

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 97137137

C12N 15/11 (2006.01)

※ 申請日期： 97. 9. 26

※IPC 分類：

C07K 16/18 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

C07K 16/24 (2006.01)

抗體固定區的變異/ANTIBODY CONSTANT REGION MUTANT

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

中外製藥股份有限公司/CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

代表人：(中文/英文)

永山治/NAGAYAMA OSAMU

住居所或營業所地址：(中文/英文)

日本國東京都北區浮間五丁目 5 番 1 號

國 籍：(中文/英文)

日本/JAPAN

三、發明人：(共 2 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 井川智之/IGAWA, TOMOYUKI

2. 白岩宙丈/SHIRAIWA, HIROTAKE

國 籍：(中文/英文)

1.~2. 日本/JAPAN

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 日本、2007/9/26、2007-250147

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

五、中文發明摘要：

本發明成功地改良抗體固定區以增加酸性條件下之安定性、降低源自鉸鏈區雙硫鍵的異質性、降低源自 H 鏈 C 終端之異質性、以及增加於高濃度之安定性，並發現具有降低的 Fc γ 受體結合活性之新穎固定區序列，而產生最小化新穎 T-細胞抗原決定基肽。其結果，本發明之抗體固定區具有良好的物理性質（安定性與同質性）、免疫性、安全性與血漿中停留時間。

六、英文發明摘要：

The present inventors succeeded in improving the antibody constant region to have increased stability under acid conditions, reduced heterogeneity originated from disulfide bonds in the hinge region, reduced heterogeneity originated from the H chain C terminus, and increased stability at high concentrations as well as in discovering novel constant region sequences having reduced Fc receptor-binding activity, while minimizing the generation of novel T-cell epitope peptides. As a result, the present inventors successfully discovered antibody constant regions with improved physical properties (stability and homogeneity), immunogenicity, safety, and retention in plasma.

[S]

七、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：無

(二) 本代表圖之元件符號簡單說明：無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明關於具有良好物理性質(安定性與同質性)、免疫性、安全性及/或血漿中停留時間之抗體固定區；以及包括該固定區之抗體。

【先前技術】

由於在血漿(血液)中為高度安定且具有較少的不良作用(adverse effects)，抗體吸引作為醫藥的注意力。其等之中，IgG-型抗體醫藥品已為市售可得且目前有許多抗體醫藥品正開發中(Janice M Reichert, Clark J Rosensweig, Laura B Faden & Matthew C Dewitz. Monoclonal antibody successes in the clinic. Nature Biotechnology (2005) 23, 1073-1078; Pavlou AK, Belsey MJ. The therapeutic antibodies market to 2008. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2005 Apr;59(3): 389-96)。

已為市售可得之所有抗體醫藥品幾乎皆為 IgG1 亞型(subclass)。由於可結合至 Fc γ 受體且顯現 ADCC 活性，IgG1 型抗體期待有用於作為抗癌抗體醫藥品。然而，對於例如 ADCC 之效應子功能(effector function)為重要者之 Fc 域與 Fc γ 受體的結合，可引起不需要的副作用，且因而較佳由預備用於中和生物活性之抗體醫藥品移除該結合活性(Reddy MP, Kinney CA, Chaikin MA, Payne A, Fishman-Lobell J, Tsui P, Dal Monte PR, Doyle ML, Brigham-Burke MR, Anderson D, Reff M, Newman R, Hanna

[5]

N, Sweet RW, Truneh A. Elimination of Fc receptor-dependent effector functions of a modified IgG4 monoclonal antibody to human CD4. *J. Immunol.* 2000 Feb 15;164(4):1925-33)。再者，由於 Fc γ 受體表現於抗原呈現細胞(antigen-presenting cells)，結合至 Fc γ 受體之分子有存在作為抗原的傾向。已經報導免疫性(immunogenicity)係藉由蛋白質或肽對 IgG1 之 Fc γ 域的連結且可藉此增強(Guyre PM, Graziano RF, Goldstein J, Wallace PK, Morganelli PM, Wardwell K, Howell AL. Increased potency of Fc-receptor-targeted antigens. *Cancer Immunol. Immunother.* 1997 Nov-Dec;45(3-4):146-8; US 20050261229A1)。抗體 Fc 域與 Fc γ 受體之間的交互作用被認為是 TGN1412 之臨床試驗第 1 期遭遇嚴重副作用的成因(Strand V, Kimberly R, Isaacs JD. Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future directions. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2007 Jan;6(1):75-92)。因此，由副作用與免疫性的觀點而言，對 Fc γ 受體的結合對於準備用於中和生物活性之抗體醫藥品被認為較不佳。

一種用於減弱對 Fc γ 受體結合的方法為改變 IgG 抗體之同型物，由 IgG1 轉換為 IgG2 或 IgG4；然而，此方法無法完全地抑制該結合(Gessner JE, Heiken H, Tamm A, Schmidt RE. The IgG Fc receptor family. *Ann. Hematol.* 1998 Jun;76(6):231-48)。經報導用於完全地抑制對 Fc γ

[5]

[5]

受體結合的方法之一為改變 Fc 域。例如抗-CD3 抗體及抗-CD4 抗體之效應子功能引起不良作用。因此，將不存在於野生型序列之胺基酸導入至 Fc 的 Fc γ -受體-結合域 (Reddy MP, Kinney CA, Chaikin MA, Payne A, Fishman-Lobell J, Tsui P, Dal Monte PR, Doyle ML, Brigham-Burke MR, Anderson D, Reff M, Newman R, Hanna N, Sweet RW, Truneh A. Elimination of Fc receptor-dependent effector functions of a modified IgG4 monoclonal antibody to human CD4. J. Immunol. 2000 Feb 15;164(4):1925-33; Cole MS, Anasetti C, Tso JY. Human IgG2 variants of chimeric anti-CD3 are nonmitogenic to T cells. J. Immunol. 1997 Oct 1;159(7):3613-21), 且正進行臨床試驗以評估不結合至 Fc γ 受體之抗-CD3 抗體與具有變異之 Fc 域的抗-CD4 抗體 (Strand V, Kimberly R, Isaacs JD. Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future directions. Nat. Rev. Drug Discov. 2007 Jan;6(1):75-92; Chau LA, Tso JY, Melrose J, Madrenas J. HuM291(Nuvion), a humanized Fc receptor-nonbinding antibody against CD3, anergizes peripheral blood T cells as partial agonist of the T cell receptor. Transplantation 2001 Apr 15;71(7):941-50)。或者，Fc γ 受體-非結合抗體可藉由將 IgG1(於 EU 編號系統之位置 233、234、235、236、327、330 及 331) 之 Fc γ R-結合域改變為 IgG2 或 IgG4 序列 (Armour KL,

[5]

[5]

Clark MR, Hadley AG, Williamson LM. Recombinant human IgG molecules lacking Fcγ receptor I binding and monocyte triggering activities. *Eur. J. Immunol.* 1999 Aug;29(8): 2613-24; WO 99/58572)而製備。然而，該等分子含有新穎非天然的 9 至 12 個胺基酸的肽序列，其可構成 T-細胞抗原決定基肽(epitope peptide)且因而造成免疫性風險。無先前報導關於以克服該等問題之 Fcγ 受體-非結合抗體。

同時，抗體蛋白質之物理性質，特別是免疫性與安定性，於抗體醫藥品的開發上為非常重要。對於 IgG2 同型物，已有報導源自鉸鏈區之雙硫鍵的異質性(Chu GC, Chelius D, Xiao G, Khor HK, Coulibaly S, Bondarenko PV. Accumulation of Succinimide in a Recombinant Monoclonal Antibody in Mildly Acidic Buffers Under Elevated Temperatures. *Pharm. Res.* 2007 Mar 24;24(6): 1145-56; US 2006/0194280)。大規模製造抗體醫藥品而同時維持所期望物質的異質性以及製造間相關物質的恆定為困難的。因此，可能的話，期望開發作為醫藥品之抗體分子為單一物質。

IgG2 與 IgG4 於酸性條件下不安定。於使用 Protein A 與病毒失活化處理之純化步驟中，IgG 型抗體通常暴露於酸性條件。因此，於該等步驟中需要關注於 IgG2 與 IgG4 的安定性且較佳為開發作為醫藥品之抗體分子於酸性條件下亦為安定者。天然的 IgG2 與 IgG4、以及衍生自 IgG2

[5]

[5]

或 IgG4 之 Fc γ 受體-非結合抗體(Gessner JE, Heiken H, Tamm A, Schmidt RE. The IgG Fc receptor family. Ann. Hematol. 1998 Jun;76(6): 231-48; Cole MS, Anasetti C, Tso JY. Human IgG2 variants of chimeric anti-CD3 are nonmitogenic to T cells. J. Immunol. 1997 Oct 1;159(7): 3613-21; WO 99/58572)具有該等問題。當開發抗體為醫藥品時，期望解決該等問題。

IgG1-型抗體於酸性條件下為相對的安定，且於此型抗體中，源自鉸鏈區之雙硫鍵的異質性程度亦為較低。然而，已有報導當 IgG1-型抗體儲存於溶液中作為製劑時，於鉸鏈區進行非酵素性肽鍵裂解，且結果產生為不純物之 Fab 片段(AJ Cordoba, BJ Shyong, D Breen, RJ Harris. Nonenzymatic hinge region fragmentation of antibodies in solution. J. Chromatogr. B. Anal. Technol. Biomed. Life Sci. (2005) 818, 115-121)。當開發抗體為醫藥品時，期望克服不純物的產生。

再者，有報導抗體 C-終端序列之異質性，其為起因於 C-終端胺基酸殘基 Lys 或兩個 C-終端胺基酸殘基 Glu 與 Lys 的刪除之 C-終端胺基的醯胺化結果(Johnson KA, Paisley-Flango K, Tangarone BS, Porter TJ, Rouse JC. Cation exchange-HPLC and mass spectrometry reveal C-terminal amidation of an IgG1 heavy chain. Anal. Biochem. 2007 Jan 1;360(1): 75-83)。當開發抗體為醫藥品時，較佳為去除該異質性。

[5]

[5]

用於中和抗原之抗體醫藥品之固定區，較佳具有克服上述問題之序列。然而尚未有報導符合所有要求之固定區。

於慢性自體免疫疾病等之抗體醫藥品投藥的較佳型式被認為是皮下製劑。可以較長間隔於皮下投藥之低劑量、便利的抗體醫藥製劑，可藉由增加抗體於血漿中之半衰期以延長其治療效果且因此降低蛋白質投藥量而提供，以及藉由賦予抗體具有高安定性而因此可製備高濃度製劑。

一般而言，皮下製劑需要為高濃度製劑。由安定性等觀點而言，IgG-型抗體製劑之濃度限制，一般認定為約100mg/ml(Shire SJ, Shahrokh Z, Liu J. Challenges in the development of high protein concentration formulations. J. Pharm. Sci. 2004 Jun; 93(6) : 1390-402)。因此，於高濃度確保安定性為一挑戰。然而，尚未有報導藉由於 IgG 固定區導入胺基酸取代物而改良 IgG 於高濃度之安定性。已報導用於延長抗體於血漿中之半衰期的方法且其取代固定區之胺基酸(Hinton PR, Xiong JM, Johlf s MG, Tang MT, Keller S, Tsurushita N. An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life. J. Immunol. 2006 Jan 1;176(1) : 346-56; Ghetie V, Popov S, Borvak J, Radu C, Matesoi D, Medesan C, Ober RJ, Ward ES. Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis.

[5]

[S]

Nat. Biotechnol. 1997 Jul;15(7): 637-40); 然而，由免疫性風險的觀點而言，非天然序列對於固定區之導入為較不佳的。

如上所述，當抗體醫藥品之目的為中和抗原時，較佳為具有上述問題已被克服之固定區序列。然而，尚未有可克服上述缺點之固定區。因此，冀求已克服上述問題之抗體固定區。

【發明內容】

有鑑於上述情況而完成本發明。本發明之目的係提供藉由胺基酸改變而具有經改良之物理性質(安定性與同質性)、免疫性、安全性及血漿中停留時間之抗體固定區。

本發明者們進行致力於研究以製造抗體固定區，該抗體固定區經由其胺基酸序列的改變而改良且具有經改良之物理性質(安定性與同質性)、免疫性、安全性及血漿中停留時間。其結果，本發明者們成功地改良抗體固定區以具有於酸性條件下之安定性增加、衍生自鉸鏈區雙硫鍵之異質性降低、衍生自 H-鏈 C-終端之異質性降低、以及於高濃度之安定性增加，以及發現具有降低的 Fcγ受體結合活性之新穎固定區序列，而最小化新穎 T-細胞抗原決定基肽的產生。

本發明關於抗體固定區，其藉由胺基酸改變之改良而由安全性、免疫性風險、物理性質(安定性與同質性)、以及血漿中之停留時間之觀點為優異的；包括該等抗體固定區之抗體；包括該等抗體知醫藥品；以及用於製造其等之

[S]

[5]

方法。更具體而言，本發明提供：

[1] 一種人類抗體固定區，其係下述任一者：

(a) 包括於序列編號：1 之胺基酸序列中於位置 329(於 EU 編號系統之位置 446，參照具有免疫學重要性之蛋白質序列，NIH 出版號 No. 91-3242)的 Gly 及位置 330(於 EU 編號系統之位置 447)的 Lys 之兩者經刪除的人類抗體固定區；

(b) 包括於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 325(於 EU 編號系統之位置 446)的 Gly 及位置 326(於 EU 編號系統之位置 447)的 Lys 之兩者經刪除的人類抗體固定區；以及

(c) 包括於序列編號：3 之胺基酸序列中於位置 329(於 EU 編號系統之位置 446)的 Gly 及位置 330(於 EU 編號系統之位置 447)的 Lys 之兩者經刪除的人類抗體固定區；

