 19
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

<400> 41

Gln Ile Lys Asp Tyr Tyr Asn Ala Tyr Ala Gly Tyr Tyr His Pro Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 42
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 42

Gln Ile Lys Asp Tyr Tyr Asn Ala Tyr Ala Gly Tyr Tyr His Pro Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 43
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 43

Val His Tyr Ala Ser Ala Ser Thr Val Leu Pro Ala Phe Gly Val Asp
1 5 10 15

Ala

〈210〉 44
〈211〉 17
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 44

Val His Tyr Ala Ser Ala Ser Thr Leu Leu Pro Ala Phe Gly Val Asp
1 5 10 15

Ala

〈210〉 45
〈211〉 17
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 45

Ile His Tyr Ala Ser Ala Ser Thr Leu Leu Pro Ala Phe Gly Val Asp
1 5 10 15

Ala

〈210〉 46
〈211〉 17
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 46

Val His Tyr Ala Ser Ala Ser Thr Leu Leu Pro Ala Phe Gly Val Asp
1 5 10 15

Ala

<210> 47
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 47

Ile His Tyr Ala Ser Ala Ser Thr Leu Leu Pro Ala Glu Gly Ile Asp
1 5 10 15

Ala

<210> 48
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 48

Val His Tyr Ala Ser Ala Ser Thr Leu Leu Pro Ala Glu Gly Val Asp
1 5 10 15

Ala

<210> 49
<400> 49

000

<210> 50
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 50

Val His Tyr Ala Ser Ala Ser Thr Leu Leu Pro Ala Glu Gly Val Asp
1 5 10 15

Ala

<210> 51
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 51

Val His Tyr Ala Ser Ala Ser Thr Leu Leu Pro Ala Glu Gly Val Asp
1 5 10 15

Ala

<210> 52
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

〈400〉 52

Val His Tyr Ala Ser Ala Ser Thr Leu Leu Pro Ala Glu Gly Val Asp
1 5 10 15

Ala

〈210〉 53
〈211〉 17
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 53

Val His Tyr Ala Ser Ala Ser Thr Leu Leu Pro Ala Glu Gly Val Asp
1 5 10 15

Ala

〈210〉 54
〈211〉 17
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 54

Ile His Tyr Ala Ser Ala Ser Thr Leu Leu Pro Ala Glu Gly Ile Asp
1 5 10 15

Ala

<210> 55
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 55

Val His Tyr Ala Ala Ala Ser Thr Leu Leu Pro Ala Glu Gly Val Asp
1 5 10 15

Ala

<210> 56
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 56

Val His Tyr Ala Ala Ala Ser Gln Leu Leu Pro Ala Glu Gly Val Asp
1 5 10 15

Ala

<210> 57
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 57

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 Gln Ala Ser Gln Glu Leu Val His Met
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 Pro 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 Ala Gln Gly
85 90 95

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

〈210〉 58
〈211〉 112
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 58

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 Gln Pro Ser Gln Glu Val Val His Met
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 Pro 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 Ala Gln Gly
85 90 95

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

〈210〉 59
〈211〉 112
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 59

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 Gln Pro Ser Gln Glu Val Val His Met
20 25 30

Asn Asn Val Val 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 Pro 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 Ala Gln Gly
85 90 95

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

〈210〉 60
〈211〉 112
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 60

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 Gln Pro Ser Gln Glu Val Val His Met
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 Val Phe Pro 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 Ala Gln Gly
85 90 95

Thr His His Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

〈210〉 61
〈211〉 112
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 61

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 Gln Pro Ser Glu Glu Val Val His Met
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 Leu Phe Pro 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 Ala Gln Gly
85 90 95

Thr His His Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

〈210〉 62
〈211〉 16
〈212〉 PRT

〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 62

Gln Ala Ser Gln Glu Leu Val His Met Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

〈210〉 63
〈211〉 16
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 63

Gln Pro Ser Gln Glu Val Val His Met Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

〈210〉 64
〈211〉 16
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 64

Gln Pro Ser Gln Glu Val Val His Met Asn Asn Val Val Tyr Leu His
1 5 10 15

〈210〉 65
〈211〉 16
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

<400> 65

Gln Pro Ser Gln Glu Val Val His Met Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 66
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 66

Gln Pro Ser Glu Glu Val Val His Met Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 67
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 67

Lys Val Ser Asn Arg Phe Pro
1 5

<210> 68
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 68

Lys Val Ser Asn Arg Phe Pro

1 5

〈210〉 69
〈211〉 7
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 69

Lys Val Ser Asn Arg Phe Pro
1 5

〈210〉 70
〈211〉 7
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 70

Lys Val Ser Asn Val Phe Pro
1 5

〈210〉 71
〈211〉 7
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 71

Lys Val Ser Asn Leu Phe Pro
1 5

〈210〉 72

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 72

Ala Gln Gly Thr Ser Val Pro Phe Thr
1 5

<210> 73
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 73

Ala Gln Gly Thr Ser His Pro Phe Thr
1 5

<210> 74
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 74

Ala Gln Gly Thr Ser His Pro Phe Thr
1 5

<210> 75
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 75

Ala Gln Gly Thr His His Pro Phe Thr
1 5

<210> 76
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 76

Ala Gln Gly Thr His His Pro Phe Thr
1 5

<210> 77
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 77

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

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Ser Gln Asn Tyr Ala Thr Tyr Val Ala Glu

50 55 60

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

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

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Ala Ala Gly Tyr Gly Val Asp Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

〈210〉 78
〈211〉 112
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 78

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 Pro 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 Gly Gln Gly
85 90 95

Thr Gln Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

〈210〉 79
〈211〉 121
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 79

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

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

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile 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 Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Tyr Gly Pro Gly Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly

100 105 110

Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 80
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 80

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

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

Ala Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 81

〈211〉 399
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 81

Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
1 5 10 15

Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
20 25 30

Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
35 40 45

Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
50 55 60

Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
65 70 75 80

Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
85 90 95

Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
100 105 110

Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
115 120 125

Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
130 135 140

Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His

145 150 155 160

Ser Pro Gln Asp Ile Glu Gly Arg Met Asp Pro Lys Ser Cys Asp Lys
165 170 175

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
180 185 190

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
195 200 205

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
210 215 220

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
225 230 235 240

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
245 250 255

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
260 265 270

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
275 280 285

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

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
305 310 315 320

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
325 330 335

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
340 345 350

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
355 360 365

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
370 375 380

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
385 390 395

〈210〉 82
〈211〉 444
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 82

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 Ser Thr Tyr
20 25 30

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

Gly Lys Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn 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 Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Ala Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240

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

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Phe Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

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

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

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

Lys Val Ser Asn Lys Ala Ala Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

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

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

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

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

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

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

〈210〉 83
〈211〉 214
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 83

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

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

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

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

Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
115 120 125

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

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210

<210> 84
<211> 212
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 84

Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Lys
1 5 10 15

Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys Pro Gln Tyr Pro
20 25 30

Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys Asn Ile Gly Gly Asp
35 40 45

Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp His Leu Ser Leu Lys
50 55 60

Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg
65 70 75 80

Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg
85 90 95

Val Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp
100 105 110

Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Gly Ser Gln Ser Ile Lys Gly
115 120 125

Asn His Leu Val Lys Val Tyr Asp Tyr Gln Glu Asp Gly Ser Val Leu
130 135 140

Leu Thr Cys Asp Ala Glu Ala Lys Asn Ile Thr Trp Phe Lys Asp Gly
145 150 155 160

Lys Met Ile Gly Phe Leu Thr Glu Asp Lys Lys Lys Trp Asn Leu Gly
165 170 175

Ser Asn Ala Lys Asp Pro Arg Gly Met Tyr Gln Cys Lys Gly Ser Gln
180 185 190

Asn Lys Ser Lys Pro Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met Asp Tyr Lys Asp
195 200 205

Asp Asp Asp Lys
210

〈210〉 85
〈211〉 112
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 85

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 Gly Gln Gly
85 90 95

Thr Gln Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 86
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 86

Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr Gln Thr Pro Tyr
1 5 10 15

〈210〉 87
〈211〉 112
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 87

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Gln Ser Ser Glu Ser Leu Leu His Ala
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 Asn 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 Ala Gln Gly
85 90 95

Thr Ala Asn Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

〈210〉 88
〈211〉 112
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

<400> 88

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 Ala Ala Ser Glu Ser Leu Leu His Thr
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 Ala Gln Gly
85 90 95

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

<210> 89
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 89

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 Thr Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ala

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 Ala Gln Gly
85 90 95

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

〈210〉 90
〈211〉 399
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 90

Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
1 5 10 15

Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
20 25 30

Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
35 40 45

Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp

50 55 60

Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
65 70 75 80

Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
85 90 95

Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
100 105 110

Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
115 120 125

Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
130 135 140

Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
145 150 155 160

Ser Pro Gln Asp Ile Glu Gly Arg Met Asp Pro Lys Ser Cys Asp Lys
165 170 175

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
180 185 190

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
195 200 205

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
210 215 220

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
225 230 235 240

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
245 250 255

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
260 265 270

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
275 280 285

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
305 310 315 320

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
325 330 335

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
340 345 350

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
355 360 365

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
370 375 380

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
385 390 395

〈210〉 91
〈211〉 270
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 91

Met Lys Ser Leu Phe Lys Val Thr Leu Leu Ala Thr Thr Met Ala Val
1 5 10 15

Ala Leu His Ala Pro Ile Thr Phe Ala Ala Glu Ala Ala Lys Pro Ala
20 25 30

Thr Ala Ala Asp Ser Lys Ala Ala Phe Lys Asn Asp Asp Gln Lys Ser
35 40 45

Ala Tyr Ala Leu Gly Ala Ser Leu Gly Arg Tyr Met Glu Asn Ser Leu
50 55 60

Lys Glu Gln Glu Lys Leu Gly Ile Lys Leu Asp Lys Asp Gln Leu Ile
65 70 75 80

Ala Gly Val Gln Asp Ala Phe Ala Asp Lys Ser Lys Leu Ser Asp Gln
85 90 95

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

Ala Gln Ala Lys Met Glu Lys Asp Ala Ala Asp Asn Glu Ala Lys Gly
115 120 125

Lys Glu Tyr Arg Glu Lys Phe Ala Lys Glu Lys Gly Val Lys Thr Ser
130 135 140

Ser Thr Gly Leu Val Tyr Gln Val Val Glu Ala Gly Lys Gly Glu Ala
145 150 155 160

Pro Lys Asp Ser Asp Thr Val Val Val Asn Tyr Lys Gly Thr Leu Ile

165 170 175

Asp Gly Lys Glu Phe Asp Asn Ser Tyr Thr Arg Gly Glu Pro Leu Ser
180 185 190

Phe Arg Leu Asp Gly Val Ile Pro Gly Trp Thr Glu Gly Leu Lys Asn
195 200 205

Ile Lys Lys Gly Gly Lys Ile Lys Leu Val Ile Pro Pro Glu Leu Ala
210 215 220

Tyr Gly Lys Ala Gly Val Pro Gly Ile Pro Pro Asn Ser Thr Leu Val
225 230 235 240

Phe Asp Val Glu Leu Leu Asp Val Lys Pro Ala Pro Lys Ala Asp Ala
245 250 255

Lys Pro Glu Ala Asp Ala Lys Ala Ala Asp Ser Ala Lys Lys
260 265 270

〈210〉 92
〈211〉 163
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 92

Leu Gln Asp Leu Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
1 5 10 15

Asn Arg Ser Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
20 25 30

Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val

35 40 45

Phe Lys Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
50 55 60

Cys Ile Ser Gly Tyr His Cys Leu Gly Ala Glu Cys Ser Met Cys Glu
65 70 75 80

Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
85 90 95

Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
100 105 110

Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
115 120 125

Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
130 135 140

Gly Ala Ser Ser Ala Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
145 150 155 160

Ser Pro Gln

<210> 93
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 93

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

1 5 10 15

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

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile 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 Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Tyr Gly Pro Gly Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
100 105 110

Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

〈210〉 94
〈211〉 109
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 94

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

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

Ala Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

〈210〉 95
〈211〉 373
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 95

Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Lys
1 5 10 15

Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys Pro Gln Tyr Pro
20 25 30

Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys Asn Ile Gly Gly Asp
35 40 45

Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp His Leu Ser Leu Lys

50 55 60

Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg
65 70 75 80

Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg
85 90 95

Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Asp Ile Glu Gly Arg Met Asp
100 105 110

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
115 120 125

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
130 135 140

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
145 150 155 160

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
165 170 175

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
180 185 190

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
195 200 205

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
210 215 220

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
225 230 235 240

Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
245 250 255

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
260 265 270

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
275 280 285

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
290 295 300

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

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
325 330 335

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Glu Asn Leu Tyr
340 345 350

Phe Gln Gly Ser Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys
355 360 365

Ile Glu Trp His Glu
370

〈210〉 96
〈211〉 323
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 96

Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg Val Phe Val Asn Cys
1 5 10 15

Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val Gly Thr Leu Leu Ser
20 25 30

Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile Leu Asp Pro Arg Gly
35 40 45

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

Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Gln Ser Cys Val Glu Leu Asp Asp
65 70 75 80

Ile Glu Gly Arg Met Asp Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
85 90 95

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
100 105 110

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
115 120 125

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
130 135 140

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
145 150 155 160

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
165 170 175

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys

180 185 190

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
195 200 205

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
210 215 220

Arg Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys
225 230 235 240

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
245 250 255

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
260 265 270

Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
275 280 285

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
290 295 300

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp
305 310 315 320

Asp Asp Lys

〈210〉 97
〈211〉 128
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 97

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

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Gly Asn Ala Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ala Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys His Tyr Val His Tyr Ala Ser Ala Ala Gly Gly Leu Pro Gly
100 105 110

Phe Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

〈210〉 98
〈211〉 128
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 98

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Ser Gln Leu Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ala Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys His Tyr Val His Tyr Ala Ser Ala Ser Thr Val Leu Gly Ala
100 105 110

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

〈210〉 99
〈211〉 128
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 99

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Ala Asn Ser Tyr Asn Ala Tyr Tyr Ala Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys His Tyr Val His Tyr Ser Ala Ala Ser Thr Leu Leu Pro Ser
100 105 110

Phe Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 100
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 100

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
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 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Gln Asn Leu Tyr Asn Ala Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys His Tyr Val His Tyr Ala Ser Ala Ser Thr Val Leu Pro Ala
100 105 110

Phe Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

〈210〉 101
〈211〉 128
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 101

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

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

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

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Val Asn Gly Tyr Thr Ala Tyr Tyr Ala Glu

50 55 60

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

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

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Ala Ala Tyr Tyr Asp Val Leu Gly Tyr
100 105 110

Gly Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

〈210〉 102
〈211〉 128
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 102

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

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

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Val Asn Ala Tyr Glu Ala Tyr Tyr Ala Pro
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser

65 70 75 80

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

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Ala Ser Tyr Tyr Asp Leu Leu Gly Tyr
100 105 110

Gly Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 103
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 103

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Gly Gln Gln Tyr Asn Ala Tyr Tyr Ala Pro
50 55 60

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

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95

Tyr Cys His Tyr Val His Tyr Ala Ser Ala Ser Ser Val Leu Pro Gly
100 105 110

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

〈210〉 104
〈211〉 128
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 104

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

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Gly Asn Ala Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ala Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys His Tyr Val His Tyr Ala Ser Ala Ser Thr Val Leu Pro Ala

100 105 110

Phe Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

〈210〉 105
〈211〉 128
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 105

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

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

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

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

Tyr Cys His Tyr Val His Tyr Ala Ser Ala Ser Thr Val Leu Pro Ala
100 105 110

Phe Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

〈210〉 106
〈211〉 128
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 106

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Gly Asn Ala Tyr Asn Ala Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys His Tyr Val His Tyr Ala Ser Ala Ser Thr Val Leu Pro Ala
100 105 110

Phe Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

〈210〉 107

〈211〉 128
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 107

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Ser Asn Ala Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ala Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys His Tyr Val His Tyr Ala Ser Ala Ser Thr Val Leu Pro Ala
100 105 110

Phe Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

〈210〉 108
〈211〉 128
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 108

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

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

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

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

Tyr Cys His Tyr Val His Tyr Ala Ser Ala Ser Thr Val Leu Pro Ala
100 105 110

Phe Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

〈210〉 109
〈211〉 128
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 109

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

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

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

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

Tyr Cys His Tyr Val His Tyr Ala Ser Ala Ser Thr Val Leu Pro Ala
100 105 110

Phe Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

〈210〉 110
〈211〉 128
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 110

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Ser Gln Leu Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ala Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys His Tyr Val His Tyr Ala Ser Ala Ser Thr Val Leu Pro Ala
100 105 110

Phe Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

〈210〉 111
〈211〉 128
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 111

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

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

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

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

Tyr Cys His Tyr Val His Tyr Ser Ala Ala Ser Thr Leu Leu Pro Ser
100 105 110

Phe Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

〈210〉 112
〈211〉 126
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 112

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Gln Gln Gly Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys Arg Phe Val His Tyr His Leu Ala Gly Tyr Gly Tyr Tyr Gly
100 105 110

Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

〈210〉 113
〈211〉 127
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 113

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Gly Asn Ala Tyr Asn Ala Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys Arg Phe Val His Tyr Arg His Pro Leu Leu His Ile Gln Tyr
100 105 110

Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

〈210〉 114
〈211〉 128
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 114

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

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

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

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

Tyr Cys His Tyr Val His Tyr Ala Gln Ala Ser Ser Leu Leu Pro Ser
100 105 110

Phe Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

〈210〉 115
〈211〉 128
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 115

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

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Gly Asn Leu Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ala Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys His Tyr Val His Tyr Ala Ser Ala Gly Gly Gly Leu Pro Gly
100 105 110

Phe Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

〈210〉 116
〈211〉 128
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 116

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

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Gly Asn Leu Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ala Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys His Tyr Val His Tyr Ala Ser Ala Gly Gly Gly Leu Ser Ala
100 105 110

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

〈210〉 117
〈211〉 128
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 117

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

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

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Ala Ser Ala Tyr Asn Ala Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Pro Ser Tyr Val Ser Phe Leu Pro Tyr
100 105 110

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

〈210〉 118
〈211〉 128
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 118

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Gly Asn Asn Tyr Asn Asn Tyr Tyr Ala Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys His Tyr Val His Tyr Ala Thr Ala Ser Thr Leu Leu Gly Ala
100 105 110

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

〈210〉 119
〈211〉 128
〈212〉 PRT

〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 119

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

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

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

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

Tyr Cys His Tyr Val His Tyr Ala Gln Ala Ser Thr Val Leu Pro Ala
100 105 110

Phe Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

〈210〉 120
〈211〉 128
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 120

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Ser Ser Ser Tyr Leu Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys His Tyr Val His Tyr Ala Ser Ser Ser Thr Leu Leu Pro Ser
100 105 110

Phe Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

〈210〉 121
〈211〉 128
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 121

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg

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

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Gly Asn Ala Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ala Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys His Tyr Val His Tyr Ser Ala Ala Ser Thr Val Leu Pro Ala
100 105 110

Phe Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

〈210〉 122
〈211〉 128
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 122

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Ser Ala

20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Ala Asn Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ala Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Ala Thr Ala Tyr Asp Gly Phe Tyr Gly
100 105 110

Phe Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 123
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 123

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 Glu Leu Val His Thr
20 25 30

Asn Arg His 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 Pro 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 Ala Gln Gly
85 90 95

Thr Gln Val Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

〈210〉 124
〈211〉 112
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 124

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 Gln Ala Ser Gln Glu Leu Val His Met
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 Pro 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 Ala Gln Gly
85 90 95

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

<210> 125
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 125

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 Ser Ala Ser Glu Ser Leu Leu His Asn
20 25 30

Asn Arg His Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Asn 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 Gly Gln Gly
85 90 95

Thr Gln Val Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

〈210〉 126
〈211〉 112
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 126

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 Thr Ser Gln Glu Leu Val His Ile
20 25 30

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

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Tyr Asn Arg Phe Gln 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 Ala Gln Gly
85 90 95

Thr Ser Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

〈210〉 127
〈211〉 112
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 127

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 Ala Ala Ser Glu Glu Leu Val His Ile
20 25 30

Asn Arg Tyr Ile Phe 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 Ile 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 Ala Gln Gly
85 90 95

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

<210> 128
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 128

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 Ser Thr Ser Glu Glu Leu Leu His Ile
20 25 30

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

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ala Asn Arg Phe Met 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 Ala Gln Gly
85 90 95

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

〈210〉 129
〈211〉 112
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 129

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 Ser Ser Ser Gln Glu Leu Val His Ala
20 25 30

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

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ala Asn Arg Phe Pro 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 Ala Gln Gly
85 90 95

Thr Gln Val Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

〈210〉 130
〈211〉 112
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 130

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 Thr Ala Ser Gln Glu Leu Val His Ile
20 25 30

Asn Arg Phe Ile Phe 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 Ile 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 Ala Gln Gly
85 90 95

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

<210> 131
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 131

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 Gln Ser Ser Glu Ser Leu Val His Val
20 25 30

Asn Arg His Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Tyr Asn Arg Phe Pro 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 Ala Gln Gly
85 90 95

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

〈210〉 132
〈211〉 112
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 132

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 Ser Ala Ser Glu Glu Leu Val His Ile
20 25 30

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

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Tyr Asn Arg Phe Met 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 Gly Gln Gly
85 90 95

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

〈210〉 133
〈211〉 112
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

<400> 133

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 Thr Ser Glu Glu Leu Leu His Ile
20 25 30

Asn Arg Phe Thr Phe 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 Met 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 Ala Gln Gly
85 90 95

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

<210> 134
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 134

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 Thr Ser Asp Gln Glu Leu Val His Met

20 25 30

Asn Arg His Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Tyr Asn Arg Phe Pro 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 Ala Gln Gly
85 90 95

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

〈210〉 135
〈211〉 112
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 135

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 Thr Ser Glu Glu Leu Leu His Ile
20 25 30

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

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Gln 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 Ala Gln Gly
85 90 95

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

〈210〉 136
〈211〉 112
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 136

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 Tyr Ala Ser Glu Glu Leu Leu His Ile
20 25 30

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

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Tyr Asn Arg Phe Asn 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 Ala Gln Gly

85 90 95

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

〈210〉 137
〈211〉 112
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 137

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 Ala Ser Glu Glu Leu Leu His Ile
20 25 30

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

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Tyr Asn Arg Phe Thr 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 Ala Gln Gly
85 90 95

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

〈210〉 138

〈211〉 112
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 138

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 Gln Thr Ser Glu Glu Leu Val His Ile
20 25 30

Asn Arg Phe Ile Phe 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 Ala Gln Gly
85 90 95

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

〈210〉 139
〈211〉 115
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 139

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
115

〈210〉 140
〈211〉 112
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 140

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

〈210〉 141
〈211〉 450
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 141

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

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

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
130 135 140

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
145 150 155 160

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

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

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

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

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe

225 230 235 240

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

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
260 265 270

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

Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

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

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

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

His His
450

〈210〉 142
〈211〉 449
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 142

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

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

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile 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 Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Tyr Gly Pro Gly Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
100 105 110

Arg 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 Ala Ala 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 Ala 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 Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Ser Cys Ala 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 Val 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〉 143
〈211〉 222
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 143

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 Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
115 120 125

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
130 135 140

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
145 150 155 160

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
165 170 175

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
180 185 190

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
195 200 205

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

〈210〉 144
〈211〉 216
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 144

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

〈210〉 145
〈211〉 122
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 145

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 146
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 146

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 Gly Gln Gly
85 90 95

Thr Gln Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

〈210〉 147
〈211〉 22
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 147

Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
1 5 10 15

Asn Arg Asn Gln Ile Cys
20

<210> 148
<211> 41
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 148

Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr
1 5 10 15

Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu
20 25 30

Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys
35 40

<210> 149
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 149

Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys
1 5 10 15

Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys
20 25 30

<210> 150
<211> 69
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 150

Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys
1 5 10 15

Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn
20 25 30

Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu
35 40 45

Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro
50 55 60

Gly His Ser Pro Gln
65

<210> 151
<211> 94
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 151

Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
1 5 10 15

Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
20 25 30

Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
35 40 45

Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
50 55 60

Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
65 70 75 80

Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys
85 90

〈210〉 152
〈211〉 63
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 152

Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
1 5 10 15

Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
20 25 30

Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
35 40 45

Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys
50 55 60

〈210〉 153
〈211〉 141
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 153

Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr
1 5 10 15

Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu
20 25 30

Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His
35 40 45

Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly
50 55 60

Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe
65 70 75 80

Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu
85 90 95

Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val
100 105 110

Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr
115 120 125

Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln
130 135 140

〈210〉 154
〈211〉 72
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

<400> 154

Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr
1 5 10 15

Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu
20 25 30

Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His
35 40 45

Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly
50 55 60

Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys
65 70

<210> 155
<211> 100
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 155

Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys
1 5 10 15

Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys
20 25 30

Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg
35 40 45

Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly

50 55 60

Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser
65 70 75 80

Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly
85 90 95

His Ser Pro Gln
100

〈210〉 156
〈211〉 336
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 156

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 Ala Ala 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 Ala 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 Cys Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala 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 Val 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 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
325 330 335

〈210〉 157
〈211〉 107
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 157

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> 158
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 158

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 Pro 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 Gly Gln Gly
85 90 95

Thr Gln Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 159
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 159

Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr Gln Thr Pro Tyr
1 5 10 15

<210> 160
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 160

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

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

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

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Tyr
100 105 110

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

<210> 161
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 161

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 Gly Gln Gly
85 90 95

Thr Gln Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

〈210〉 162
〈211〉 122
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 162

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

〈210〉 163

〈211〉 112
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 163

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

Gly Gln Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Asn
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Val Ser Trp Tyr Ile Gln Lys Pro Ser Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ile Ser
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 Pro Asp Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly
85 90 95

Thr Gln Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

〈210〉 164
〈211〉 119
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 164

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
50 55 60

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

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

〈210〉 165
〈211〉 107
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 165

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

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

〈210〉 166
〈211〉 447
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 166

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
50 55 60

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

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala 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> 167
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 167

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
50 55 60

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

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala 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 Lys 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 Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

〈210〉 168
〈211〉 447
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

<400> 168

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
50 55 60

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

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala 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 Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

〈210〉 169
〈211〉 445
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 169

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

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

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

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

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

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
130 135 140

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
145 150 155 160

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

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

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
195 200 205

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
210 215 220

Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
225 230 235 240

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
245 250 255

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
260 265 270

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
275 280 285

Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
290 295 300

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
305 310 315 320

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
325 330 335

Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
340 345 350

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
355 360 365

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
370 375 380

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
385 390 395 400

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
405 410 415

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser

420 425 430

Leu Ser Leu Ser Pro His His His His His His His His
435 440 445

<210> 170
<211> 226
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 170

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
50 55 60

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

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe

115 120 125

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
130 135 140

Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp
145 150 155 160

Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr
165 170 175

Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
180 185 190

Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
195 200 205

Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly
210 215 220

Glu Cys
225

〈210〉 171
〈211〉 458
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 171

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala

20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser 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 Ala Ala
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 Ala 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 Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Ser Cys Ala 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 Val 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 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
450 455

<210> 172
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 172

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

Gly Gln Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Asn
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Val Ser Trp Tyr Ile Gln Lys Pro Ser Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ile Ser
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 Pro Asp Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly
85 90 95

Thr Gln Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu 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〉 173
〈211〉 461
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

<400> 173

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
65 70 75 80

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly Val
100 105 110

Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser 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 Ala Ala 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

Ala 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 Cys Glu Leu Thr Lys

355 360 365

Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala 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 Val 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 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
450 455 460

<210> 174
<211> 464
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 174

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asn Tyr
50 55 60

Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
65 70 75 80

Asp Asp Ser Lys Ser Asn Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Glu
85 90 95

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Tyr
100 105 110

Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser 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 Ala Ala 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 Ala 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 Cys Glu
355 360 365

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala 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 Val 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 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
450 455 460

〈210〉 175
〈211〉 6
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 175

Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

〈210〉 176
〈211〉 467
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 176

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ser
50 55 60

Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
65 70 75 80

Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Asn Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser
85 90 95

Leu Lys Glu Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr
100 105 110

Gly Ala Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser 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 Ala Ala 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 Ala 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 Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala 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 Val 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 Asp Tyr Lys Asp Asp
450 455 460

Asp Asp Lys
465

〈210〉 177
〈211〉 9
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 177

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

〈210〉 178
〈211〉 461
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 178

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Ser Leu Val Gln Pro Gly Lys

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

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

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly Val
100 105 110

Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser 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 Ala Ala 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

Ala 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 Cys Glu Leu Thr Lys
355 360 365

Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala 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 Val 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 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
450 455 460

〈210〉 179
〈211〉 464
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 179

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu

50 55 60

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

Ser Asp Ser Lys Ser Asn Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Glu
85 90 95

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Tyr
100 105 110

Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser 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 Ala Ala 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 Ala 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 Cys Glu
355 360 365

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala 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 Val 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 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
450 455 460

〈210〉 180
〈211〉 467
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 180

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

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

Ser Gly Gly Ser Asp Ser Lys Ser Asn Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser
85 90 95

Leu Lys Glu Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr

100 105 110

Gly Ala Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser 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 Ala Ala 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 Ala 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 Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala 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 Val 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 Asp Tyr Lys Asp Asp
450 455 460

Asp Asp Lys

465

〈210〉 181
〈211〉 461
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 181

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Gly Gly Ser Tyr Tyr Gly Val
100 105 110

Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser 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 Ala Ala 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

Ala 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 Cys Glu Leu Thr Lys
355 360 365

Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala 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 Val 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 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
450 455 460

〈210〉 182
〈211〉 464
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 182

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Tyr
100 105 110

Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser 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 Ala Ala 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 Ala 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 Cys Glu
355 360 365

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala 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 Val 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 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
450 455 460

〈210〉 183
〈211〉 467
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 183

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Ser Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser 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 Ala Ala 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 Ala 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 Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala 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 Val 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 Asp Tyr Lys Asp Asp
450 455 460

Asp Asp Lys
465

<210> 184
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 184

Gln 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 Asn Ala
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

〈210〉 185
〈211〉 112
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 185

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 Gly Gln Gly
85 90 95

Thr Gln Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

〈210〉 186
〈211〉 336
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 186

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 Ala Ala 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 Ala 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 Cys Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala 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 Val 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 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
325 330 335

〈210〉 187
〈211〉 107
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 187

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〉 188

〈211〉 230
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 188

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

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro
225 230

〈210〉 189
〈211〉 449
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 189

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> 190
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 190

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〉 191
〈211〉 7
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 191

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5

〈210〉 192

〈211〉 8
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 192

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5

〈210〉 193
〈211〉 458
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 193

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

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Ala Ala Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp
100 105 110

Gly Gln 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 Ala Ala
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 Ala 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 Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Ser Cys Ala 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 Val 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 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
450 455

<210> 194
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 194

Xaa Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Lys
1 5 10 15

Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys
20 25

<210> 195
<211> 163
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 195

Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
1 5 10 15

Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
20 25 30

Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
35 40 45

Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
50 55 60

Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
65 70 75 80

Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
85 90 95

Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
100 105 110

Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
115 120 125

Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
130 135 140

Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
145 150 155 160

Ser Pro Gln

〈210〉 196
〈211〉 18
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 196
gcgtcacact ttgctatg 18

〈210〉 197

<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 197
tgagttccac gacaccgtca c 21

<210> 198
<211> 55
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 198
gttattactc gcggcccagc cggccatggc ggatatcgtg atgacccagt ctccg 55

<210> 199
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 199
tttaatttcc agtttggtac cttgacc 27

<210> 200
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 200

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

〈210〉 201
〈211〉 189
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 201

Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
1 5 10 15

Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
20 25 30

Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
35 40 45

Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
50 55 60

Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
65 70 75 80

Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
85 90 95

Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
100 105 110

Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
115 120 125

Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro

130 135 140

Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
145 150 155 160

Ser Pro Gln His His His His His His Gly Gly Gly Gly Ser Gly Leu
165 170 175

Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
180 185

<210> 202
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 202

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

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

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile 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 Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Asp Tyr Gly Pro Gly Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
100 105 110

Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 203
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 203

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

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

Ala Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

〈210〉 204
〈211〉 128
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 204

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

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

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

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

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Thr Thr Tyr Ala Gly Ser Ser Phe Ser
100 105 110

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

〈210〉 205

〈211〉 112
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 205

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 Pro 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 Gly Gln Gly
85 90 95

Thr Gln Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

〈210〉 206
〈211〉 115
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 206

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

Ser Val Thr 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 Glu Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ala Ile Asp Gly Pro Thr Pro Asp Thr Ala Tyr Ser Glu 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
115

〈210〉 207
〈211〉 112
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 207

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 Pro 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 Gly Gln Gly
85 90 95

Thr Gln Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

〈210〉 208
〈211〉 330
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 208

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> 209
<211> 326
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 209

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〉 210
〈211〉 377
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 210

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〉 211
〈211〉 327
〈212〉 PRT

〈213〉 人工序列

〈220〉

〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 211

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〉 212

〈211〉 330
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 212

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〉 213
〈211〉 326
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 213

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

〈210〉 214
〈211〉 377
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 214

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〉 215
〈211〉 327
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 215

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〉 216
〈211〉 4
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 216

Gly Gly Gly Ser
1

〈210〉 217
〈211〉 4
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 人工合成的序列

〈400〉 217

Ser Gly Gly Gly
1

<210> 218
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 218

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 219
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 219

Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 220
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 220

Gly Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 221
<211> 6
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 221

Ser Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 222
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 222

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 223
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 223

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 224
<211> 549
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 224
atggaacagg ggaagggcct ggctgtcctc atcctggcta tcattcttct tcaaggtact 60

ttggcccagt caatcaaagg aaaccacttg gttaaggtgt atgactatca agaagatggt 120

tcggtacttc tgacttgtga tgcagaagcc aaaaatatca catggtttaa agatgggaag 180

atgatcggct tcctaactga agataaaaaa aaatggaatc tgggaagtaa tgccaaggac 240

cctcgaggga tgtatcagtg taaaggatca cagaacaagt caaaaccact ccaagtgtat 300

tacagaatgt gtcagaactg cattgaacta aatgcagcca ccatatctgg ctttctcttt 360

gctgaaatcg tcagcatttt cgtccttgct gttggggtct acttcattgc tggacaggat 420

ggagttcgcc agtcgagagc ttcagacaag cagactctgt tgcccaatga ccagctctac 480

cagcccctca aggatcgaga agatgaccag tacagccacc ttcaaggaaa ccagttgagg 540

aggaattga 549

<210> 225
<211> 182
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 225

Met Glu Gln Gly Lys Gly Leu Ala Val Leu Ile Leu Ala Ile Ile Leu
1 5 10 15

Leu Gln Gly Thr Leu Ala Gln Ser Ile Lys Gly Asn His Leu Val Lys
20 25 30

Val Tyr Asp Tyr Gln Glu Asp Gly Ser Val Leu Leu Thr Cys Asp Ala
35 40 45

Glu Ala Lys Asn Ile Thr Trp Phe Lys Asp Gly Lys Met Ile Gly Phe

50 55 60

Leu Thr Glu Asp Lys Lys Lys Trp Asn Leu Gly Ser Asn Ala Lys Asp
65 70 75 80

Pro Arg Gly Met Tyr Gln Cys Lys Gly Ser Gln Asn Lys Ser Lys Pro
85 90 95

Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met Cys Gln Asn Cys Ile Glu Leu Asn Ala
100 105 110

Ala Thr Ile Ser Gly Phe Leu Phe Ala Glu Ile Val Ser Ile Phe Val
115 120 125

Leu Ala Val Gly Val Tyr Phe Ile Ala Gly Gln Asp Gly Val Arg Gln
130 135 140

Ser Arg Ala Ser Asp Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr
145 150 155 160

Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly
165 170 175

Asn Gln Leu Arg Arg Asn
180

<210> 226
<211> 516
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 226
atggaacata gcacgtttct ctctggcctg gtactggcta cccttctctc gcaagtgagc 60

cccttcaaga tacctataga ggaacttgag gacagagtgt ttgtgaattg caataccagc 120

atcacatggg tagagggaac ggtgggaaca ctgctctcag acattacaag actggacctg 180

ggaaaacgca tcctggaccc acgaggaata tataggtgta atgggacaga tatatacaag 240

gacaaagaat ctaccgtgca agttcattat cgaatgtgcc agagctgtgt ggagctggat 300

ccagccaccg tggctggcat cattgtcact gatgtcattg ccactctgct ccttgctttg 360

ggagtcttct gctttgctgg acatgagact ggaaggctgt ctggggctgc cgacacacaa 420

gctctgttga ggaatgacca ggtctatcag ccccctccgag atcgagatga tgctcagtac 480

agccaccttg gaggaaactg ggctcggaac aagtga 516

<210> 227
<211> 171
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 227

Met Glu His Ser Thr Phe Leu Ser Gly Leu Val Leu Ala Thr Leu Leu
1 5 10 15

Ser Gln Val Ser Pro Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg
20 25 30

Val Phe Val Asn Cys Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val
35 40 45

Gly Thr Leu Leu Ser Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile
50 55 60

Leu Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys
65 70 75 80

Asp Lys Glu Ser Thr Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Gln Ser Cys
85 90 95

Val Glu Leu Asp Pro Ala Thr Val Ala Gly Ile Ile Val Thr Asp Val
100 105 110

Ile Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Gly Val Phe Cys Phe Ala Gly His
115 120 125

Glu Thr Gly Arg Leu Ser Gly Ala Ala Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg
130 135 140

Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr
145 150 155 160

Ser His Leu Gly Gly Asn Trp Ala Arg Asn Lys
165 170

<210> 228
<211> 624
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 228
atgcagtcgg gcactcactg gagagttctg ggcctctgcc tcttatcagt tggcgtttgg 60

gggcaagatg gtaatgaaga aatgggtggt attacacaga caccatataa agtctccatc 120

tctggaacca cagtaatatt gacatgccct cagtatcctg gatctgaaat actatggcaa 180

cacaatgata aaaacatagg cggtgatgag gatgataaaa acataggcag tgatgaggat 240

cacctgtcac tgaaggaatt ttcagaattg gagcaaagtg gttattatgt ctgctacccc 300

agaggaagca aaccagaaga tgcgaacttt tatctctacc tgagggcaag agtgtgtgag 360

aactgcatgg agatggatgt gatgtcggtg gccacaattg tcatagtgga catctgcatc 420

actgggggct tgctgctgct ggtttactac tggagcaaga atagaaaggc caaggccaag 480

cctgtgacac gaggagcggg tgctggcggc aggcaaaggg gacaaaacaa ggagaggcca 540

ccacctgttc ccaacccaga ctatgagccc atccggaaag gccagcggga cctgtattct 600

ggcctgaatc agagacgcat ctga 624

<210> 229
<211> 207
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 229

Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
1 5 10 15

Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr
20 25 30

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

Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys
50 55 60

Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp
65 70 75 80

His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr
85 90 95

Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu

100 105 110

Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met
115 120 125

Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu
130 135 140

Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys
145 150 155 160

Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn
165 170 175

Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg
180 185 190

Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile
195 200 205

【發明申請專利範圍】

【請求項1】　一種抗原結合分子，包含：

可結合至CD3及CD137，但不同時結合至CD3及CD137的抗體可變區；其中，該抗原結合分子以小於5×10^{-6}M的平衡解離常數(KD)結合至CD137；較佳地藉由SPR於下述條件測定:

37°C，pH 7.4，20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% Tween 20、0.005% NaN3；該抗原結合分子係經固定於CM4感測晶片上，抗原作為分析物。

【請求項2】　如請求項1的抗原結合分子，其中該抗原結合分子結合至:

(a) 包含SEQ ID NO: 159的胺基酸序列的CD3ε (CD3 epsilon)的細胞外域的至少一、二、三或更多個胺基酸殘基；及/或

(b) 包含LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAEC (SEQ ID NO: 152)，較佳地人類CD137的LQDPCSN、NNRNQI 及/或GQRTCDI的胺基酸序列的CD137的N-終端區的至少一、二、三或更多個胺基酸殘基。

【請求項3】　如請求項1或2的抗原結合分子，其中該抗體可變區包含下述任一者:

(a1) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 16，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 30，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 44，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 63，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相

同於SEQ ID NO: 68，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90%相同於SEQ ID NO: 73；

(a2) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 17，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 31，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 45，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 64，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 69，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 74；

(a3) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 18，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 32，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 46，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 63，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 68，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 73；

(a4) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 19，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 33，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 47，輕鏈互補決定區1

(LCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 63，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 68，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 73；

(a5) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 19，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO:33，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 47，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 65，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 70，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 75；

(a6) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 20，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 34，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 48，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 63，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 68，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 73；

(a7) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 22，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少

70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 36，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 50，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 63，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 68，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 73；

(a8) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 23，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 37，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 51，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 63，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 68，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 73；

(a9) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 23，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 37，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 51，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 66，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 71，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 76；

(a10) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 24，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 38，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 52，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 63，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 68，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 73；

(a11) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 25，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 39，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 53，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 66，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 71，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 76；

(a12) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 26，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 40，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 54，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 66，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相

同於SEQ ID NO: 71，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 76；

(a13) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 26，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 40，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 54，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 63，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 68，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 73；

(a14) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO:27，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 41，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 55，輕鏈互補決定區1 (LCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 63，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 68，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 73；

(a15) 重鏈互補決定區 1 (HCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 28，重鏈互補決定區 2 (HCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 42，重鏈互補決定區 3 (HCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 56，輕鏈互補決定

區1 (LCDR1)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 63，輕鏈互補決定區2 (LCDR2)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 68，及輕鏈互補決定區3 (LCDR3)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 73；

(b1)包含SEQ ID NO: 16的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 30的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 44的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 63的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 68的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 73的胺基酸序列的LCDR3；

(b2)包含SEQ ID NO: 17的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 31的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 45的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 64的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 69的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 74的LCDR3；

(b3)包含SEQ ID NO: 18的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 32的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 46的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 63的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 68的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 73的LCDR3；

(b4)包含SEQ ID NO: 19的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 33的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 47的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 63的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 68的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 73的LCDR3；

(b5)包含SEQ ID NO: 19的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 33的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 47的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 65

的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 70的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 75的LCDR3；

(b6)包含SEQ ID NO: 20的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 34的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 48的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 63的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 68的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 73的LCDR3；

(b7)包含SEQ ID NO: 22的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 36的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 50的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 63的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 68的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 73的LCDR3；

(b8)包含SEQ ID NO: 23的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 37的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 51的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 63的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 68的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 73的LCDR3；

(b9)包含SEQ ID NO: 23的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 37的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 51的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 66的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 71的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 76的LCDR3；

(b10)包含SEQ ID NO: 24的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 38的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 52的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 63的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 68的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 73的LCDR3；

(b11)包含SEQ ID NO: 25的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 39的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 53的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 66的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 71的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 76的LCDR3；

(b12)包含SEQ ID NO: 26的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 40的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 54的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 66的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 71的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 76的LCDR3；

(b13)包含SEQ ID NO: 26的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 40的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 54的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 63的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 68的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 73的LCDR3；

(b14)包含SEQ ID NO: 27的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 41的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 55的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 63的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 68的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 73的LCDR3；

(b15)包含SEQ ID NO: 28的胺基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO: 42的胺基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO: 56的胺基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO: 63的胺基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO: 68的胺基酸序列的LCDR2，及包含SEQ ID NO: 73的LCDR3；

(c1) 重鏈可變域 (VH)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 2，及輕鏈可變域(VL)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相

同於SEQ ID NO: 58；

(c2) 重鏈可變域 (VH)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 3，及輕鏈可變域(VL)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 59；

(c3) 重鏈可變域 (VH)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 4，及輕鏈可變域(VL)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 58；

(c4) 重鏈可變域 (VH)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 5，及輕鏈可變域(VL)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 58；

(c5) 重鏈可變域 (VH)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 5，及輕鏈可變域(VL)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 60；

(c6) 重鏈可變域 (VH)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 6，及輕鏈可變域(VL)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 58；

(c7) 重鏈可變域 (VH)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 8，及輕鏈可變域(VL)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 58；

(c8) 重鏈可變域 (VH)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 9，及輕鏈可變域(VL)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 58；

(c9) 重鏈可變域 (VH)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 9，及輕鏈可變域(VL)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 61；

(c10) 重鏈可變域 (VH) ，其包含之胺基酸序列為至少70% 、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 10，及輕鏈可變域(VL)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 58；

(c11) 重鏈可變域 (VH) ，其包含之胺基酸序列為至少70% 、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 11，及輕鏈可變域(VL)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 61；

(c12) 重鏈可變域 (VH) ，其包含之胺基酸序列為至少70% 、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 12，及輕鏈可變域(VL)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 61；

(c13) 重鏈可變域 (VH) ，其包含之胺基酸序列為至少70% 、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 12，及輕鏈可變域(VL)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 58；

(c14) 重鏈可變域 (VH) ，其包含之胺基酸序列為至少70% 、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 13，及輕鏈可變域(VL)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 58；

(c15) 重鏈可變域 (VH) ，其包含之胺基酸序列為至少70% 、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 14，及輕鏈可變域(VL)，其包含之胺基酸序列為至少70%、80%或90% 相同於SEQ ID NO: 58；

(d1) SEQ ID NO: 2的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 58的輕鏈可變域(VL)；

(d2) SEQ ID NO: 3的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 59的輕鏈可變域(VL)；

(d3) SEQ ID NO: 4的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 58的輕鏈可變域(VL)；

(d4) SEQ ID NO: 5的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 58的輕鏈可變域(VL)；

(d5) SEQ ID NO: 5的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 60的輕鏈可變域(VL)；

(d6) SEQ ID NO: 6的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 58的輕鏈可變域(VL)；

(d7) SEQ ID NO: 8的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 58的輕鏈可變域(VL)；

(d8) SEQ ID NO: 9的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 58的輕鏈可變域(VL)；

(d9) SEQ ID NO: 9的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 61的輕鏈可變域(VL)；

(d10) SEQ ID NO: 10的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 58的輕鏈可變域(VL)；

(d11) SEQ ID NO: 11的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 61的輕鏈可變域(VL)；

(d12) SEQ ID NO: 12的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 61的輕鏈可變域(VL)；

(d13) SEQ ID NO: 12的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 58的輕鏈可變域(VL)；

(d14) SEQ ID NO: 13的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 58的輕鏈可變域(VL)；

(d15) SEQ ID NO: 14的重鏈可變域(VH)，及SEQ ID NO: 58的輕鏈可變域(VL)；

(e) 與(a1)至(d15)的抗體可變區之任一者競爭結合至CD3的抗體可變區；

(f) 與(a1)至(d15)的抗體可變區之任一者競爭結合至CD137的抗體可變區；

(g) 與(a1)至(d15)的抗體可變區之任一者結合至CD3上的相同抗原決定基的抗體可變區；

(h) 與(a1)至(d15)的抗體可變區之任一者結合至CD137上的相同抗原決定基的抗體可變區。

【請求項4】　如請求項3(a1)至(a15)或(c1)至(c15)中任一項的抗原結合分子，其包含:

(a) 重鏈可變域胺基酸序列，於下述每一位置(皆根據Kabat編號)，包含針對該位置的一或多個下述胺基酸殘基:

A、D、E、I、G、K、L、M、N、R、T、W或Y 於胺基酸位置26；

D、F、G、I、M或L，於胺基酸位置27；

D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 28；

F或W於胺基酸位置 29；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 30；

F、I、N、R、S、T或V於胺基酸位置 31；

A、H、I、K、L、N、Q、R、S、T或V於胺基酸位置 32；

W於胺基酸位置 33；

F、I、L、M或V於胺基酸位置 34；

F、H、S、T、V或Y於胺基酸位置 35；

E、F、H、I、K、L、M、N、Q、S、T、W或Y於胺基酸位置 50；

I、K或V於胺基酸位置 51；

K、M、R或T於胺基酸位置 52；

A、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、V、W或Y於胺基酸位置 52b；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 52c；

A、E、F、H、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 53；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位

置 54；

E、F、G、H、L、M、N、Q、W或Y於胺基酸位置 55；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 56；

A、D、E、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T或V於胺基酸位置 57；

A、F、H、K、N、P、R或Y於胺基酸位置 58；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 59；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 60；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 61；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 62；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 63；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 64；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 65；

H或R於胺基酸位置 93；

F、G、H、L、M、S、T、V或Y於胺基酸位置 94；

I或V於胺基酸位置 95；

F、H、I、K、L、M、T、V、W或Y於胺基酸位置 96；

F、Y或W於胺基酸位置 97；

A、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 98；

A、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 99；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 100；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 100a；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 100b；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 100c；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 100d；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 100e；

A、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 100f；

A、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 100g；

A、D、E、G、H、I、L、M、N、P、S、T或V於胺基酸位置 100h；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 100i；

A、D、F、I、L、M、N、Q、S、T或V於胺基酸位置101；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 102；及/或

(b) 輕鏈可變域胺基酸序列，於下述每一位置(皆根據Kabat編號)，包含針對該位置的一或多個下述胺基酸殘基:

A、D、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 24；

A、G、N、P、S、T或V於胺基酸位置 25；

A、D、E、F、G、I、K、L、M、N、Q、R、S、T或V於胺基酸位置 26；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 27；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 27a；

A、I、L、M、P、T或V於胺基酸位置 27b；

A、E、F、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、W或Y於胺基酸位置 27c；

A、E、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 27d；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 27e；

G、N、S或T於胺基酸位置 28；

A、F、G、H、K、L、M、N、Q、R、S、T、W或Y於胺基酸位置 29；

A、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、V、W或Y於胺基酸位置 30；

I、L、Q、S、T或V於胺基酸位置 31；

F、W或Y於胺基酸位置 32；

A、F、H、L、M、Q或V於胺基酸位置 33；

A、H或S於胺基酸位置 34；

I、K、L、M或R於胺基酸位置 50；

A、E、I、K、L、M、Q、R、S、T或V於胺基酸位置 51；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 52；

A、E、F、G、H、K、L、M、N、P、Q、R、S、V、W或Y於胺基酸位置 53；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 54；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V或Y於胺基酸位置 55；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 56；

A、G、K、S或Y於胺基酸位置 89；

Q於胺基酸位置 90；

G於胺基酸位置 91；

A、D、H、K、N、Q、R、S或T於胺基酸位置 92；

A、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W或Y於胺基酸位置 93；

A、D、H、I、M、N、P、Q、R、S、T或V於胺基酸位置 94；

P於胺基酸位置 95；

F或Y於胺基酸位置 96；

及A、D、E、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T或V於胺基酸位置 97。

【請求項5】　如請求項1至4中任一項的抗原結合分子，其中該抗原結合分子具有擇自於下示(1)至(3)所組成之群組的至少一個特徵:

(1) 抗原結合分子不同時結合至各自表現於不同細胞上的CD3及CD137；

(2) 抗原結合分子具有針對CD137的促效活性(agonistic activity)；及

(3) 相較於包含SEQ ID NO: 1 的VH序列及SEQ ID NO: 57的VL序列的參考抗體，抗原結合分子對於結合至人類CD137具有等效於或低10-倍、20-倍、50-倍、100-倍的KD值，其中該KD值較佳地係藉由SPR於下述條件測定: 37°C，pH 7.4，20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% Tween 20、0.005% NaN3；抗原結合分子係經固定於CM4感測晶片上，抗原作為分析物。

【請求項6】　如請求項1至5中任一項的抗原-結合分子，更包含能夠結合至不同於CD3及CD137的第三抗原的抗體可變區。

【請求項7】　如請求項6的抗原結合分子，其中該第三抗原為特異性地表現於癌組織的分子。

【請求項8】　如請求項1至7中任一項的抗原結合分子，更包含抗體Fc區。

【請求項9】　如請求項8的抗原結合分子，其中該Fc區為相較於天然發生的人類IgG1抗體的Fc區，針對FcγR具有減低的結合活性的Fc區。

【請求項10】　一種醫藥組成物，包含如請求項1至9中任一項的抗原結合分子及醫藥上可接受的載劑。

【請求項11】　一種經單離的多核苷酸，包含編碼請求項1至9中任一項的抗

原結合分子的核苷酸序列。

【請求項12】 一種表現載體，包含請求項11的多核苷酸。

【請求項13】 一種宿主細胞，經以請求項11的多核苷酸或請求項12的表現載體轉形或轉染。

【請求項14】 一種用於產生多特異性抗原結合分子或多特異性抗體的方法，包含培養請求項13的宿主細胞。

【請求項15】 一種用於獲得或篩選抗體可變區的方法，該抗體可變區能夠結合至CD3及CD137，但不同時結合至CD3及CD137，該方法包含:

(a) 提供包含複數個抗體可變區的庫，

(b) 將步驟(a)提供的庫與作為第一抗原的CD3或CD137接觸，且收集結合至該第一抗原的抗體可變區，

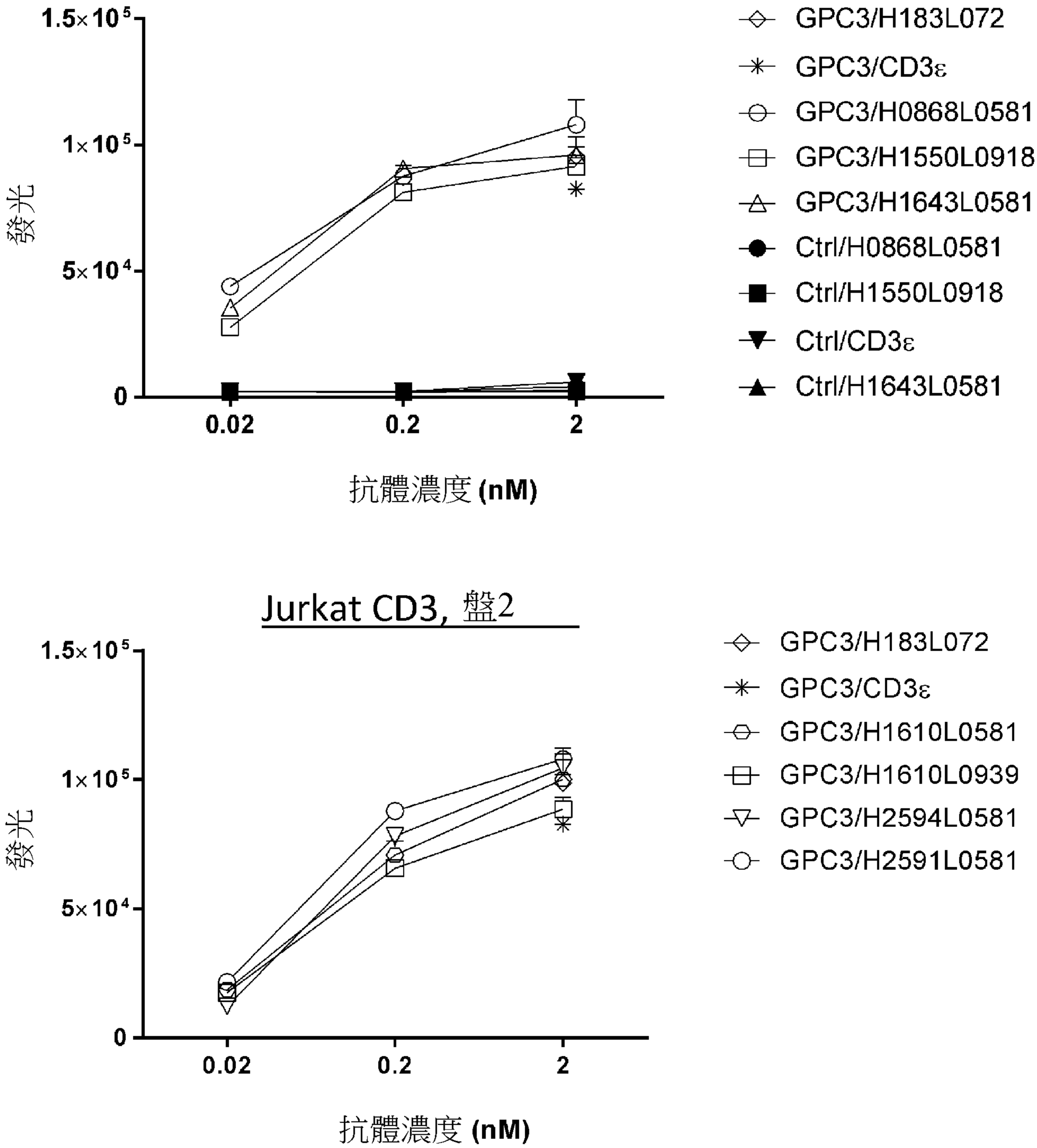
(c) 將步驟(b)所收集的抗體可變區與CD3或CD137中的第二抗原接觸且收集結合至該第二抗原的抗體可變區，以及

(d) 選擇抗體可變區其為:

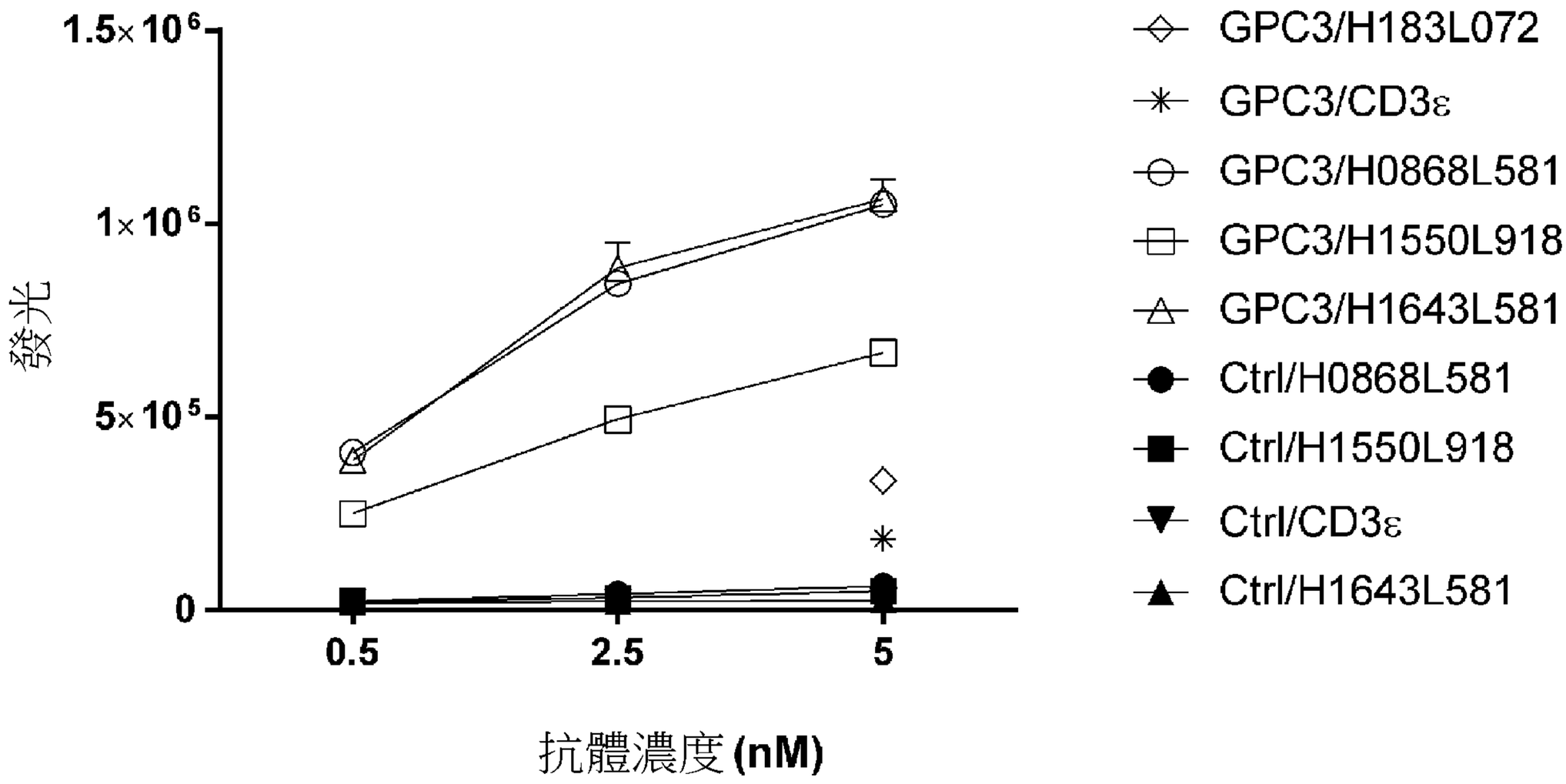
(1) 以低於約5×10^{-6} M 或介於5×10^{-6} M及3×10^{-8} M之間的平衡解離常數(KD)結合至CD137，較佳地藉由SPR於下述條件測定: 37°C，pH 7.4，20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% Tween 20、0.005% NaN3；該抗原結合分子係經固定於CM4感測晶片上，抗原作為分析物；及/或

(2) 以介於2×10^{-6} M及1×10^{-8} M之間的平衡解離常數(KD)結合至CD3，較佳地藉由SPR於下述條件測定: 25°C，pH 7.4，20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% Tween 20、0.005% NaN3；該抗原結合分子係經固定於CM4感測晶片上，抗原作為分析物。

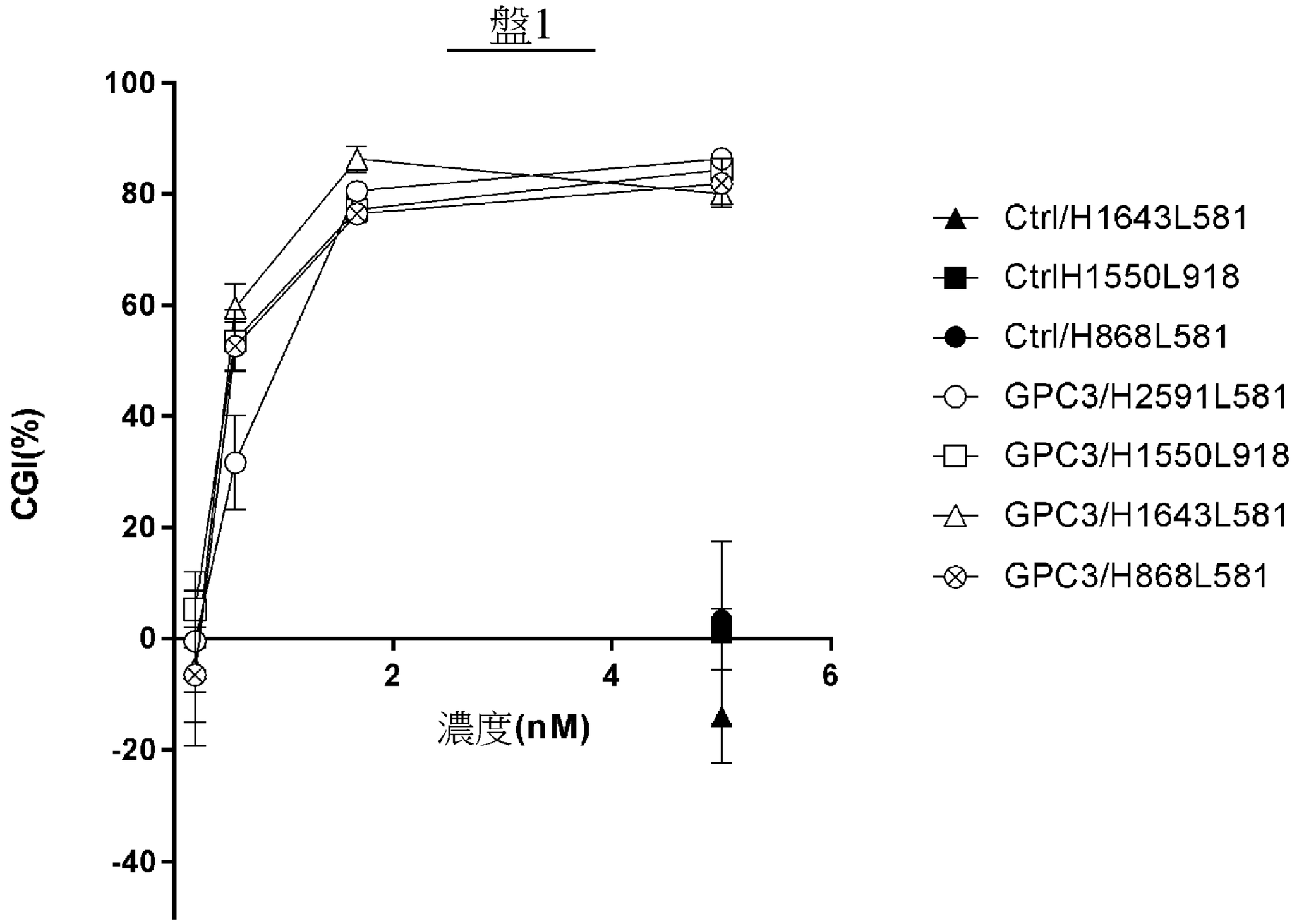
【發明圖式】


Jurkat CD3, 盤1
1.5×10^5
1×10^5
5×10^4
0
發光
0.02
0.2
2
抗體濃度 (nM)
GPC3/H183L072
GPC3/CD3ε
GPC3/H0868L0581
GPC3/H1550L0918
GPC3/H1643L0581
Ctrl/H0868L0581
Ctrl/H1550L0918
Ctrl/CD3ε
Ctrl/H1643L0581
Jurkat CD3, 盤2
1.5×10^5
1×10^5
5×10^4
0
發光
0.02
0.2
2
抗體濃度 (nM)
GPC3/H183L072
GPC3/CD3ε
GPC3/H1610L0581
GPC3/H1610L0939
GPC3/H2594L0581
GPC3/H2591L0581

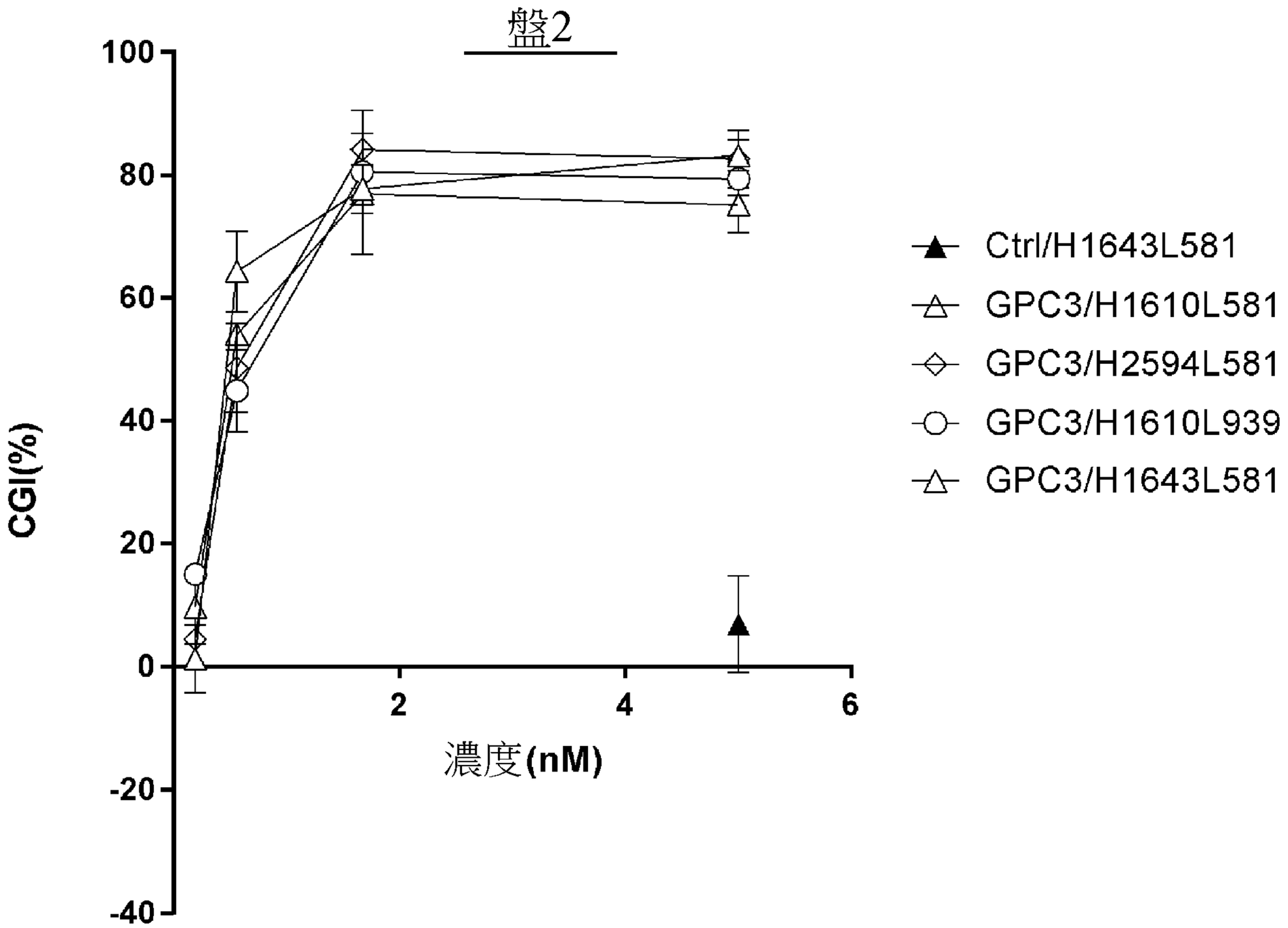
【圖 1.1】


Jurkat CD137, 盤1
1.5×10⁶
1×10⁶
5×10⁵
0
發光
0.5
2.5
5
抗體濃度 (nM)
GPC3/H183L072
GPC3/CD3ε
GPC3/H0868L581
GPC3/H1550L918
GPC3/H1643L581
Ctrl/H0868L581
Ctrl/H1550L918
Ctrl/CD3ε
Ctrl/H1643L581
Jurkat CD137, 盤2
1.5×10⁶
1×10⁶
5×10⁵
0
發光
0.5
2.5
5
抗體濃度 (nM)
GPC3/H183L072
GPC3/CD3ε
GPC3/H1610L0581
GPC3/H1610L0939
GPC3/H2594L0581
GPC3/H2591L0581

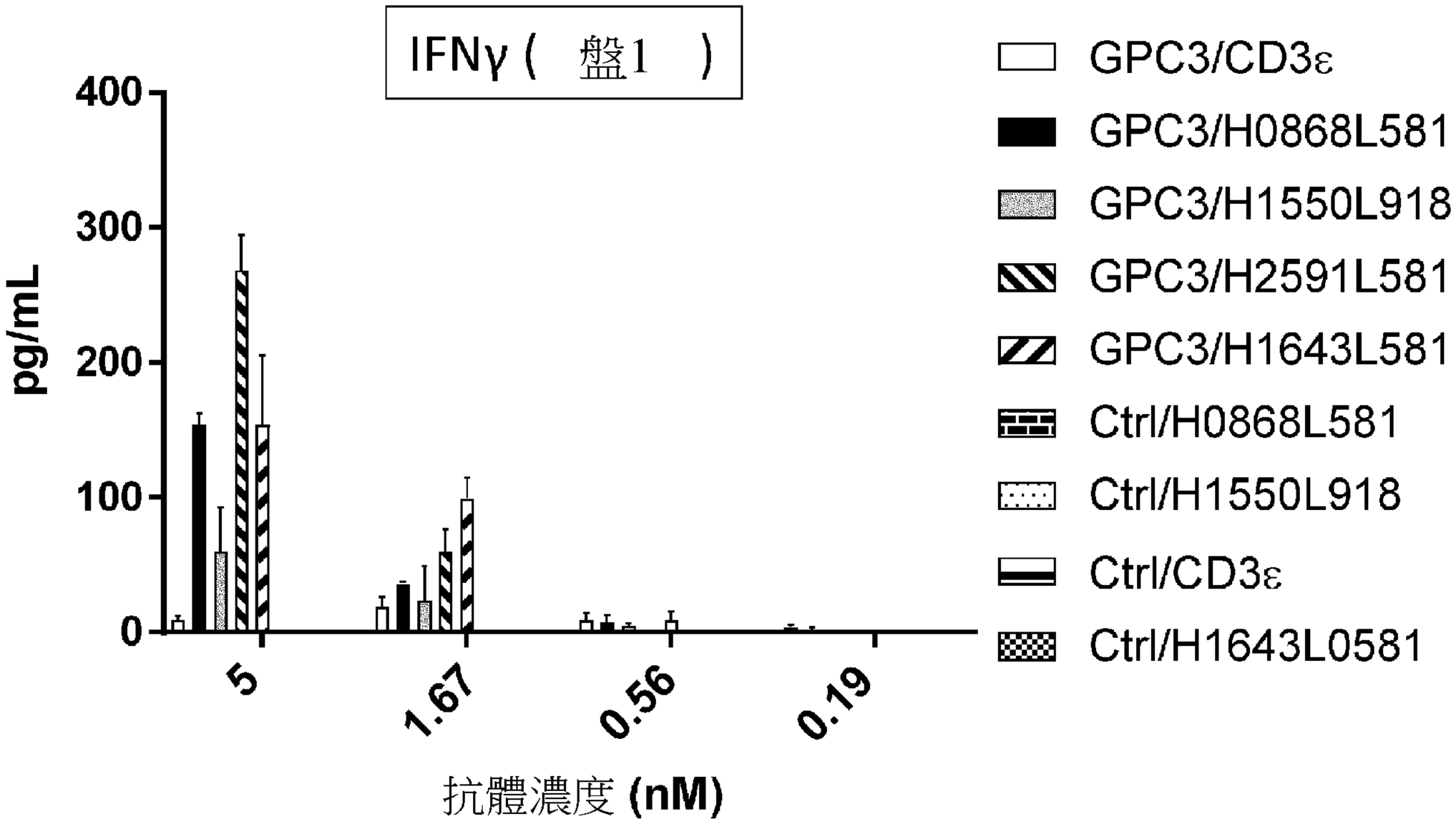
【圖 1.2】

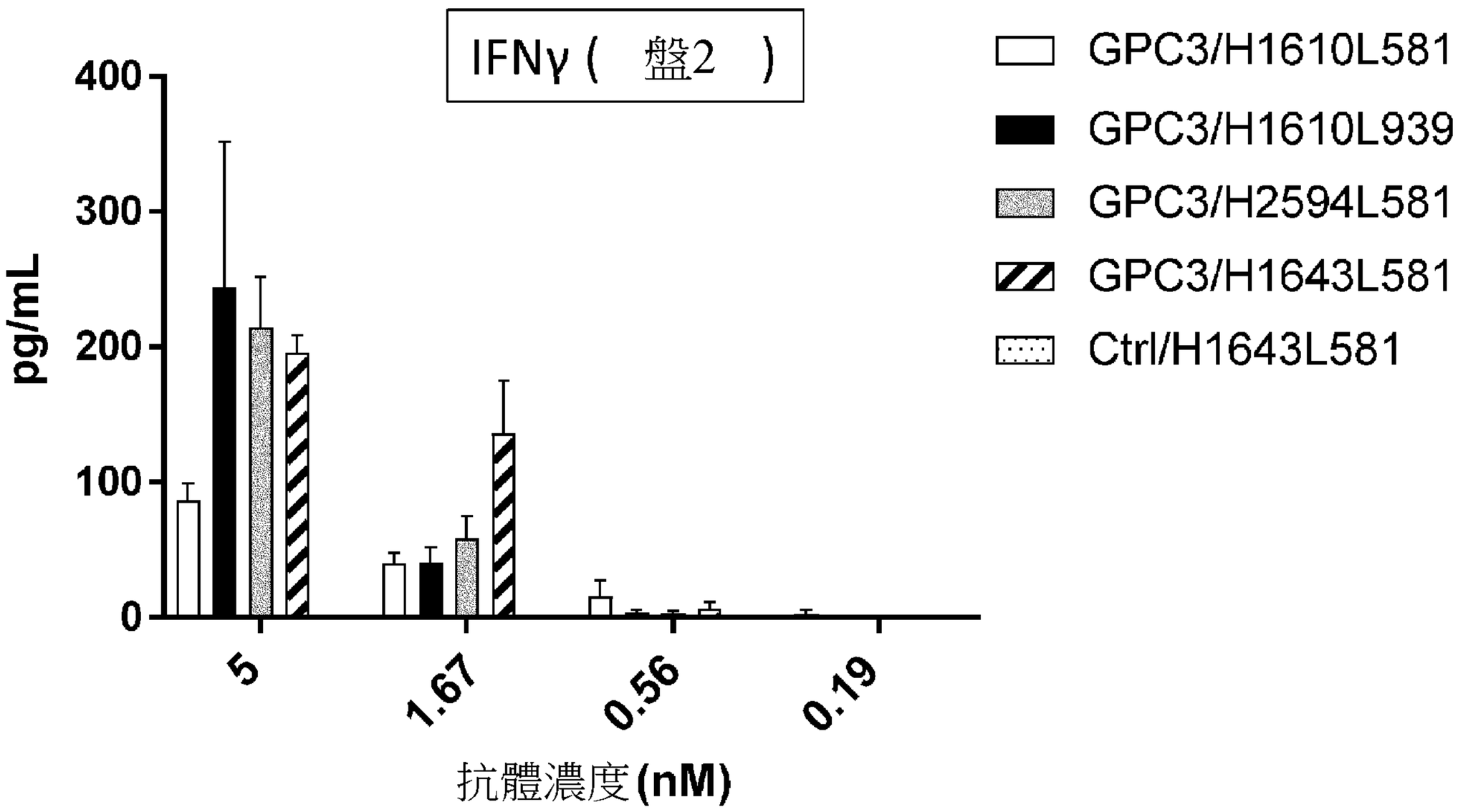

盤1
100
80
60
40
20
0
-20
-40
CGI(%)
2
4
6
濃度(nM)
Ctrl/H1643L581
CtrlH1550L918
Ctrl/H868L581
GPC3/H2591L581
GPC3/H1550L918
GPC3/H1643L581
GPC3/H868L581