[2] 一種 IgG2 固定區，其於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 209(於 EU 編號系統之位置 330)、210(於 EU 編號系統之位置 331)及 218(於 EU 編號系統之位置 339)的胺基酸經其他胺基酸取代；

[3] 一種 IgG2 固定區，其於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 276(於 EU 編號系統之位置 397)的胺基酸經另一胺基酸取代；

[4] 一種 IgG2 固定區，其於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 14(於 EU 編號系統之位置 131)、102(於 EU 編號系統之位置 219)及/或 16(於 EU 編號系統之位置 133)的胺基酸經以另一胺基酸取代；

[5]

[5] 如 [4] 之 IgG2 固定區，其中，於序列編號：2 之胺基酸序列之位置 20(於 EU 編號系統之位置 137)及 21(於 EU 編號系統之位置 138)的胺基酸經另一胺基酸取代；

[6] 一種 IgG2 固定區，其於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 147(於 EU 編號系統之位置 268)的 His、於位置 234(於 EU 編號系統之位置 355)的 Arg、及 / 或於位置 298(於 EU 編號系統之位置 419)的 Gln 經其他胺基酸取代；

[7] 一種 IgG2 固定區，其於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 209(於 EU 編號系統之位置 330)、210(於 EU 編號系統之位置 331)、218(於 EU 編號系統之位置 339)、276(於 EU 編號系統之位置 397)、14(於 EU 編號系統之位置 131)、16(於 EU 編號系統之位置 133)、102(於 EU 編號系統之位置 219)、20(於 EU 編號系統之位置 137)、及 21(於 EU 編號系統之位置 138)的胺基酸經以其他胺基酸取代；

[8] 如 [7] 之 IgG2 固定區，其進一步包括於位置 325(於 EU 編號系統之位置 446)的 Gly 及位置 326(於 EU 編號系統之位置 447)的 Lys 之兩者經刪除；

[9] 一種 IgG2 固定區，其於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 276(於 EU 編號系統之位置 397)、14(於 EU 編號系統之位置 131)、16(於 EU 編號系統之位置 133)、102(於 EU 編號系統之位置 219)、20(於 EU 編號系統之位置 137)、及 21(於 EU 編號系統之位置 138)的胺基酸經其他胺基酸取代；

[10] 如 [9] 之 IgG2 固定區，其進一步包括於位置 325(於

EU 編號系統之位置 446) 的 Gly 及位置 326(於 EU 編號系統之位置 447) 的 Lys 之兩者刪除；

[11] 一種 IgG2 固定區，其於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 14(於 EU 編號系統之位置 131) 的 Cys、於位置 16(於 EU 編號系統之位置 133) 的 Arg、於位置 102(於 EU 編號系統之位置 219) 的 Cys、於位置 20(於 EU 編號系統之位置 137) 的 Glu、於位置 21(於 EU 編號系統之位置 138) 的 Ser、於位 147(於 EU 編號系統之位置 268) 的 His、於位置 234(於 EU 編號系統之位置 355) 的 Arg、及於位置 298(於 EU 編號系統之位置 419) 的 Gln 經其他胺基酸取代；

[12] 如 [11] 之 IgG2 固定區，其進一步包括於位置 325(於 EU 編號系統之位置 446) 的 Gly 及位置 326(於 EU 編號系統之位置 447) 的 Lys 之兩者經刪除；

[13] 一種 IgG2 固定區，其於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 14(於 EU 編號系統之位置 131) 的 Cys、於位置 16(於 EU 編號系統之位置 133) 的 Arg、於位置 102(於 EU 編號系統之位置 219) 的 Cys、於位置 20(於 EU 編號系統之位置 137) 的 Glu、於位置 21(於 EU 編號系統之位置 138) 的 Ser、於位 147(於 EU 編號系統之位置 268) 的 His、於位置 234(於 EU 編號系統之位置 355) 的 Arg、於位置 298(於 EU 編號系統之位置 419) 的 Gln、及於位置 313(於 EU 編號系統之位置 434) 的 Asn 經其他胺基酸取代；

[14] 如 [11] 之 IgG2 固定區，其進一步包括於位置 325(於 EU 編號系統之位置 446) 的 Gly 及位置 326(於 EU 編號系統

之位置 447)的 Lys 之兩者刪除；

[15] 一種 IgG4 固定區，其於序列編號：3 之胺基酸序列中於位置 289(於 EU 編號系統之位置 409)的胺基酸經以另一胺基酸取代；

[16] 一種 IgG4 固定區，其於序列編號：3 之胺基酸序列中於位置 289(於 EU 編號系統之位置 409)、位置 14、16、20、21、97、100、102、103、104 及 105(於 EU 編號系統分別為位置 131、133、137、138、214、217、219、220、221 及 222)、及位置 113、114 及 115(於 EU 編號系統分別為位置 233、234 及 235) 的胺基酸經以其他胺基酸取代，以及於位置 116 (於 EU 編號系統之位置 236)的胺基酸經刪除；

[17] 如 [16]之 IgG4 固定區，其進一步包括於位置 326(於 EU 編號系統之位置 446)的 Gly 及位置 327(於 EU 編號系統之位置 447)的 Lys 之兩者刪除；

[18] 一種 IgG1 固定區，其序列編號：1 中於位置 317(於 EU 編號系統之位置 434)的 Asn 經另一胺基酸取代；

[19] 如 [18]之 IgG1 固定區，其進一步包括於位置 329(於 EU 編號系統之位置 446)的 Gly 及位置 330(於 EU 編號系統之位置 447)的 Lys 之兩者經刪除；

[20] 一種 IgG2 固定區，其於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 209(於 EU 編號系統之位置 330)的 Ala、於位置 210(於 EU 編號系統之位置 331)的 Pro、於位置 218(於 EU 編號系統之位置 339)的 Thr、於位置 14(於 EU 編號系統之

位置 131) 的 Cys、於位置 16(於 EU 編號系統之位置 133) 的 Arg、於位置 102(於 EU 編號系統之位置 219) 的 Cys、於位置 20(於 EU 編號系統之位置 137) 的 Glu、及於位置 21(於 EU 編號系統之位置 138) 的 Ser 經其他胺基酸取代；

[21] 如 [20] 之 IgG2 固定區，其進一步包括於位置 325(於 EU 編號系統之位置 446) 的 Gly 及位置 326(於 EU 編號系統之位置 447) 的 Lys 之兩者經刪除；

[22] 一種 IgG2 固定區，其於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 14(於 EU 編號系統之位置 131) 的 Cys、於位置 16(於 EU 編號系統之位置 133) 的 Arg、於位置 102(於 EU 編號系統之位置 219) 的 Cys、於位置 20(於 EU 編號系統之位置 137) 的 Glu、及於位置 21(於 EU 編號系統之位置 138) 的 Ser 經其他胺基酸取代；

[23] 如 [22] 之 IgG2 固定區，其進一步包括於位置 325(於 EU 編號系統之位置 446) 的 Gly 及位置 326(於 EU 編號系統之位置 447) 的 Lys 之兩者經刪除；

[24] 一種人類抗體固定區，包括序列編號：5 之胺基酸序列；

[25] 一種人類抗體固定區，包括序列編號：7 之胺基酸序列；

[26] 一種人類抗體固定區，包括序列編號：9 之胺基酸序列；

[27] 一種人類抗體固定區，包括序列編號：35 之胺基酸序列；

[28] 一種人類抗體固定區，包括序列編號：36 之胺基酸序列；

[29] 一種人類抗體固定區，包括序列編號：37 之胺基酸序列；

[30] 一種人類抗體固定區，包括序列編號：43 之胺基酸序列；

[31] 一種人類抗體固定區，包括序列編號：57 之胺基酸序列(M40 Δ GK)；

[32] 一種人類抗體固定區，包括序列編號：55 之胺基酸序列(M86 Δ GK)；

[33] 一種抗體，包括[1]至[32]中任一項之固定區；

[34] 一種抗-IL-6-受體之抗體，包括[1]至[32]中任一項之固定區；[35] 一種醫藥組合物，包括[1]至[32]中任一項之固定區。

【實施方式】

本發明提供抗體固定區，藉由改變抗體固定區之胺基酸序列使該抗體之物理性質(安定性與同質性)、免疫性、安全性及/或血漿中停留已為改善；包括該固定區之抗體；包括該抗體之醫藥組合物；以及製造該等之方法。

本文中，固定區意指 IgG1、IgG2 或 IgG4 型之固定區。該抗體固定區較佳人類抗體固定區。人類 IgG1、IgG2 與 IgG4 固定區之胺基酸為已知(人類 IgG1 固定區，序列編號：1；人類 IgG2 固定區，序列編號：2；以及人類 IgG4 固定區，序列編號：3)。本發明之含有胺基酸取代之抗體固

定區可包括其他胺基酸取代與修改，只要其包括本發明之胺基酸取代即可。因此，於包括序列編號：2 之胺基酸序列之 IgG2 固定區中包括本發明之胺基酸取代的 IgG2 固定區，包含：於序列編號：2 中包括一個或多個胺基酸取代/或修改且進一步包括本發明之胺基酸取代的 IgG2 固定區，以及包括本發明之胺基酸取代且進一步包括一個或多個胺基酸取代及/或修改的 IgG2 固定區。同樣應用於包括序列編號：1 之胺基酸序列的 IgG1 固定區以及包括序列編號：3 之胺基酸序列的 IgG4 固定區。人類 IgG4 固定區之序列已改變以改良鉸鏈區之安定性。(Mol. Immunol. 1993 Jan;30(1):105-8)。再者，於 EU 編號系統中於位置 297 之糖鏈可為任何糖鏈結構，或可無任何糖鏈連接於此位置(例如可以大腸桿菌(*E. coli*)製造)。

<具有經改變之胺基酸的 IgG2 >

本發明提供於酸性條件下具有經改良之安定性的 IgG2 固定區。

更具體而言，本發明提供 IgG2 固定區，其中序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 276(於 EU 編號系統之位置 276)之 Met 經以另一胺基酸取代。取代後之胺基酸型態並無各別限制；然而，較佳取代為 Val。於酸性條件下之抗體安定性可藉由以另一胺基酸取代序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 276(於 EU 編號系統之位置 276)之 Met 而改良。

本發明所提供之具有於酸性條件下經改良之安定性

的 IgG2 固定區，亦可具有其他胺基酸之取代、刪除、增加及/或插入，只要其至少具有上述胺基酸取代即可。

本發明提供具有降低的鉸鏈區異質性的 IgG2 固定區。

更具體而言，本發明提供 IgG2 固定區，其中於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 14(於 EU 編號系統之位置 131)的 Cys、於位置 16(於 EU 編號系統之位置 133)的 Arg、及/或於位置 102(於 EU 編號系統之位置 219)的 Cys 經以其他胺基酸取代。取代後之胺基酸型態並無特別限制；然而，較佳為於位置 14(於 EU 編號系統之位置 131)的 Cys 取代為 Ser、於位置 16(於 EU 編號系統之位置 133)的 Arg 取代為 Lys、及於位置 102(於 EU 編號系統之位置 219)的 Cys 取代為 Ser(IgG2-SKSC)。

該等取代可降低源自 IgG2 鉸鏈區之異質性。包括胺基酸取代之本發明的 IgG2 固定區，包含 IgG2 固定區(其包括上述三型態胺基酸取代之至少一者)；然而，IgG2 固定區較佳地包括於位置 14 的 Cys 與於位置 102 的 Cys 以其他胺基酸取代或所有上述三型態胺基酸取代。

本發明所提供之具有降低的異質性之 IgG2 固定區，亦可具有其他胺基酸之取代、刪除、增加及/或插入，只要其至少具有上述胺基酸取代即可。

例如，於包括序列編號：2 之 IgG2 固定區域變異於位置 14 的 Cys 與於位置 16 的 Arg，可產生非天然、新穎的 9 至 12 個胺基酸肽序列，其可變成 T-細胞抗原決定基肽，且因而產生免疫性風險。即使以上述之導入胺基酸取代，

非天然 T-細胞抗原決定基肽的產生可藉由以其他胺基酸取代於位置 20(於 EU 編號系統之位置 137)的 Glu 以及於位置 21(於 EU 編號系統之位置 138)的 Ser 而避免。取代後之胺基酸型態並無各別限制；然而，較佳為於位置 14 的 Glu 取代為 Gly 及於位置 21 的 Ser 取代為 Gly。

本發明亦提供具有低 Fc γ 受體-結合活性之 IgG2 固定區。

更具體而言，本發明亦提供 IgG2 固定區，其包括於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 209(EU330)的 Ala、於位置 210(EU331)的 Pro、及/或於位置 218(EU339)的 Thr，分別以 Ser、Ser 及 Ala 取代之胺基酸序列。已有報導於位置 209(EU303)的 Ala 取代及於位置 210(EU331)的 Pro 取代能減弱 Fc γ 受體結合(Eur. J. Immunol. 1999 Aug;29(8):2613-24)。由免疫性風險的觀點，因為造成可成為 T-細胞抗原決定基之非人類衍生肽的產生而非較佳者。然而，IgG2 之 Fc γ 受體結合可藉由同時將位置 218(EU339)的 Thr 取代為 Ala 而降低，且可變成 T-細胞抗原決定基之該 9 至 12 的胺基酸肽為僅衍生自人類。

本發明之包括胺基酸取代之 IgG2 固定區包括上述三型態胺基酸取代之至少一者；然而，該 IgG2 固定區較佳地包括所有上述三型態胺基酸取代。於較佳具體例中，包括胺基酸取代之本發明的 IgG2 固定區包含 IgG2 固定區，其包括於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 209(EU330)的 Ala、於位置 210(EU331)的 Pro、及/或於位置 218(EU339)