【圖 1.3a】

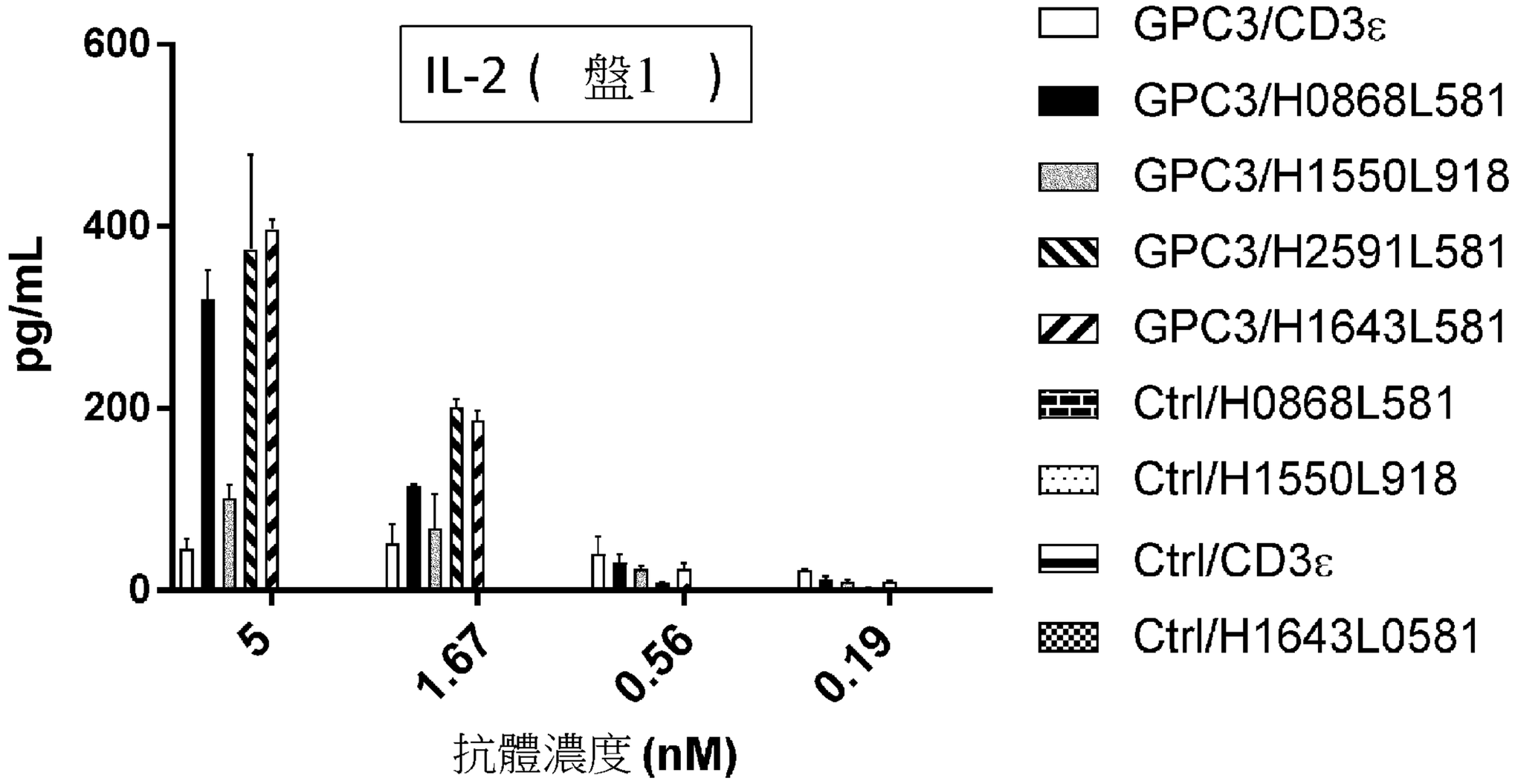

盤2
100
80
60
40
20
0
-20
-40
CGI(%)
2
4
6
濃度(nM)
Ctrl/H1643L581
GPC3/H1610L581
GPC3/H2594L581
GPC3/H1610L939
GPC3/H1643L581

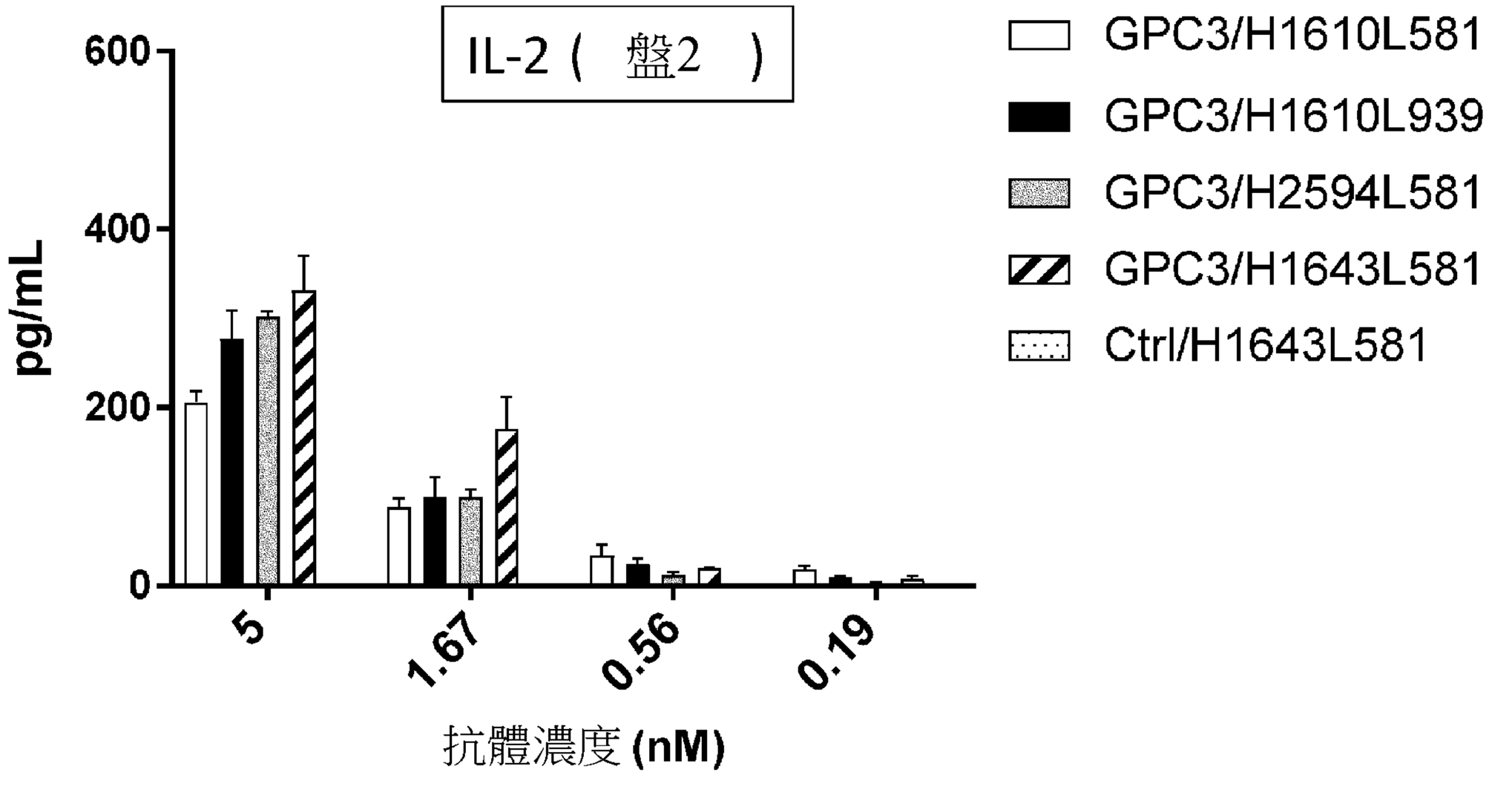
【圖 1.3b】


IFNγ (盤1)
400
300
200
100
0
pg/mL
5
1.67
0.56
0.19
抗體濃度 (nM)
GPC3/CD3ε
GPC3/H0868L581
GPC3/H1550L918
GPC3/H2591L581
GPC3/H1643L581
Ctrl/H0868L581
Ctrl/H1550L918
Ctrl/CD3ε
Ctrl/H1643L0581

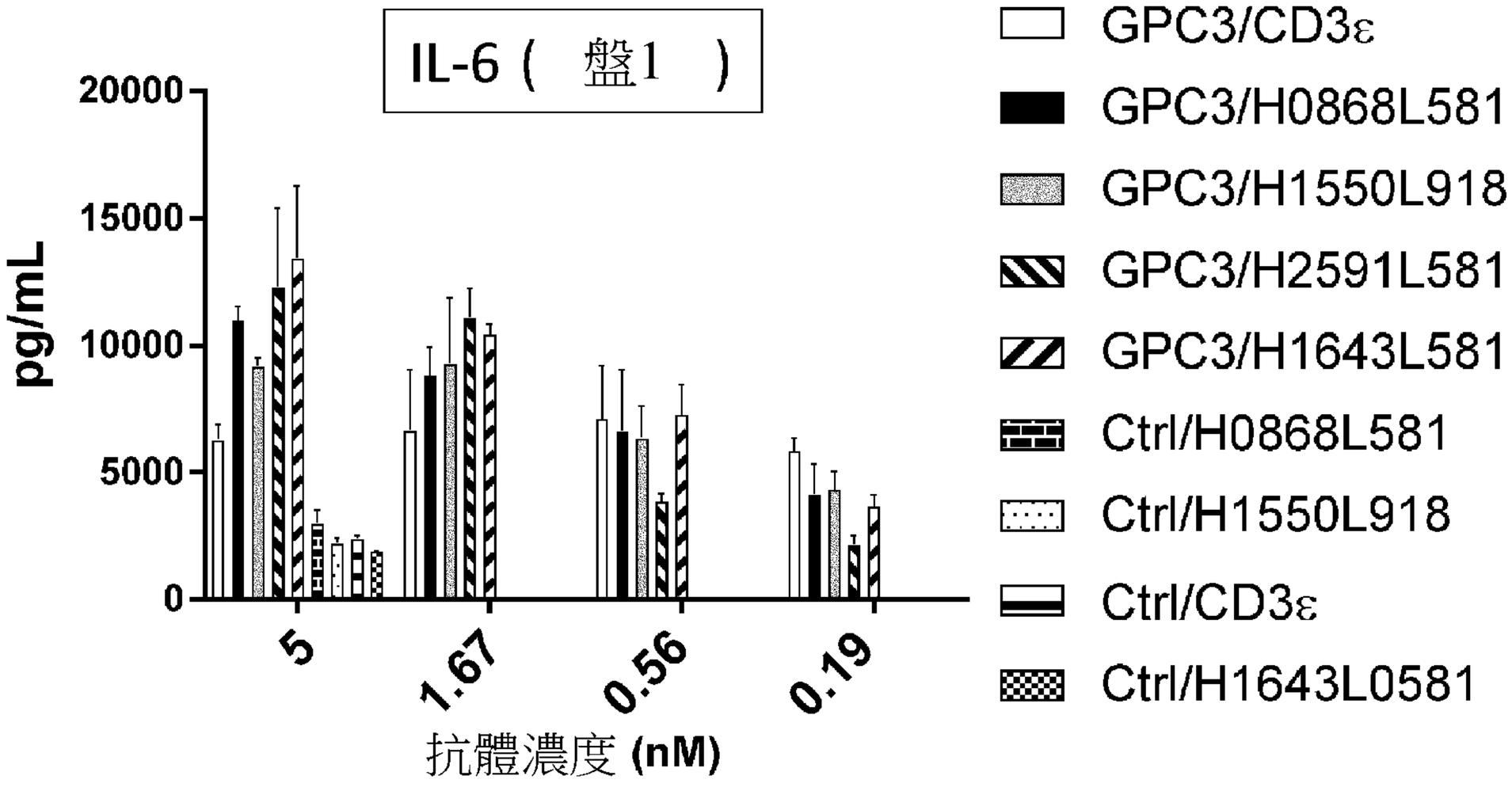

IFNγ (盤2)
400
300
200
100
0
pg/mL
5
1.67
0.56
0.19
抗體濃度(nM)
GPC3/H1610L581
GPC3/H1610L939
GPC3/H2594L581
GPC3/H1643L581
Ctrl/H1643L581

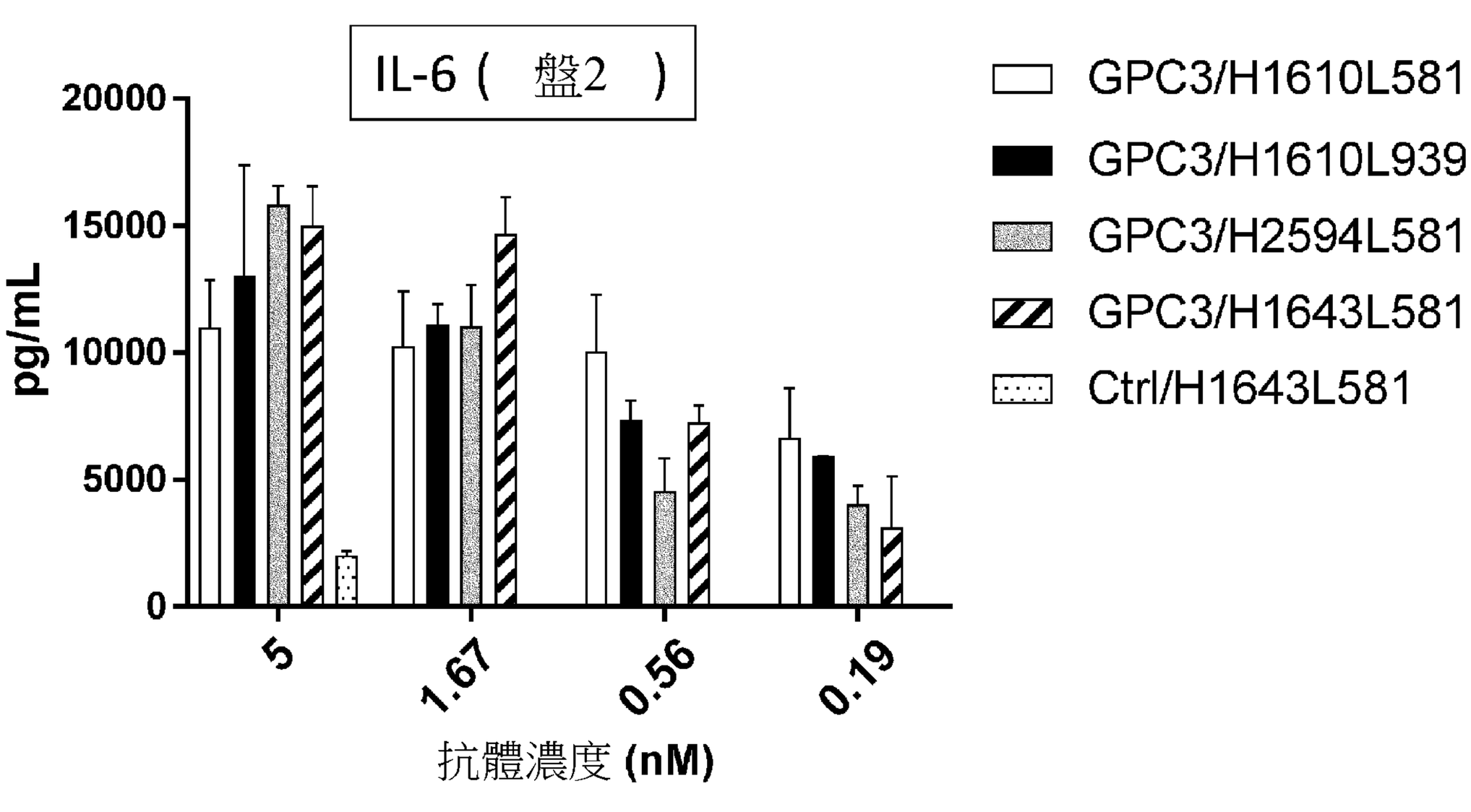
【圖 1.3c】


IL-2（ 盤1 ）
600
400
200
0
pg/mL
5
1.67
0.56
0.19
抗體濃度 (nM)
GPC3/CD3ε
GPC3/H0868L581
GPC3/H1550L918
GPC3/H2591L581
GPC3/H1643L581
Ctrl/H0868L581
Ctrl/H1550L918
Ctrl/CD3ε
Ctrl/H1643L0581

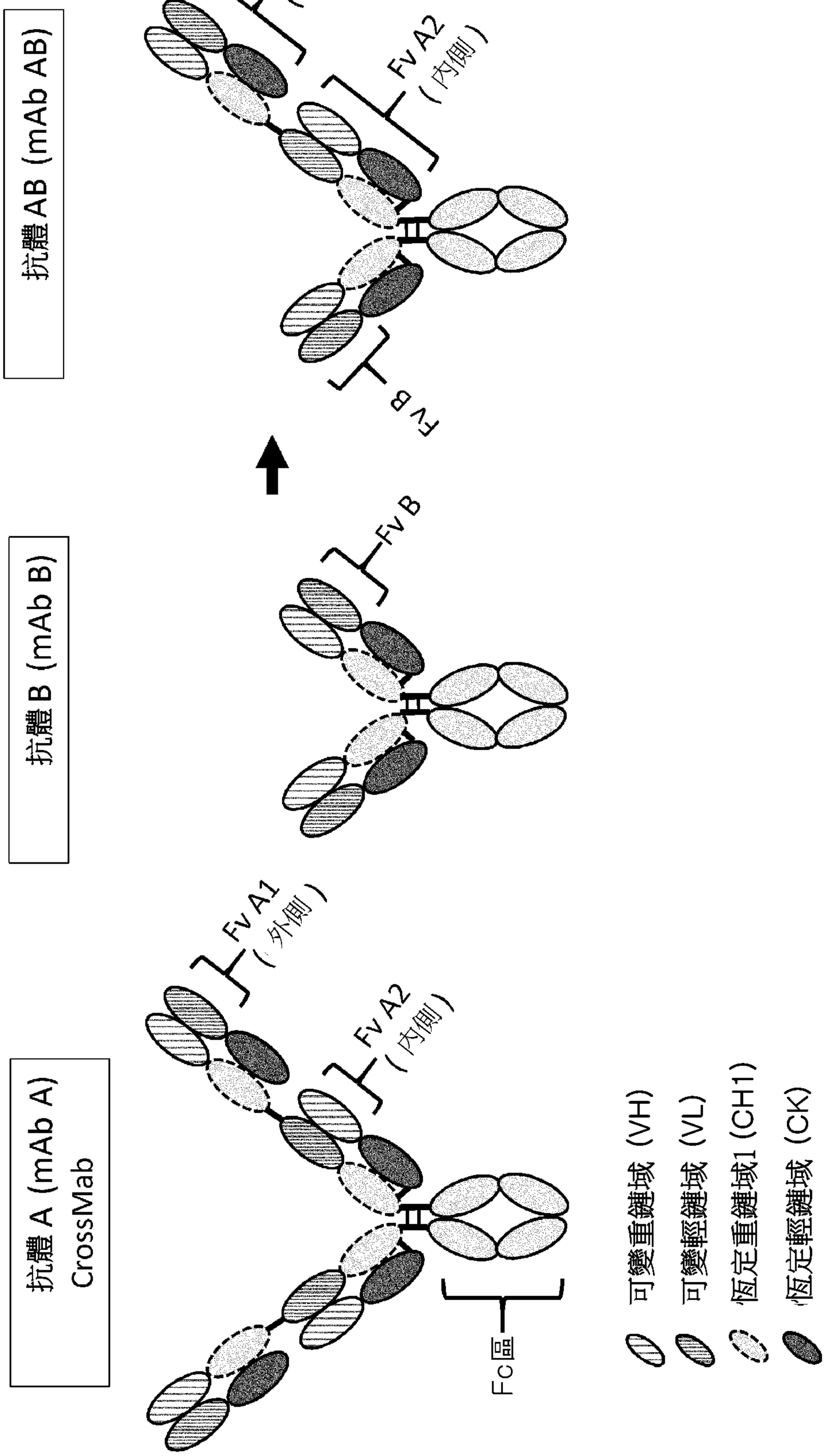

IL-2（ 盤2 ）
600
400
200
0
pg/mL
5
1.67
0.56
0.19
抗體濃度 (nM)
GPC3/H1610L581
GPC3/H1610L939
GPC3/H2594L581
GPC3/H1643L581
Ctrl/H1643L581

【圖 1.3d】


IL-6 (盤1)
pg/mL
20000
15000
10000
5000
0
5
1.67
0.56
0.19
抗體濃度 (nM)
GPC3/CD3ε
GPC3/H0868L581
GPC3/H1550L918
GPC3/H2591L581
GPC3/H1643L581
Ctrl/H0868L581
Ctrl/H1550L918
Ctrl/CD3ε
Ctrl/H1643L0581


IL-6 (盤2)
pg/mL
20000
15000
10000
5000
0
5
1.67
0.56
0.19
抗體濃度 (nM)
GPC3/H1610L581
GPC3/H1610L939
GPC3/H2594L581
GPC3/H1643L581
Ctrl/H1643L581

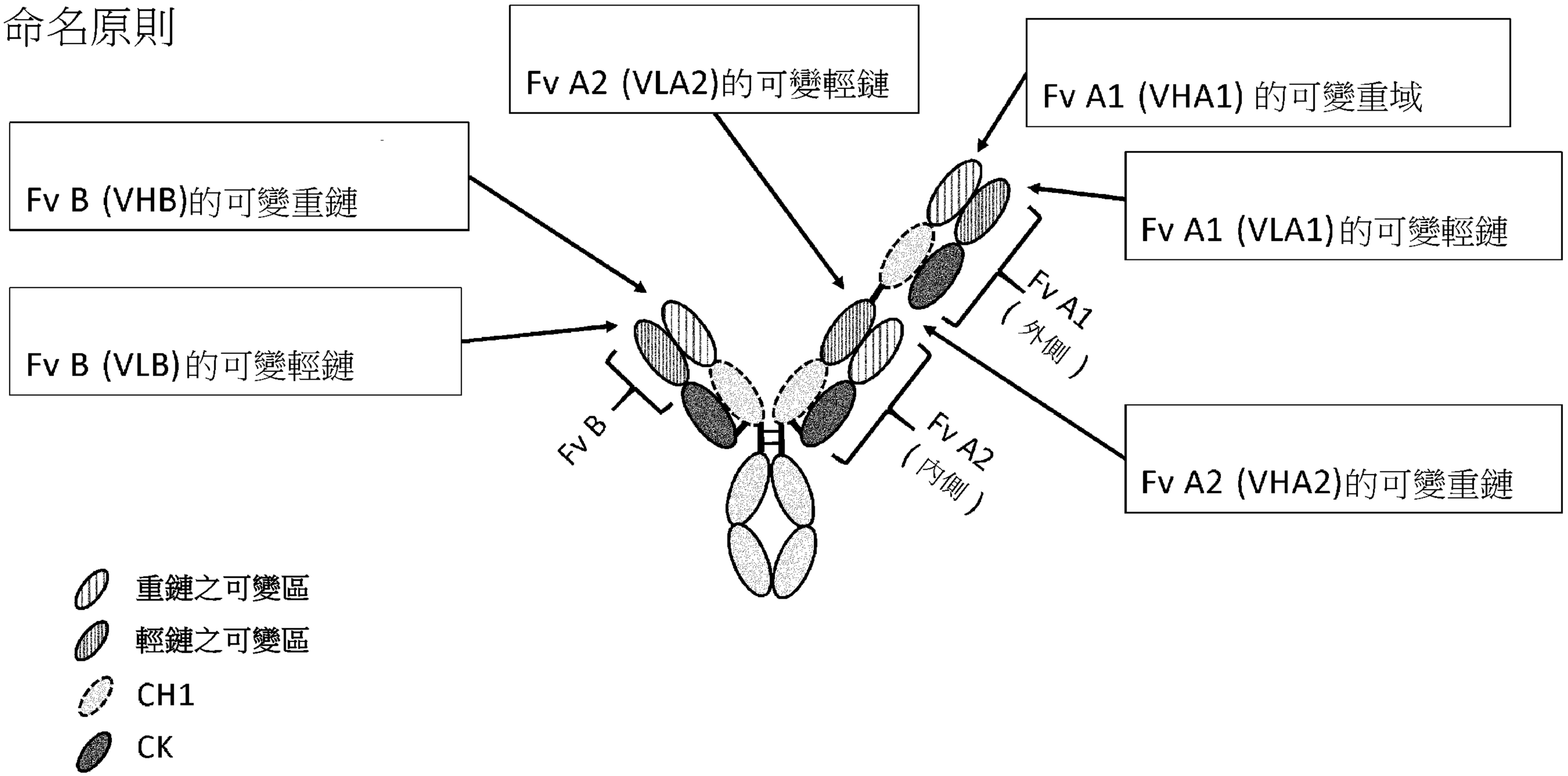
【圖 1.3e】


抗體 AB (mAb AB)
Fv A1
（外側）
Fv A2
（內側）
Fv B
抗體 B (mAb B)
抗體 A (mAb A)
CrossMab
可變重鏈域 (VH)
可變輕鏈域 (VL)
恆定重鏈域1 (CH1)
恆定輕鏈域 (CK)
Fc區

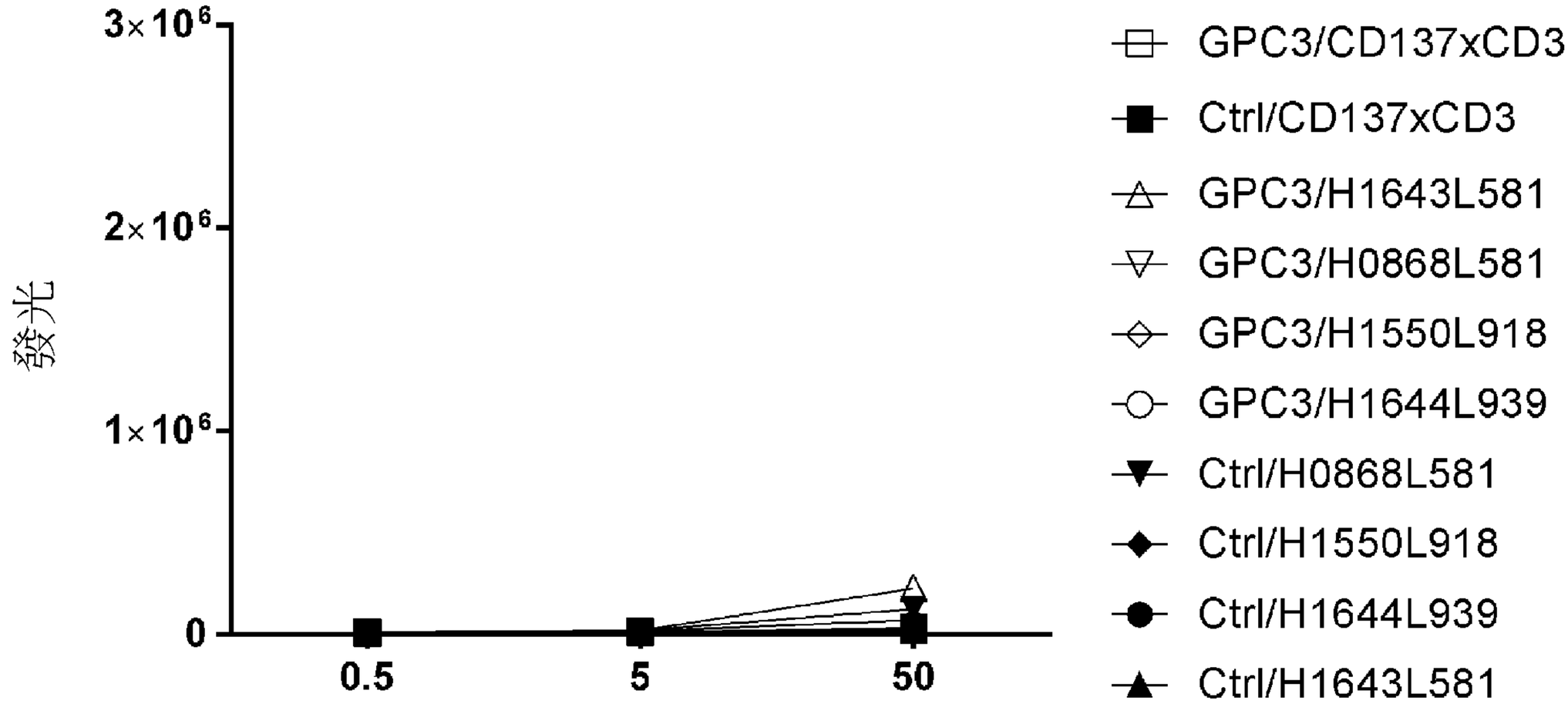
【圖 2.1】

【圖 2.2】

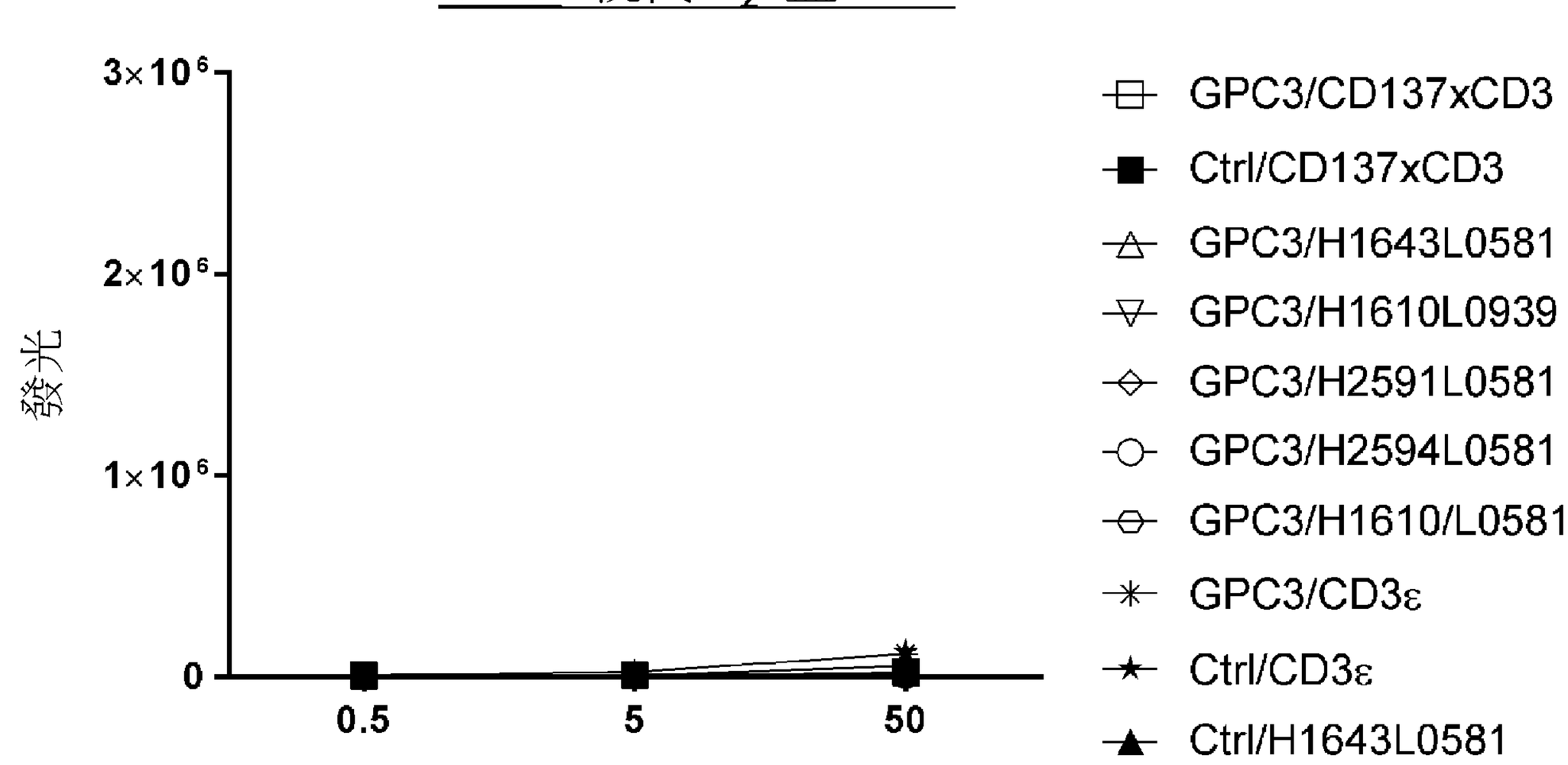
命名原則


Fv A2 (VLA2)的可變輕鏈
Fv A1 (VHA1) 的可變重域
Fv B (VHB)的可變重鏈
Fv A1 (VLA1)的可變輕鏈
Fv B (VLB)的可變輕鏈
Fv A1
（外側）
Fv B
Fv A2
（內側）
Fv A2 (VHA2)的可變重鏈
重鏈之可變區
輕鏈之可變區
CH1
CK

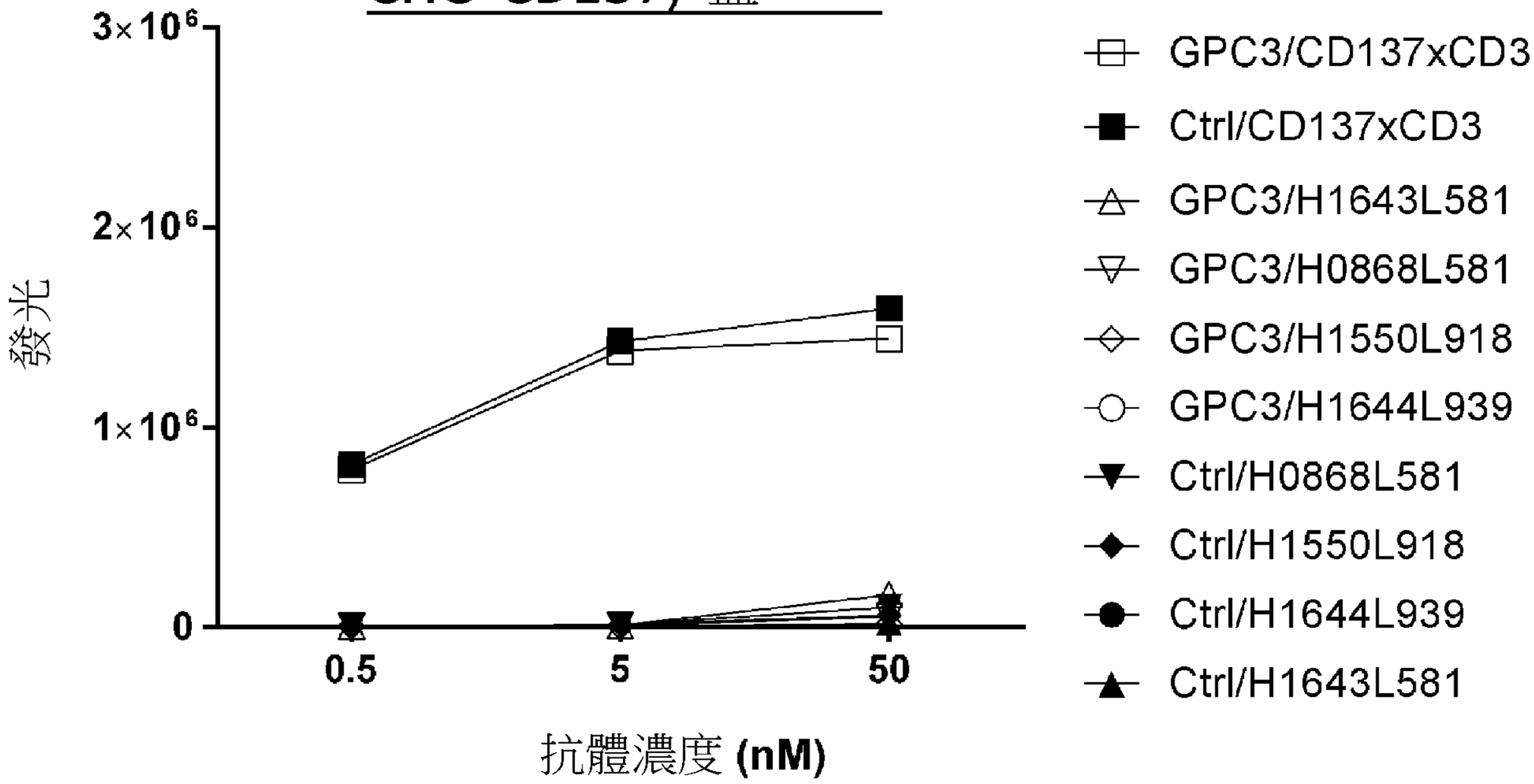
CHO 親代 ，盤1

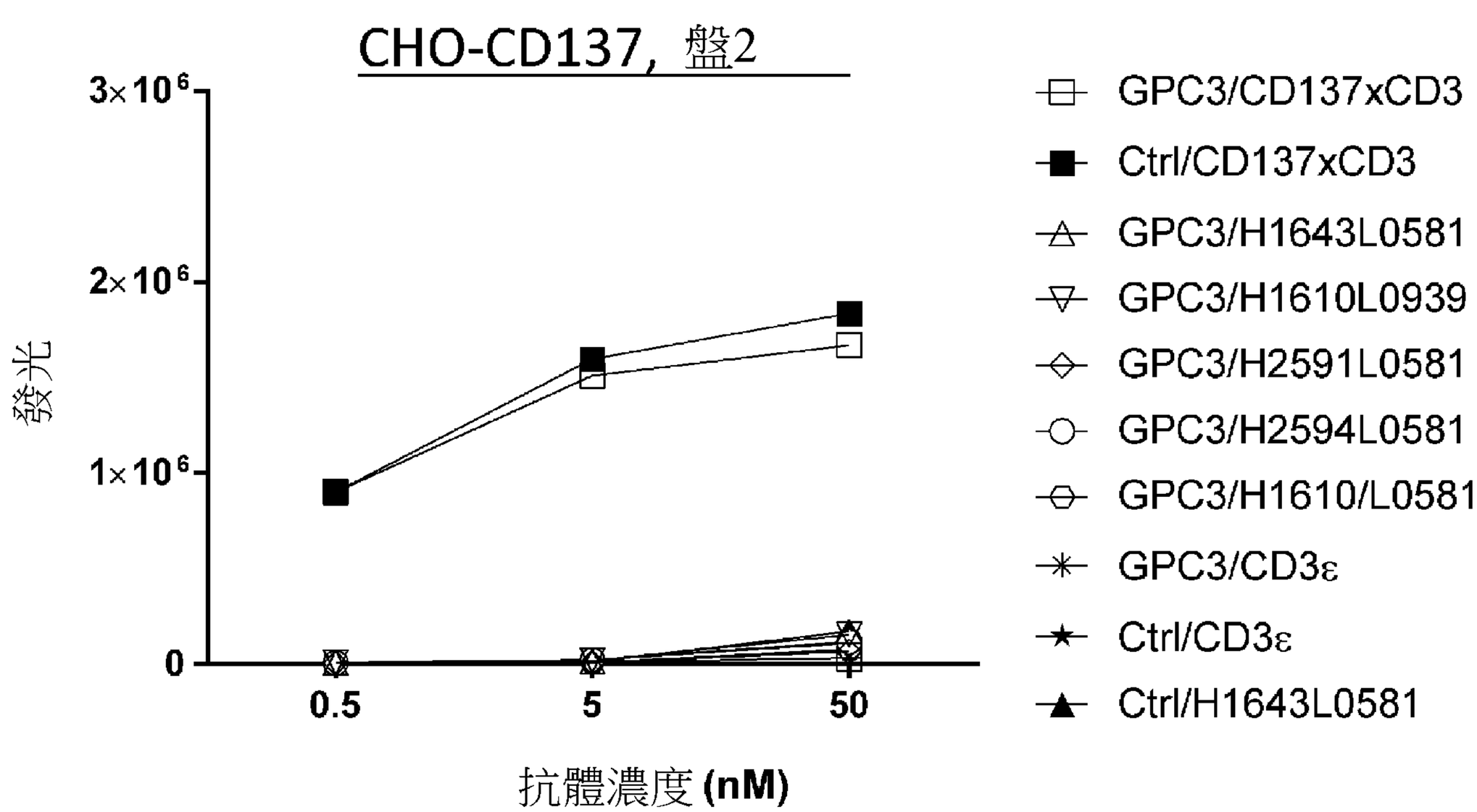


CHO 親代 ，盤2

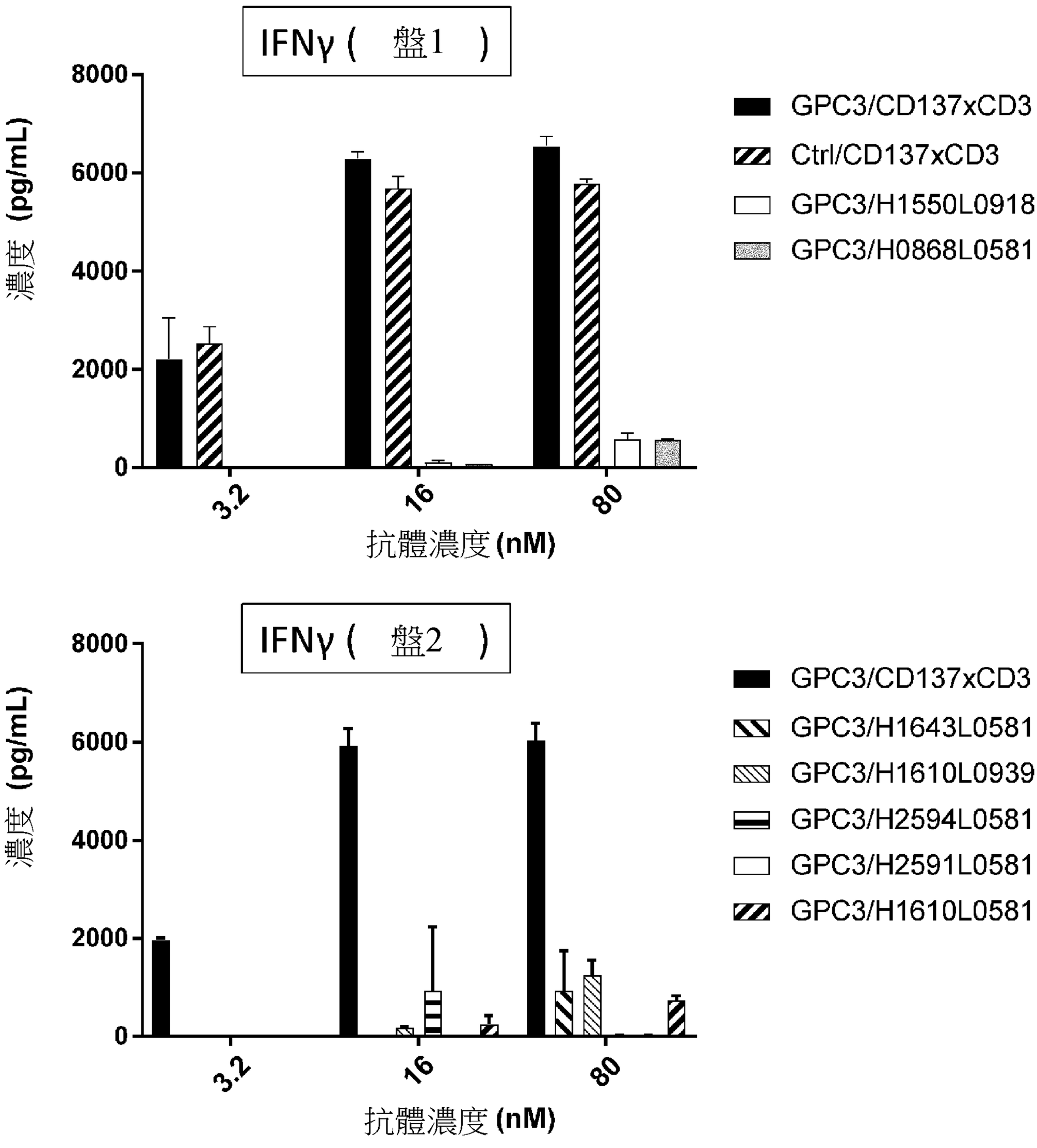


【圖 2.3a】

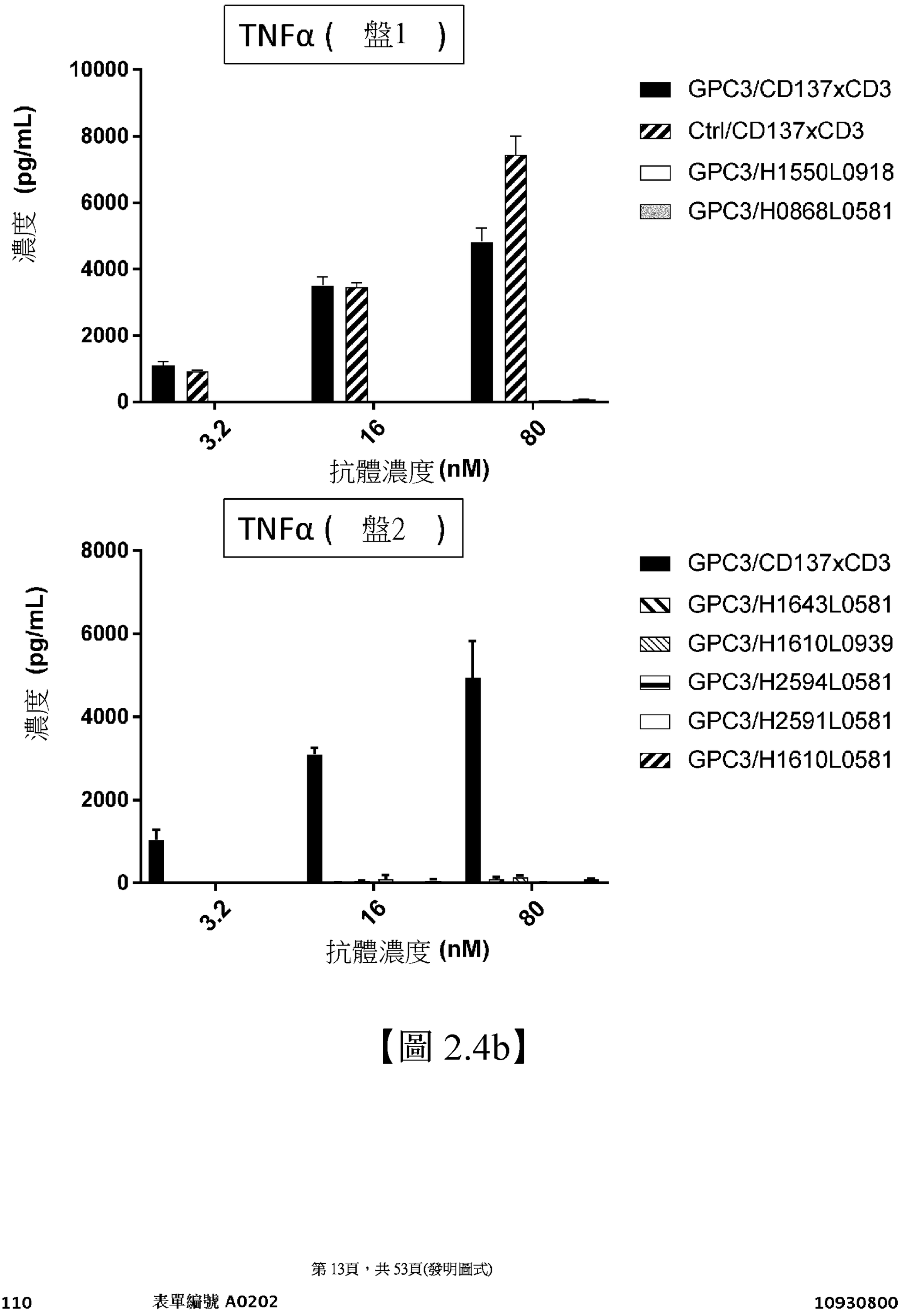

CHO-CD137, 盤1
3×10^6
2×10^6
1×10^6
0
發光
0.5
5
50
抗體濃度 (nM)
GPC3/CD137xCD3
Ctrl/CD137xCD3
GPC3/H1643L581
GPC3/H0868L581
GPC3/H1550L918
GPC3/H1644L939
Ctrl/H0868L581
Ctrl/H1550L918
Ctrl/H1644L939
Ctrl/H1643L581


CHO-CD137, 盤2
3×10^6
2×10^6
1×10^6
0
發光
0.5
5
50
抗體濃度 (nM)
GPC3/CD137xCD3
Ctrl/CD137xCD3
GPC3/H1643L0581
GPC3/H1610L0939
GPC3/H2591L0581
GPC3/H2594L0581
GPC3/H1610/L0581
GPC3/CD3ε
Ctrl/CD3ε
Ctrl/H1643L0581

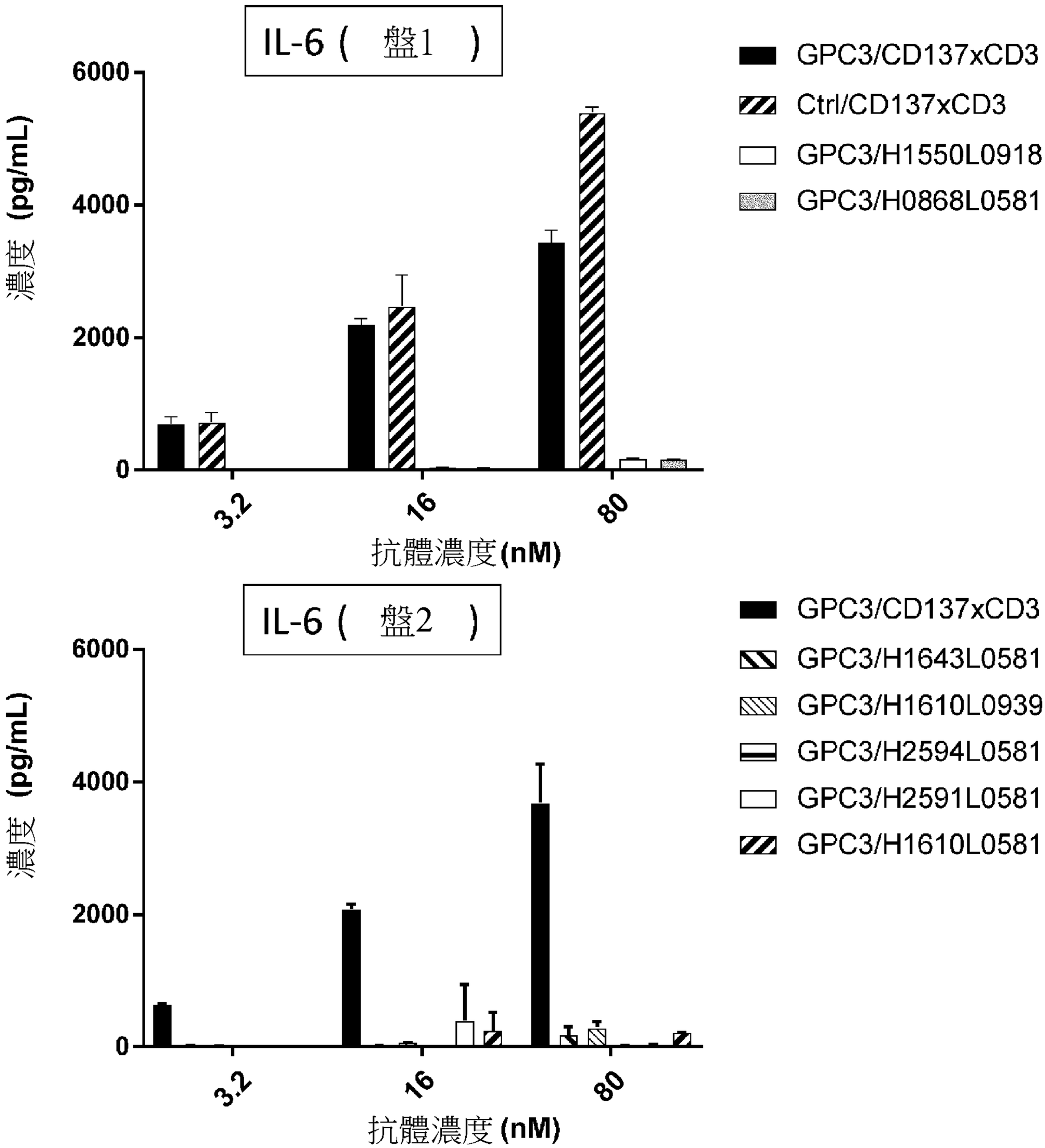
【圖 2.3b】


IFNγ (盤1)
濃度 (pg/mL)
8000
6000
4000
2000
0
3.2
16
80
抗體濃度 (nM)
GPC3/CD137xCD3
Ctrl/CD137xCD3
GPC3/H1550L0918
GPC3/H0868L0581
IFNγ (盤2)
濃度 (pg/mL)
8000
6000
4000
2000
0
3.2
16
80
抗體濃度 (nM)
GPC3/CD137xCD3
GPC3/H1643L0581
GPC3/H1610L0939
GPC3/H2594L0581
GPC3/H2591L0581
GPC3/H1610L0581

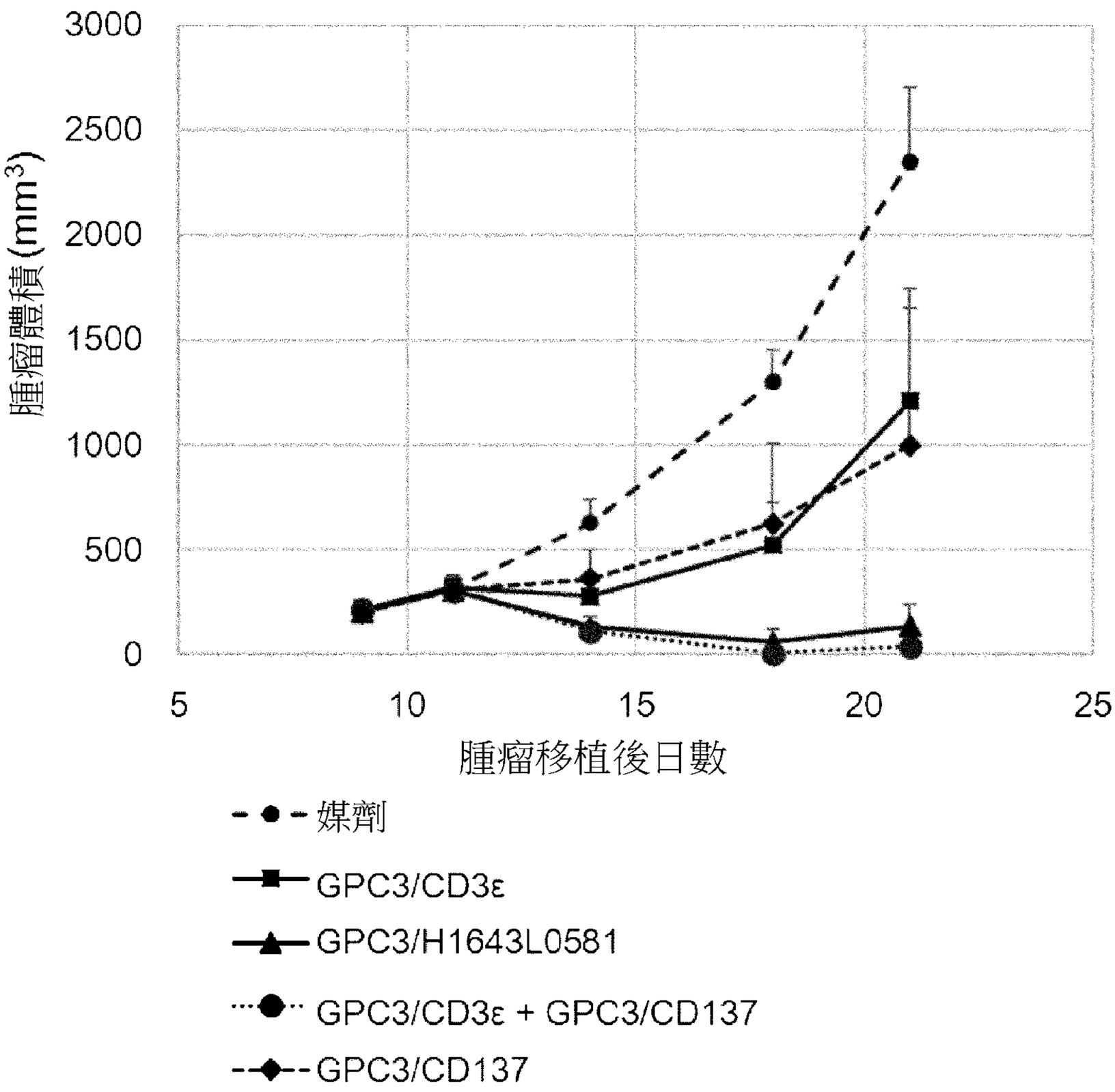
【圖 2.4a】


TNFα (盤1)
濃度 (pg/mL)
10000
8000
6000
4000
2000
0
3.2
16
80
抗體濃度 (nM)
GPC3/CD137xCD3
Ctrl/CD137xCD3
GPC3/H1550L0918
GPC3/H0868L0581
TNFα (盤2)
濃度 (pg/mL)
8000
6000
4000
2000
0
3.2
16
80
抗體濃度 (nM)
GPC3/CD137xCD3
GPC3/H1643L0581
GPC3/H1610L0939
GPC3/H2594L0581
GPC3/H2591L0581
GPC3/H1610L0581

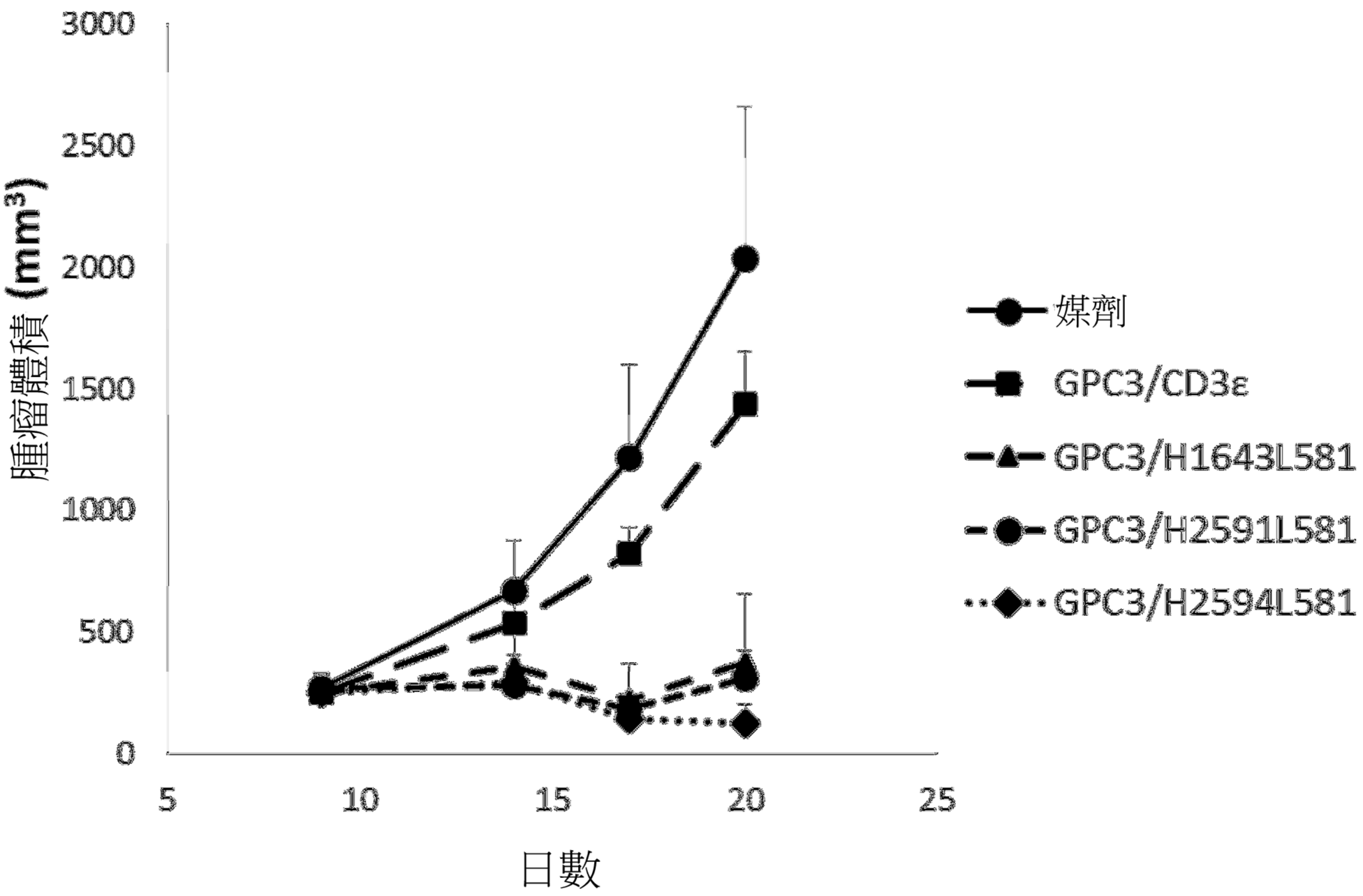
【圖 2.4b】


IL-6 (盤1)
濃度 (pg/mL)
6000
4000
2000
0
3.2
16
80
抗體濃度(nM)
GPC3/CD137xCD3
Ctrl/CD137xCD3
GPC3/H1550L0918
GPC3/H0868L0581
IL-6 (盤2)
濃度 (pg/mL)
6000
4000
2000
0
3.2
16
80
抗體濃度 (nM)
GPC3/CD137xCD3
GPC3/H1643L0581
GPC3/H1610L0939
GPC3/H2594L0581
GPC3/H2591L0581
GPC3/H1610L0581

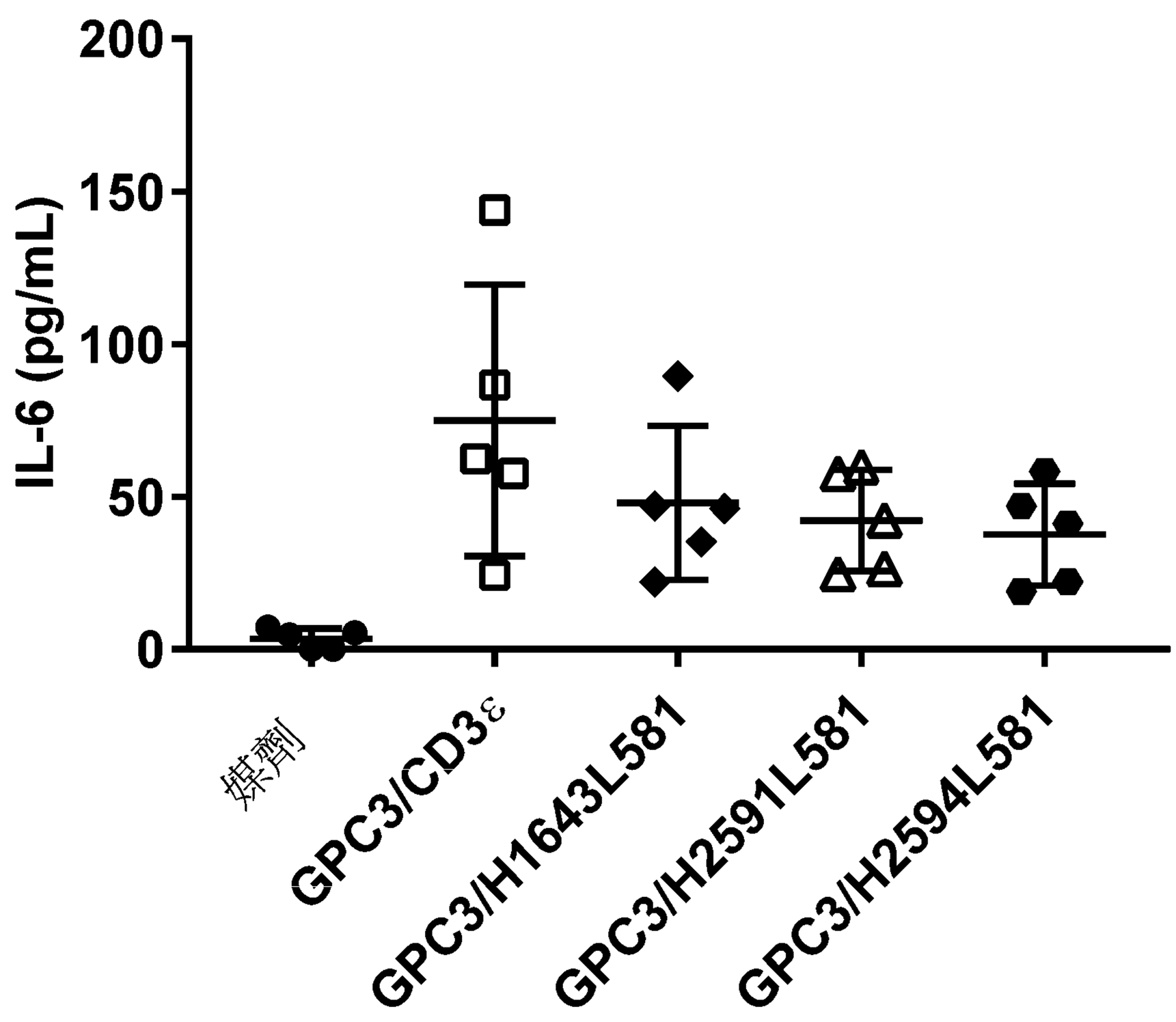
【圖 2.4c】


腫瘤體積 (mm3)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
5
10
15
20
25
腫瘤移植後日數
媒劑
GPC3/CD3ε
GPC3/H1643L0581
GPC3/CD3ε + GPC3/CD137
GPC3/CD137

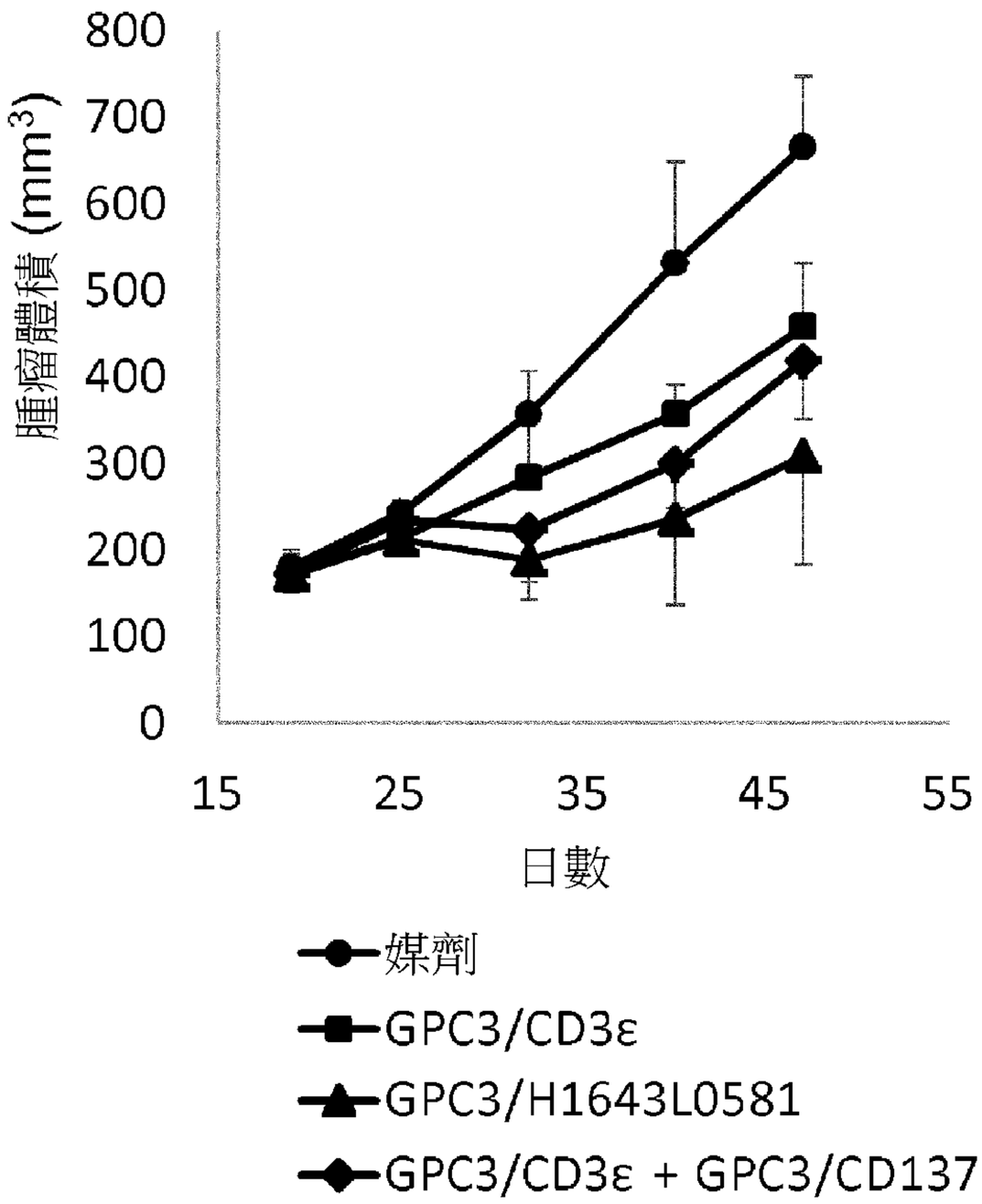
【圖 3.1a】


腫瘤體積 (mm3)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
5
10
15
20
25
日數
媒劑
GPC3/CD3ε
GPC3/H1643L581
GPC3/H2591L581
GPC3/H2594L581

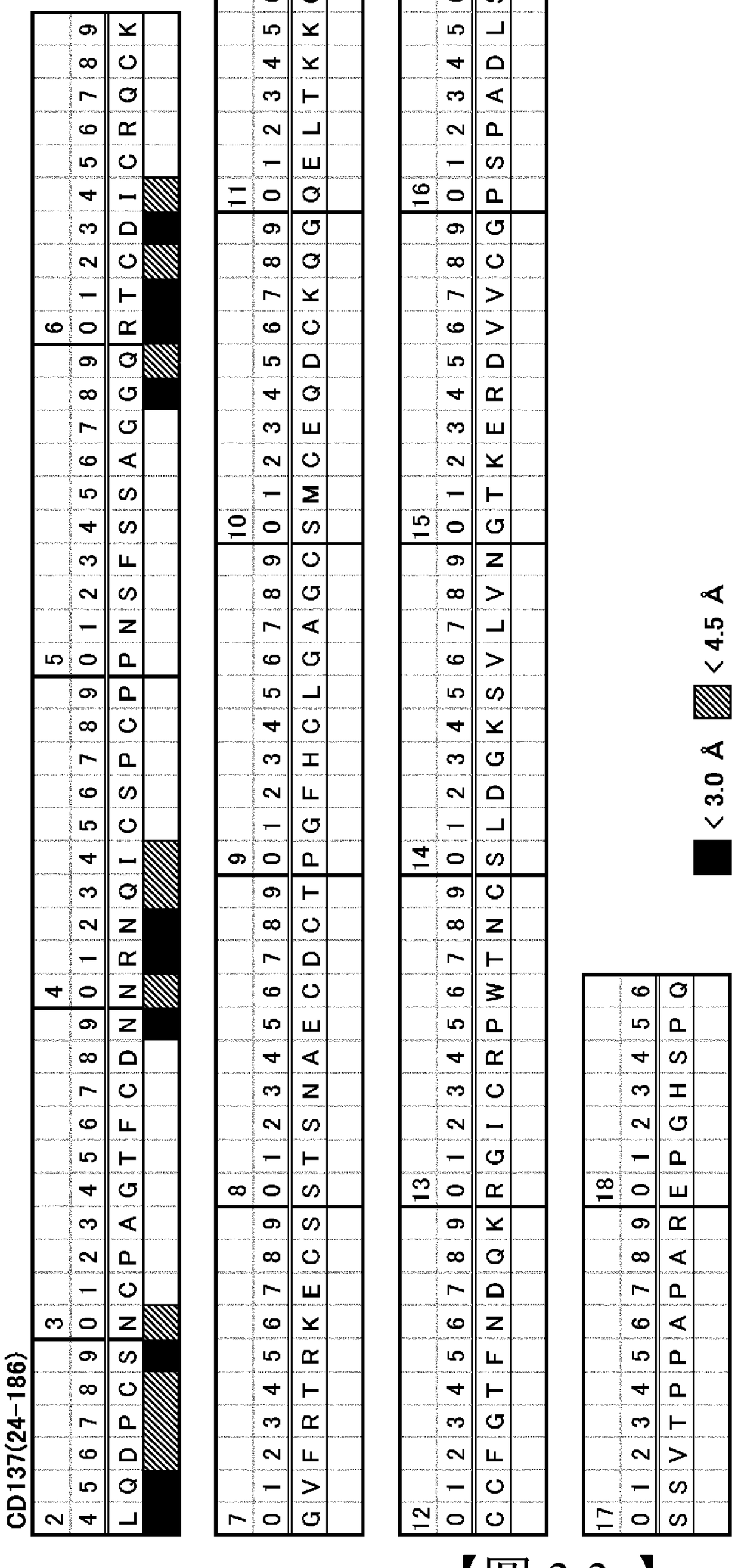
【圖 3.1b】


IL-6 (pg/mL)
200
150
100
50
0
媒劑
GPC3/CD3ε
GPC3/H1643L581
GPC3/H2591L581
GPC3/H2594L581

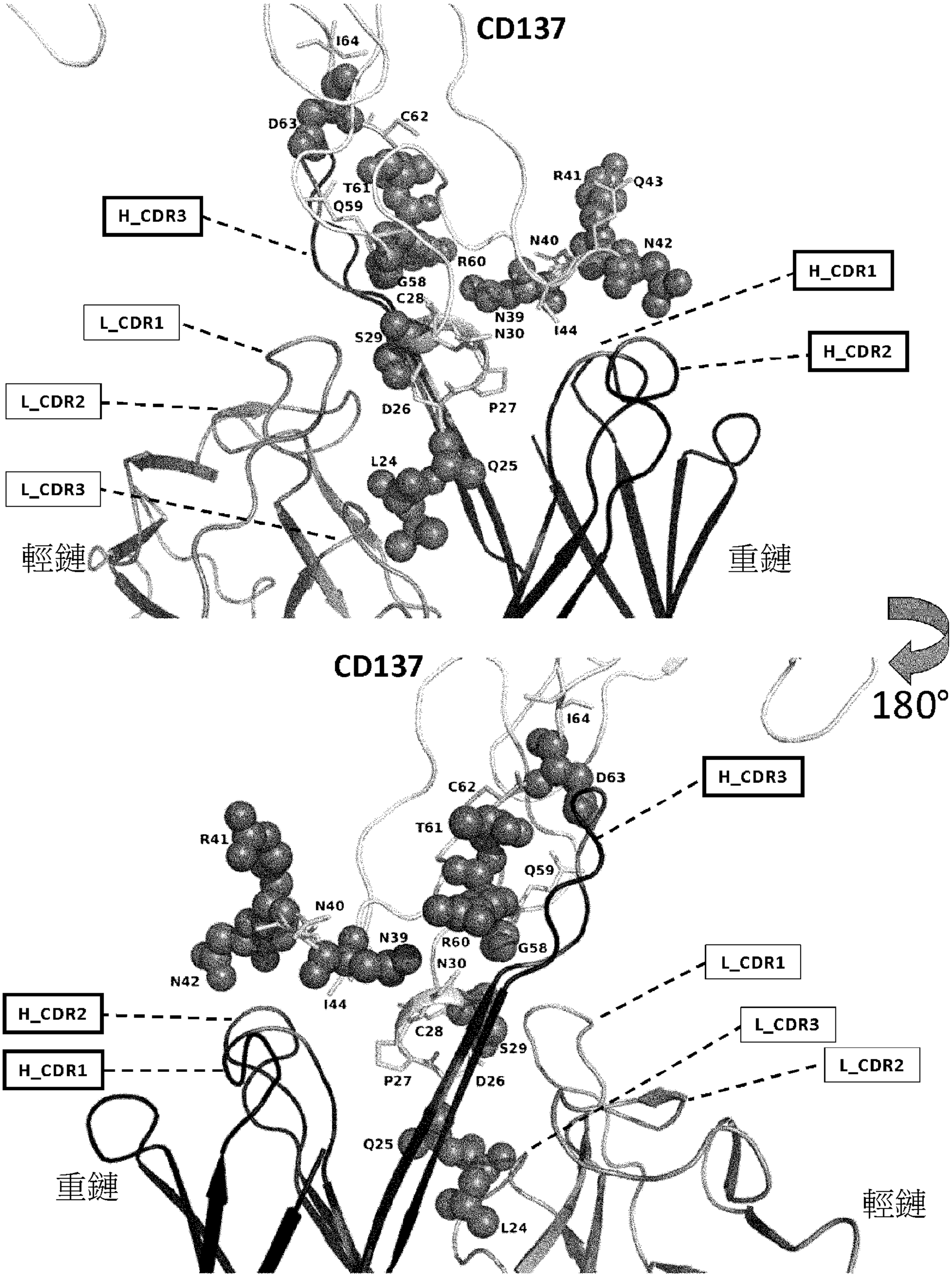
【圖 3.1c】


腫瘤體積 (mm3)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
15
25
35
45
55
日數
媒劑
GPC3/CD3ε
GPC3/H1643L0581
GPC3/CD3ε + GPC3/CD137