的 Thr，分別以 Ser、Ser 及 Ala 取代之胺基酸序列。

本發明所提供之具有低 Fc γ 受體結合活性之 IgG2 固定區，亦可具有其他胺基酸之取代、刪除、增加及/或插入，只要其至少具有上述胺基酸取代即可。

本發明亦提供具有低 C-端異質性之 IgG2 固定區。

更具體而言，本發明亦提供 IgG2 固定區，其包括於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 325(EU 編號系統之位置 446)的 Gly 及於位置 326(EU 編號系統之位置 447)的 Lys 經刪除之胺基酸序列。源自抗體 H 鏈之 C 終端的異質性僅可在該二胺基酸經刪除時降低。

本發明所提供之具有降低的 C-終端異質性之 IgG2 固定區，亦可具有其他胺基酸之取代、刪除、增加及/或插入，只要其至少具有上述胺基酸取代即可。

本發明進一步地亦提供具有改良的血漿中停留時間之 IgG2 固定區。

具體而言，本發明亦提供 IgG2 固定區，其包括於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 147(EU 編號系統之位置 268)的 His、於位置 234(EU 編號系統之位置 355)的 Arg 及於位置 298(EU 編號系統之位置 419)的 Gln 經以其他胺基酸取代之胺基酸序列。取代後之胺基酸型態並無特別限制；然而，較佳為於位置 147(於 EU 編號系統之位置 268)的 His 取代為 Gln、於位置 234(於 EU 編號系統之位置 355)的 Arg 取代為 Gln、及於位置 298(於 EU 編號系統之位置 419)的 Gln 取代為 Glu。本發明之包括胺基酸取代之 IgG2

固定區包含上述三型態胺基酸取代之至少一者；然而，該 IgG2 固定區較佳地包括所有上述三型態胺基酸取代。

下述為本發明 IgG2 之較佳具體例，其於酸性條件下具有經改良的安定性、於鉸鏈區具有降低的異質性及/或降低的 Fc γ 受體結合活性。

包括 IgG2 固定區之抗體，該 IgG2 固定區包括胺基酸序列其中於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 209 的 Ala、於位置 210 的 Pro、於位置 218 的 Thr、於位置 276 的 Met、於位置 14 的 Cys、於位置 16 的 Arg、於位置 102 的 Cys、於位置 20 的 Glu 及於位置 21 的 Ser，經其他胺基酸取代。

取代後之胺基酸型態並無特別限制；然而，較佳為於位置 209(於 EU 編號系統之位置 330)的 Ala 取代為 Ser、於位置 210(於 EU 編號系統之位置 331)的 Pro 取代為 Ser、於位置 218(於 EU 編號系統之位置 339)的 Thr 取代為 Ala、於位置 276(於 EU 編號系統之位置 397)的 Met 取代為 Val、於位置 14(於 EU 編號系統之位置 131)的 Cys 取代為 Ser、於位置 16(於 EU 編號系統之位置 133)的 Arg 取代為 Lys、於位置 102(於 EU 編號系統之位置 219)的 Cys 取代為 Ser、於位置 20(於 EU 編號系統之位置 137)的 Glu 取代為 Gly 及於位置 21(於 EU 編號系統之位置 138)的 Ser 取代為 Gly。

該 IgG2 固定區包括，例如，包括序列編號：4(M14)之胺基酸序列。

於另一較佳具體例中，本發明之 IgG2 固定區包括上述 IgG2 固定區中刪除於位置 325 的 Gly 及於位置 326 的 Lys 以降低 C-終端異質性所成之 IgG2 固定區。該等抗體包括，例如，包括序列編號：5 (M14 Δ GK) 之胺基酸序列的固定區之 IgG2 固定區。

下述為本發明 IgG2 之較佳具體例，其於鉸鏈區具有降低的異質性及/或降低的 Fc γ 受體結合活性。

包括 IgG2 固定區之抗體，該 IgG2 固定區包括胺基酸序列其中於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 209 的 Ala、於位置 210 的 Pro、於位置 218 的 Thr、於位置 14 的 Cys、於位置 16 的 Arg、於位置 102 的 Cys、於位置 20 的 Glu 及於位置 21 的 Ser，經以其他胺基酸取代。

取代後之胺基酸型態並無特別限制；然而，較佳為於位置 209(於 EU 編號系統之位置 330)的 Ala 取代為 Ser、於位置 210(於 EU 編號系統之位置 331)的 Pro 取代為 Ser、於位置 218(於 EU 編號系統之位置 339)的 Thr 取代為 Ala、於位置 14(於 EU 編號系統之位置 131)的 Cys 取代為 Ser、於位置 16(於 EU 編號系統之位置 133)的 Arg 取代為 Lys、於位置 102(於 EU 編號系統之位置 219)的 Cys 取代為 Ser、於位置 20(於 EU 編號系統之位置 137)的 Glu 取代為 Gly 及於位置 21(於 EU 編號系統之位置 138)的 Ser 取代為 Gly。

該 IgG2 固定區包括，例如，包括序列編號：54(M86) 之胺基酸序列之 IgG2 固定區。

於另一較佳具體例中，本發明之 IgG2 固定區包括上述 IgG2 固定區中刪除於位置 325 的 Gly 及於位置 326 的 Lys 以降低 C-終端異質性所成之 IgG2 固定區。該等抗體包括，例如，包括序列編號：55 (M86 Δ GK) 之胺基酸序列的固定區之 IgG2 固定區。

下述為為本發明之 IgG2 固定區之另一較佳具體例，其於酸性條件下具有經改良的安定性及於鉸鏈區具有降低的異質性。

包括 IgG2 固定區之抗體，該 IgG2 固定區包括胺基酸序列其中於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 276 的 Met、於位置 14 的 Cys、於位置 16 的 Arg、於位置 102 的 Cys、於位置 20 的 Glu 及於位置 21 的 Ser，經以其他胺基酸取代。

取代後之胺基酸型態並無特別限制；然而，較佳為於位置 276(於 EU 編號系統之位置 397)的 Met 取代為 Val、於位置 14(於 EU 編號系統之位置 131)的 Cys 取代為 Ser、於位置 16(於 EU 編號系統之位置 133)的 Arg 取代為 Lys、於位置 102(於 EU 編號系統之位置 219)的 Cys 取代為 Ser、於位置 20(於 EU 編號系統之位置 137)的 Glu 取代為 Gly 及於位置 21(於 EU 編號系統之位置 138)的 Ser 取代為 Gly。

該 IgG2 固定區包括，例如，包括序列編號：3(M31)之胺基酸序列之 IgG2 固定區。

於另一較佳具體例中，本發明之 IgG2 固定區包括上

述 IgG2 固定區中刪除於位置 325 的 Gly 及於位置 326 的 Lys 以降低 C-終端異質性所成之 IgG2 固定區。該等抗體包括，例如，包括序列編號：7(M31 Δ GK)之胺基酸序列的固定區之 IgG2 固定區。

下述為本發明之 IgG2 固定區之另一較佳具體例，其於鉸鏈區具有降低的異質性。

包括 IgG2 固定區之抗體，該 IgG2 固定區包括胺基酸序列其中於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 14 的 Cys、於位置 16 的 Arg、於位置 102 的 Cys、於位置 20 的 Glu 及於位置 21 的 Ser，經以其他胺基酸取代。

取代後之胺基酸型態並無特別限制；然而，較佳為於位置 14(於 EU 編號系統之位置 131)的 Cys 取代為 Ser、於位置 16(於 EU 編號系統之位置 133)的 Arg 取代為 Lys、於位置 102(於 EU 編號系統之位置 219)的 Cys 取代為 Ser、於位置 20(於 EU 編號系統之位置 137)的 Glu 取代為 Gly 及於位置 21(於 EU 編號系統之位置 138)的 Ser 取代為 Gly。

該 IgG2 固定區包括，例如，包括序列編號：56(M40)之胺基酸序列之 IgG2 固定區。

於另一較佳具體例中，本發明之 IgG2 固定區進一步包括上述 IgG2 固定區中刪除於位置 325 的 Gly 及於位置 326 的 Lys 之 IgG2 固定區。該等抗體包括，例如，包括序列編號：57 (M40 Δ GK)之胺基酸序列的固定區之 IgG2 固定區。

本發明提供 IgG2 固定區，其包括下述胺基酸序列：於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 14(於 EU 編號系統之位置 131)的 Cys、於位置 16(於 EU 編號系統之位置 133)的 Arg、於位置 102(於 EU 編號系統之位置 219)的 Cys、於位置 20(於 EU 編號系統之位置 137)的 Glu、於位置 21(於 EU 編號系統之位置 138)的 Ser、於位置 147(於 EU 編號系統之位置 268)的 His、於位置 234(於 EU 編號系統之位置 355)的 Arg 及於位置 298(於 EU 編號系統之位置 419)的 Gln 經以其他胺基酸取代，以及同時地於位置 325(於 EU 編號系統之位置 446)的 Gly 及於位置 326(於 EU 編號系統之位置 447)的 Lys 經刪除。

取代後之胺基酸型態並無特別限制；然而，較佳為於位置 14 的 Cys 取代為 Ser、於位置 16 的 Arg 取代為 Lys、於位置 102 的 Cys 取代為 Ser、於位置 20 的 Glu 取代為 Gly、於位置 21 的 Ser 取代為 Gly、於位置 147 的 His 取代為 Gln、於位置 234 的 Arg 取代為 Gln 及於位置 298 的 Gln 取代為 Glu。

具體而言，本發明提供包括序列編號：35(M58)之胺基酸序列之抗體固定區。

本發明提供 IgG2 固定區，其包括下述胺基酸序列：於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 14(於 EU 編號系統之位置 131)的 Cys、於位置 16(於 EU 編號系統之位置 133)的 Arg、於位置 102(於 EU 編號系統之位置 219)的 Cys、於位置 20(於 EU 編號系統之位置 137)的 Glu、於位置 21(於

EU 編號系統之位置 138) 的 Ser、於位置 147(於 EU 編號系統之位置 268) 的 His、於位置 234(於 EU 編號系統之位置 355) 的 Arg、於位置 298(於 EU 編號系統之位置 419) 的 Gln 及於位置 313(於 EU 編號系統之位置 434) 的 Asn 經以其他胺基酸取代，以及同時地於位置 325(於 EU 編號系統之位置 446) 的 Gly 及於位置 326(於 EU 編號系統之位置 447) 的 Lys 經刪除。

取代後之胺基酸型態並無特別限制；然而，較佳為於位置 14 的 Cys 取代為 Ser、於位置 16 的 Arg 取代為 Lys、於位置 102 的 Cys 取代為 Ser、於位置 20 的 Glu 取代為 Gly、於位置 21 的 Ser 取代為 Gly、於位置 147 的 His 取代為 Gln、於位置 234 的 Arg 取代為 Gln、於位置 298 的 Gln 取代為 Glu 及於位置 313 的 Asn 取代為 Ala。

具體而言，本發明提供包括序列編號：37(M73) 之胺基酸序列之抗體固定區。

該等抗體固定區經最適化以具有相較於 IgG1 固定區為降低的 Fcγ 受體結合活性、降低的免疫性風險、改良的酸性條件下安定性、降低的異質性、改良的血漿中停留時間及/或製劑中較高的安定性。

<具有經改變之胺基酸的 IgG4 >

本發明提供於酸性條件下為安定的 IgG4 固定區。

更具體而言，本發明提供 IgG4 固定區，其包括於序列編號：3 之胺基酸序列中於位置 289(於 EU 編號系統之位置 409) 的 Arg 經以另一胺基酸取代之胺基酸序列。取代

後之胺基酸型態並無特別限制；然而，較佳取代為 Lys。於酸性條件下之抗體安定性可藉由將序列編號：3 之胺基酸序列中於位置 277(於 EU 編號系統之位置 409)的 Arg 經以另一胺基酸取代而改良。

本發明所提供之具有酸性條件下經改良之安定性的 IgG4 固定區，亦可具有其他胺基酸之取代、刪除、增加及/或插入，只要其至少具有上述胺基酸取代即可。

本發明提供具有降低的 C-終端異質性之 IgG4 固定區。

本發明提供 IgG4 固定區，其中於包括序列編號：3 之胺基酸序列之 IgG4 固定區中於位置 326(EU 編號系統之位置 446)的 Gly 及於位置 327(EU 編號系統之位置 447)的 Lys 經刪除。源自抗體 H 鏈之 C 終端的異質性僅可在該二胺基酸經刪除時降低。

本發明所提供之具有降低的 C-終端異質性之 IgG4 固定區，亦可具有其他胺基酸之取代、刪除、增加及/或插入，只要其至少具有上述胺基酸取代即可。

IgG4 固定區包括胺基酸序列其中於序列編號：3 之胺基酸序列於位置 14 的 Cys、於位置 16 的 Arg、於位置 20 的 Glu、於位置 21 的 Ser、於位置 97 的 Arg、於位置 100 的 Ser、於位置 102 的 Tyr、於位置 103 的 Gly、於位置 104 的 Pro、於位置 105 的 Pro、於位置 113 的 Glu、於位置 114 的 Phe、於位置 115 的 Leu 及於位置 289 的 Arg 經以其他胺基酸取代，且同時地於位置 116 的 Gly 經刪除。

取代後之胺基酸型態並無特別限制；然而，較佳為於位置 14(EU 編號系統之位置 131)的 Cys 取代為 Ser、於位置 16(EU 編號系統之位置 133)的 Arg 取代為 Lys、於位置 20(EU 編號系統之位置 137)的 Glu 取代為 Gly、於位置 21(EU 編號系統之位置 138)的 Ser 取代為 Gly、於位置 97(EU 編號系統之位置 214)的 Arg 取代為 Thr、於位置 100(EU 編號系統之位置 217)的 Ser 取代為 Arg、於位置 102(EU 編號系統之位置 219)的 Tyr 取代為 Ser、於位置 103(EU 編號系統之位置 220)的 Gly 取代為 Cys、於位置 104(EU 編號系統之位置 221)的 Pro 取代為 Val、於位置 105(EU 編號系統之位置 222)的 Pro 取代為 Glu、於位置 113(EU 編號系統之位置 233)的 Glu 取代為 Pro、於位置 114(EU 編號系統之位置 234)的 Phe 取代為 Val、於位置 115(EU 編號系統之位置 255)的 Leu 取代為 Ala 及於位置 289(EU 編號系統之位置 409)的 Arg 取代為 Lys。