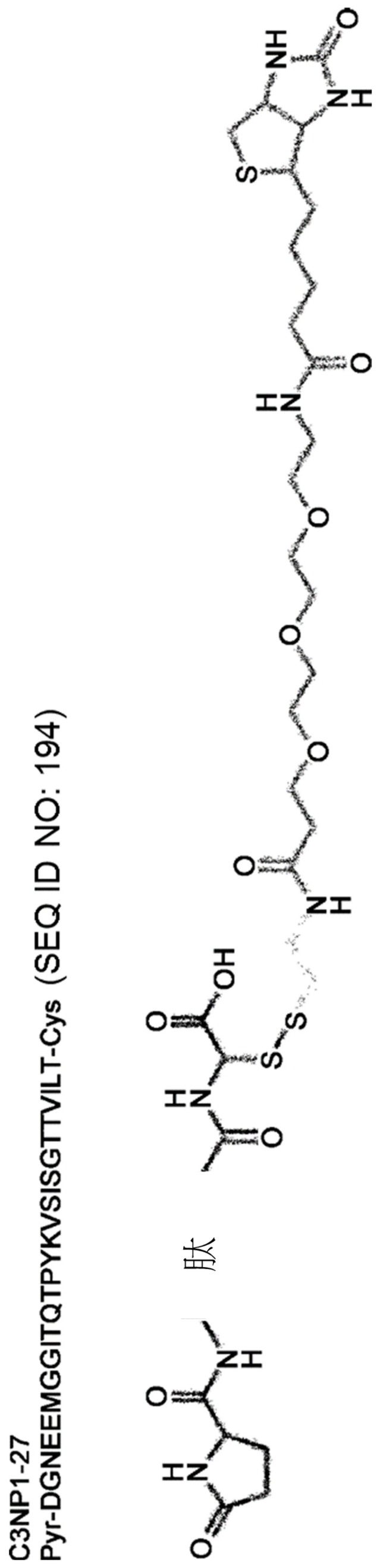
【圖 3.2】



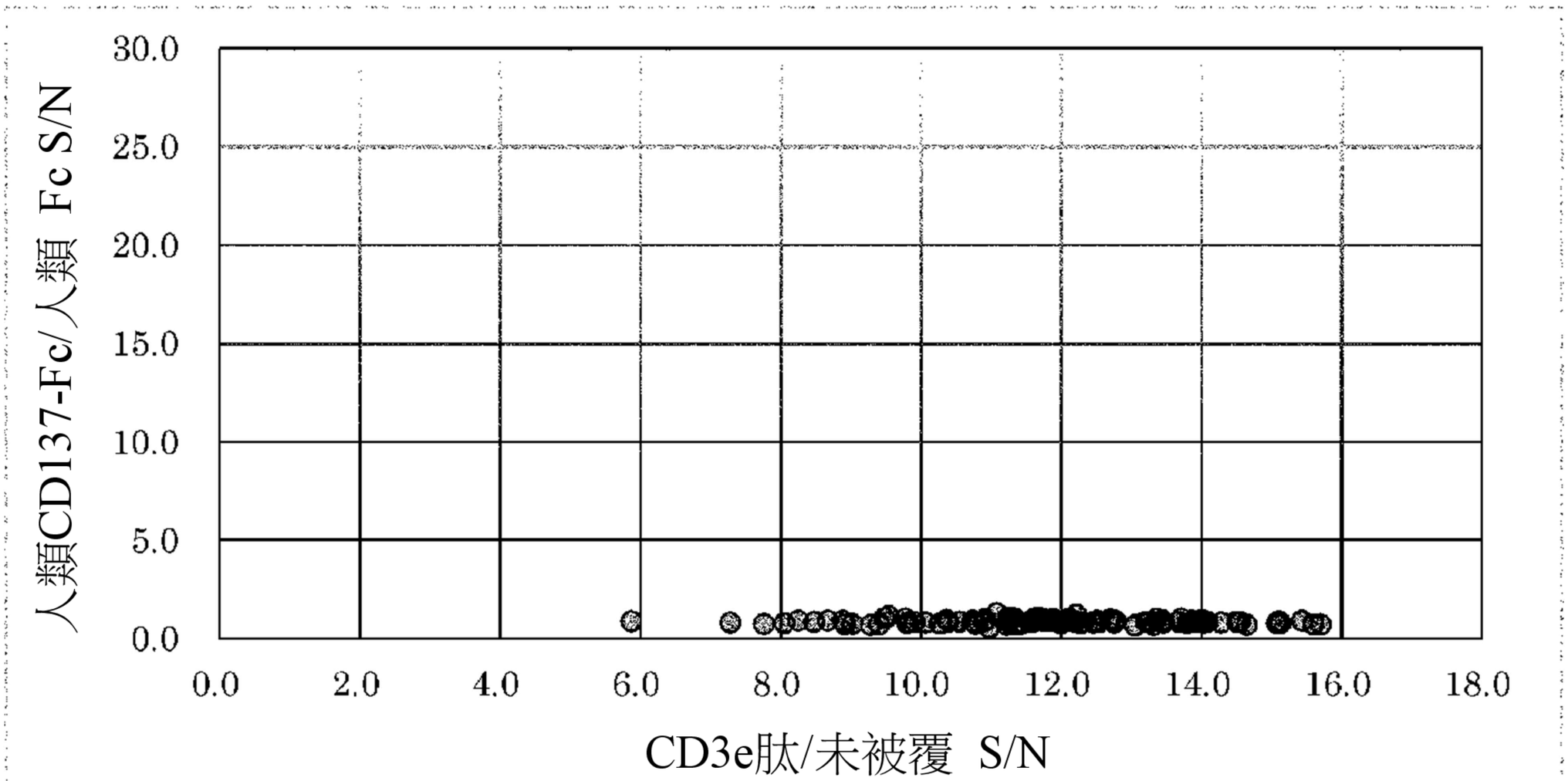
【圖 3.3a】


CD137
I64
D63
C62
T61
Q59
R60
G58
C28
S29
N30
D26
P27
L24
Q25
R41
Q43
N40
N42
N39
I44
H_CDR3
H_CDR1
H_CDR2
L_CDR1
L_CDR2
L_CDR3
輕鏈
重鏈
180°
CD137
I64
D63
C62
T61
R41
Q59
N40
N39
R60
G58
N30
N42
I44
C28
S29
P27
D26
Q25
L24
H_CDR3
L_CDR1
L_CDR3
L_CDR2
H_CDR2
H_CDR1
重鏈
輕鏈

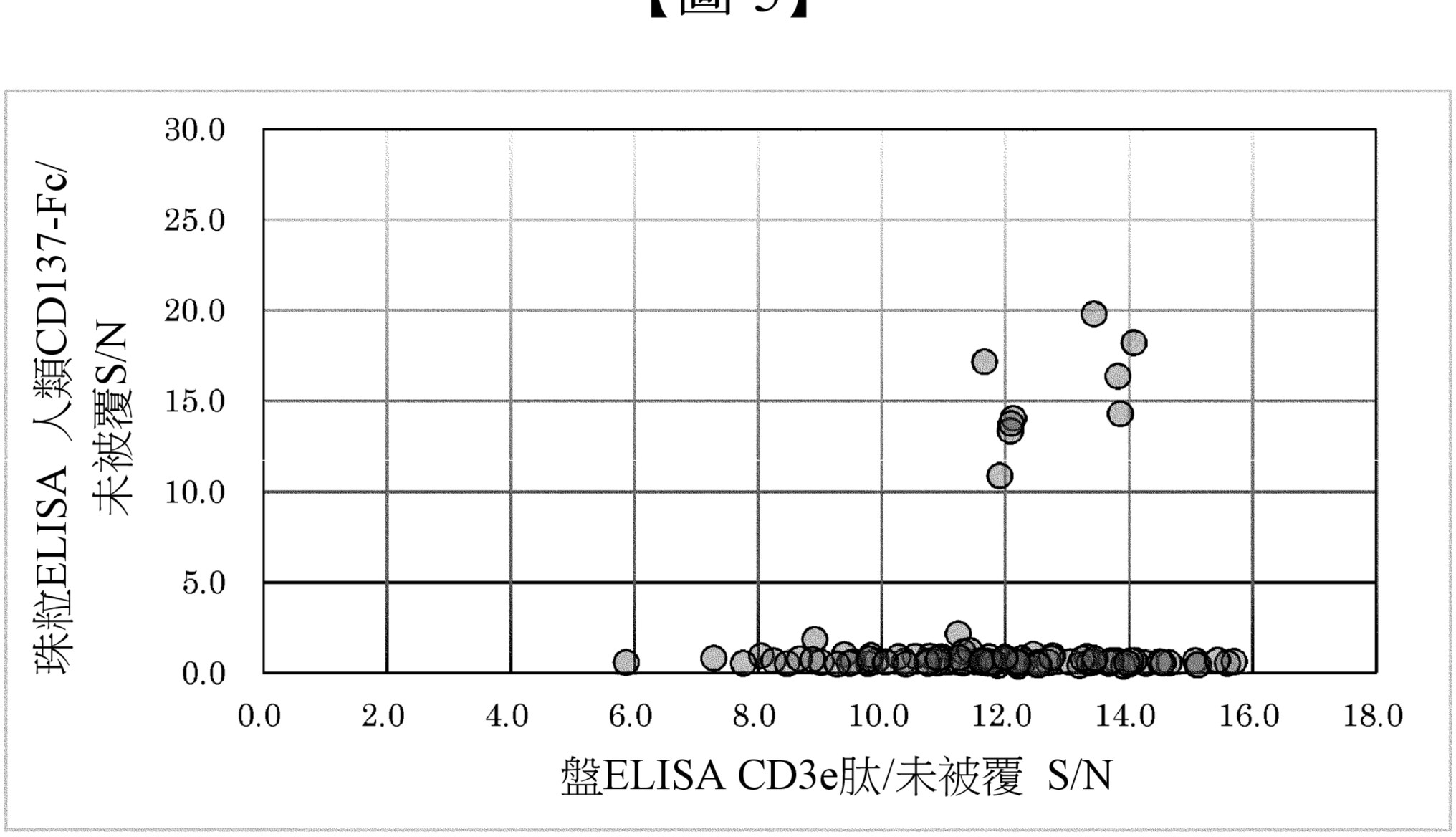
【圖 3.3b】


C3NP1-27
Pyr-DGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILT-Cys (SEQ ID NO: 194)
肽

【圖 4】


人類CD137-Fc/人類 Fc S/N
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
0.0
2.0
4.0
6.0
8.0
10.0
12.0
14.0
16.0
18.0
CD3e肽/未被覆 S/N

【圖 5】


珠粒ELISA 人類CD137-Fc/
未被覆S/N
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
0.0
2.0
4.0
6.0
8.0
10.0
12.0
14.0
16.0
18.0
盤ELISA CD3e肽/未被覆 S/N

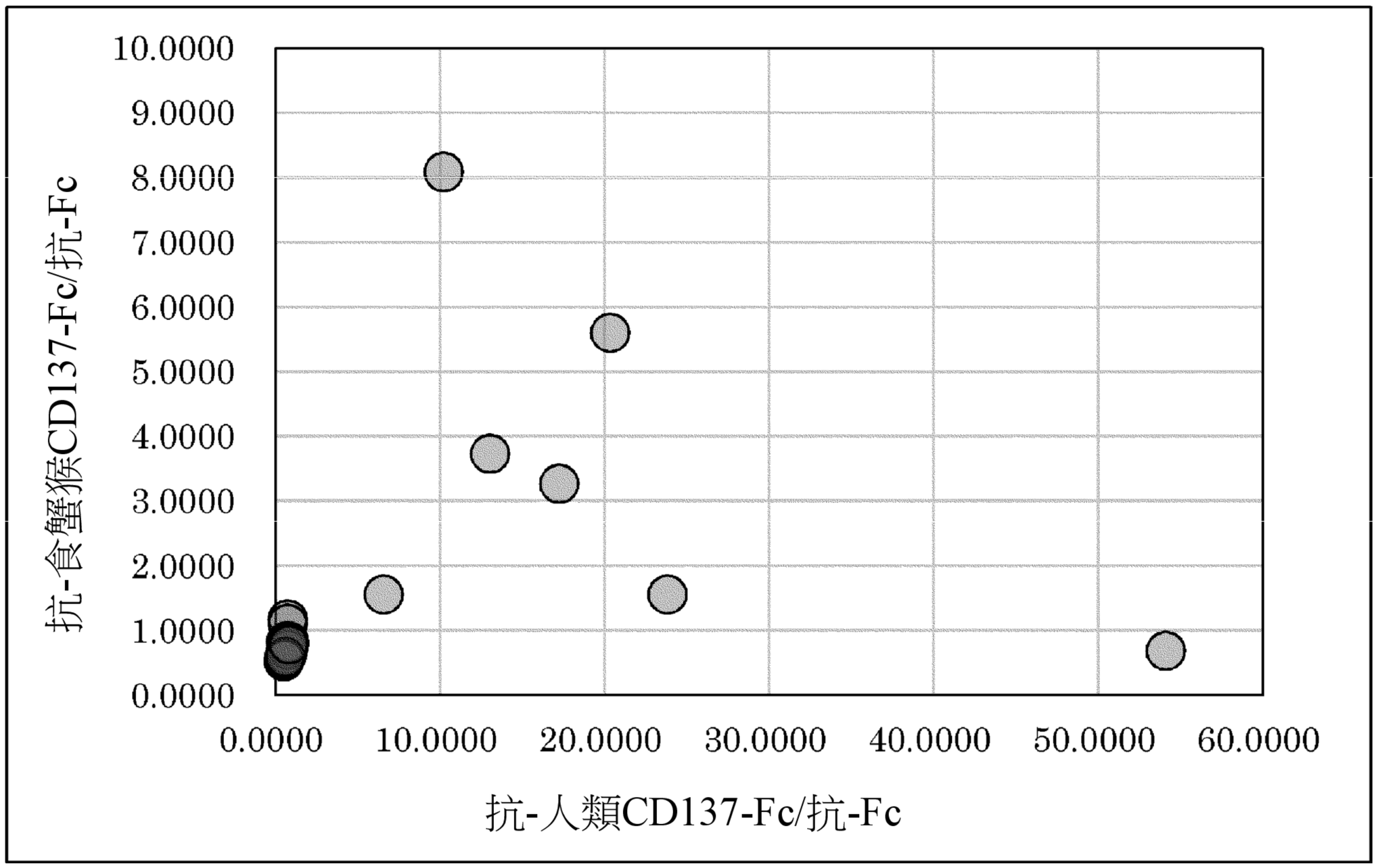
【圖 6】

【圖 7】

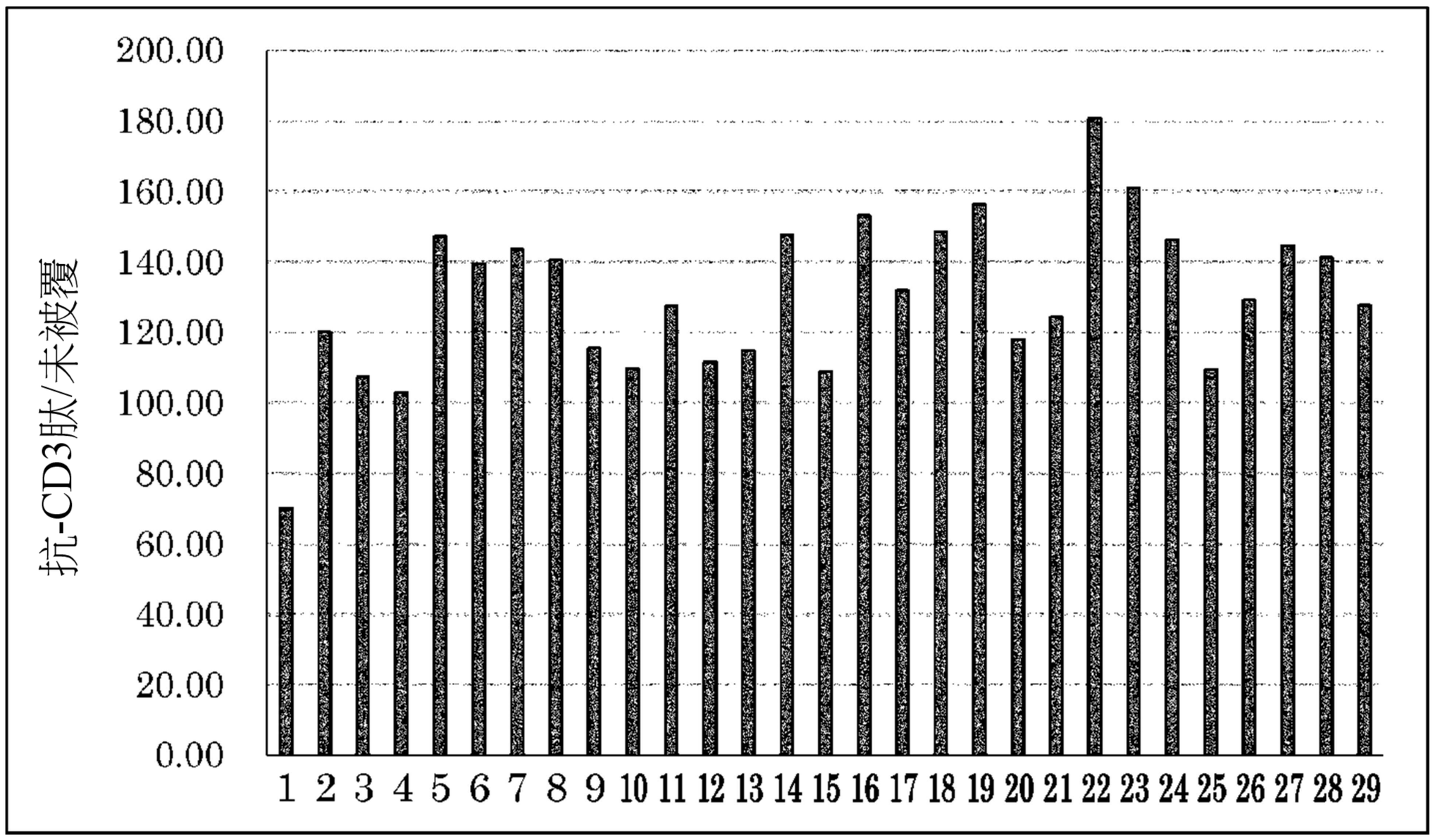
```
cyCD137     1  LQDLCSNCPAGTFCDNNRSQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFKTRKECSSTSN  60
huCD137     1  LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSN  60

cyCD137    61  AECDCISGYHCLGAECSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDG  120
huCD137    61  AECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDG  120

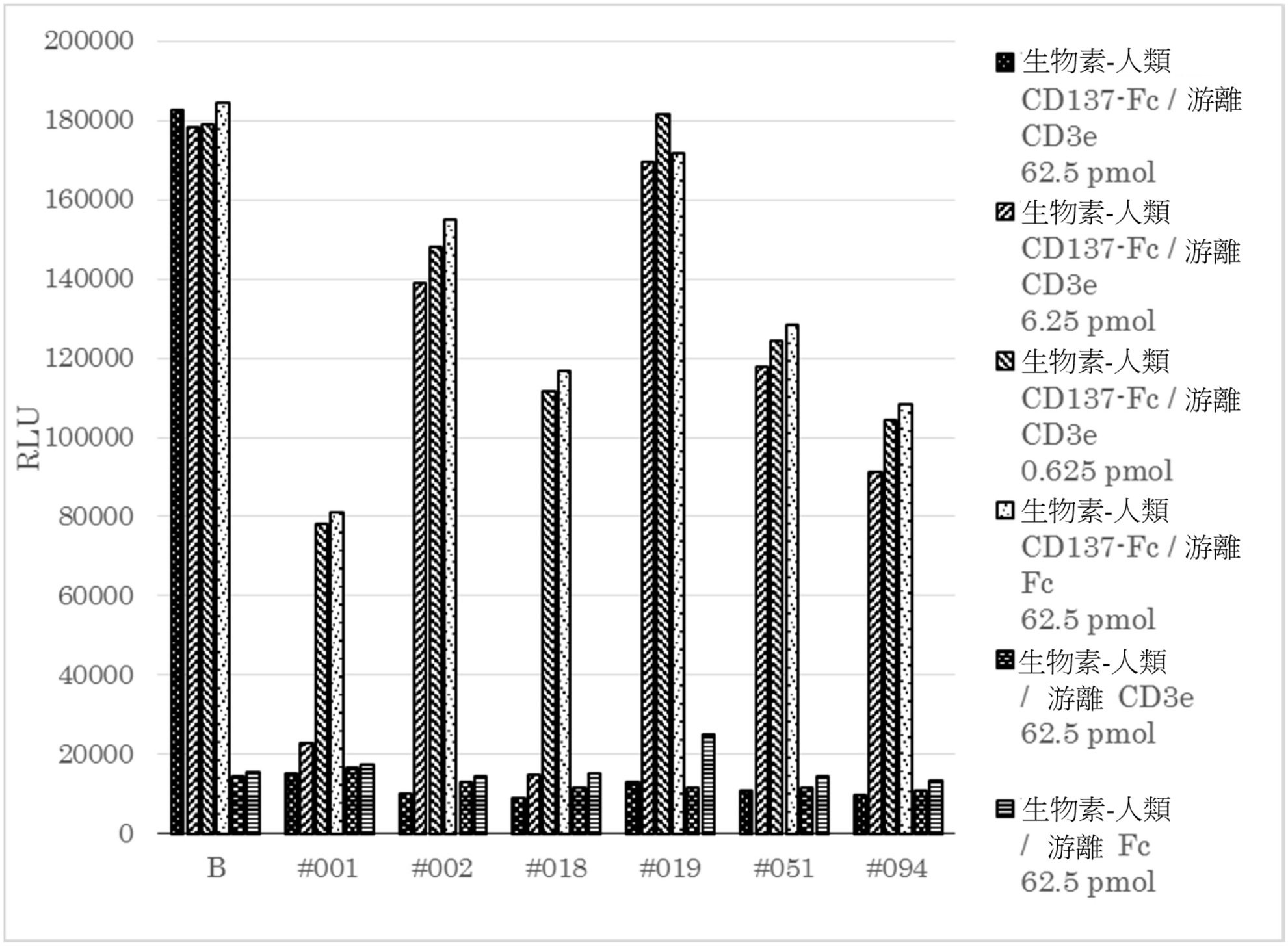
cyCD137   121  KSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSATPPAPAREPGHSPQ (SEQ ID NO  92)     163
huCD137   121  KSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQ (SEQ ID NO : 195)   163
```


10.0000
9.0000
8.0000
7.0000
6.0000
5.0000
4.0000
3.0000
2.0000
1.0000
0.0000
抗-食蟹猴CD137-Fc/抗-Fc
0.0000
10.0000
20.0000
30.0000
40.0000
50.0000
60.0000
抗-人類CD137-Fc/抗-Fc

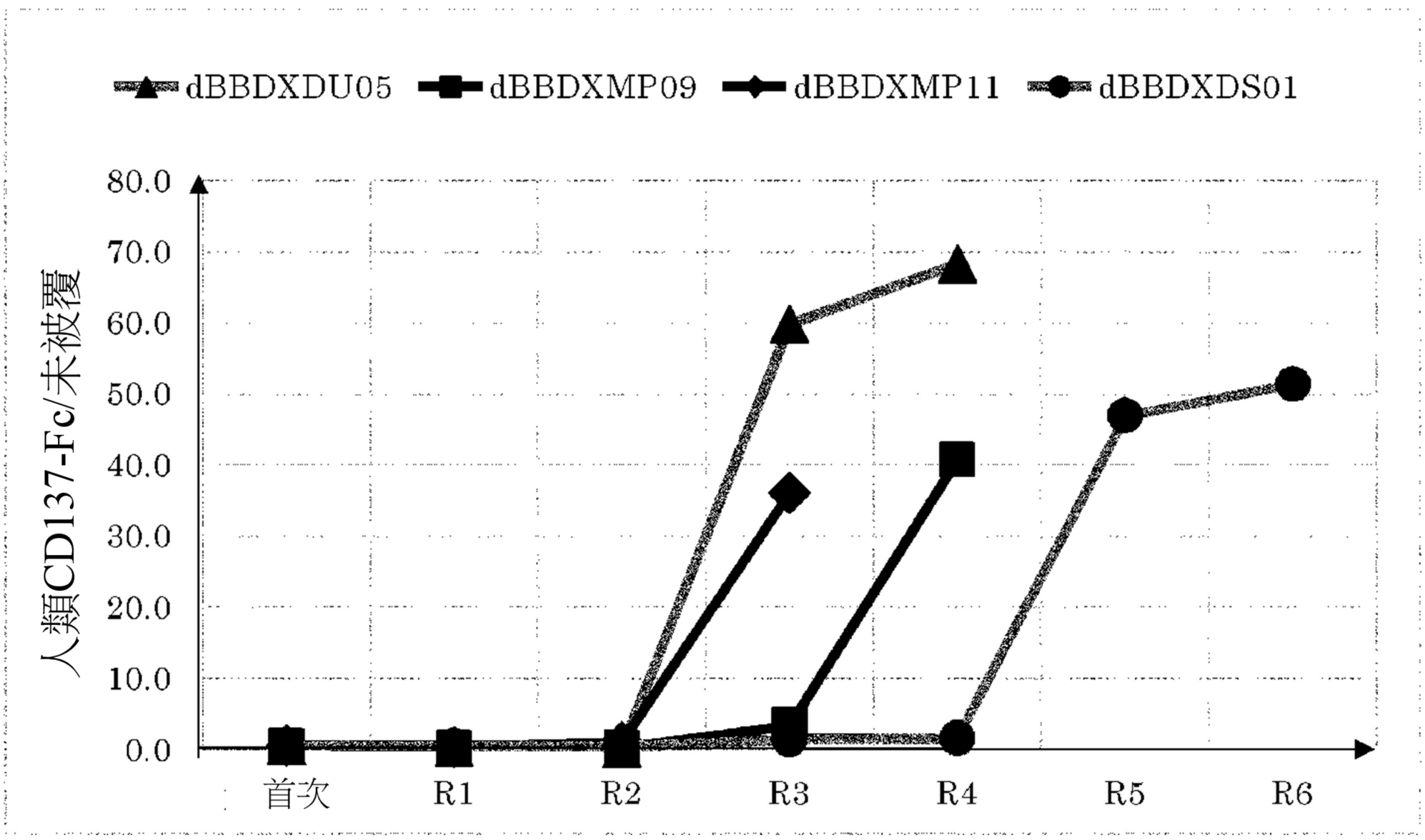
【圖 8】


200.00
180.00
160.00
140.00
120.00
100.00
80.00
60.00
40.00
20.00
0.00
抗-CD3肽/未被覆
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29

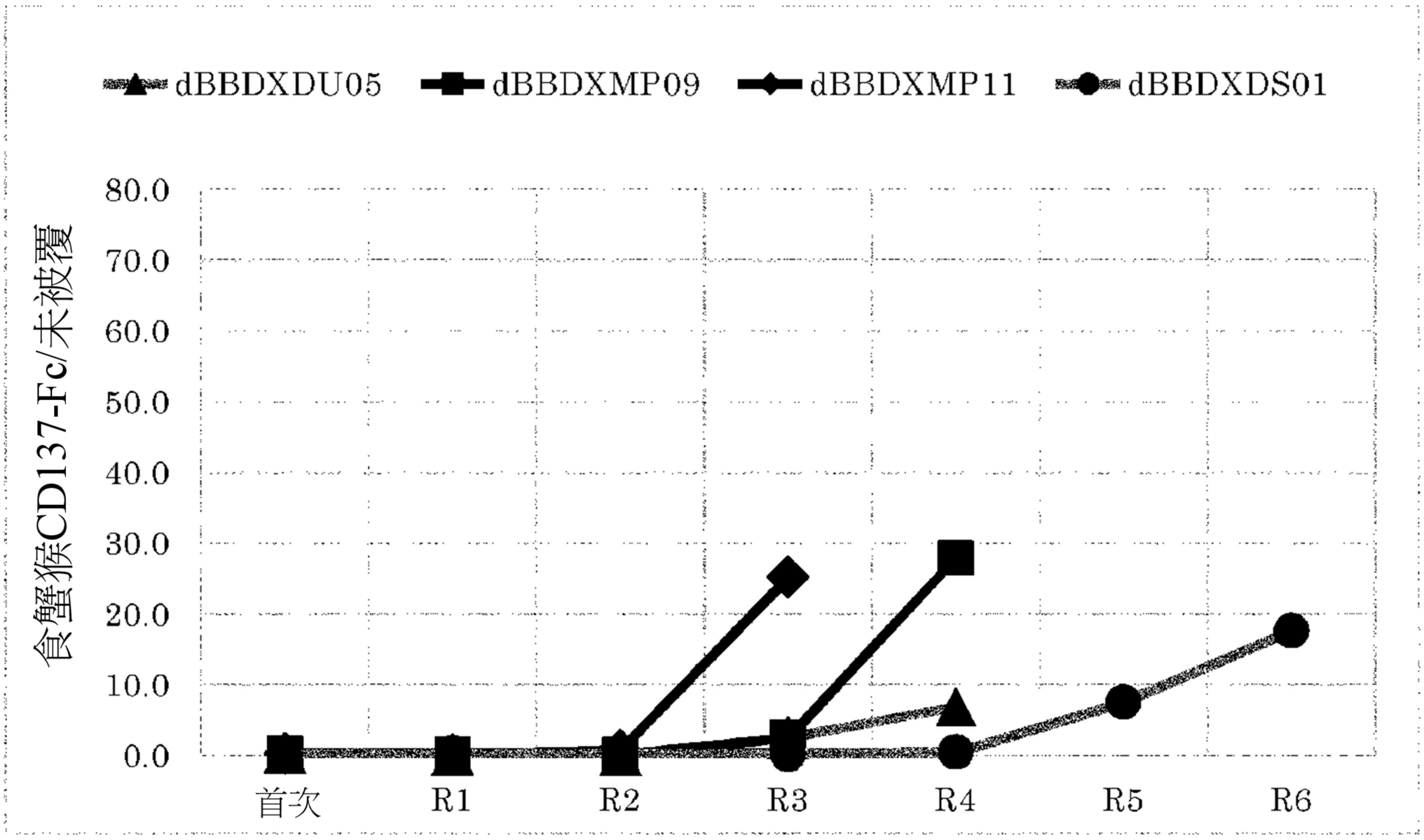
【圖 9】


200000
180000
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
RLU
B
#001
#002
#018
#019
#051
#094
生物素-人類 CD137-Fc / 游離 CD3e 62.5 pmol
生物素-人類 CD137-Fc / 游離 CD3e 6.25 pmol
生物素-人類 CD137-Fc / 游離 CD3e 0.625 pmol
生物素-人類 CD137-Fc / 游離 Fc 62.5 pmol
生物素-人類 / 游離 CD3e 62.5 pmol
生物素-人類 / 游離 Fc 62.5 pmol

【圖 10】


dBBDXDU05
dBBDXMP09
dBBDXMP11
dBBDXDS01
人類CD137-Fc/未被覆
80.0
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
首次
R1
R2
R3
R4
R5
R6

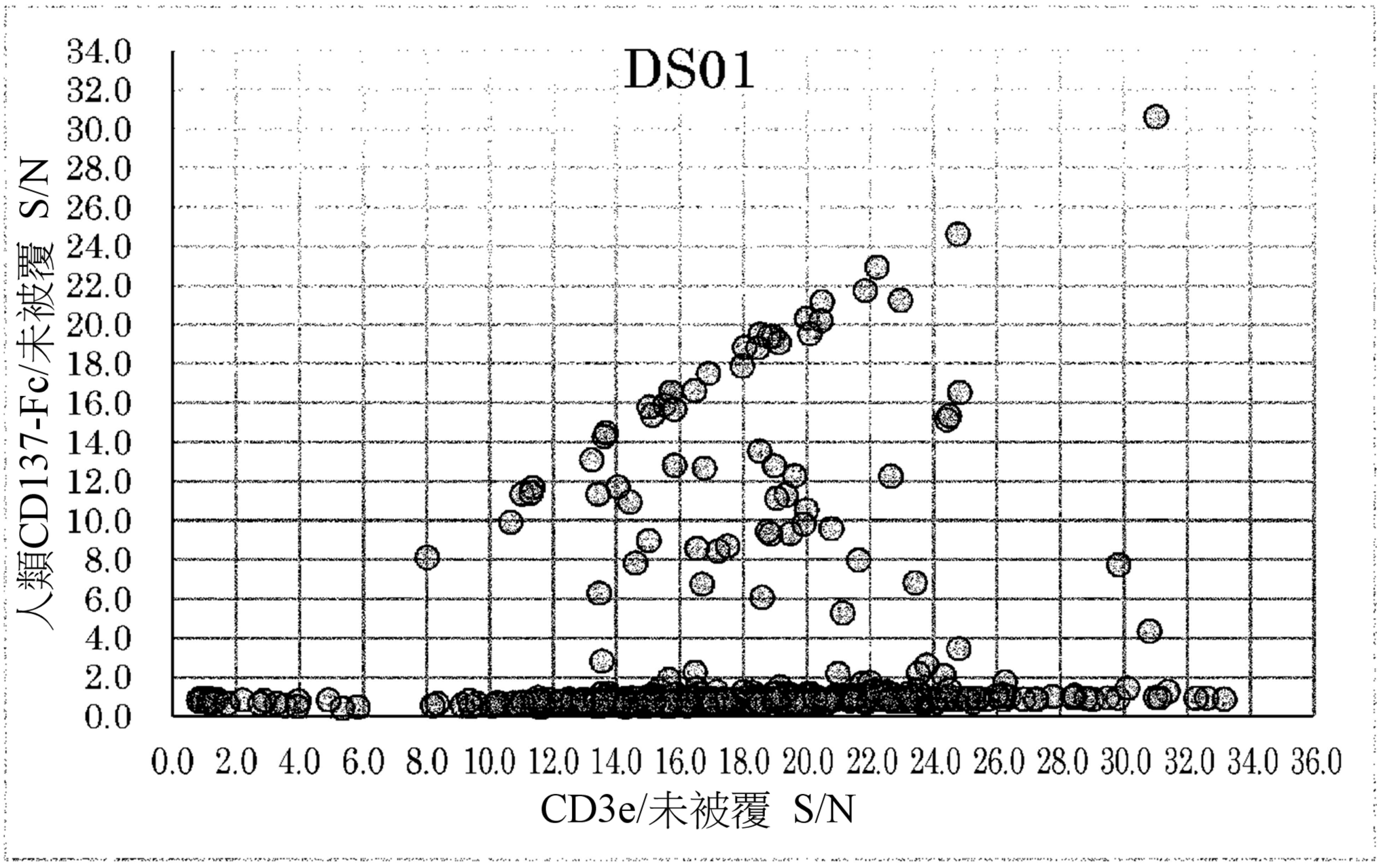
【圖 11A】

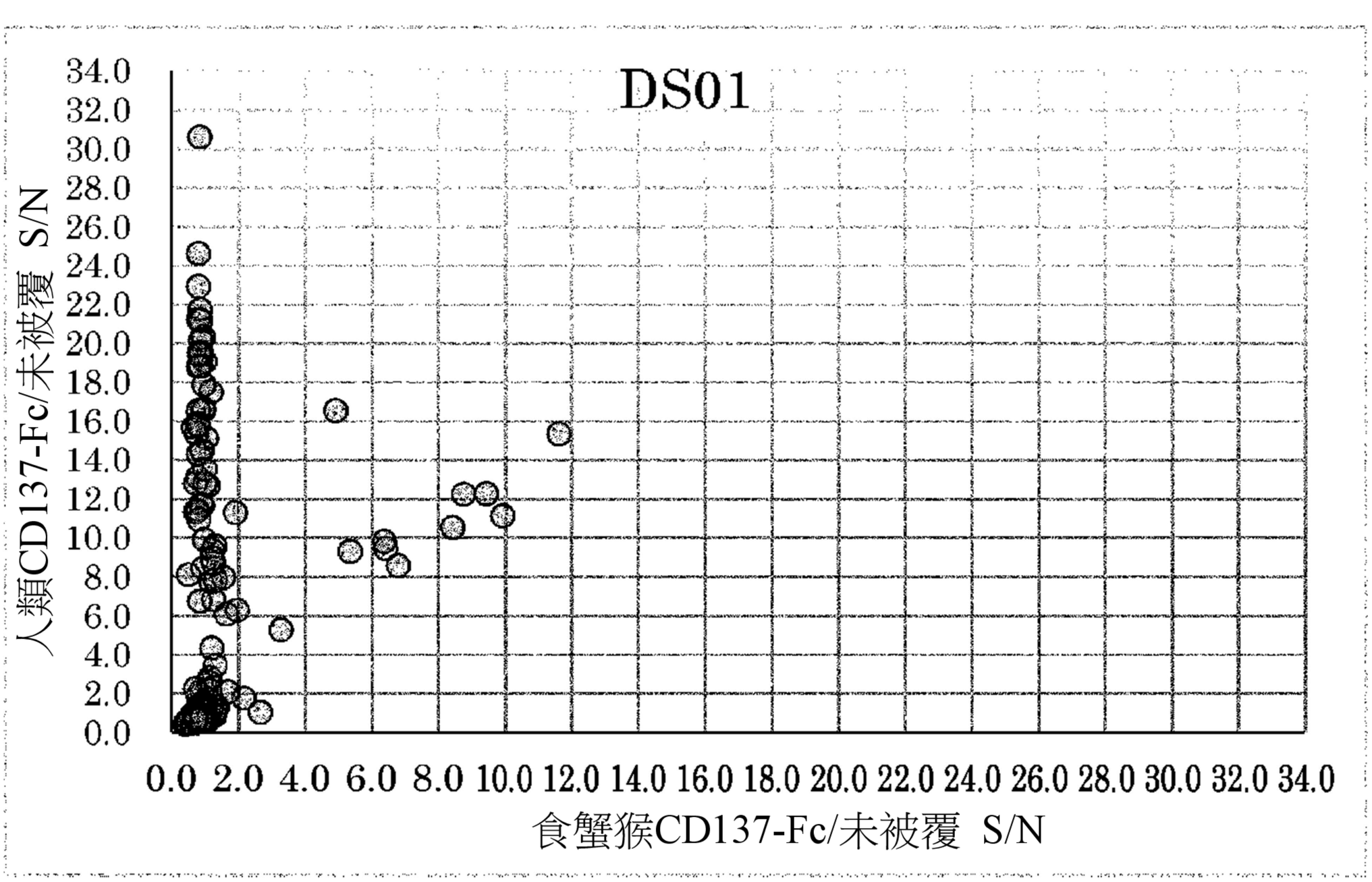

dBBDXDU05
dBBDXMP09
dBBDXMP11
dBBDXDS01
食蟹猴CD137-Fc/未被覆
80.0
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
首次
R1
R2
R3
R4
R5
R6