該 IgG4 固定區包括，例如，包括序列編號：8(M11)之胺基酸序列之 IgG4 固定區。

於另一較佳具體例中，本發明之 IgG4 固定區包含於上述 IgG4 固定區中進一步包括於位置 325(EU 編號系統之位置 446)的 Gly 及於位置 326(EU 編號系統之位置 447)的 Lys 經刪除之 IgG4 固定區。該等抗體包含，例如，包括序列編號：9(M11 Δ GK)之胺基酸序列之 IgG4 固定區。

<具有經改變之胺基酸的 IgG1 >

本發明提供具有降低的 C-終端異質性的 IgG1 固定

區。

更具體而言，本發明提供具有於包括序列編號：1 之胺基酸序列的 IgG1 固定區中於位置 329(EU 編號系統之位置 446)的 Gly 及於位置 330(EU 編號系統之位置 447)的 Lys 經刪除之 IgG1 固定區。源自抗體 H-鏈 C 終端的異質性僅可在該二胺基酸經刪除時降低。

本發明提供具有良好血漿中停留時間之 IgG1 固定區。

本發明提供 IgG1 固定區，其包括於序列編號：1 之胺基酸序列中於位置 317(EU 編號系統之位置 434)的 Asn 經另一胺基酸取代之胺基酸序列。取代後之胺基酸型態並無特別限制；然而，較佳取代為 Ala。

本發明提供具有於序列編號：36 之胺基酸序列中於位置 329 的 Gly 及於位置 330 的 Lys 經刪除之固定區。更具體而言，本發明提供包括序列編號：43(M83)之胺基酸序列的抗體固定區。

本發明所提供之具有降低的 C-終端異質性的 IgG1 固定區，亦可具有其他胺基酸之取代、刪除、增加及/或插入，只要其至少具有上述胺基酸取代即可。

本發明亦提供包括上述任一抗體固定區的抗體。本發明之抗體的型態與起源並無特別限制，只要其包括上述抗體固定區即可，且可為任何抗體。

本發明之抗體亦包含抗體(該抗體包括上述之任何胺基酸取代)之經修改產物。抗體的起源並無特別限制。抗體包含人類、小鼠、大鼠及兔子的抗體。本發明之抗體可

為嵌合性抗體、人源化抗體、完全地人源化抗體等。於較佳具體例中，本發明之抗體可為人源化抗體。

或者，上述抗體固定區及/或包括上述抗體固定區之抗體分子，可經連接為Fc融合分子至類抗體結合分子(支架分子(scaffold molecules)、生物活性肽、結合肽等之形式。

本發明之抗體亦包含抗體(該抗體包括上述任一固定區)之修改產物。

該等抗體修改產物包含，例如，與例如聚乙二醇(PEG)及細胞毒物物質之多種分子連接的抗體。該等抗體修改產物可藉由化學性修改本發明抗體而獲得。用於修改抗體之方法已知於此項技術領域。

本發明之抗體亦可為雙特異抗體(bispecific antibody)。「雙特異抗體」意指具有辨識不同抗原定基之單一分子可變區的抗體。該等抗原決定基可存在於單一分子或不同分子。

上述抗體固定區可使用於對抗所欲抗原之抗體中作為固定區。該抗原並無特別限制。

本發明之抗體亦可藉由，例如下述方法獲得。於獲得本發明之抗體之一具體例中，於固定區中之一個或多個胺基酸殘基首先經刪除或以感興趣之胺基酸取代。以感興趣之胺基酸取代一個或多個胺基酸殘基的方法包含，例如，
定 點 突 變 (site-directed mutagenesis)(Hashimoto-Gotoh, T., Mizuno, T.,

Ogasahara, Y., and Nakagawa, M. An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis. *Gene* (1995) 152, 271-275; Zoller, M. J., and Smith, M. Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors. *Methods Enzymol.* (1983) 100, 468-500; Kramer, W., Drutsa, V., Jansen, H. W., Kramer, B., Pflugfelder, M., and Fritz, H. J. The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction. *Nucleic Acids Res.* (1984) 12, 9441-9456; Kramer W., and Fritz H. J. Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA *Methods. Enzymol.* (1987) 154, 350-367; Kunkel, T. A. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985) 82, 488-492)。該等方法可使用以感興趣之胺基酸於抗體之固定區中取代目標胺基酸。

獲得抗體之另一具體例中，結合至感興趣之抗原的抗體首先以此項技術領域中具有通常知識者習知之技術製備。當所製備之抗體係衍生自非人類動物時，其可經人源化。抗體之結合活性可藉由習知方法測定。其次，抗體固定區中一個或多個胺基酸殘基可經刪除或以感興趣之胺基酸取代。

更具體而言，本發明關於用於製造抗體的方法，其包括下述步驟：

- (a) 表現編碼於固定區之一個或多個胺基酸殘基經刪除或以感興趣之胺基酸取代之 H 鏈的 DNA，及表現編碼 L 鏈的 DNA；以及
- (b) 收集步驟(a)之表現產物。

本發明製造方法之第一步驟為表現編碼於固定區之一個或多個胺基酸殘基經刪除或以感興趣之胺基酸取代之 H 鏈的 DNA，及表現編碼 L 鏈的 DNA。編碼於固定區之一個或多個胺基酸殘基經刪除或以感興趣之胺基酸取代之 H 鏈的 DNA 可藉由下述方法製備，例如，獲得編碼野生型 H 鏈固定區的 DNA，且導入合適取代以使固定區中編碼特定胺基酸之密碼(code)編碼感興趣之胺基酸。

或者，編碼於固定區之一個或多個胺基酸殘基經刪除或以感興趣之胺基酸取代之 H 鏈的 DNA，亦可藉由設計然後化學性合成編碼於野生型 H 鏈之固定區之一個或多個胺基酸殘基經刪除或以感興趣之胺基酸取代之蛋白質的 DNA 而製備。

胺基酸取代之型態包含本文所述及之取代，但不限於該等。

或者，編碼於固定區之一個或多個胺基酸殘基經刪除或以感興趣之胺基酸取代之 H 鏈的 DNA 亦可製備為部分 DNA 之組合。該等部分 DNA 之組合包含，例如，編碼可變區的 DNA 與編碼固定區的 DNA 之組合，以及編碼 Fab 區的

DNA 與編碼 Fc 區的 DNA 之組合，但不限定於該等。編碼 L 鏈的 DNA 亦可製備為部分 DNA 之組合。

用於表現上述 DNA 之方法包含下文所述者。例如，藉由插入編碼 H 鏈可變區的 DNA 至具有編碼 H 鏈固定區的 DNA 之表現載體而構築的 H 鏈表現載體。同樣地，藉由插入編碼 L 鏈可變區的 DNA 至具有編碼 L 鏈固定區的 DNA 之表現載體而構築的 L 鏈表現載體。或者，該等 H 鏈基因及 L 鏈基因可插入至單一載體。表現載體包含，例如，SV40 為基礎的載體，EB 病毒為基礎的載體以及 BPV(乳突病毒)為基礎的載體，但不限於該等。

宿主細胞以藉由上述方法所構築的抗體表現載體共轉形(co-transform)。該等宿主細胞包含上述細胞如 CHO(中國倉鼠卵巢)細胞以及如大腸桿菌(*E. coli*)、酵母菌及枯草桿菌之微生物，以及植物與動物(Nature Biotechnology (2007) 25, 563-565; Nature Biotechnology (1998) 16, 773-777; Biochemical and Biophysical Research Communications (1999) 255, 444-450; Nature Biotechnology (2005) 23, 1159-1169; Journal of Virology (2001) 75, 2803-2809; Biochemical and Biophysical Research Communications (2003) 308, 94-100)。該轉型較佳可使用電穿孔(electroporation)、陽離子脂質體(lipofectin)方法(R. W. Malone et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86, 6077; P. L. Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci.

USA (1987) 84, 7413)、磷酸鈣方法(F. L. Graham & A. J. van der Eb, Virology (1973) 52, 456-467)、DEAE-Dextran 方法等而達成。

抗體製造之下一步驟中，收集步驟(a)之表現產物。表現產物例如可藉由培養轉形株，然後將產物由轉形細胞或培養基分離而收集。抗體之分離與純化可藉由如離心、硫酸銨劃分、鹽析、超過濾、Iq、FcRn、Protein A 與 Protein G 之管柱、親和層析、離子交換層析與凝膠滲透層析之方法的合適組合而達成。

<用於改良 IgG2 固定區於酸性條件之安定性的方法>

本發明亦關於改良於酸性條件之抗體安定性的方法，其包括於序列編號：2(IgG2)之胺基酸序列中於位置 276(EU 編號系統之位置 397)的 Met 經另一胺基酸取代的步驟。本發明用於改良於酸性條件之抗體安定性的方法可包括其他胺基酸取代步驟，只要其包括於序列編號：2(IgG2)之胺基酸序列中於位置 276(EU 編號系統之位置 397)的 Met 經另一胺基酸取代即可。取代後胺基酸之型態雖無特別限制；然而，較佳取代為 Val。用於胺基酸取代之方法並無特別限制。取代例如可藉由上述之定點突變或實施例中所述方法而達成。

<用於降低衍生自 IgG2 固定區之鉸鏈區的異質性的方法>

本發明亦關於用於降低抗體異質性的方法，其包括於序列編號：2(IgG2)之胺基酸序列中取代於位置 14(EU 編號系統之位置 131)的 Cys、於位置 16(EU 編號系統之位置

133)的 Arg 及/或於位置 102(EU 編號系統之位置 219)的 Cys 的步驟。取代後之胺基酸型態並無特別限制；然而較佳為於位置 14 的 Cys 取代為 Ser，於位置 16 的 Arg 取代為 Lys，於位置 102 的 Cys 取代為 Ser。本發明之用於降低抗體異質性的方法可包括其他胺基酸取代步驟，只要其包括於序列編號：2(IgG2)之胺基酸序列中取代於位置 14(EU 編號系統之位置 131)的 Cys、於位置 16(EU 編號系統之位置 133)的 Arg 及/或於位置 102(EU 編號系統之位置 219)的 Cys 的步驟。取代方法並無特別限制。取代例如可藉由上述之定點突變或實施例中所述方法而達成。於胺基酸取代中，所有上述三個胺基酸可經取代或該等之一者或二者(例如位置 14 與 102)可經取代。

<用於降低源自 IgG2 固定區中 C-終端胺基酸刪除之異質性的方法>

本發明亦關於用於降低抗體異質性的方法，其包括於包括序列編號：2 之胺基酸序列的 IgG2 固定區中刪除於位置 325(EU 編號系統之位置 446)的 Gly 及於位置 326(EU 編號系統之位置 447)的 Lys 的步驟。本發明之用於降低抗體異質性的方法可包括胺基酸取代的其他步驟，只要其包括於包括序列編號：2 之胺基酸序列的 IgG2 固定區中刪除於位置 325(EU 編號系統之位置 446)的 Gly 及於位置 326(EU 編號系統之位置 447)的 Lys 的步驟即可。胺基酸取代的方法並無特別限制。取代例如可藉由上述之定點突變或實施例中所述方法而達成。

<藉由取代 IgG2 固定區之胺基酸以改良血漿中停留時間的方法>

本發明亦關於用於改良抗體之血漿中停留時間的方法，其包括於包括序列編號：2 之胺基酸序列的 IgG2 固定區中取代於位置 147(EU268)的 His、於位置 234(EU355)的 Arg 及/或於位置 298(EU419)的 Gln 的步驟。本發明之用於改良抗體之血漿中停留時間的方法可包括胺基酸取代的其他步驟，只要其包括上述步驟即可。取代後胺基酸之型態並無特別限制；然而，較佳為於位置 147(EU268)的 His 取代為 Gln，於位置 234(EU355)的 Arg 取代為 Gln 及於位置 298(EU419)的 Gln 取代為 Glu。

本發明亦關於用於改良抗體之血漿中停留時間的方法，其包括於包括序列編號：2 或 35(M58)之胺基酸序列的 IgG2 固定區中取代於位置 313(EU434)的 Asn 的步驟。取代後胺基酸之型態並無特別限制；然而，較佳取代為 Ala。本發明用於改良抗體之血漿中停留時間的方法可包括其他胺基酸取代步驟，只要其包括上述步驟即可。

<藉由取代 IgG1 固定區之胺基酸以改良血漿中停留時間的方法>

本發明亦關於用於改良抗體之血漿中停留時間的方法，其包括於包括序列編號：1 之胺基酸序列的 IgG1 固定區中取代於位置 317(EU434)的 Asn 的步驟。取代後胺基酸之型態並無特別限制；然而，較佳取代為 Ala。本發明用於改良抗體之血漿中停留時間的方法可包括其他胺基酸

取代步驟，只要其包括上述步驟即可。

本發明亦關於用於改良抗體之血漿中停留時間且降低衍生自刪除 C-端胺基酸之異質性的方法，其包括於包括序列編號：1 之胺基酸序列的 IgG1 固定區中取代於位置 317(EU434)的 Asn 及刪除於位置 329(EU446)的 Gly 的步驟。取代後胺基酸之型態並無特別限制；然而，較佳取代為 Ala。本發明用於改良抗體之血漿中停留時間的方法可包括其他胺基酸取代步驟，只要其包括上述步驟即可。

<用於降低 FcγR 結合而維持 IgG2 固定區中人類序列的之方法>

本發明亦關於用於降低抗體之 FcγR 結合的方法，其包括於包括序列編號：2 之胺基酸序列的 IgG2 固定區中於位置 209 (EU330)的 Ala 取代為 Ser，於位置 210(EU331)的 Pro 取代為 Ser 及於位置 218(EU339)的 Thr 取代為 Ala 的步驟。本發明之用於降低抗體之 FcγR 結合的方法可包括其他胺基酸取代步驟，只要其包括於包括序列編號：2 之胺基酸序列的 IgG2 固定區中於位置 209 (EU330)的 Ala 取代為 Ser，於位置 210(EU331)的 Pro 取代為 Ser 及於位置 218(EU339)的 Thr 取代為 Ala 的步驟即可。取代例如可藉由上述之定點突變或實施例中所述方法而達成。

本發明亦關於用於降低源自 IgG2 鉸鏈區之異質性的方法，用於改良於酸性條件之抗體安定性的方法，用於降低源自 C-終端之抗體異質性的方法，及/或用於降低抗體之 FcγR 結合的方法，所有該等包括於包括序列編號：

2(M14ΔGK)之胺基酸序列之 IgG2 固定區中之下述步驟：

- (a) 於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 209(EU 編號系統之位置 330)的 Ala 經以另一胺基酸取代；
- (b) 於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 210(EU 編號系統之位置 331)的 Pro 經以另一胺基酸取代；
- (c) 於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 218(EU 編號系統之位置 339)的 Thr 經以另一胺基酸取代；
- (d) 於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 276(EU 編號系統之位置 397)的 Met 經以另一胺基酸取代；
- (e) 於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 14(EU 編號系統之位置 131)的 Cys 經以另一胺基酸取代；
- (f) 於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 16(EU 編號系統之位置 133)的 Arg 經以另一胺基酸取代；
- (g) 於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 102(EU 編號系統之位置 219)的 Cys 經以另一胺基酸取代；
- (h) 於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 20(EU 編號系統之位置 137)的 Glu 經以另一胺基酸取代；
- (i) 於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 21(EU 編號系統之位置 138)的 Ser 經以另一胺基酸取代；
- (j) 刪除於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 325 的 Gly 及於位置 326 的 Lys(分別為 EU 編號系統之位置 446 及 447)。

取代後胺基酸之型態並無特別限制；然而，較佳為於位置 209(於 EU 編號系統之位置 330)的 Ala 取代為 Ser、

於位置 210(於 EU 編號系統之位置 331)的 Pro 取代為 Ser、於位置 218(於 EU 編號系統之位置 339)的 Thr 取代為 Ala、於位置 276(於 EU 編號系統之位置 397)的 Met 取代為 Val、於位置 14(於 EU 編號系統之位置 131)的 Cys 取代為 Ser、於位置 16(於 EU 編號系統之位置 133)的 Arg 取代為 Lys、於位置 102(於 EU 編號系統之位置 219)的 Cys 取代為 Ser、於位置 20(於 EU 編號系統之位置 137)的 Glu 取代為 Gly 及於位置 21(於 EU 編號系統之位置 138)的 Ser 取代為 Gly。

本發明亦關於用於降低源自 IgG2 鉸鏈區之異質性的方法，用於降低源自 C-終端之抗體異質性的方法，及/或用於降低抗體之 FcγR 結合的方法，所有該等包括於包括序列編號：2(M86ΔGK)之胺基酸序列之 IgG2 固定區中之下述步驟：

- (a) 於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 209(EU 編號系統之位置 330)的 Ala 經以另一胺基酸取代；
- (b) 於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 210(EU 編號系統之位置 331)的 Pro 經以另一胺基酸取代；
- (c) 於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 218(EU 編號系統之位置 339)的 Thr 經以另一胺基酸取代；
- (d) 於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 14(EU 編號系統之位置 131)的 Cys 經以另一胺基酸取代；
- (e) 於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 16(EU 編號系統之位置 133)的 Arg 經以另一胺基酸取代；

(f) 於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 102(EU 編號系統之位置 219)的 Cys 經以另一胺基酸取代；

(g) 於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 20(EU 編號系統之位置 137)的 Glu 經以另一胺基酸取代；

(h) 於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 21(EU 編號系統之位置 138)的 Ser 經以另一胺基酸取代；

(i) 刪除於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 325 的 Gly 及於位置 326 的 Lys(分別為 EU 編號系統之位置 446 及 447)。

取代後胺基酸之型態並無特別限制；然而，較佳為於位置 209(於 EU 編號系統之位置 330)的 Ala 取代為 Ser、於位置 210(於 EU 編號系統之位置 331)的 Pro 取代為 Ser、於位置 218(於 EU 編號系統之位置 339)的 Thr 取代為 Ala、於位置 14(於 EU 編號系統之位置 131)的 Cys 取代為 Ser、於位置 16(於 EU 編號系統之位置 133)的 Arg 取代為 Lys、於位置 102(於 EU 編號系統之位置 219)的 Cys 取代為 Ser、於位置 20(於 EU 編號系統之位置 137)的 Glu 取代為 Gly 及於位置 21(於 EU 編號系統之位置 138)的 Ser 取代為 Gly。

本發明之方法可包括如胺基酸取代及刪除之其他步驟，只要其包括上述步驟即可。用於胺基酸取代及刪除的方法並無特別限制。取代及刪除例如可藉由上述之定點突變或實施例中所述方法而達成。

本發明亦關於用於降低源自 IgG2 鉸鏈區之異質性的

方法，用於改良於酸性條件之抗體安定性的方法，及/或用於降低源自 C-終端之抗體異質性的方法，所有該等包括於包括序列編號：2 (M31 Δ GK) 之胺基酸序列之 IgG2 固定區中之下述步驟：

- (a) 於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 276 (EU 編號系統之位置 397) 的 Met 經以另一胺基酸取代；
- (b) 於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 14 (EU 編號系統之位置 131) 的 Cys 經以另一胺基酸取代；
- (c) 於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 16 (EU 編號系統之位置 133) 的 Arg 經以另一胺基酸取代；
- (d) 於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 102 (EU 編號系統之位置 219) 的 Cys 經以另一胺基酸取代；
- (e) 於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 20 (EU 編號系統之位置 137) 的 Glu 經以另一胺基酸取代；
- (f) 於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 21 (EU 編號系統之位置 138) 的 Ser 經以另一胺基酸取代；
- (g) 刪除於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 325 的 Gly 及於位置 326 的 Lys (分別為 EU 編號系統之位置 446 及 447)。

取代後胺基酸之型態並無特別限制；然而，較佳為於位置 276 (於 EU 編號系統之位置 397) 的 Met 取代為 Val、於位置 14 (於 EU 編號系統之位置 131) 的 Cys 取代為 Ser、於位置 16 (於 EU 編號系統之位置 133) 的 Arg 取代為 Lys、於位置 102 (於 EU 編號系統之位置 219) 的 Cys 取代為

Ser、於位置 20(於 EU 編號系統之位置 137)的 Glu 取代為 Gly 及於位置 21(於 EU 編號系統之位置 138)的 Ser 取代為 Gly。

本發明亦關於用於降低源自 IgG2 鉸鏈區之異質性的方法及/或用於降低源自 C-終端之抗體異質性的方法，所有該等包括於包括序列編號：2 (M40ΔGK)之胺基酸序列之 IgG2 固定區中之下述步驟：

- (a) 於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 14(EU 編號系統之位置 131)的 Cys 經以另一胺基酸取代；
- (b) 於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 16(EU 編號系統之位置 133)的 Arg 經以另一胺基酸取代；
- (c) 於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 102(EU 編號系統之位置 219)的 Cys 經以另一胺基酸取代；
- (d) 於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 20(EU 編號系統之位置 137)的 Glu 經以另一胺基酸取代；
- (e) 於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 21(EU 編號系統之位置 138)的 Ser 經以另一胺基酸取代；
- (f) 刪除於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 325 的 Gly 及於位置 326 的 Lys(分別為 EU 編號系統之位置 446 及 447)。

取代後胺基酸之型態並無特別限制；然而，較佳為於位置 14(於 EU 編號系統之位置 131)的 Cys 取代為 Ser、於位置 16(於 EU 編號系統之位置 133)的 Arg 取代為 Lys、於位置 102(於 EU 編號系統之位置 219)的 Cys 取代為 Ser、

於位置 20(於 EU 編號系統之位置 137)的 Glu 取代為 Gly
及於位置 21(於 EU 編號系統之位置 138)的 Ser 取代為
Gly。

本發明亦關於用於改良於酸性條件之抗體安定性的
方法，用於改良抗體之血漿中停留時間的方法及/或用於
降低源自 C-終端之抗體異質性的方法，所有該等包括於包
括序列編號：2(M58)之胺基酸序列之 IgG2 固定區中之下
述步驟：

(a) 於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 14(EU 編號系
統之位置 131)的 Cys 取代為 Ser；

(b) 於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 16(EU 編號系
統之位置 133)的 Arg 取代為 Lys；

(c) 於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 102(EU 編號
系統之位置 219)的 Cys 取代為 Ser；

(d) 於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 20(EU 編號系
統之位置 137)的 Glu 取代為 Gly；

(e) 於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 21(EU 編號系
統之位置 138)的 Ser 取代為 Gly；

(f) 於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 147(EU 編號
系統之位置 268)的 His 取代為 Gln；

(g) 於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 234(EU 編號
系統之位置 355)的 Arg 取代為 Gln；

(h) 於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 298(EU 編號
系統之位置 419)的 Gln 取代為 Glu；

(i) 刪除於序列編號：2之胺基酸序列中於位置 325 的 Gly 及於位置 326 的 Lys(分別為 EU 編號系統之位置 446 及 447)。

本發明亦關於用於降低源自 IgG2 鉸鏈區之異質性的方法，用於改良抗體之血漿中停留時間的方法及/或用於降低源自 C-終端之抗體異質性的方法，所有該等包括於包括序列編號：2(M73)之胺基酸序列之 IgG2 固定區中之下述步驟：

(a) 於序列編號：2之胺基酸序列中於位置 14(EU 編號系統之位置 131)的 Cys 取代為 Ser；

(b) 於序列編號：2之胺基酸序列中於位置 16(EU 編號系統之位置 133)的 Arg 取代為 Lys；

(c) 於序列編號：2之胺基酸序列中於位置 102(EU 編號系統之位置 219)的 Cys 取代為 Ser；

(d) 於序列編號：2之胺基酸序列中於位置 20(EU 編號系統之位置 137)的 Glu 取代為 Gly；

(e) 於序列編號：2之胺基酸序列中於位置 21(EU 編號系統之位置 138)的 Ser 取代為 Gly；

(f) 於序列編號：2之胺基酸序列中於位置 147(EU 編號系統之位置 268)的 His 取代為 Gln；

(g) 於序列編號：2之胺基酸序列中於位置 234(EU 編號系統之位置 355)的 Arg 取代為 Gln；

(h) 於序列編號：2之胺基酸序列中於位置 298(EU 編號系統之位置 419)的 Gln 取代為 Glu；

(i) 於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 313(EU 編號系統之位置 434)的 Asn 取代為 Ala；

(j) 刪除於序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 325 的 Gly 及於位置 326 的 Lys(分別為 EU 編號系統之位置 446 及 447)。

本發明之方法可包括如胺基酸取代及刪除之其他步驟，只要其包括上述步驟即可。用於胺基酸取代及刪除的方法並無特別限制。取代及刪除例如可藉由上述之定點突變或實施例中所述方法而達成。

<用於改良於酸性條件下 IgG4 固定區安定性的方法>

本發明亦關於用於改良於酸性條件下抗體安定性的方法，其包括於包括序列編號：3((Mol. Immunol. 1993 Jan;30(1):105-8))之胺基酸序列之 IgG4 固定區中於位置 289(EU 編號系統之位置 409)的 Arg 經以另一胺基酸取代的步驟。本發明之用於改良於酸性條件下抗體安定性的方法可包括其他胺基酸取代步驟，只要其包括於包括序列編號：3(人類 IgG4 固定區)之胺基酸序列中於位置 289(EU 編號系統之位置 409)的 Arg 經以另一胺基酸取代的步驟即可。取代後胺基酸之型態並無特別限制；然而，較佳取代為 Lys。取代例如可藉由上述之定點突變或實施例中所述方法而達成。

<用於降低源自 IgG4 固定區中 C-端胺基酸刪除之異質性的方法>

本發明亦關於用於降低抗體異質性的方法，其包括於

包括序列編號：3((Mol. Immunol. 1993 Jan;30(1):105-8))之胺基酸序列之 IgG4 固定區中刪除於位置 326(EU 編號系統之位置 446)的 Gly 及於位置 327(EU 編號系統之位置 447)的 Lys 的步驟。本發明之用於降低抗體異質性的方法可包括其他胺基酸取代步驟，只要其包括於包括序列編號：3((Mol. Immunol. 1993 Jan;30(1):105-8))之胺基酸序列之 IgG4 固定區中刪除於位置 327(EU 編號系統之位置 447)的 Lys 及/或於位置 326(EU 編號系統之位置 446)的 Gly 及的步驟即可。取代後胺基酸之型態並無特別限制。取代例如可藉由上述之定點突變或實施例中所述方法而達成。

本發明亦關於用於改良於酸性條件之抗體安定性的方法，用於降低源自 C-終端之抗體異質性的方法，及/或用於降低抗體之 FcγR 結合的方法，所有該等包括於包括序列編號：3(M11ΔGK)之胺基酸序列之 IgG4 固定區中之下述步驟：

- (a) 於序列編號：3 之胺基酸序列中於位置 14(EU 編號系統之位置 131)的 Cys 經以另一胺基酸取代；
- (b) 於序列編號：3 之胺基酸序列中於位置 16(EU 編號系統之位置 133)的 Arg 經以另一胺基酸取代；
- (c) 於序列編號：3 之胺基酸序列中於位置 20(EU 編號系統之位置 137)的 Glu 經以另一胺基酸取代；
- (d) 於序列編號：3 之胺基酸序列中於位置 21(EU 編號系統之位置 138)的 Ser 經以另一胺基酸取代；