【圖 11B】

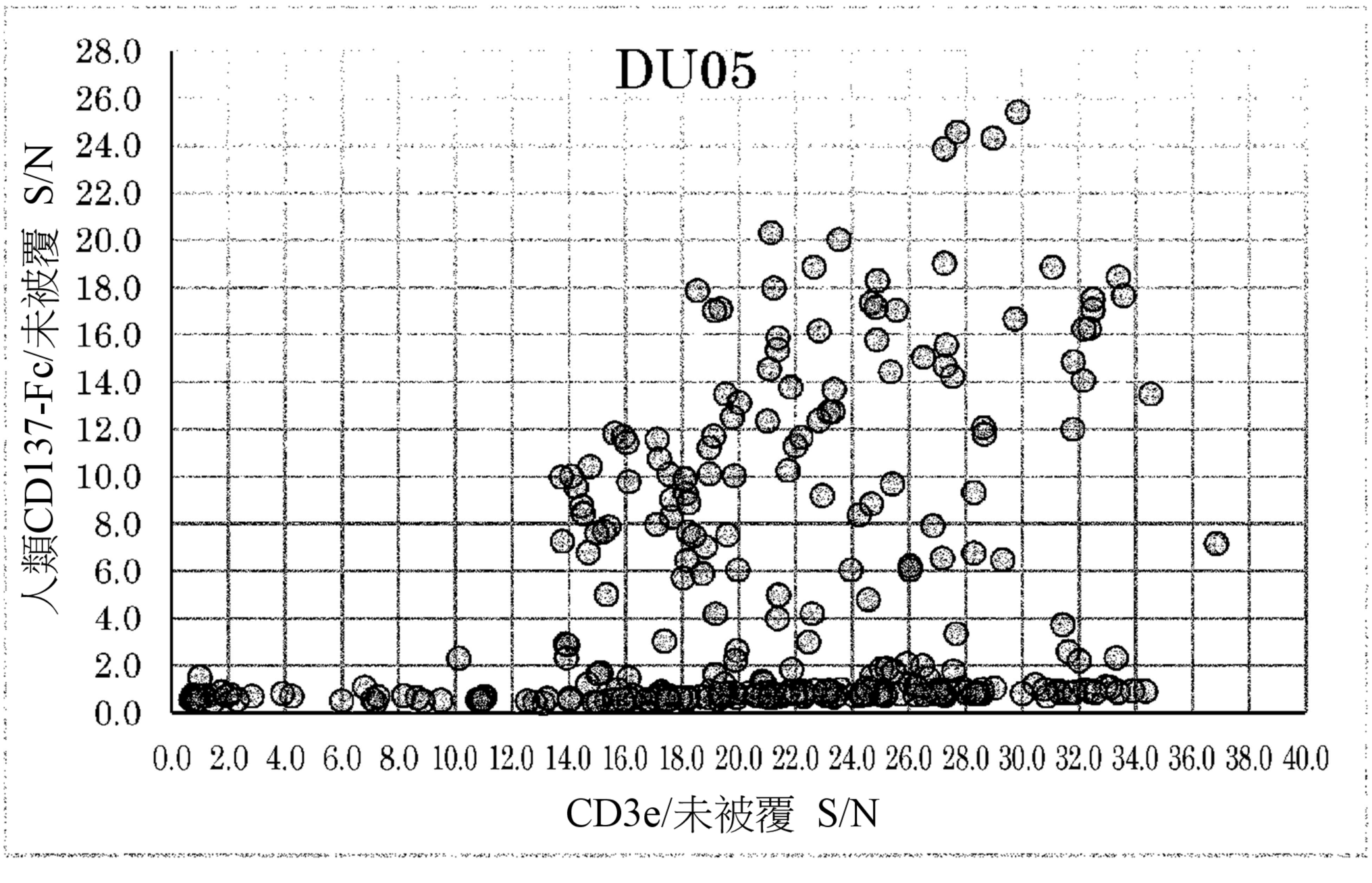
dBBDXDU05
dBBDXMP09
dBBDXMP11
dBBDXDS01
CD3 ε /未被覆
2000.0
1800.0
1600.0
1400.0
1200.0
1000.0
800.0
600.0
400.0
200.0
0.0
首次
R1
R2
R3
R4
R5
R6

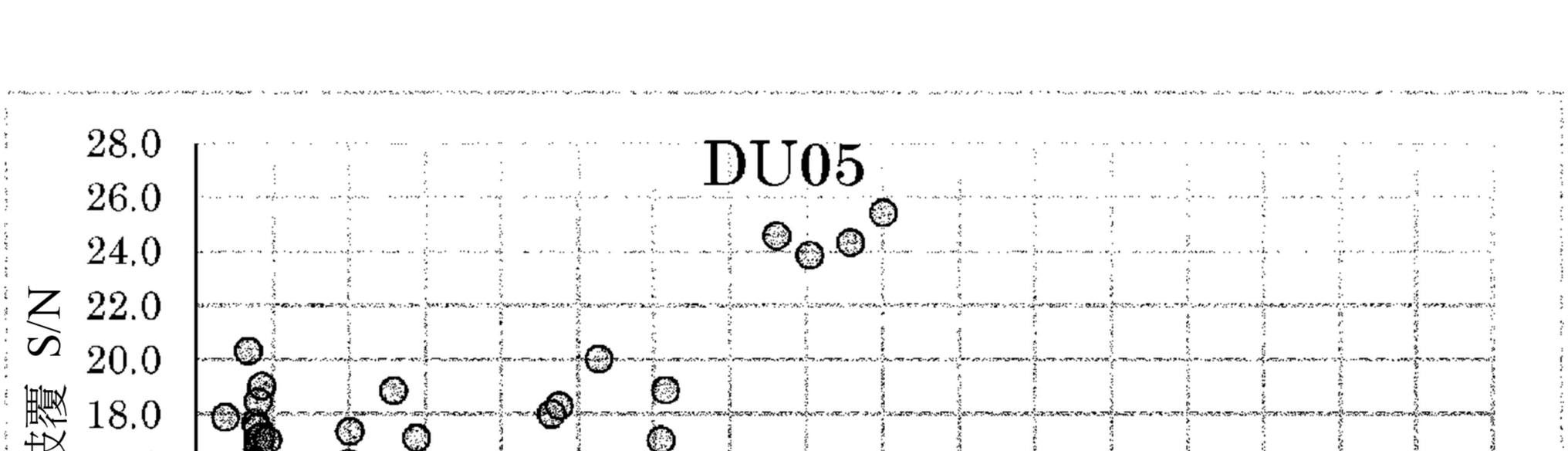
【圖 11C】


DS01
人類CD137-Fc/未被覆 S/N
CD3e/未被覆 S/N
0.0 2.0 4.0 6.0 8.0 10.0 12.0 14.0 16.0 18.0 20.0 22.0 24.0 26.0 28.0 30.0 32.0 34.0 36.0

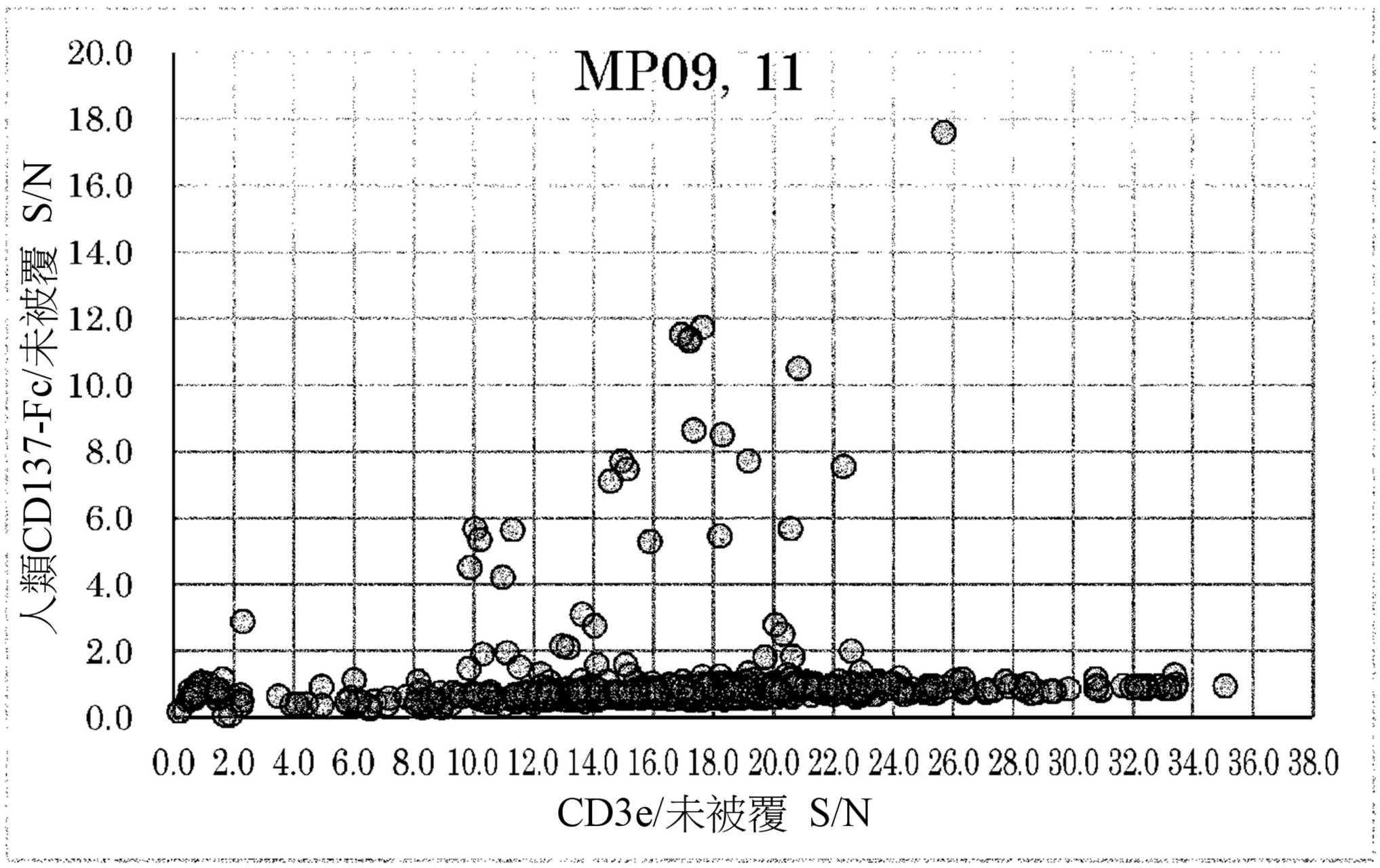

DS01
人類CD137-Fc/未被覆 S/N
食蟹猴CD137-Fc/未被覆 S/N
0.0 2.0 4.0 6.0 8.0 10.0 12.0 14.0 16.0 18.0 20.0 22.0 24.0 26.0 28.0 30.0 32.0 34.0

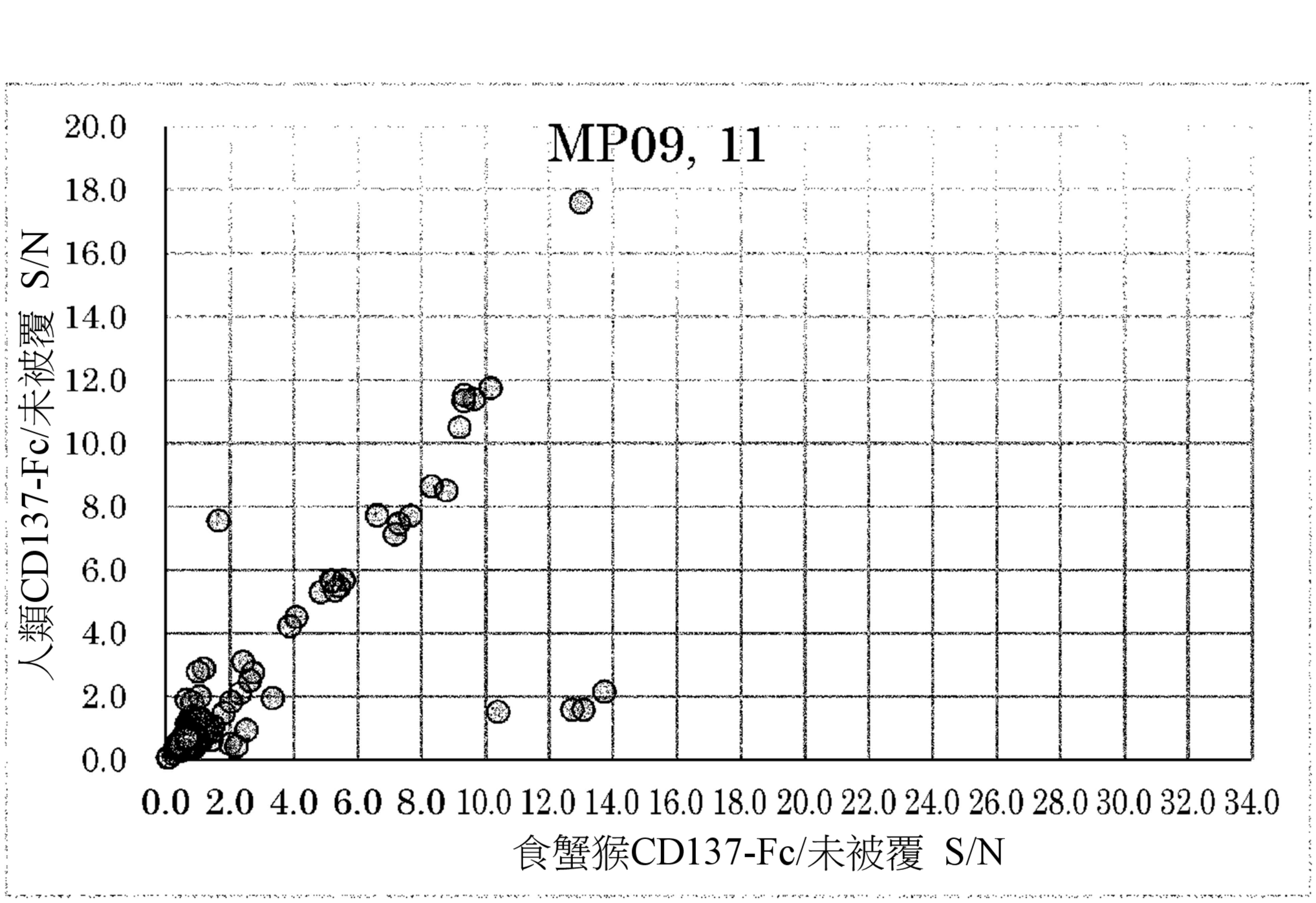
【圖 12.1】


DU05
人類CD137-Fc/未被覆 S/N
CD3e/未被覆 S/N
28.0
26.0
24.0
22.0
20.0
18.0
16.0
14.0
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
0.0 2.0 4.0 6.0 8.0 10.0 12.0 14.0 16.0 18.0 20.0 22.0 24.0 26.0 28.0 30.0 32.0 34.0 36.0 38.0 40.0


DU05
人類CD137-Fc/未被覆 S/N
食蟹猴CD137-Fc/未被覆 S/N
28.0
26.0
24.0
22.0
20.0
18.0
16.0
14.0
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
0.0 2.0 4.0 6.0 8.0 10.0 12.0 14.0 16.0 18.0 20.0 22.0 24.0 26.0 28.0 30.0 32.0 34.0

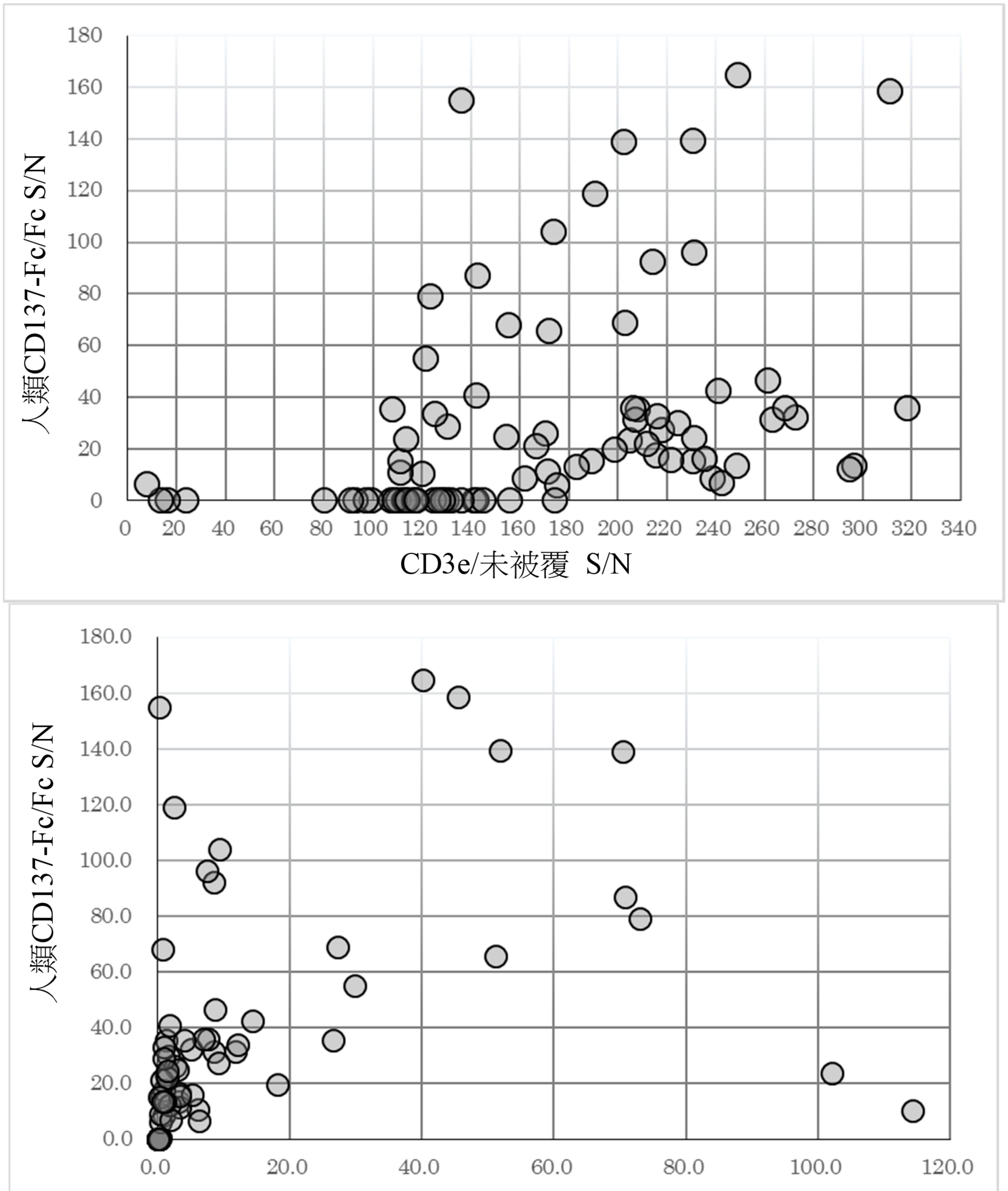
【圖 12.2】


MP09, 11
人類CD137-Fc/未被覆 S/N
CD3e/未被覆 S/N
0.0
2.0
4.0
6.0
8.0
10.0
12.0
14.0
16.0
18.0
20.0
22.0
24.0
26.0
28.0
30.0
32.0
34.0
36.0
38.0

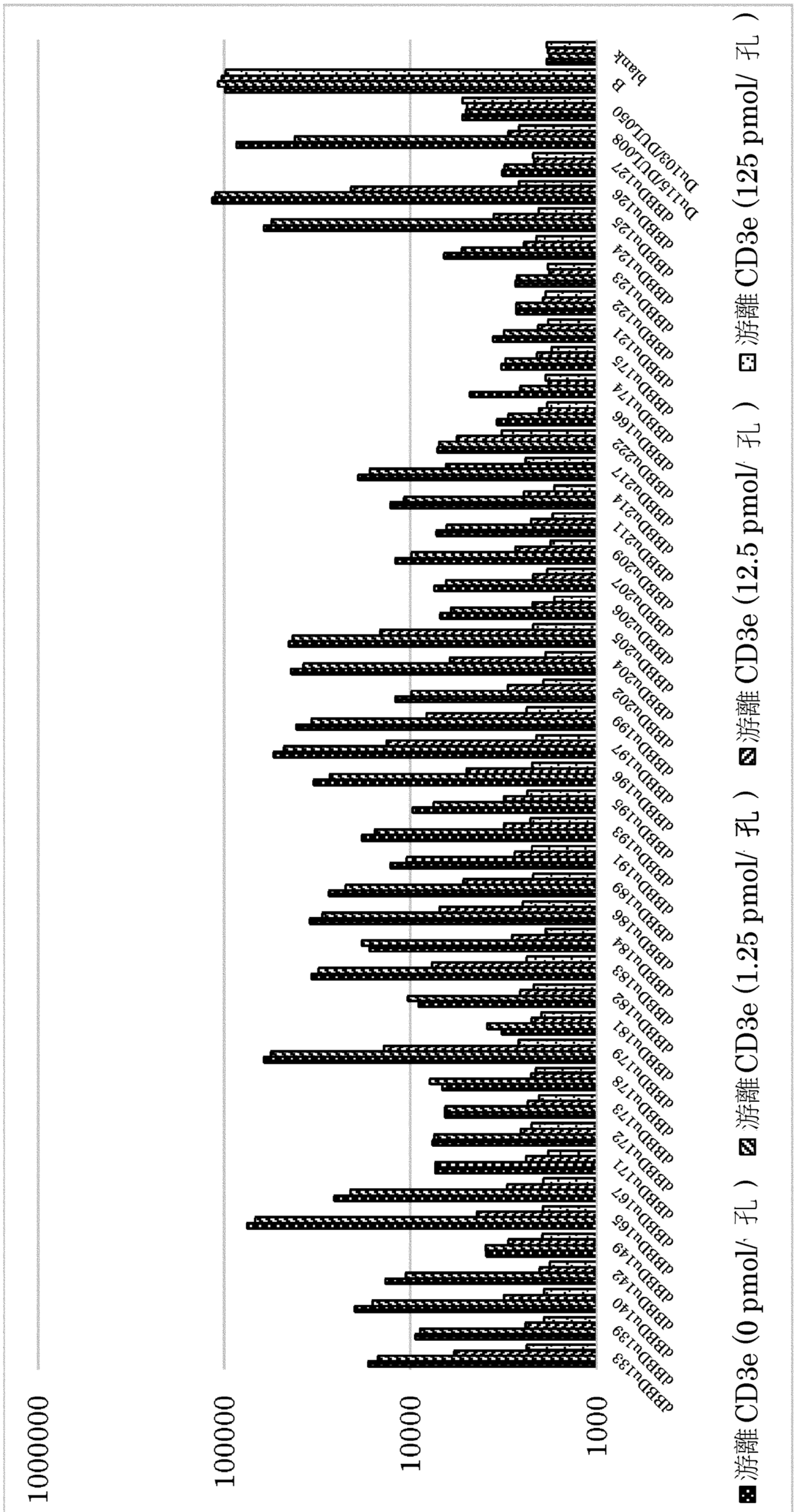

MP09, 11
人類CD137-Fc/未被覆 S/N
食蟹猴CD137-Fc/未被覆 S/N
0.0
2.0
4.0
6.0
8.0
10.0
12.0
14.0
16.0
18.0
20.0
22.0
24.0
26.0
28.0
30.0
32.0
34.0

【圖 12.3】

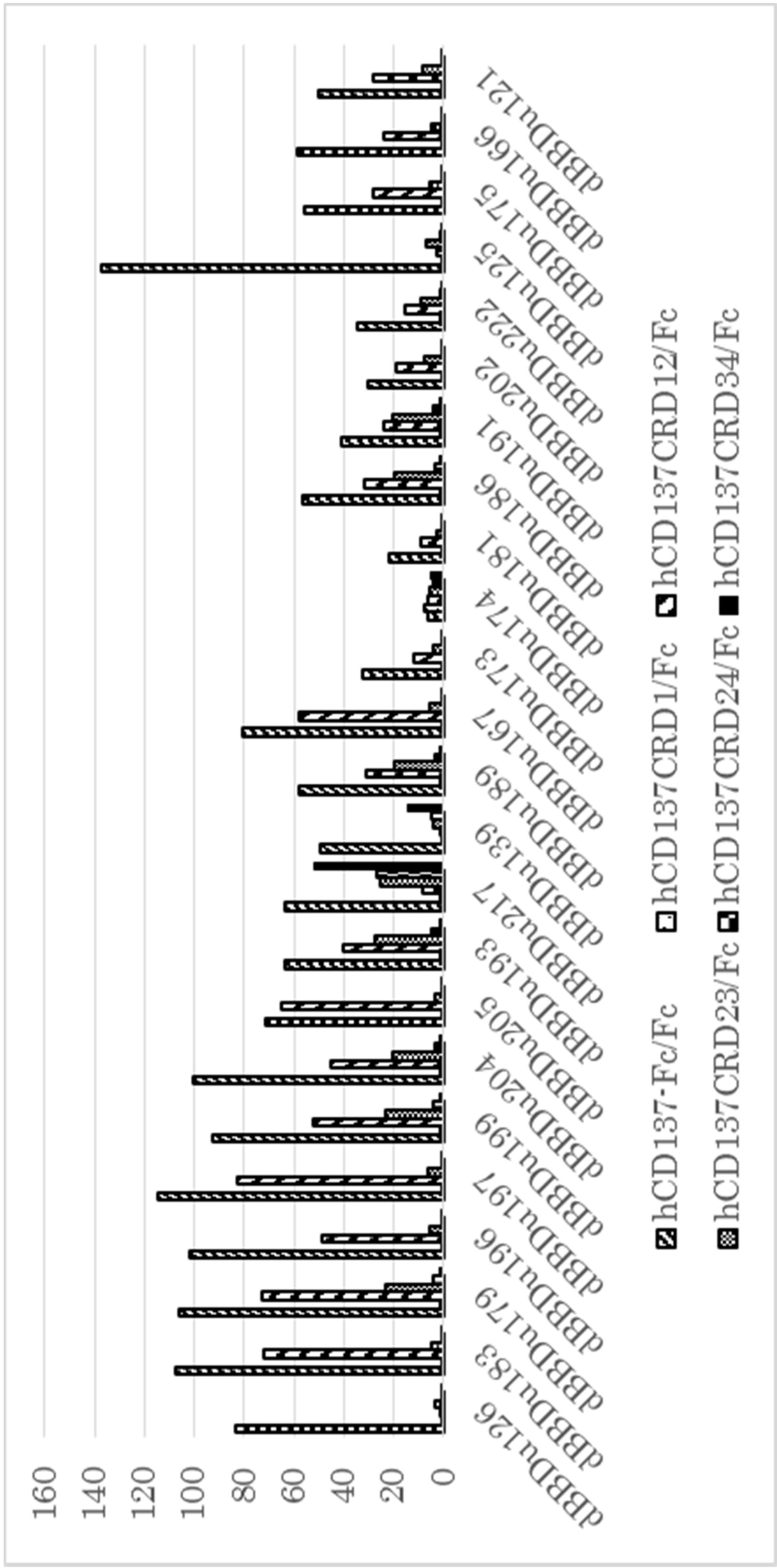
202028238



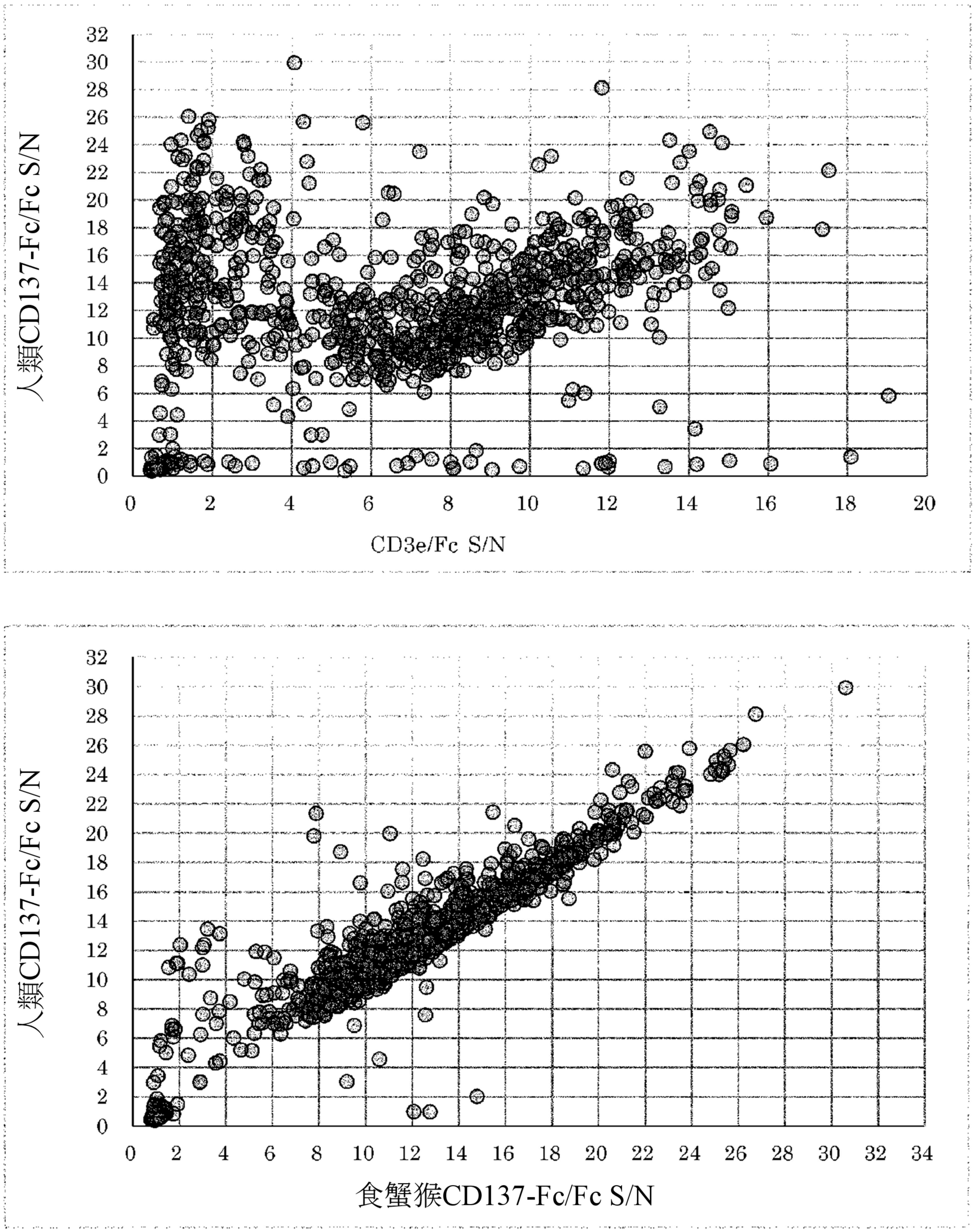
【圖 13】


游離 CD3e (125 pmol/ 孔)
游離 CD3e (12.5 pmol/ 孔)
游離 CD3e (1.25 pmol/ 孔)
游離 CD3e (0 pmol/ 孔)
1000000
100000
10000
1000
blank
B
Du10/DUL050
Du15/DUL008
dBBDu127
dBBDu126
dBBDu125
dBBDu124
dBBDu123
dBBDu122
dBBDu121
dBBDu175
dBBDu174
dBBDu166
dBBDu222
dBBDu217
dBBDu214
dBBDu211
dBBDu209
dBBDu207
dBBDu206
dBBDu205
dBBDu204
dBBDu202
dBBDu199
dBBDu197
dBBDu196
dBBDu195
dBBDu193
dBBDu191
dBBDu189
dBBDu186
dBBDu184
dBBDu183
dBBDu182
dBBDu181
dBBDu179
dBBDu178
dBBDu173
dBBDu172
dBBDu171
dBBDu167
dBBDu165
dBBDu149
dBBDu142
dBBDu140
dBBDu139
dBBDu133

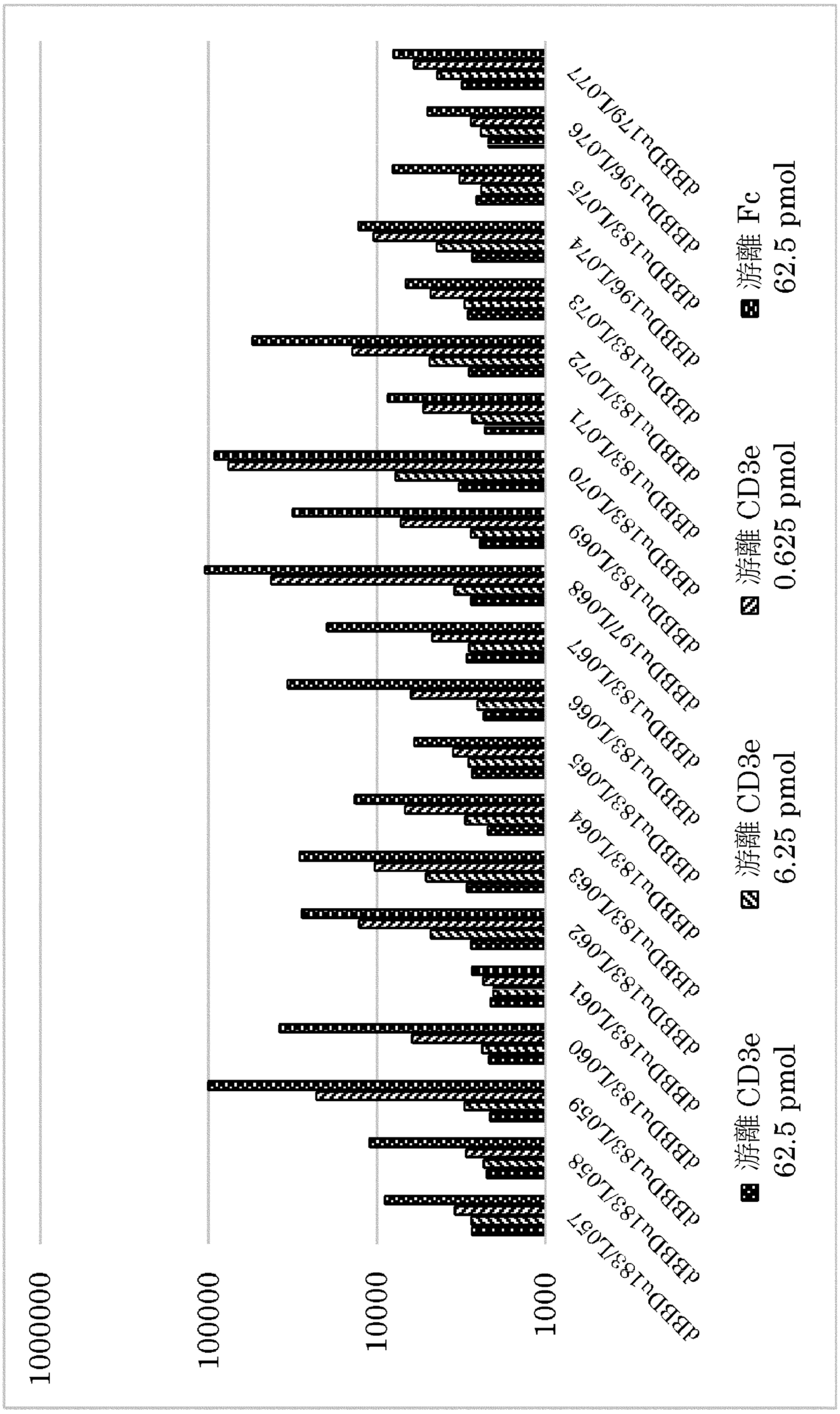
【圖 14】


hCD137-Fc/Fc
hCD137CRD1/Fc
hCD137CRD12/Fc
hCD137CRD23/Fc
hCD137CRD24/Fc
hCD137CRD34/Fc
160
140
120
100
80
60
40
20
0

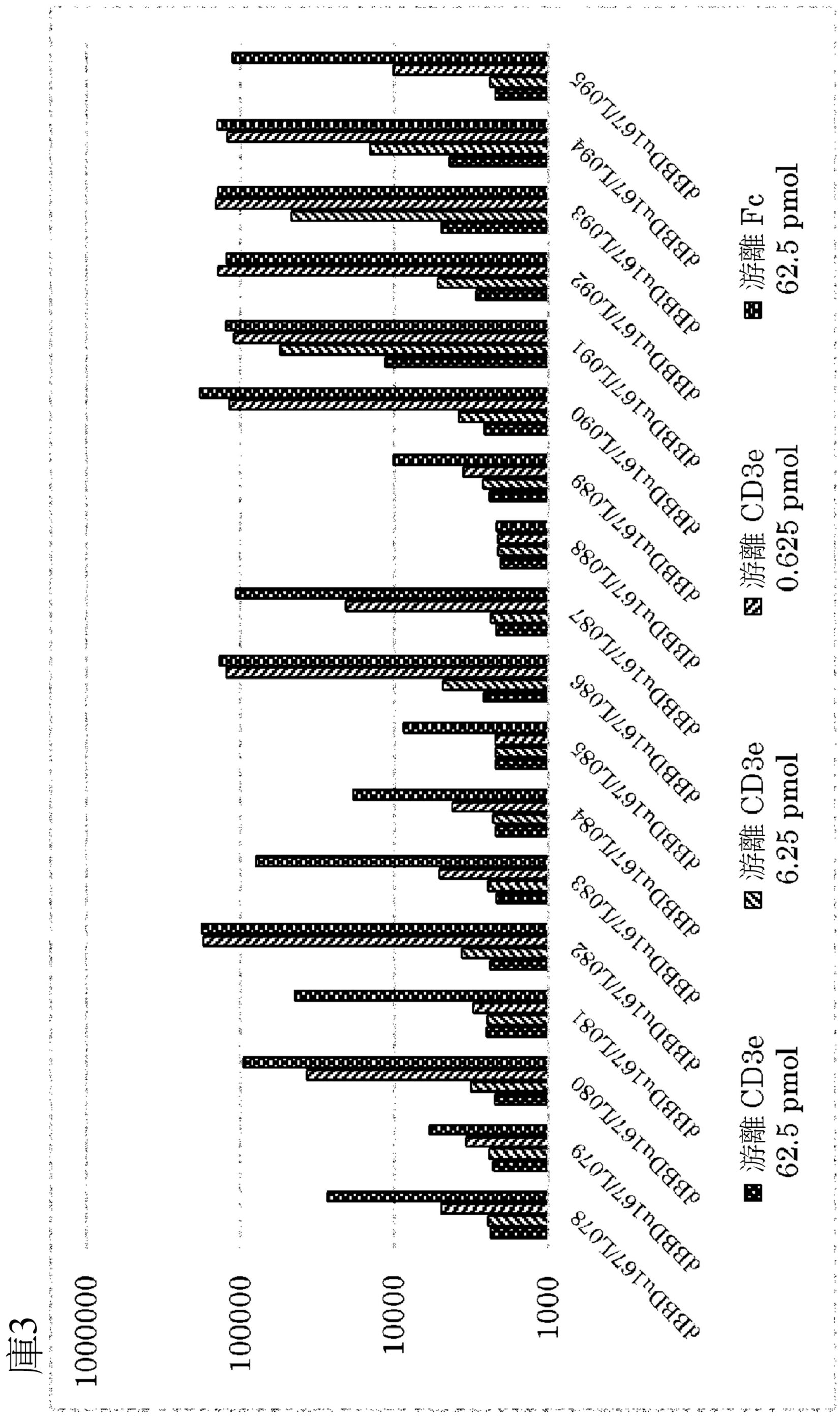
【圖 15】



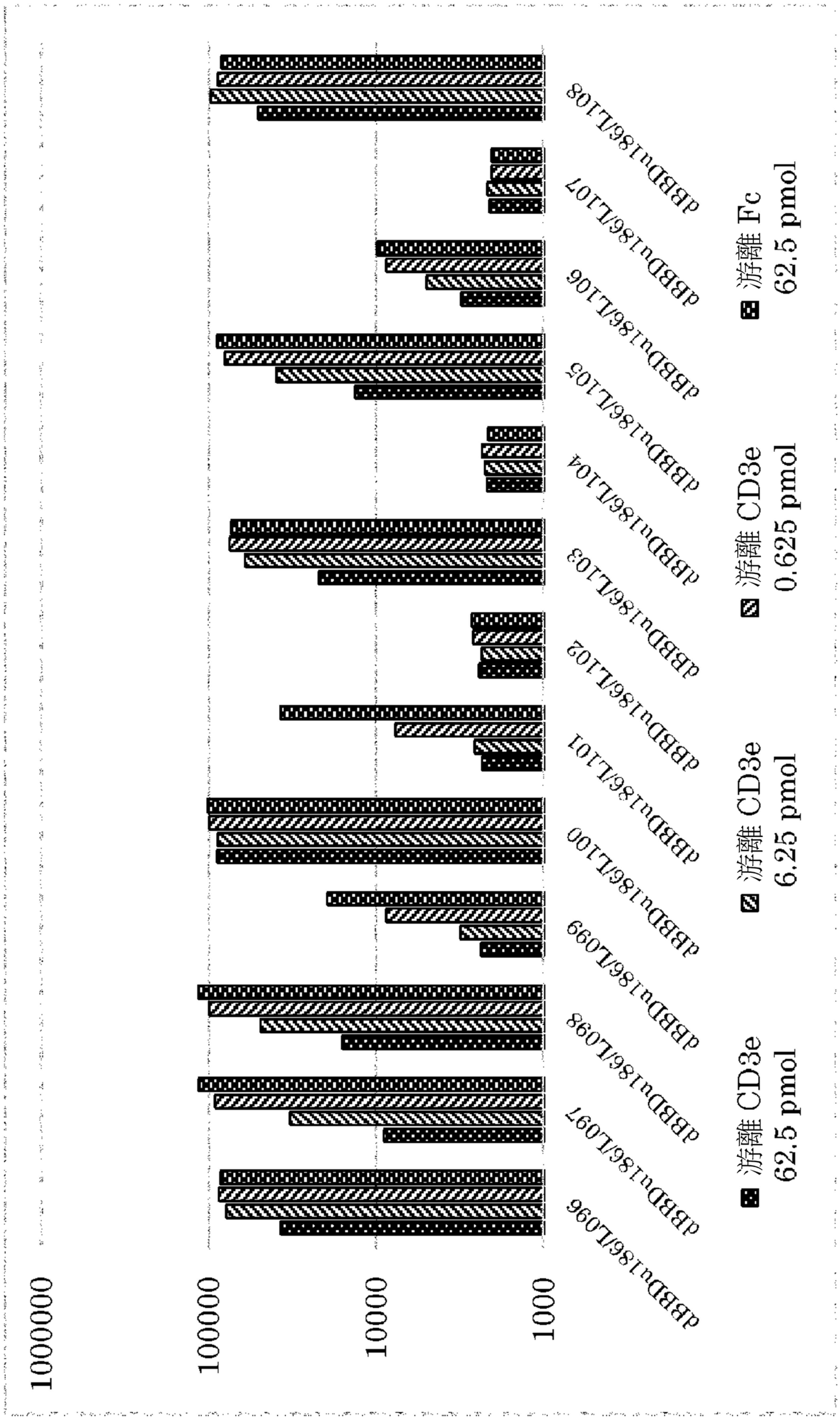
【圖 16】


游離 Fc
62.5 pmol
游離 CD3e
0.625 pmol
游離 CD3e
6.25 pmol
游離 CD3e
62.5 pmol
庫2
1000000
100000
10000
1000
dBBDu179/L077
dBBDu196/L076
dBBDu183/L075
dBBDu196/L074
dBBDu183/L073
dBBDu183/L072
dBBDu183/L071
dBBDu183/L070
dBBDu183/L069
dBBDu197/L068
dBBDu183/L067
dBBDu183/L066
dBBDu183/L065
dBBDu183/L064
dBBDu183/L063
dBBDu183/L062
dBBDu183/L061
dBBDu183/L060
dBBDu183/L059
dBBDu183/L058
dBBDu183/L057

【圖 17.1】

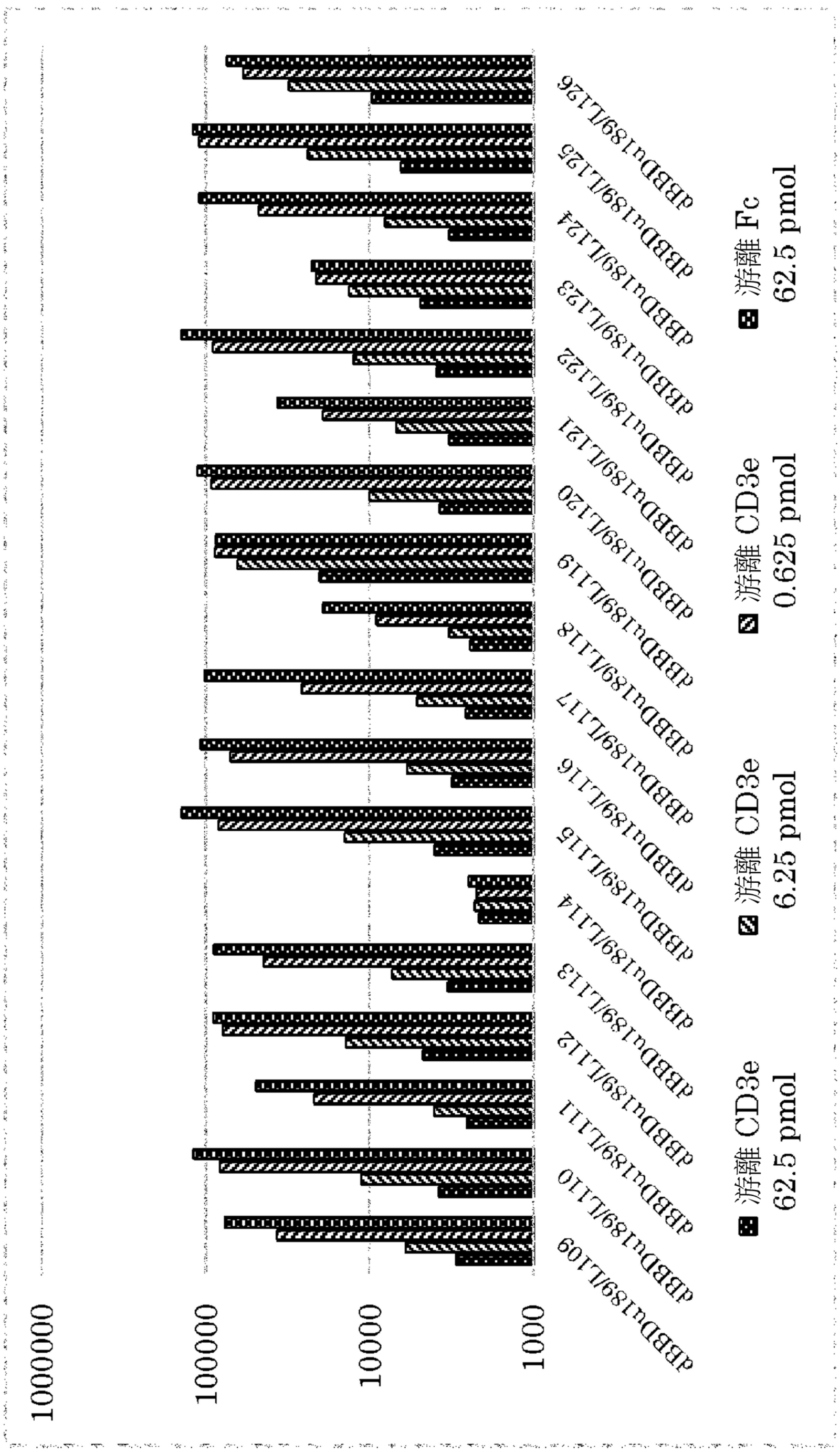

游離 Fc
62.5 pmol
游離 CD3e
0.625 pmol
游離 CD3e
62.5 pmol
游離 CD3e
6.25 pmol
游離 CD3e
62.5 pmol
庫3
1000000
100000
10000
1000
dBBDu167TL095
dBBDu167TL094
dBBDu167TL093
dBBDu167TL092
dBBDu167TL091
dBBDu167TL090
dBBDu167TL089
dBBDu167TL088
dBBDu167TL087
dBBDu167TL086
dBBDu167TL085
dBBDu167TL084
dBBDu167TL083
dBBDu167TL082
dBBDu167TL081
dBBDu167TL080
dBBDu167TL079
dBBDu167TL078

【圖 17.2】


游離 Fc
62.5 pmol
游離 CD3e
0.625 pmol
游離 CD3e
6.25 pmol
游離 CD3e
62.5 pmol
dBBDu186/L108
dBBDu186/L107
dBBDu186/L106
dBBDu186/L105
dBBDu186/L104
dBBDu186/L103
dBBDu186/L102
dBBDu186/L101
dBBDu186/L100
dBBDu186/L099
dBBDu186/L098
dBBDu186/L097
dBBDu186/L096
庫4
1000000
100000
10000
1000

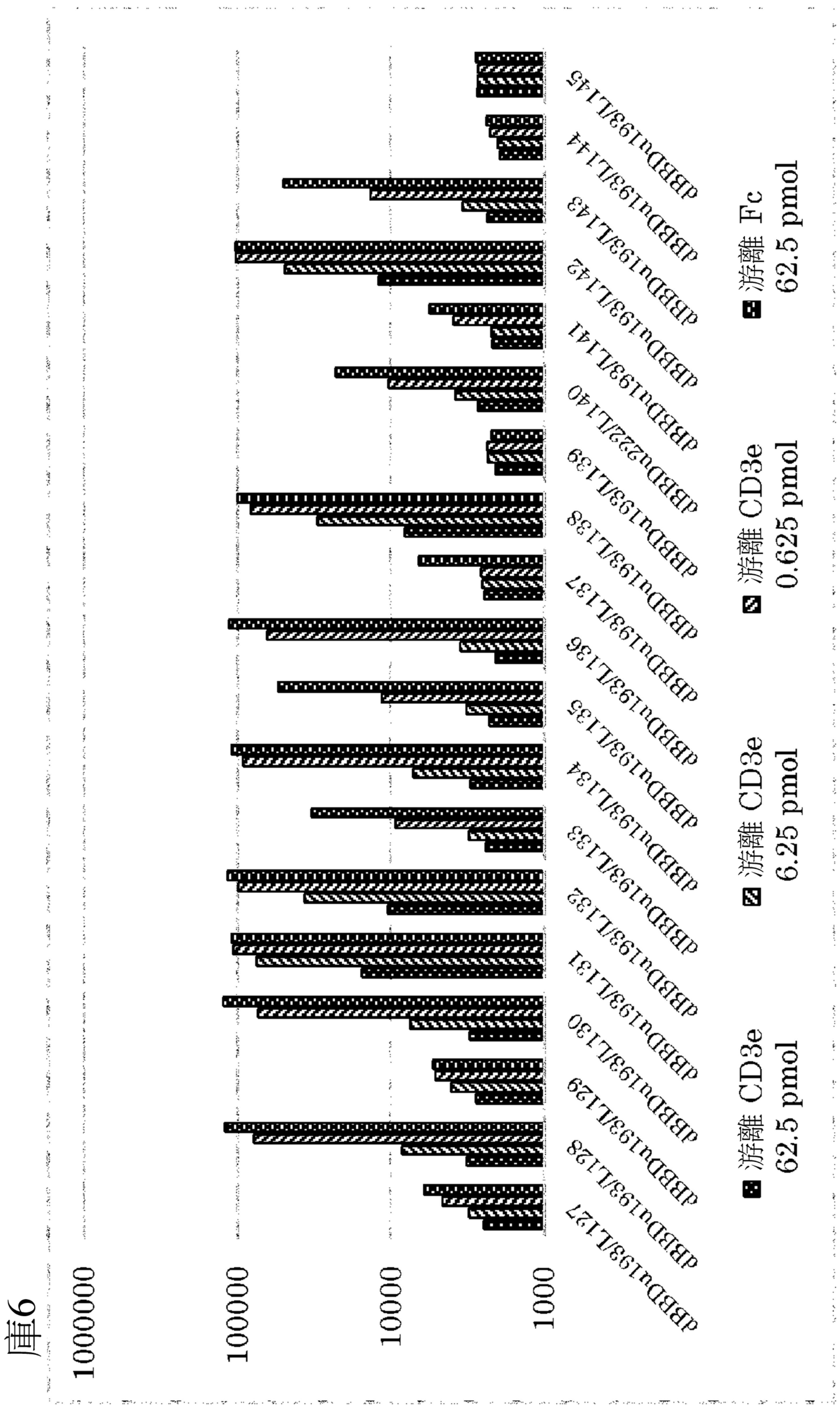
【圖 17.3】

202028238

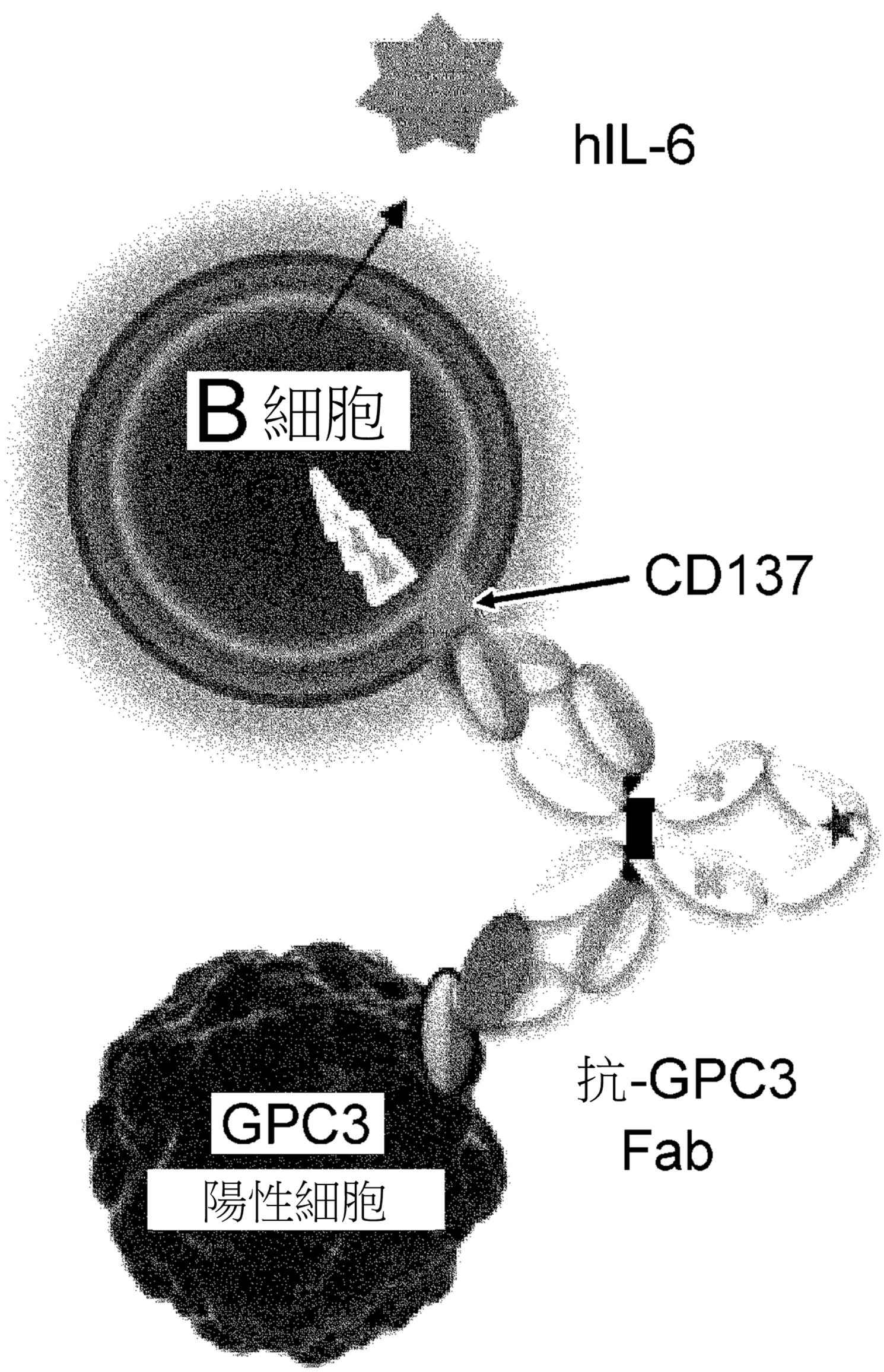


【圖 17.4】

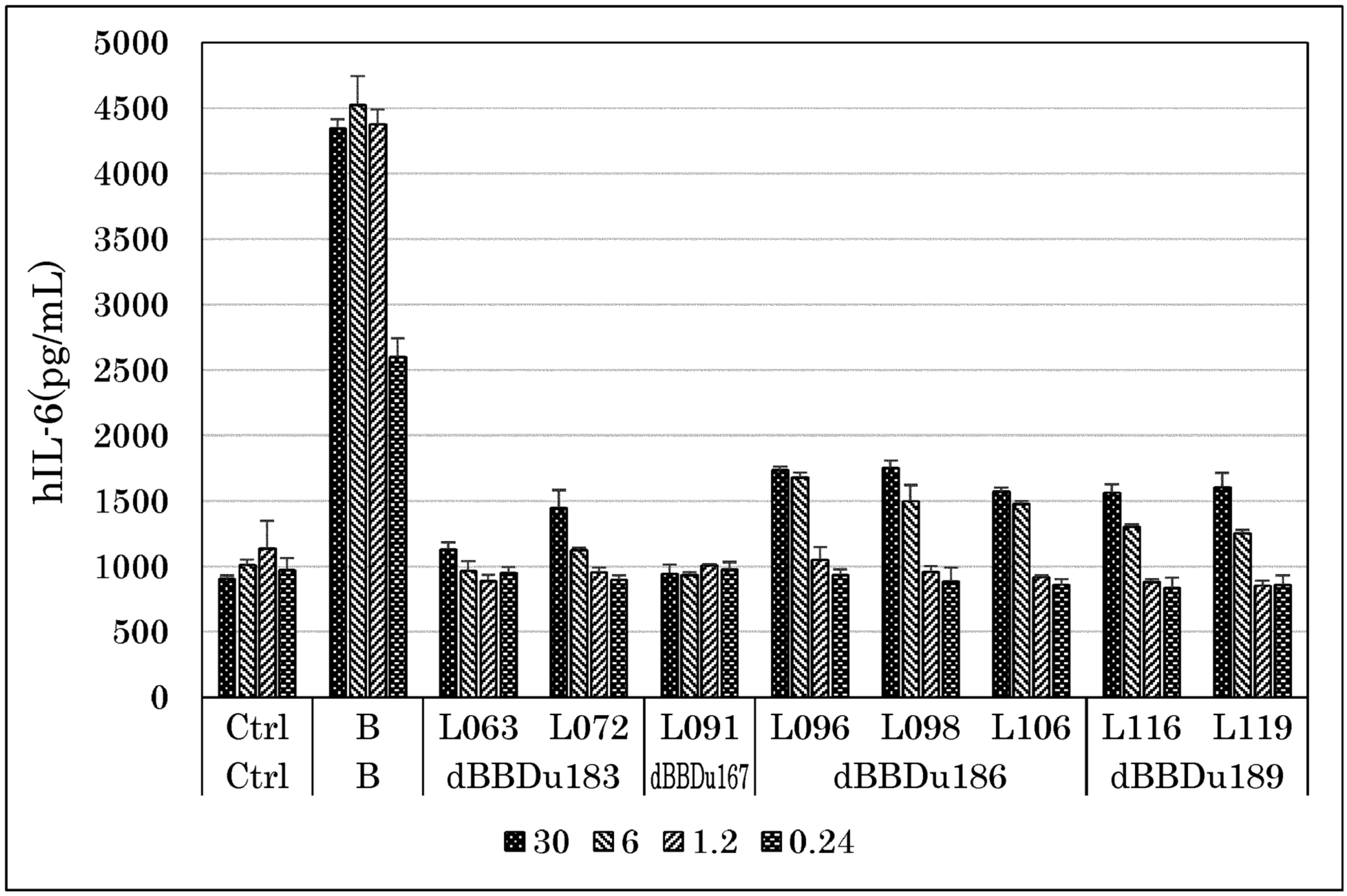
202028238



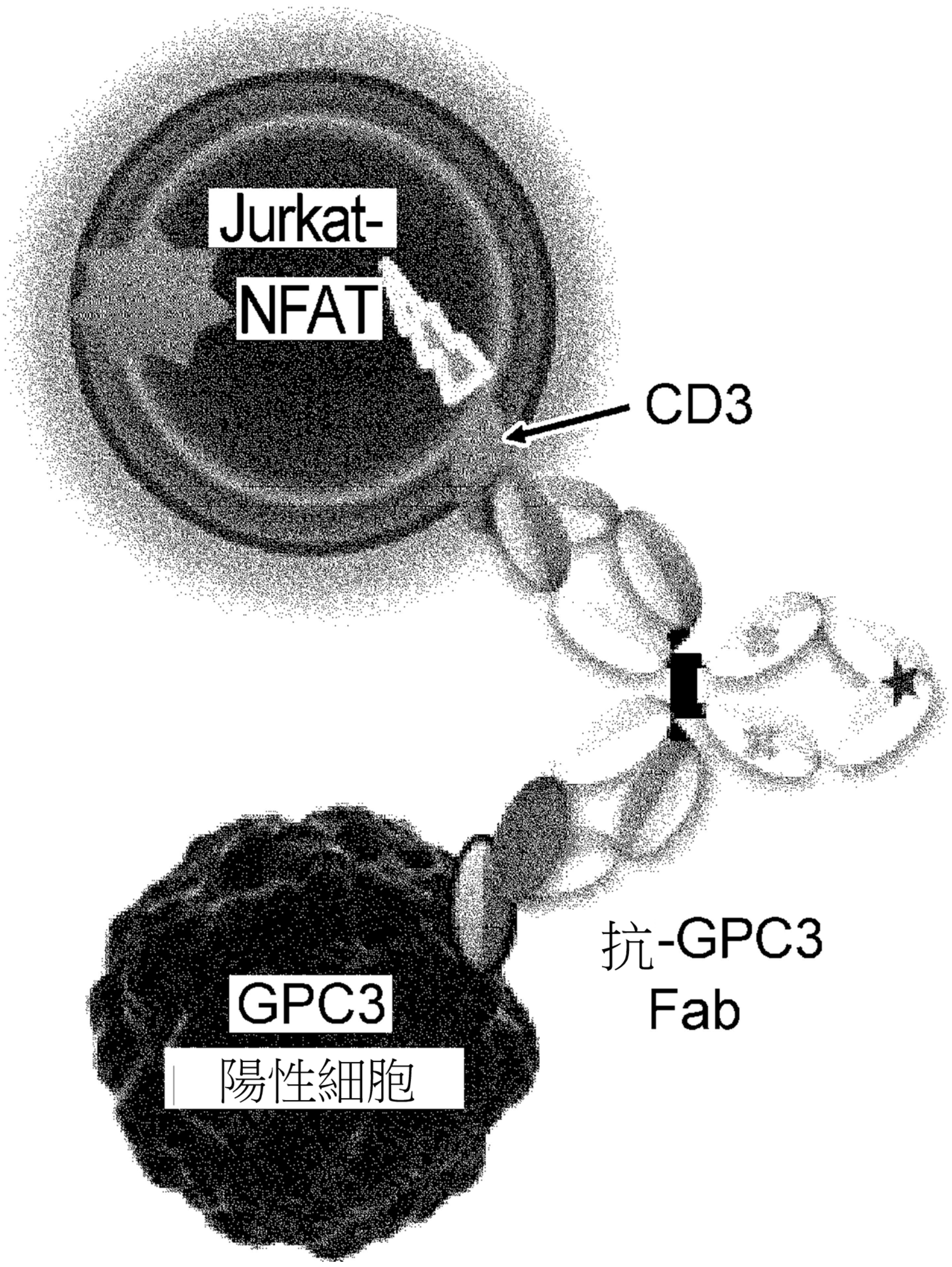
【圖 17.5】



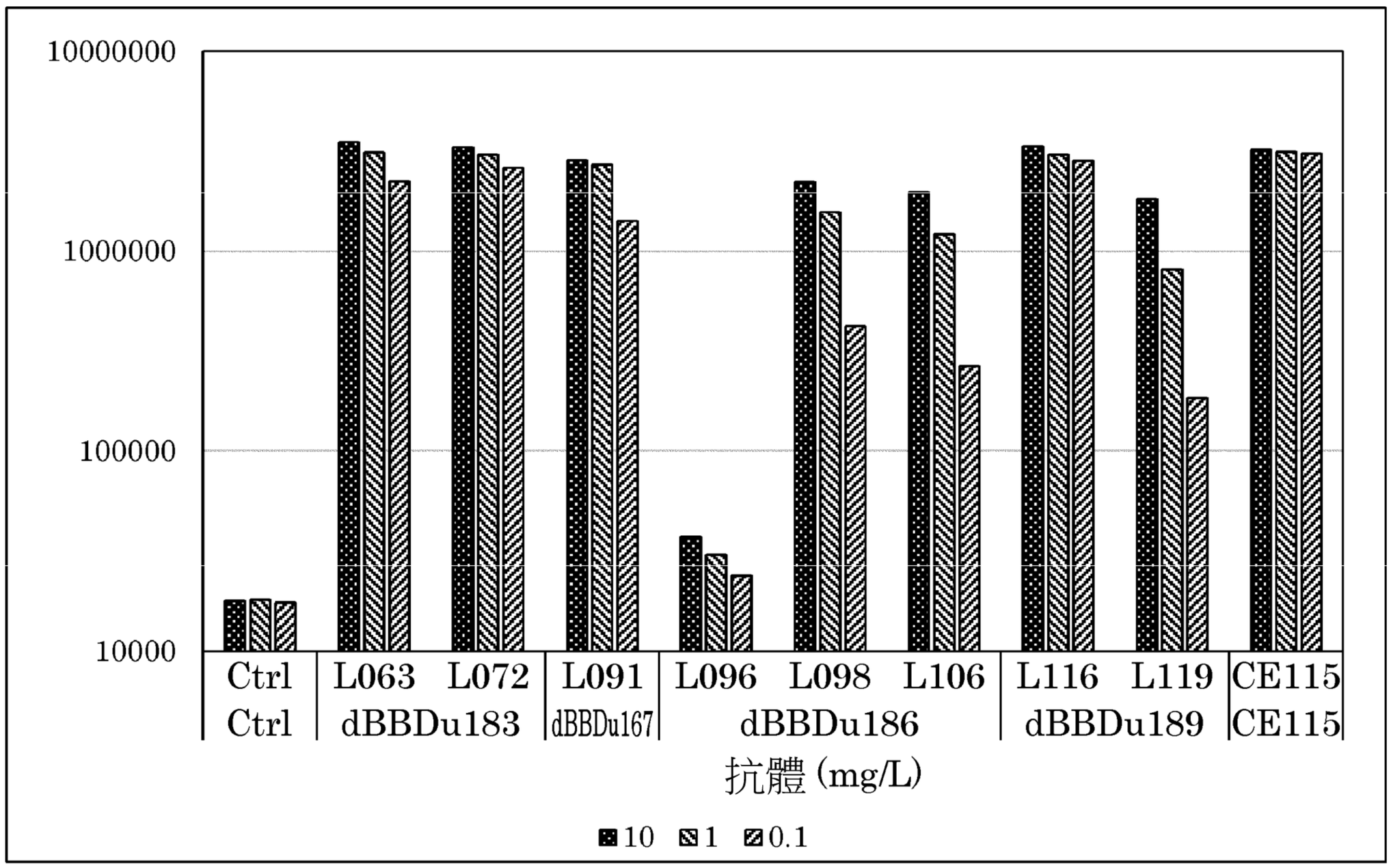
【圖 18A】

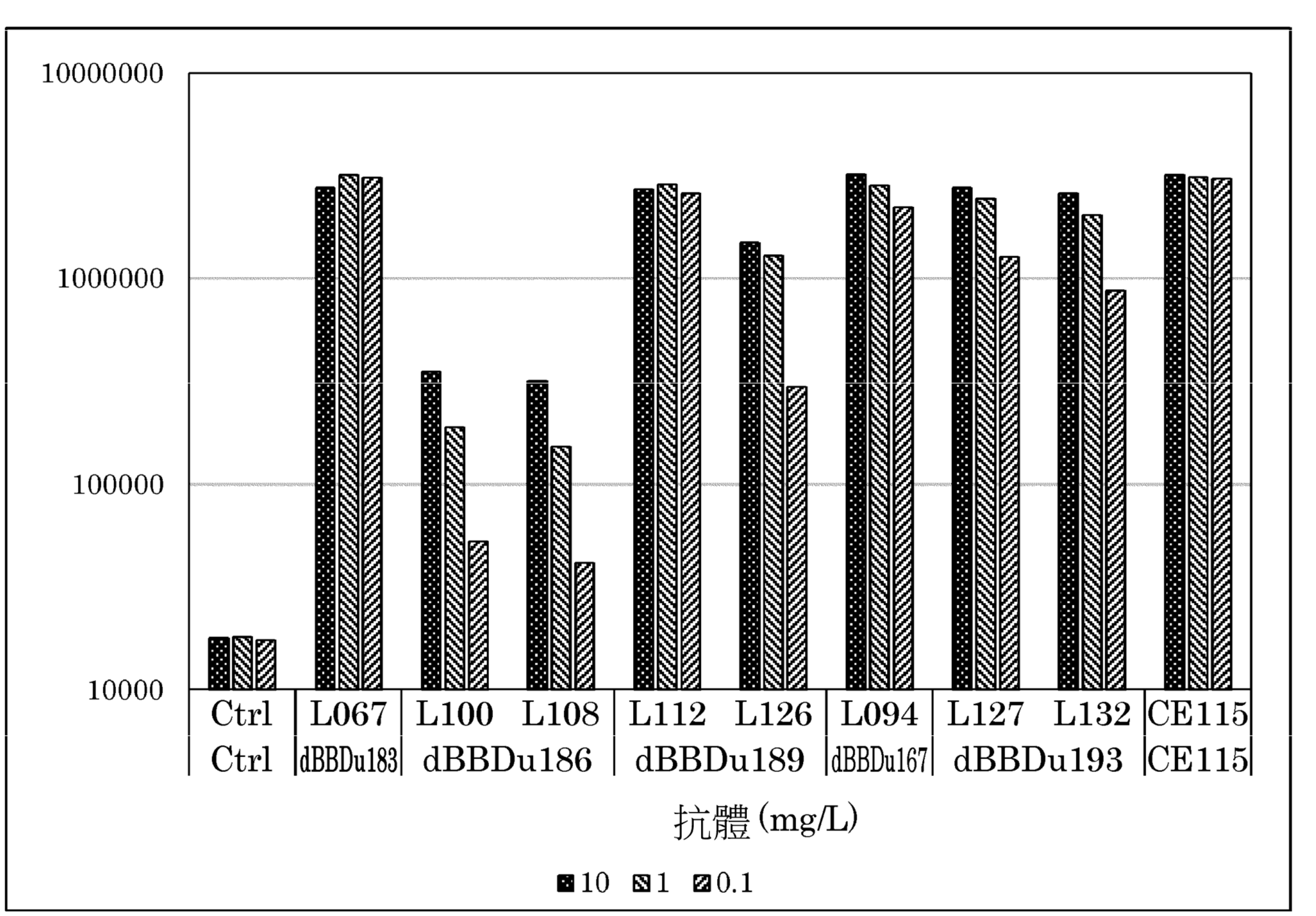

5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
hIL-6(pg/mL)
Ctrl
B
L063
L072
L091
L096
L098
L106
L116
L119
Ctrl
B
dBBDu183
dBBDu167
dBBDu186
dBBDu189
30
6
1.2
0.24

【圖 18B】

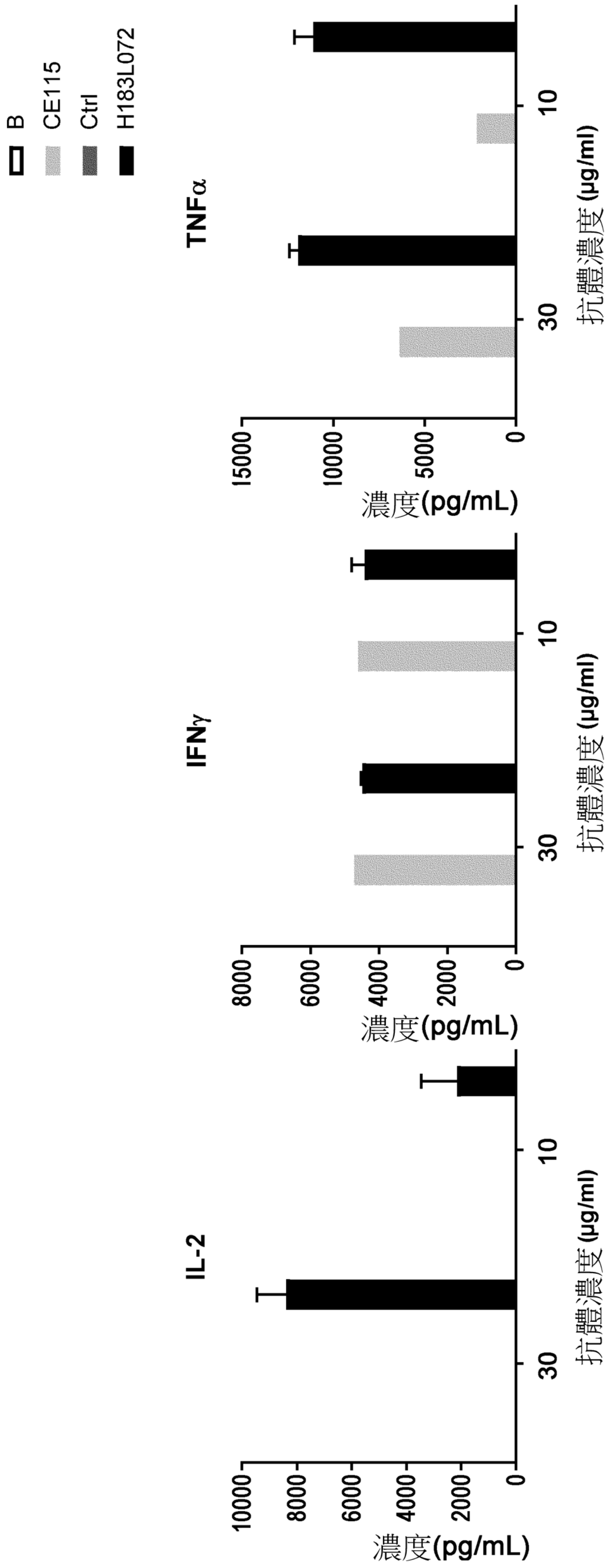


【圖 19A】

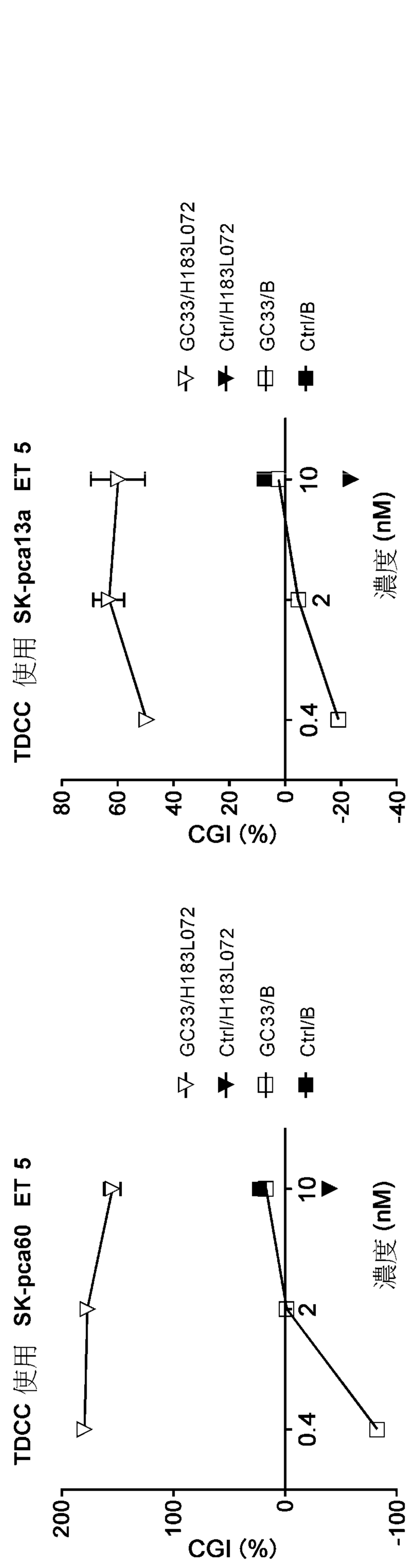

10000000
1000000
100000
10000
Ctrl
Ctrl
L063
L072
dBBDu183
L091
dBBDu167
L096
L098
L106
dBBDu186
L116
L119
dBBDu189
CE115
CE115
抗體 (mg/L)
10
1
0.1