- (e) 於序列編號：3 之胺基酸序列中於位置 97(EU 編號系統之位置 214)的 Arg 經以另一胺基酸取代；
- (f) 於序列編號：3 之胺基酸序列中於位置 100(EU 編號系統之位置 217)的 Ser 經以另一胺基酸取代；
- (g) 於序列編號：3 之胺基酸序列中於位置 102(EU 編號系統之位置 219)的 Tyr 經以另一胺基酸取代；
- (h) 於序列編號：3 之胺基酸序列中於位置 103(EU 編號系統之位置 220)的 Gly 經以另一胺基酸取代；
- (i) 於序列編號：3 之胺基酸序列中於位置 104(EU 編號系統之位置 221)的 Pro 經以另一胺基酸取代；
- (j) 於序列編號：3 之胺基酸序列中於位置 105(EU 編號系統之位置 222)的 Pro 經以另一胺基酸取代；
- (k) 於序列編號：3 之胺基酸序列中於位置 113(EU 編號系統之位置 233)的 Glu 經以另一胺基酸取代；
- (l) 於序列編號：3 之胺基酸序列中於位置 114(EU 編號系統之位置 234)的 Phe 經以另一胺基酸取代；
- (m) 於序列編號：3 之胺基酸序列中於位置 115(EU 編號系統之位置 235)的 Leu 經以另一胺基酸取代；
- (n) 刪除於序列編號：3 之胺基酸序列中於位置 116(EU 編號系統之位置 236)的 Gly；
- (o) 於序列編號：3 之胺基酸序列中於位置 289(EU 編號系統之位置 409)的 Arg 經以另一胺基酸取代；
- (p)刪除於序列編號：3 之胺基酸序列中於位置 236 的 Gly 及於位置 237 的 Lys(分別為 EU 編號系統之位置 446 及

447)。

取代後胺基酸之型態並無特別限制；然而，較佳為於位置 14(EU 編號系統之位置 131)的 Cys 取代為 Ser、於位置 16(EU 編號系統之位置 133)的 Arg 取代為 Lys、於位置 20(EU 編號系統之位置 137)的 Glu 取代為 Gly、於位置 21(EU 編號系統之位置 138)的 Ser 取代為 Gly、於位置 97(EU 編號系統之位置 214)的 Arg 取代為 Thr、於位置 100(EU 編號系統之位置 217)的 Ser 取代為 Arg、於位置 102(EU 編號系統之位置 219)的 Tyr 取代為 Ser、於位置 103(EU 編號系統之位置 220)的 Gly 取代為 Cys、於位置 104(EU 編號系統之位置 221)的 Pro 取代為 Val、於位置 105(EU 編號系統之位置 222)的 Pro 取代為 Glu、於位置 113(EU 編號系統之位置 233)的 Glu 取代為 Pro、於位置 114(EU 編號系統之位置 234)的 Phe 取代為 Val、於位置 115(EU 編號系統之位置 255)的 Leu 取代為 Ala 及於位置 289(EU 編號系統之位置 409)的 Arg 取代為 Lys。

本發明之方法可包括如胺基酸取代及刪除之其他步驟，只要其包括上述步驟即可。用於胺基酸取代及刪除的方法並無特別限制。取代及刪除例如可藉由上述之定點突變或實施例中所述方法而達成。

<用於降低源自 IgG1 固定區之 C-終端胺基酸刪除之異質性的方法>

本發明亦關於用於降低抗體異質性的方法，其包括於包括序列編號：1 之胺基酸序列之 IgG1 固定區中刪除於位

置 329(EU 編號系統之位置 446)的 Gly 及於位置 330(EU 編號系統之位置 447)的 Lys 的步驟。本發明之用於降低抗體異質性的方法可包括其他胺基酸取代步驟，只要其包括於包括序列編號：1 之胺基酸序列之 IgG1 固定區中刪除於位置 330(EU 編號系統之位置 447)的 Lys 及於位置 329(EU 編號系統之位置 446)的 Gly 及的步驟即可。取代後胺基酸之型態並無特別限制。取代例如可藉由上述之定點突變或實施例中所述方法而達成。

上述抗體固定區並無特別限制，且可使用於任何抗體。使用本發明固定區之抗體之例包含：

- (a) 包括序列編號：48 之胺基酸序列之重鏈(VH4-M73)；
- (b) 包括序列編號：46 之胺基酸序列之重鏈(VH3-M73)；
- (c) 包括序列編號：44 之胺基酸序列之重鏈(VH5-M83)；
- (d) 包括序列編號：49 之胺基酸序列之輕鏈(VL1-κ)；
- (e) 包括序列編號：47 之胺基酸序列之輕鏈(VL3-κ)；
- (f) 包括序列編號：45 之胺基酸序列之輕鏈(VL5-κ)；
- (g) 包括(a)之重鏈及(d)之輕鏈的抗體(FV3-M73)；
- (h) 包括(b)之重鏈及(e)之輕鏈的抗體(FV4-M73)；以及
- (i) 包括(c)之重鏈及(f)之輕鏈的抗體(FV5-M83)。

<包括抗體之醫藥組合物>

本發明提供包括本發明抗體之醫藥組合物。

除了該抗體之外，本發明之醫藥組合物可藉由習知方法與醫藥可接受載劑一起配方。例如，當抗體使用水或任何醫藥可接受液體配方為注射用無菌溶液或懸浮物時，該

組合物可非經腸使用。例如，組合物可藉由合適地組合抗體與醫藥可接受載劑或介質而配方，具體地為無菌水或生理鹽水、植物油、乳化劑、懸浮劑、界面活性劑、安定劑、香味劑、賦形劑、媒劑、防腐劑、結合劑等，以一般可接受之醫藥實施所需要之單位劑量及形式將其混合。於該配方物中之活性成分含量可經調整以獲得於所需範圍內之合適劑量。

注射用無菌組合物可根據標準協定，使用媒劑如無菌注射水而配方。

使用於注射之水溶液包含，例如生理鹽水與含有葡萄糖或如 D-山梨糖醇、D-甘露糖、D-甘露糖醇及氯化鈉之其他輔劑的等張溶液。該等可與合適的助溶劑結合，如具體地為乙醇之醇、如丙二醇與聚乙二醇之多元醇類、以及如 Polysorbate 80™ 及 HCO-50 之非離子性界面活性劑。

油包括芝麻油與大豆油，且可與如苯甲酸苄酯或苄醇之助溶劑組合。其等亦可與下述者配方：緩衝液，如磷酸鹽緩衝液或乙酸鈉緩衝液；鎮痛劑，如普卡因鹽酸鹽；安定化劑，如苄醇或酚；或抗氧化劑。所製備之注射物典型地分裝取樣至合適的安瓿。

投藥較佳地為非經腸地，且具體地包括注射、鼻內投藥、肺內投藥及經皮投藥。例如，注射可藉由靜脈內注射、肌肉內注射、腹腔內注射或皮下注射而全身性或局部性投藥。

再者，投藥方法可根據患者的年齡及症狀而合適地選

擇。含有抗體或編碼抗體之多核苷酸的醫藥組合物之單一劑量，可例如由每公斤體重之 0.0001 至 1,000mg 的範圍選擇。或者，劑量可為每人 0.001 至 100,000mg 的範圍。然而，劑量並不限於該等值。投藥之劑量與方法根據患者的體重及症狀而變化，且可由此項技術領域中具有通常知識者合適地選擇。

如使用於本文，三-字母與一-字母密碼所代表之胺基酸係如下述：

丙胺酸： Ala (A)

精胺酸： Arg (R)

天門冬醯胺： Asn (N)

天門冬胺酸： Asp (D)

半胱胺酸： Cys (C)

麩胺醯胺： Gln (Q)

麩胺酸： Glu (E)

甘胺酸： Gly (G)

組胺酸： His (H)

異白胺酸： Ile (I)

白胺酸： Leu (L)

離胺酸： Lys (K)

甲硫胺酸： Met (M)

苯丙胺酸： Phe (F)

脯胺酸： Pro (P)

絲胺酸： Ser (S)

經丁胺酸： Thr (T)

色胺酸： Trp (W)

酪胺酸： Tyr (Y)

纈胺酸： Val (V)

本發明提供合適於醫藥品之抗體固定區，其物理性質（安定性與同質性）、免疫性、安全性與血漿中停留時間皆由胺基酸改變而經改良。

本文所述及之所有先前技術文獻皆併入本文作為參考文獻。

實施例

後文中，參照實施例進一步地說明本發明，但其不意味限制於該等。

實施例 1：於酸性條件下 IgG2 及 IgG4 安定性的改良

IgG2-或 IgG4-轉化人源化 IL-6 受體抗體之表現載體的構築與該抗體的表現

為了降低 Fcγ受體-結合活性，人源化抗人類 IL-6 受體抗體之固定區，人源化 PM-1 抗體(Cancer Res. 1993 Feb 15;53(4):851-6)，其為 IgG1 同型物(isotype)，係經 IgG2 或 IgG4(Mol. Immunol. 1993 Jan;30(1):105-8)取代以產生分子 WT-IgG2(序列編號：13)及 WT-IgG4(序列編號：14)。使用動物細胞表現載體表現 IgG。構築表現載體，其中使用於參考例 1 之人源化 PM-1 抗體(IgG1)之固定區係經 *NheI/NotI* 分解後，藉由接合(ligation)以 IgG2 或 IgG4 固定區取代。各 DNA 片段之核苷酸序列使用 BigDye

Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) 根據所附之指導手冊，以 DNA 定序儀 (ABI PRISM 3730xL DNA Sequencer or ABI PRISM 3700 DNA Sequencer (Applied Biosystems)) 測定。藉由下述方法使用 WT L 鏈 (序列編號：15) 表現 WT-IgG1、WT-IgG2 與 WT-IgG4。人類胚胎腎癌-衍生之 HEK293H 細胞 (Invitrogen) 懸浮於補充有 10% 胎牛血清 (Invitrogen) 之 DMEM (Invitrogen)。對於貼附性細胞，細胞 (10-ml/plate ; 細胞密度：5 至 6×10^5 cells/ml) 平鋪於碟中 (10 cm 直徑; CORNING) 且培養於 CO_2 培養箱中 (37°C , 5% CO_2) 培養一整日夜。然後，藉由吸引移除培養基，且添加 6.9 之 CHO-S-SFM-II 培養基 (Invitrogen)。所製備之質體 DNA 混合物 (總和 $13.8 \mu\text{g}$) 與 $20.7 \mu\text{l}$ 之 $1 \mu\text{g/ml}$ 聚伸乙亞胺 (Polysciences Inc.) 及 $690 \mu\text{l}$ 之 CHO-S-SFMII 培養基組合。使所得混合物於室溫靜置 10 分鐘，且之後將細胞添加至各碟。細胞於 CO_2 培養箱中 (37°C 於 5% CO_2) 培養 4 至 5 小時。然後，6.9 ml 之 CHO-S-SFM-II 培養基 (Invitrogen) 添加至碟，且細胞於 CO_2 培養箱中培養 3 日。收集培養上清液且離心 (約 2000 g , 5 分鐘, 室溫) 以移除細胞，且通過 $0.22 \mu\text{m}$ 過濾器 MILLEX^(R)-GV (Millipore) 無菌化。樣品儲存於 4°C 直至使用。

(1) 人源化 PM-1 抗體 (PM-1 VH + IgG1) H 鏈，序列編號：12 (胺基酸序列)

(2) 人源化 PM-1 VH + IgG2 H 鏈，序列編號：13 (胺

基 酸 序 列)

(3) 人源化 PM-1 VH + IgG4 H 鏈，序列編號：14 (氨基酸序列)

使用鹽酸純化經 Protein A 溶洗之 WT-IgG1、WT-IgG2 與 WT-IgG4

50 μ l 之懸浮於 TBS 的 rProtein A Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences) 添加至所得培養上清液，且合併之溶液藉由於 4°C 回轉 4 小時或更久而混合。將溶液移轉至 Ultrafree^(R)-MC (Millipore) 的 0.22- μ m 過濾杯。以 500 μ l 之 TBS 清洗 3 次後，rProtein A Sepharose™ 樹脂懸浮於 100 μ l 之 10 mM HCl/150 mM NaCl (pH 2.0) 且使混合物靜置兩分鐘以溶洗抗體(鹽酸溶洗液)。立即地，藉由添加 6.7 μ l 之 1.5 M Tris-HCl (pH 7.8) 中和溶洗液。溶洗進行兩次，製得 200 μ l 之經純化抗體。

藉由鹽酸溶洗純化之 WT-IgG1、WT-IgG2 與 WT-IgG4 之凝膠過濾層析法分析

藉由鹽酸溶洗所獲得之經純化樣品的凝集物中的含量，係藉由凝膠過濾層析法分析。

凝集估算方法：

系統： Waters Alliance

管柱： G3000SWx1 (TOSOH)

移動相： 50 mM 磷酸鈉，300 mM KCl，pH 7.0

流速，波長： 0.5 ml/min，220 nm

結果示於第 1 圖。雖然純化後 WT-IgG1 中凝集物之含量為約 2%，但純化後 WT-IgG2 與 WT-IgG4 之含量為約 25%。此建議 IgG1 於鹽酸溶洗中對於酸為安定的，且相對地，IgG2 與 IgG4 為不安定的且進行變性/凝集。因此，IgG2 與 IgG4 於酸性條件顯現的安定性較低於 IgG1 的安定性。Protein A 經常使用於純化 IgG 分子，且 IgG 分子於酸性條件下由 Protein A 溶洗。此外，於開發 IgG 分子作為醫藥品中所需要之病毒失活化，通常於酸性條件下實施。因而期望 IgG 分子於酸性條件下的安定性較高。然而，發現 IgG2 與 IgG4 分子於酸性條件下的安定性比 IgG1 更低，且首次建議於酸性條件下開發 IgG2 與 IgG4 分子作為醫藥品時有變性/凝集的問題。期望當開發其等作為醫藥品時，可克服此變性/凝集的問題。然而，截至今日，尚未有報導經由胺基酸取代用以解決此問題之方法。