10000000
1000000
100000
10000
Ctrl
Ctrl
L067
dBBDu183
L100
L108
dBBDu186
L112
L126
dBBDu189
L094
dBBDu167
L127
L132
dBBDu193
CE115
CE115
抗體 (mg/L)
10
1
0.1

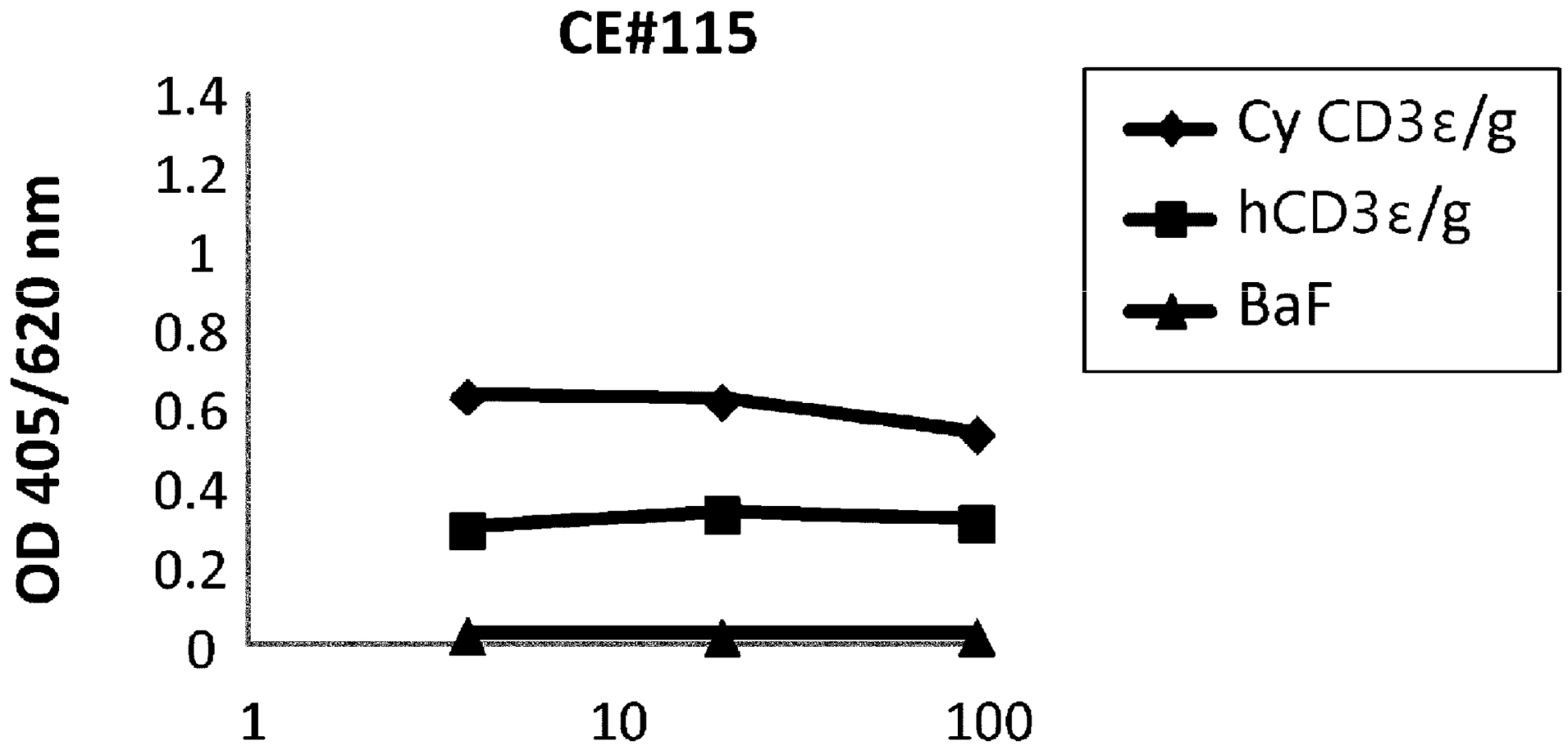
【圖 19B】


B
CE115
Ctrl
H183L072
TNFα
15000
10000
5000
0
濃度(pg/mL)
0
10
30
抗體濃度 (μg/ml)
IFNγ
8000
6000
4000
2000
0
濃度(pg/mL)
0
10
30
抗體濃度 (μg/ml)
IL-2
10000
8000
6000
4000
2000
0
濃度(pg/mL)
0
10
30
抗體濃度 (μg/ml)

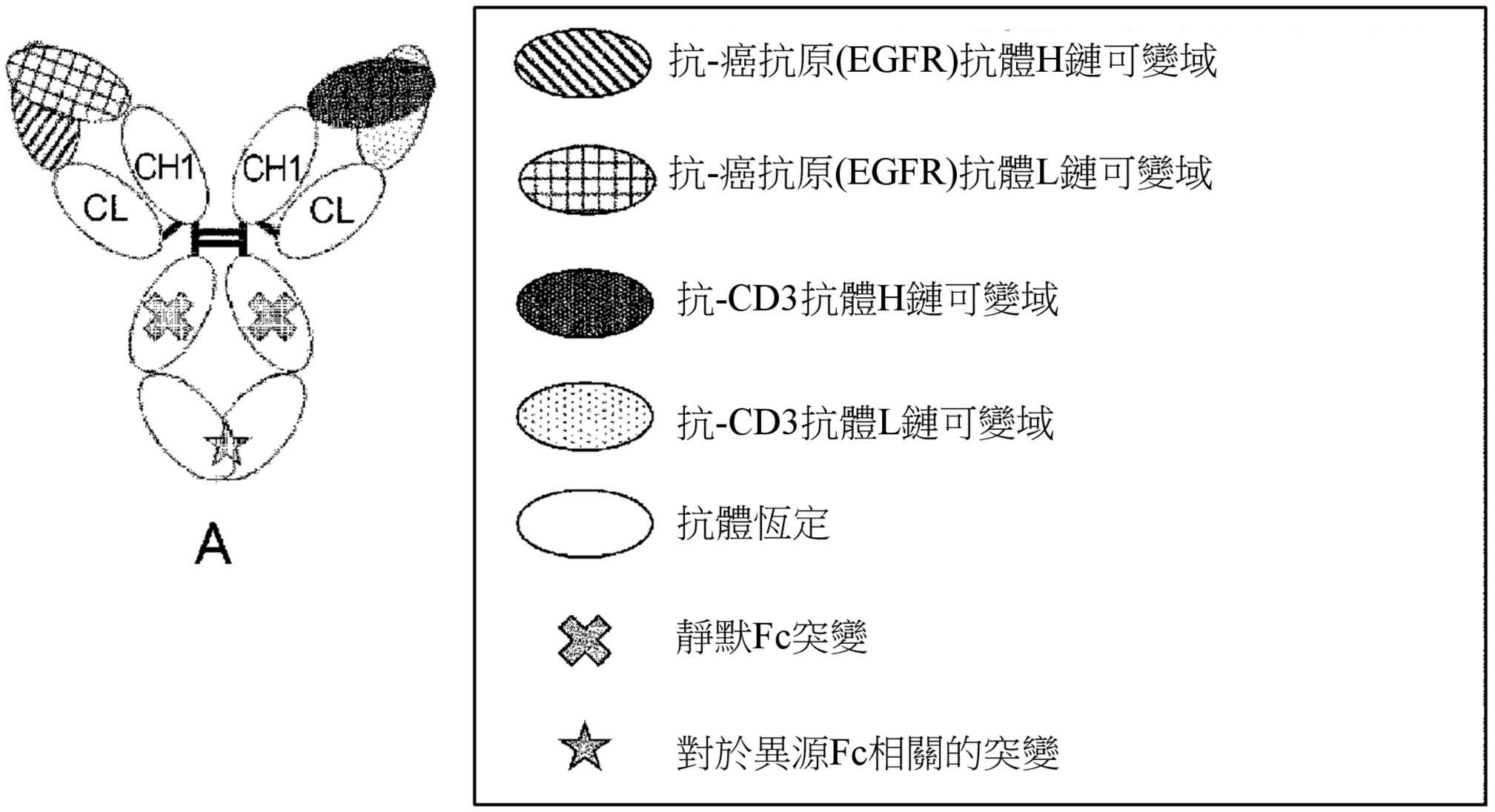
【圖 20】


GC33/H183L072
Ctrl/H183L072
GC33/B
Ctrl/B
TDCC 使用 SK-pca13a ET 5
80
60
40
20
0
-20
-40
CGI (%)
0.4
2
10
濃度 (nM)
GC33/H183L072
Ctrl/H183L072
GC33/B
Ctrl/B
TDCC 使用 SK-pca60 ET 5
200
100
0
-100
CGI (%)
0.4
2
10
濃度 (nM)

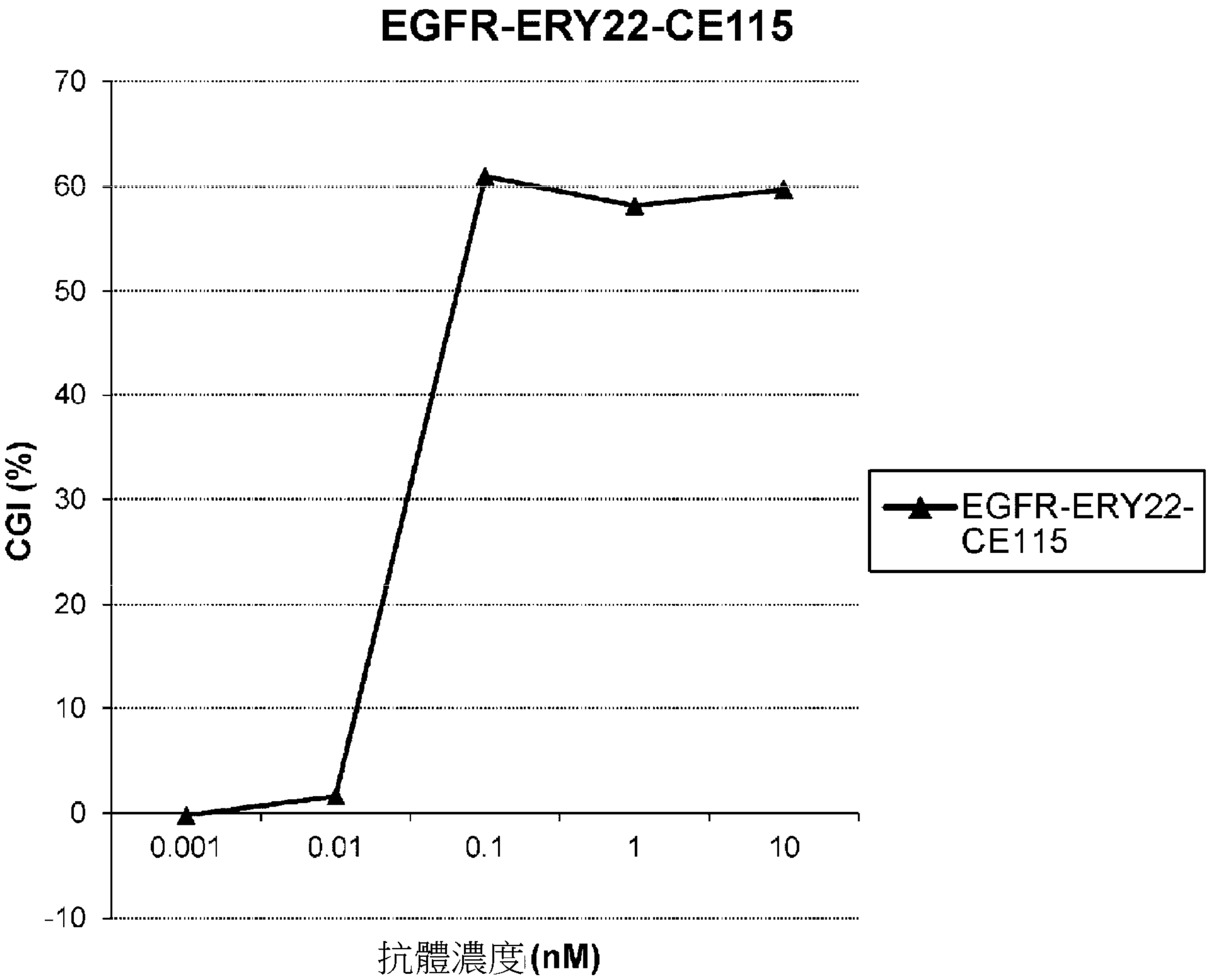
【圖 21】


CE#115
OD 405/620 nm
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
1
10
100
CM濃度 (%)
Cy CD3ε/g
hCD3ε/g
BaF

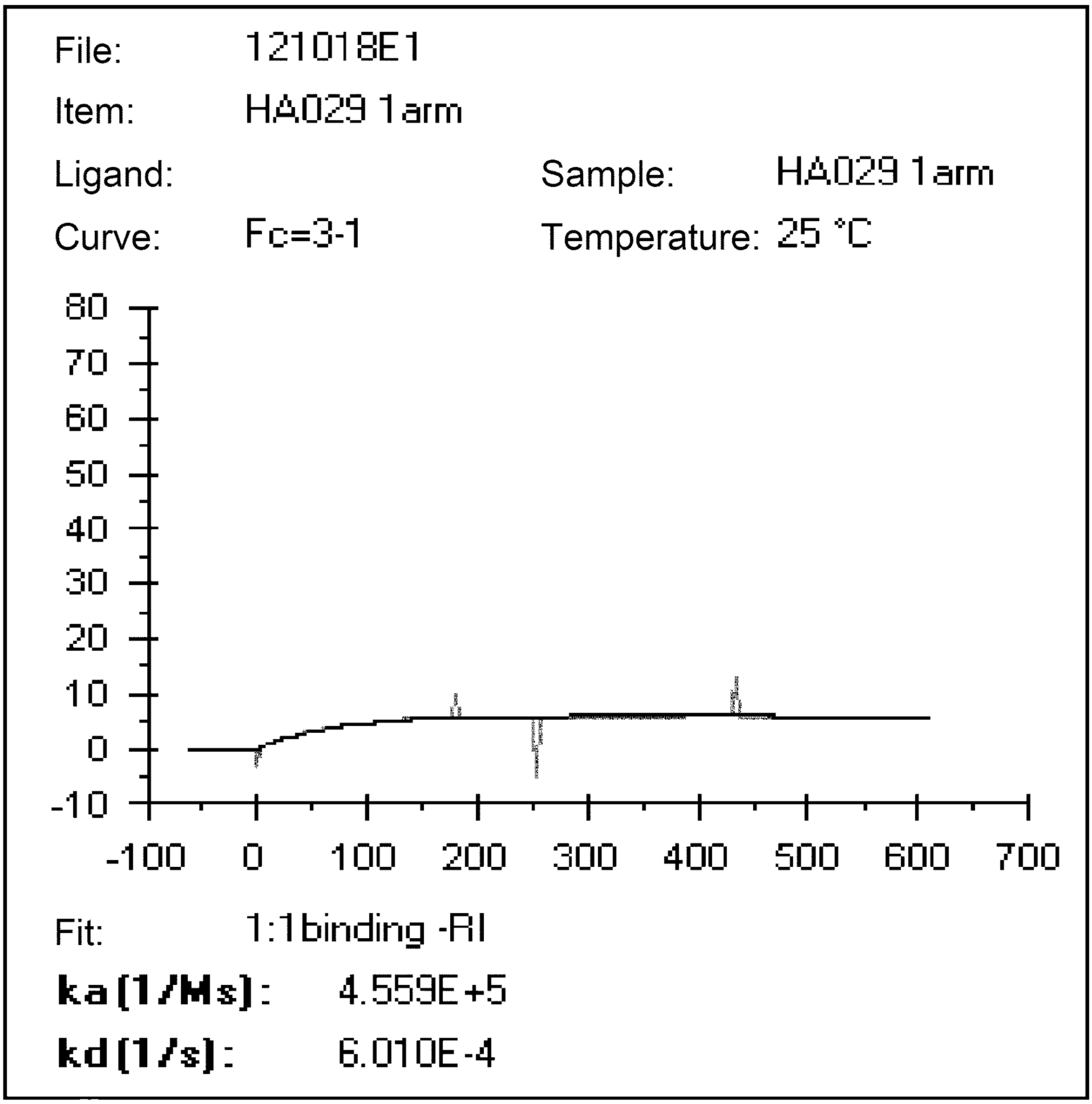
【圖 22】


CH1
CH1
CL
CL
A
抗-癌抗原(EGFR)抗體H鏈可變域
抗-癌抗原(EGFR)抗體L鏈可變域
抗-CD3抗體H鏈可變域
抗-CD3抗體L鏈可變域
抗體恆定
靜默Fc突變
對於異源Fc相關的突變

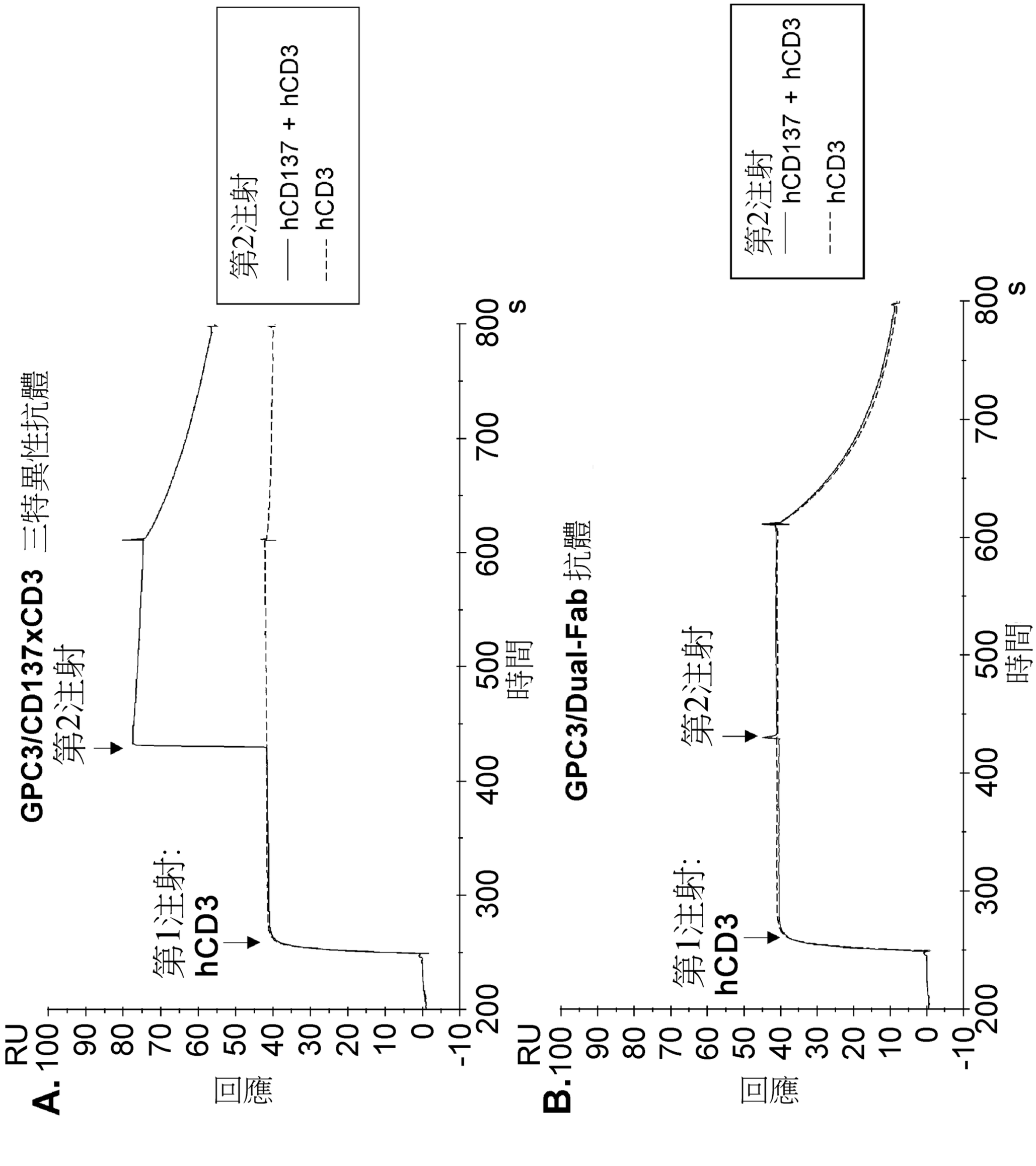
【圖 23】


EGFR-ERY22-CE115
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
CGI (%)
0.001
0.01
0.1
1
10
EGFR-ERY22-CE115
抗體濃度(nM)

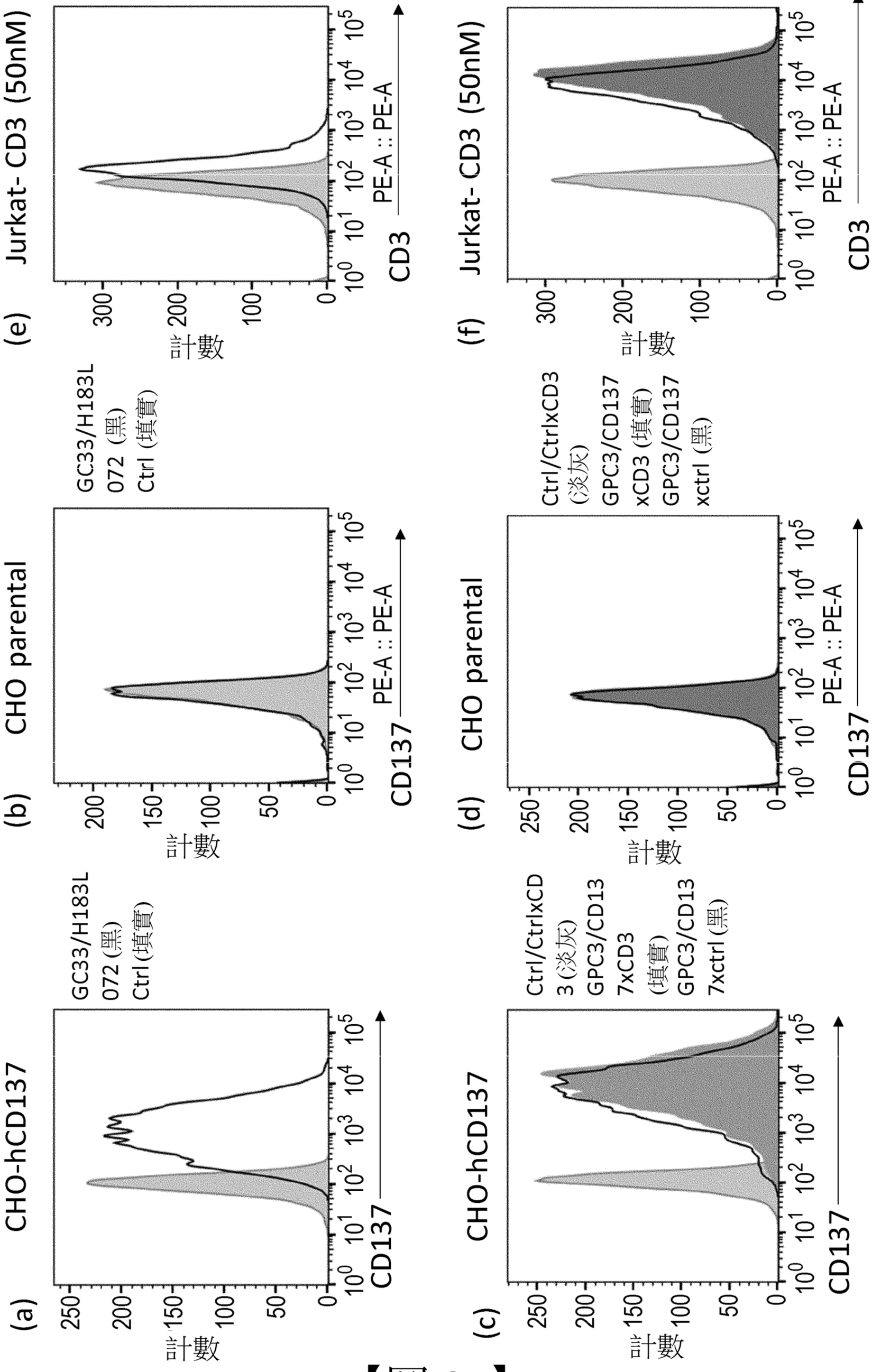
【圖 24】


File: 121018E1
Item: HA029 1arm
Ligand:
Sample: HA029 1arm
Curve: Fc=3-1
Temperature: 25 °C
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
-100
0
100
200
300
400
500
600
700
Fit: 1:1binding -RI
ka(1/Ms): 4.559E+5
kd(1/s): 6.010E-4

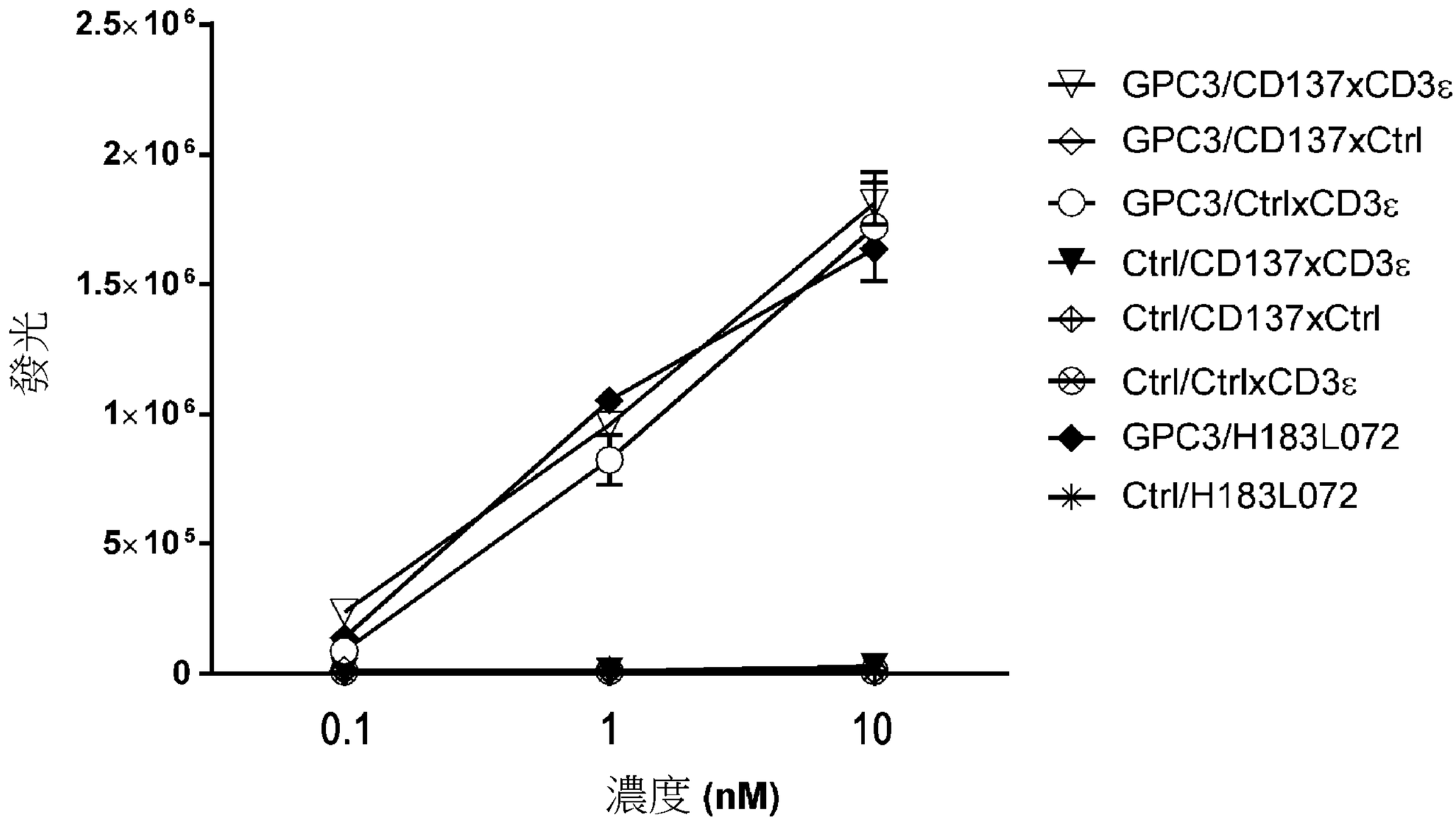
【圖 25】


A.
GPC3/CD137xCD3 三特異性抗體
第2注射
第1注射:
hCD3
RU
回應
時間
第2注射
hCD137 + hCD3
hCD3
B.
GPC3/Dual-Fab 抗體
第2注射
第1注射:
hCD3
RU
回應
時間
第2注射
hCD137 + hCD3
hCD3

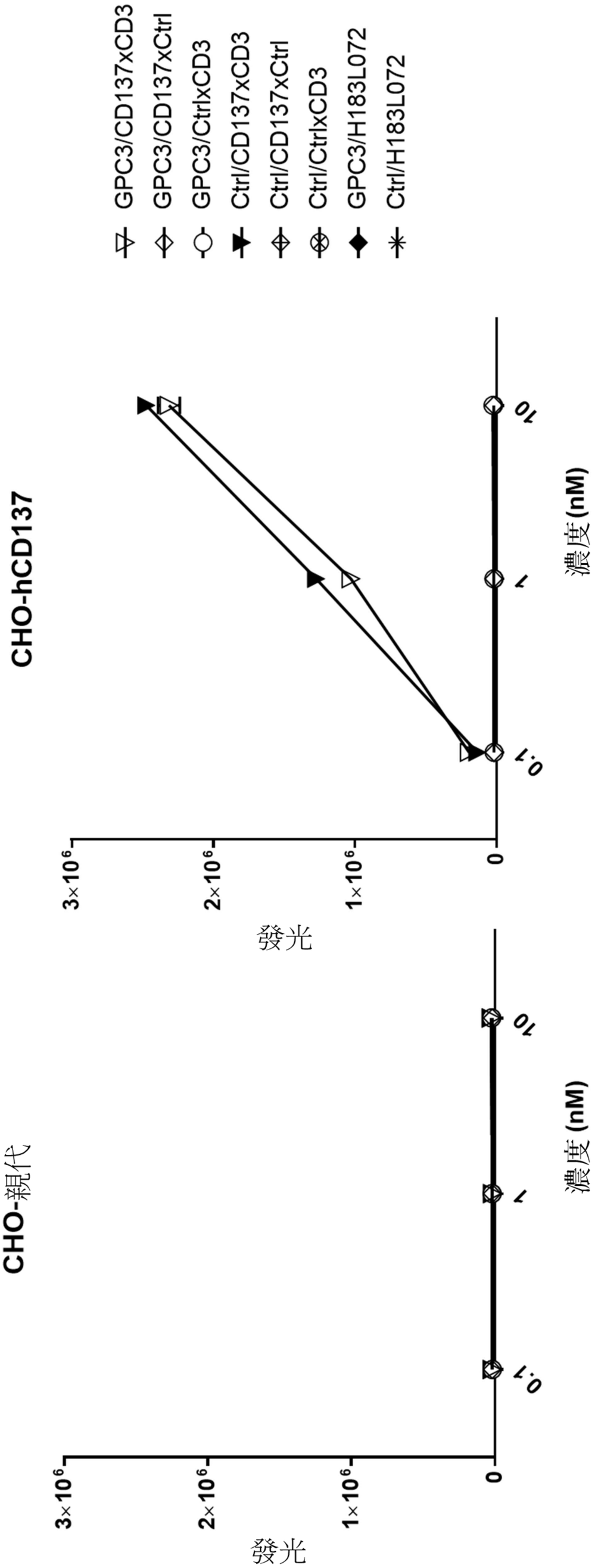
【圖 26】


(a)
CHO-hCD137
CD137
計數
GC33/H183L
072 (黑)
Ctrl (填實)
(b)
CHO parental
CD137
計數
GC33/H183L
072 (黑)
Ctrl (填實)
(c)
CHO-hCD137
CD137
計數
Ctrl/CtrlxCD
3 (淡灰)
GPC3/CD13
7xCD3
(填實)
GPC3/CD13
7xctrl (黑)
(d)
CHO parental
CD137
計數
Ctrl/CtrlxCD3
(淡灰)
GPC3/CD137
xCD3 (填實)
GPC3/CD137
xctrl (黑)
(e)
Jurkat-CD137
CD3
計數
GC33/H183L
072 (黑)
Ctrl (填實)
(f)
Jurkat-CD137
CD3
計數
Ctrl/CD137
xCtrl (淡灰)
GPC3/CD1
37xCD3
(填實)
GPC3/Ctrlx
CD3 (黑)

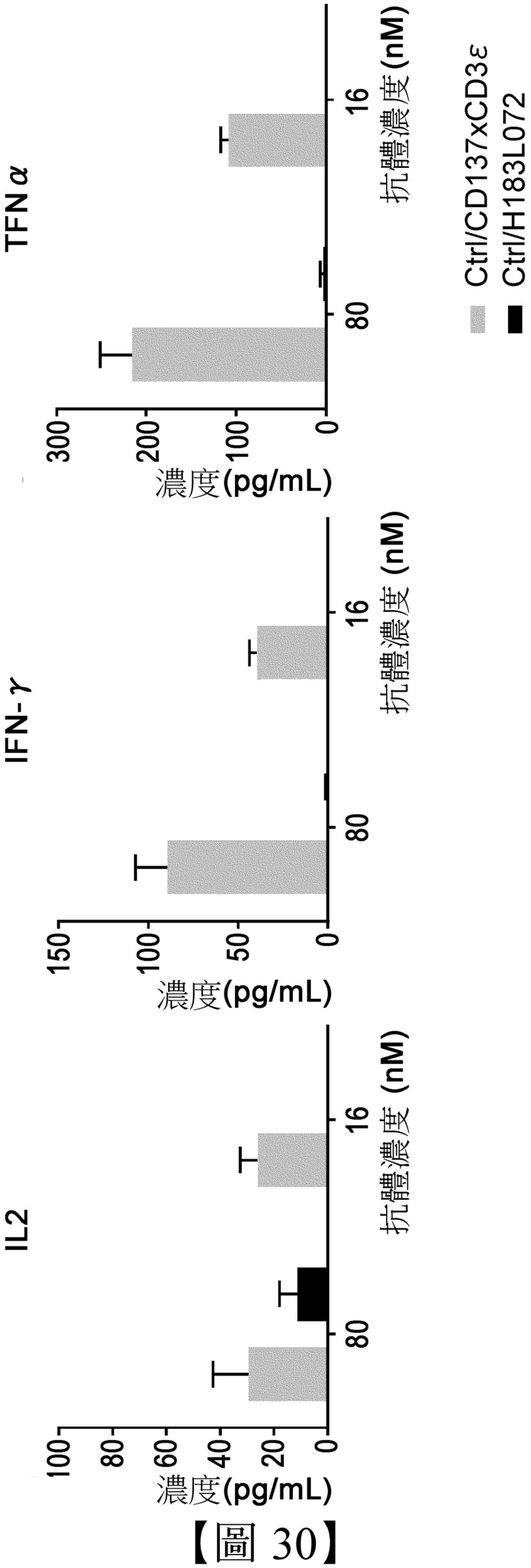
【圖 27】


SK-pca60
2.5×10⁶
2×10⁶
1.5×10⁶
1×10⁶
5×10⁵
0
發光
0.1
1
10
濃度 (nM)
GPC3/CD137xCD3ε
GPC3/CD137xCtrl
GPC3/CtrlxCD3ε
Ctrl/CD137xCD3ε
Ctrl/CD137xCtrl
Ctrl/CtrlxCD3ε
GPC3/H183L072
Ctrl/H183L072

【圖 28】


GPC3/CD137xCD3
GPC3/CD137xCtrl
GPC3/CtrlxCD3
Ctrl/CD137xCD3
Ctrl/CD137xCtrl
Ctrl/CtrlxCD3
GPC3/H183L072
Ctrl/H183L072
CHO-hCD137
3×10^6
2×10^6
1×10^6
0
發光
10
1
0.1
濃度(nM)
CHO-親代
3×10^6
2×10^6
1×10^6
0
發光
10
1
0.1
濃度 (nM)

【圖 29】


TFNα
300
200
100
0
濃度(pg/mL)
16
80
抗體濃度 (nM)
Ctrl/CD137xCD3ε
Ctrl/H183L072
IFN-γ
150
100
50
0
濃度(pg/mL)
16
80
抗體濃度 (nM)
IL2
100
80
60
40
20
0
濃度(pg/mL)
16
80
抗體濃度 (nM)

【圖 30】