具有經改變之 CH3 域的 WT-IgG2 與 WT-IgG4 的純化與估算

IgG2 與 IgG4 分子於酸性條件下的安定性顯現比 IgG1 的安定性低。因此，測試 IgG2 與 IgG4 分子之經改變形式於酸性條件下的安定性。根據用於 IgG2 與 IgG4 分子之固定區的模式，咸認為於酸性條件下之去安定化 (destabilizing) 可能因子之一為 CH3-CH3 域界面之不安定性。IgG2 中於 EU 編號系統之位置 397 的甲硫胺酸或 IgG4 中於 EU 編號系統之位置 409 的精胺酸，被認為使 CH3/CH3 界面去安定化。由於 IgG1 於 EU 編號系統中的位置 397 與 409 分別為纈胺酸與離胺酸，製備包括於 EU 編號系統中於

位置 397 的甲硫胺酸取代為纈胺酸之經改變的 IgG2(IgG2-M397V, 序列編號: 16 (胺基酸序列))以及包括於 EU 編號系統中於位置 397 的精胺酸取代為離胺酸之經改變的 IgG4(IgG4-R409K, 序列編號: 17 (胺基酸序列))。

使用於感興趣抗體之構築表現載體的方法、以及表現與純化抗體的方法，與上述鹽酸溶洗所使用者相同。進行凝膠過濾分析以估算由 Protein A 鹽酸溶洗所獲得經純化樣品中凝集物的含量。

凝集物估算方法：

系統： Waters Alliance

管柱： G3000SWx1 (TOSOH)

移動相： 50 mM 磷酸鈉，300 mM KCl, pH 7.0

流速，波長： 0.5 ml/min, 220 nm

結果示於第 1 圖。雖然純化後 WT-IgG1 中凝集物之含量為約 2%，但純化後 WT-IgG2 與 WT-IgG4 之含量為約 25%。相對地，於具有經改變 CH3 域之變異株中，IgG2-M397V 與 IgG4-R409K，凝集物的含量相當於(約 2%)IgG1 者。此發現顯示 IgG2 或 IgG4 抗體於酸性條件下的安定性，可藉由 IgG2 於 EU 編號系統中於位置 397 的甲硫胺酸取代為纈胺酸或 IgG4 於 EU 編號系統中於位置 409 的精胺酸取代為離胺酸而改良。經純化抗體對抗 20 mM 乙酸鈉、150 mM NaCl、pH 6.0 (EasySEP, TOMY)之溶液而透析。DSC 測定(中點溫度(midpoint temperature)與 T_m 值的測定)係於

約 0.1mg/ml 的蛋白質濃度以 1°C/min 的加熱速率由 40 至 100°C 實施。再者，測定 WT-IgG2、WT-IgG4、IgG2-M397V 與 IgG4-R409K 之熱變性(thermal denaturation)之中點溫度。結果顯示，對於經改變之 CH3 域的 T_m 值，分別相較於 WT-IgG2 與 WT-IgG4，於 IgG2-M397V 與 IgG4-R409K 中較高。此結果建議，由熱安定性的觀點而言，分別相較於 WT-IgG2 與 WT-IgG4，IgG2-M397V 與 IgG4-R409K 亦較為優異。

於病毒失活步驟與使用 Protein A 的純化步驟中，IgG2 與 IgG4 暴露於酸性條件。因此，於上述步驟之變性/凝集成為問題。然而，發現藉由使用 IgG2-M397V 與 IgG4-R409K 於 IgG2 與 IgG4 固定區的序列可解決該問題。因此，顯現該等改變非常有用於開發 IgG2 與 IgG4 抗體醫藥品。再者，IgG2-M397V 與 IgG4-R409K 的有用性亦藉由其優異的熱安定性而顯現。

實施例 2：衍生自 IgG2 雙硫鍵之異質性的改良

由 Protein A 經鹽酸溶洗 WT-IgG1、WT-IgG2 與 WT-IgG4 的純化

50 μ l 之懸浮於 TBS 的 rProtein A Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences) 添加至實施例 1 所得培養上清液，且合併之溶液藉由於 4°C 回轉 4 小時或更久而混合。將溶液移轉至 Ultrafree^(R)-MC (Millipore) 的 0.22- μ m 過濾杯。以 500 μ l 之 TBS 清洗 3 次後，rProtein A Sepharose™ 樹脂懸浮於 100 μ l 之 50 mM 乙酸鈉 (pH 3.3)

水溶液且使混合物靜置兩分鐘以溶洗抗體。立即地，藉由添加 $6.7\ \mu\text{l}$ 之 $1.5\ \text{M}$ Tris-HCl (pH 7.8) 中和溶洗液。進行兩次溶洗，製得 $200\ \mu\text{l}$ 之經純化抗體。

藉由陽離子交換層析 (IEC) 之 WT-IgG1、WT-IgG2 與 WT-IgG4 之分析

經純化之 WT-IgG1、WT-IgG2 與 WT-IgG4 藉由陽離子交換層析法分析同質性。

使用 IEC 之估算方法：

系統： Waters Alliance

管柱： ProPac WCX-10 (Dionex)

移動相 A： $25\ \text{mM}$ MES-NaOH, pH 6.1

B： $25\ \text{mM}$ MES-NaOH, $250\ \text{mM}$ Na-乙酸鹽, pH 6.1

流速，波長： $0.5\ \text{ml/min}$, $280\ \text{nm}$

梯度 B：於 WT-IgG1 之分析中為 50%至 75% (75 min)

B：於 WT-IgG2 與 WT-IgG4 之分析中為 30%至 55% (75 min)

結果示於第 2 圖。WT-IgG2 於離子交換分析中顯示超過一個波峰，而 WT-IgG1 與 WT-IgG4 顯現單一波峰。此建議，相較於 IgG1 與 IgG4，IgG2 分子為更異質性的。確實地，已報導 IgG2 同型物具有衍生自鉸鏈區之雙硫鍵的異質性 (Chu GC *et al.*, Pharm. Res. 2007 Mar 24;24(6): 1145-56)。因此，顯示於第 2 圖之 IgG2 的雜峰 (hetero-peaks) 亦認定為期望物質 / 衍生自雙硫鍵之相關

物質。大規模的製造抗體藥品而維持製造之間的期望物質/相關物質之異質性的差異為困難的，且因而開發作為醫藥品之抗體分子為期望盡可能有同質性(較低異質性)的分子。對於野生型 IgG2，於開發抗體醫藥品中有重要的同質性問題。確實地，美國專利 US20060194280(A1)已顯示天然 IgG2 於離子交換層析法分析中獲得雜峰(為雙硫鍵之結果)，且生物活性於雜峰間變化。美國專利 US20060194280 (A1)報導於純化步驟中之重新折疊作為組合雜峰為單一波峰之方法，但於製造中使用該步驟為成本高且複雜的。因此，用於組合該雜峰成為單一波峰之較佳方法係以胺基酸取代為主。雖然應克服源自鉸鏈區雙硫鍵之異質性以開發 IgG2 作為醫藥品，但截至目前仍無報導關於經由胺基酸取代解決此問題之方法。

經改變 WT-IgG2 CH1 域與鉸鏈區之製備與估算

如示於第 3 圖，對於 IgG2 分子有多可能的雙硫鍵型態。雙硫鍵與游離半胱胺酸之差異型態，為衍生自 IgG2 鉸鏈區之異質性的可能成因。IgG2 具有兩個半胱胺酸(EU 編號系統之位置 219 與 220)於上鉸鏈區，且緊鄰該二上-鉸鏈半胱胺酸之半胱胺酸包含 H 鏈 CH1 域之 EU 編號系統中位置 131 的半胱胺酸與 L 鏈 C-終端半胱胺酸，以及於二聚體 H 鏈之上鉸鏈的兩個相應的半胱胺酸。具體地，當抗體組合為 H2L2 形式時，於 IgG2 之上鉸鏈區的附近有總數為 8 的半胱胺酸。此可為起因於錯誤雙硫鍵與游離般光胺酸之各種異質性型態的理由。

IgG2 之鉸鏈序列與 CH1 係經改變以降低源自 IgG2 鉸鏈區之異質性。進行測試以避免起因於雙硫鍵與游離半胱胺酸之差異型態的 IgG2 異質性。測試多種經改變抗體的結果建議，可不降低熱安定性而避免異質性，此係藉由於野生型 IgG2 固定區序列之 H 鏈 CH1 域中分別於 EU 編號系統之位置 131 與 133 之半胱胺酸與精胺酸取代為絲胺酸與離胺酸，以及於 H 鏈之上鉸鏈之 EU 編號系統之位置 219 的半胱胺酸取代為絲胺酸（後文稱為 IgG2-SKSC，序列編號：18）。該等取代將使 IgG2-SKSC 於 H 與 L 鏈間形成同質性共價鍵，其為 L 鏈的 C-終端半胱胺酸與 EU 編號系統之位置 220 的半胱胺酸之間的雙硫鍵（第 4 圖）。

使用揭示於參考例 1 之方法，構築 IgG2-SKSC 表現載體且表現與純化 IgG2-SKSC。經純化之 IgG2-SKSC 與野生型 IgG2 (WT-IgG2) 藉由離子交換層析法分析。

使用 IEC 之估算方法：

系統：Waters Alliance

管柱：ProPac WCX-10 (Dionex)

移動相 A：25 mM MES-NaOH, pH 5.6

B：25 mM MES-NaOH, 250 mM Na-乙酸鹽, pH

5.6

流速，波長：0.5 ml/min, 280 nm

梯度 B：50%至 100% (75 min)

結果示於第 5 圖。如上述所預期的，IgG2-SKSC 顯示經溶洗為單一波峰而 WT-IgG2 獲得多波峰。此建議衍生於

IgG2 之鉸鏈區的異質性可使用例如用於產生 IgG2-SKSC 的改變而避免，該改變使 L 鏈之 C-終端半胱胺酸與 EU 編號系統之位置 220 的半胱胺酸之間形成單一雙硫鍵。WT-IgG1、WT-IgG2 與 IgG2-SKSC 之熱變性的中點溫度係藉由相同於實施例 1 揭示的方法而測定。結果顯示 WT-IgG2 獲得 Fab 域之波峰，該 Fab 域具有比 WT-IgG1 更低的 T_m 值，而 IgG2-SKSC 不獲得該波峰。此建議於熱安定性上，相較於 WT-IgG2，IgG2-SKSC 亦較優異。

雖然野生型 IgG2 被認為具有於開發抗體醫藥品為重要的同質性問題，但發現此問題可藉由使用 IgG2-SKSC 於 IgG2 的固定區而解決此問題。因此，IgG2-SKSC 非常有用於開發 IgG2 抗體醫藥品。再者，IgG2-SKSC 之有用性亦藉由發現其為熱安定性優異而顯現。

實施例 3：IgG 分子中 C-終端異質性的改良

自 WT-IgG1 之 H 鏈 C-終端 Δ GK 抗體之表現載體的構築

有報導關於抗體 C-終端序列之異質性，其為起因於兩個 C-終端胺基酸之甘胺酸與離胺酸的刪除所致之 C-終端胺基酸殘基的刪除與 C-終端胺基之醯胺化的結果 (Johnson KA *et al.*, Anal. Biochem. 2007 Jan 1;360(1): 75-83)。當開抗體醫藥品時，較佳為缺乏該異質性。事實上，於人源化 PM-1 抗體 TOCILIZUMAB 中，主要成分為缺乏 C-終端胺基酸離胺酸之序列，其為核苷酸序列所編碼但刪除後轉譯修飾 (post-translational modification)，以及具有離胺酸之次要成分亦共存為異

質性。因此，C-終端胺基酸序列係經改變以降低 C-終端異質性。具體地，本發明者們改變野生型 IgG1 之核苷酸序列，以刪除源自 IgG1 之 H 鏈固定區之 C-終端離胺酸與甘胺酸，且確定 C-終端胺基之醃胺化是否能藉由刪除兩個 C-終端胺基酸之甘胺酸與離胺酸而受到抑制。

使用於參考例 1 所獲得之編碼人源化 PM-1 抗體(WT)之 pB-CH 載體，將突變導入 H 鏈之 C 終端序列。編碼 EU 編號系統中於位置 447 的離胺酸及/或於位置 446 的甘胺酸，係使用 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)，根據所附之操作指南所揭示之方法，導入突變而轉化為中止密碼(stop codon)。因此，構築經基因工程而缺乏 C-終端胺基酸之離胺酸(EU 編號系統之位置 447)的抗體以及經基因工程而缺乏兩個 C-終端胺基酸之甘胺酸與離胺酸(分別為 EU 編號系統之位置 446 與 447)的抗體之表現載體。藉由表現該人源化 PM-1 抗體之經基因工程之 H 鏈與 L 鏈獲得 H 鏈 C-終端 K 與 Δ GK 抗體。抗體藉由參考例 1 揭示之方法表現與純化。

經純化之 H 鏈 C-終端 Δ GK 抗體根據下述步驟，藉由陽離子交換層析法分析。C-終端刪除對於異質性的效果，藉由陽離子交換層析法，根據下述方法使用經純化之 H 鏈 C-終端 Δ GK 抗體估算。陽離子交換層析法分析之條件係如下文所述。比較 PM-1 抗體、H 鏈 C-終端 Δ K 抗體與 H 鏈 C-終端 Δ GK 抗體之層析圖。

管柱： ProPac WCX-10 (Dionex)

移動相 A： 25 mmol/l MES/NaOH, pH 6.1

B： 25 mmol/l MES/NaOH, 250 mmol/l NaCl,
pH 6.1

流速： 0.5 ml/min

梯度： 25% B (5 min) -> (105 min) -> 67% B -> (1
min) ->

100% B (5 min)

偵測： 280 nm

未改變之人源化 PM-1 抗體、H 鏈 C-終端 Δ K 抗體與 H 鏈 C-終端 Δ GK 抗體之分析結果示於第 6 圖。根據 Chu GC 等人 (Pharm. Res. 2007 Mar 24;24(6): 1145-56)，具有較主波峰 (main peak) 為更延長的滯留時間的基峰 (basic peak)，含有 H 鏈 C 終端於位置 449 具有 Lys 以及 H 鏈 C 終端於位置 447 具有 Pro。基峰的強度顯著地於 H 鏈 C-終端 Δ GK 抗體中降低，而於 H 鏈 C-終端 Δ K 抗體中未觀察到該顯著的降低。此建議 H 鏈之 C-終端異質性僅可在兩個 C-終端胺基酸由 H 鏈刪除時為之降低。

H 鏈 C-終端 Δ GK 抗體之熱變性溫度藉由 DSC 測定，確認於 H 鏈 C-終端之兩的胺基酸的刪除，對於熱安定性的效果。為了 DSC 測定，抗體以 150mM NaC 之 120 mM 乙酸緩衝液 (pH 6.0) 透析，轉換緩衝液。經脫氣後，人源化 PM-1 抗體與 H 鏈 C 終端 Δ GK 抗體溶液，以及參考溶液 (外透析液) 密封至熱量槽 (calorimetric cell)，且均勻地於 40°C 熱平衡。然後，以速率約 1K/min 由 40 至 100°C 掃描樣品。

註解所得變性峰(Rodolfo *et al.*, Immunology Letters, 1999, p 47-52)。結果顯示 C-終端刪除對於 CH3 域之熱變性溫度沒有效果。

因此，源自 C-終端胺基酸之異質性，可藉由於核苷酸層級，由 H 鏈固定區刪除 C-終端離胺酸與甘胺酸而降低，且不影響抗體之熱安定性。由於所有人類抗體 IgG1、IgG2 與 IgG4 的固定區，皆於其 C-終端序列中 EU 編號系統之位置 446 與 447 含有 Gly 與 Lys，所以於此實施例與其他實施例所發現之降低 C-終端胺基酸異質性的方法，亦期待應用於 IgG2 與 IgG4 固定區。

實施例 4：具有新穎之最適化固定區序列之 M14 Δ GK 的構築

當抗體醫藥品目標為中和抗原時，例如 Fc 域之 ADCC 的效應子功能為必需的且因而對 Fc γ 受體的結合為非必需的。由免疫性與不良作用的觀點，認定對 Fc γ 受體的結合為不佳的(Strand V *et al.*, Nat. Rev. Drug Discov. 2007 Jan;6(1):75-92; Gessner JE *et al.*, Ann. Hematol. 1998 Jun;76(6):231-48)。人源化抗-IL-6 受體 IgG1 抗體 TOCILIZUMAB 不需要結合至 Fc γ 受體，因期僅需要特異地結合至 IL-6 受體以及中和其生物活性，以使用作為例如類風濕性關節炎之 IL-6 相關疾病的治療劑。

M14 Δ GK、M11 Δ GK 與 M17 Δ GK，Fc γ 受體-非結合、最適化固定區之構築與估算

一種減弱 Fc γ 受體結合的可能方法為將 IgG 抗體由

IgG1 同型物轉換為 IgG2 或 IgG4 同型物(Ann. Hematol. 1998 Jun;76(6): 231-48)。作為完全去除對 Fc γ 受體結合的方法，已報導將人工改變導入至 Fc 域的方法。例如，由於抗-CD3 抗體與抗-CD4 抗體的效應子功能引起不良作用，不存在於野生型序列之胺基酸突變已導入至 Fc 域之 Fc γ 受體-結合區(Cole MS *et al.*, J. Immunol. 1997 Oct 1;159(7): 3613-21; Reddy MP *et al.*, J. Immunol. 2000 Feb 15;164(4): 1925-33)，且所得之 Fc γ 受體-非結合抗-CD3 及抗-CD4 抗體正於臨床試驗中(Strand V *et al.*, Nat. Rev. Drug Discov. 2007 Jan;6(1): 75-92; Chau LA *et al.*, Transplantation 2001 Apr 15;71(7): 941-50)。根據另一報導(WO 99/58572)，Fc γ 受體-非結合抗體可藉由將 IgG1 之 Fc γ R-結合域(EU 編號系統中於位置 233、234、235、236、327、330 及 331)轉換為 IgG2 之序列(EU 編號系統中於位置 233、234、235 與 236)或 IgG4 之序列(EU 編號系統中於位置 327、330 與 331)而製備。然而，若上述所有突變皆導入 IgG1，將產生有潛力作為非天然 T-細胞抗原決定基肽之九個胺基酸之新穎肽序列，而此增加免疫性風險。於開發抗體醫藥品中，免疫性應最小化。

為了克服上述問題，考慮於 IgG2 固定區之改變。於 IgG 固定區之 Fc γ R-結合域，EU 編號系統中於位置 327、330 與 331 的殘基，不同於 IgG4 之非結合序列，而 EU 編號系統中於位置 233、234、235 與 236 為非結合型之胺基酸 EU 編號系統中於位置 327、330 與 331 的胺基酸改變為

IgG4 之序列 (G2Δa 揭示於 Eur. J. Immunol. 1999 Aug;29(8):2613-24)。然而，由於 EU 編號系統中於位置 339 的胺基酸為丙胺酸，而於 IgG2 相對應之殘基為甲硫胺酸，EU 編號系統中於位置 327、330 與 331 的胺基酸的簡單改變為 IgG4 之序列，不佳地產生 9 個胺基酸之新穎肽序列，有潛力作為非天然 T-細胞抗原決定基肽，且因而增加免疫性風險。然後，本發明者們發現，除了上述改變之外，於 IgG2 中藉由導入 EU 編號系統中於位置 339 的甲硫胺酸取代為丙胺酸，可避免新穎肽序列之產生。

除了上述突變之外，導入其他突變，且其等為 IgG2 中 EU 編號系統中於位置 397 的甲硫胺酸取代為纈胺酸，其發現於實施例 1 以改良 IgG2 於酸性條件之安定性；以及 EU 編號系統中於位置 131 的半胱胺酸取代為絲胺酸、EU 編號系統中於位置 133 的精胺酸取代為離胺酸以及 EU 編號系統中於位置 219 的半胱胺酸取代為絲胺酸，其發現於實施例 2 以改良源自鉸鏈區雙硫鍵之異質性。再者，由於於位置 131 與 133 之突變產生 9 個胺基酸之新穎肽序列，有潛力地作為非天然 T-細胞抗原決定基肽，且因而增加免疫性風險，因此於位置 131 至 139 附近之肽序列，藉由導入 EU 編號系統中於位置 137 的麩胺酸取代為甘胺酸以及 EU 編號系統中於位置 138 之絲胺酸取代為甘胺酸，轉換為天然人類序列。再者，EU 編號系統中於位置 446 與 447 的甘胺酸與離胺酸，由 H 鏈之 C 終端刪除以降低 C-終端異質性。具有所有經導入突變之固定區序列命名為

M14 Δ GK (M14 Δ GK, 序列編號: 5)。雖然 M14 Δ GK 於位置 219 的半胱氨酸突變為絲氨酸為新穎 9 個胺基酸序列而有潛力作為 T-細胞抗原決定基肽, 但由於絲氨酸的性質類似於半胱氨酸的性質而任意免疫性風險非常低。藉由 TEPITOPE 之免疫性預測亦建議於免疫性無差異。

對於抗體 H 鏈之可變區為 WT 且固定區為 M14 Δ GK (M14 Δ GK, 序列編號: 5; WT-M14 Δ GK, 序列編號: 19) 之表現載體系藉由參考例 1 揭示之方法構築。具有 M14 Δ GK 作為 H 鏈及 WT 作為 L 鏈之抗體, 藉由參考例 1 揭示之方法表現與純化。

再者, WT-M11 Δ GK (M11 Δ GK, 序列編號: 8; WT-M11 Δ GK, 序列編號: 21) 中, 以相同方法將突變導入 IgG4 固定區於 EU 編號系統中於位置 233、234、235 與 236 (G4 Δ b 揭示於 Eur. J. Immunol. 1999 Aug; 29(8): 2613-24; 此改變新產生非人類序列且因而增加免疫性風險) 以降低 Fc γ 受體結合。除了上述改變之外, 為了降低免疫性風險, 於 EU 編號系統中於位置 131、133、137、138、214、217、219、220、221 與 222 導入突變, 以使鉸鏈區雙硫鍵之型態與 M14 Δ GK 相同; 於 EU 編號系統中於位置 409 導入突變 (實施例 1) 以改良於酸性條件之安定性; 以及於 EU 編號系統中於位置 446 與 447 的胺基酸刪除 (實施例 3), 以降低 C-終端異質性。

再者, 構築 WT-M17 Δ GK (M17 Δ GK, 序列編號: 10; WT-M17 Δ GK, 序列編號: 20), 藉由於 IgG1 固定區於 EU

編號系統中於位置 233、234、235、236、327、330、331 與 339 導入突變(G1 Δ ab 揭示於 Eur. J. Immunol. 1999 Aug;29(8):2613-24)，以減弱 Fc γ 受體結合且藉由刪除於 EU 編號系統中於位置 446 與 447 的胺基酸以降低 C-終端異質性(實施例 3)。

WT-M17 Δ GK 或 WT-M11 Δ GK 使用作為 H 鏈，且 WT 使用作為 L 鏈。該等抗體藉由參考例 1 揭示之方法表現與純化。

WT-M14 Δ GK、WT-M17 Δ GK 與 WT-M11 Δ GK 對於 Fc γ 受體結合活性之估算

Fc γ R 結合活性藉由下述步驟估算。使用 Biacore T100，人類衍生之 Fc γ 受體 I (後文稱為 Fc γ RI)經固定至感應晶片使其與作為分析物之 IgG1、IgG2、IgG4、M11 Δ GK、M14 Δ GK 或 M17 Δ GK 交互作用。比較結合抗體量。測量係使用 Recombinant Human FcRIA/CD64 (R&D systems)作為人類衍生之 Fc γ RI，以及 IgG1、IgG2、IgG4、M11 Δ GK、M14 Δ GK 與 M1 Δ GK 作為樣品進行。Fc γ RI 藉由胺偶合方法經固定至感應晶片 CM5 (BIACORE)。經固定 Fc γ RI 之最終量為 13000 RU。泳動緩衝液(running buffer)使用 HBS-EP+，且流速為 20 μ l/min。樣品濃度使用 HBS-EP+調整為 100 μ g/ml。分析包含下述兩步驟：兩分鐘締合相(association phase)，其中注射 10 μ l 抗體溶液；以及後續的四分鐘分離相(dissociation phase)，其中注射物換為 HBS-EP+。分離相後，感應晶片藉由注射

20 μ l 之 5 mM 氫氧化鈉與更新(regenerate)。締合、分離與更新構成一個循環。注射各種抗體溶液以獲得感應圖譜(sensorgram)。作為分析物，依次序注射 IgG4、IgG2、IgG1、M11、M14 與 M17。此注射系列重複兩次。測定結合抗體量之數據比較結果示於第 7 圖。比較結果顯示結合抗體量依下述次序降低： IgG1 > IgG4 >> IgG2 = M11 Δ GK = M14 Δ GK = M17 Δ GK。因此，其顯示野生型 IgG2、M11 Δ GK、M14 Δ GK 與 M17 Δ GK 之 Fc γ RI 結合較野生型 IgG1 與 IgG4 弱。

Fc γ RIIa 結合係藉由下述步驟估算。使用 Using Biacore T100，人類衍生之 Fc γ 受體 I Ia (後文稱為 Fc γ RIIa) 經固定至感應晶片使其與作為分析物之 IgG1、IgG2、IgG4、M11 Δ GK、M14 Δ GK 或 M17 Δ GK 交互作用。測量係使用 Recombinant Human FcRIIA/CD32a (R&D systems) 作為人類衍生之 Fc γ RIIa，以及 IgG1、IgG2、IgG4、M11 Δ GK、M14 Δ GK 與 M17 Δ GK 作為樣品進行。Fc γ RIIa 藉由胺偶合方法經固定至感應晶片 CM5 (BIACORE)。經固定 Fc γ RIIa 之最終量為 3300 RU。泳動緩衝液(running buffer)使用 HBS-EP+，且流速為 20 μ l/min。然後，注射電泳緩衝液直到基線穩定為止。測量於基線穩定後進行。使經固定之 Fc γ RIIa 與作為分析物之各 IgG 同型物(IgG1、IgG2 或 IgG4) 之抗體或導入突變之抗體(M11 Δ GK、M14 Δ GK 或 M17 Δ GK)。觀察結合的抗體量。泳動緩衝液使用 HBS-EP+，且流速為 20 μ l/min。測量溫度為 25°C。各 IgG 或其經改

變型式之濃度調整為 $100 \mu\text{g/ml}$ 。注射 $20 \mu\text{l}$ 分析物且使其與固定之 Fc γ RIIa 交互作用。交互作用後，分析物由 Fc γ RIIa 分離且該感應晶片藉由注射 $200 \mu\text{l}$ 泳動緩衝液而更新。作為分析物，依序注射 IgG1、IgG2、IgG4、M11 Δ GK、M14 Δ GK 與 M17 Δ GK。此注射系列重複兩次。測定結合抗體量之數據比較結果示於第 8 圖。比較結果顯示結合抗體量依下述次序降低：IgG1 > IgG2 = IgG4 > M11 Δ GK = M14 Δ GK = M17 Δ GK。因此，其顯示 M11 Δ GK、M14 Δ GK 與 M17 Δ GK 之 Fc γ RIIa 結合較野生型 IgG1、IgG2 與 IgG4 弱。

Fc γ RIIb 結合係藉由下述步驟估算。使用 Using Biacore T100，人類衍生之 Fc γ 受體 IIB（後文稱為 Fc γ RIIb）經固定至感應晶片使其與作為分析物之 IgG1、IgG2、IgG4、M11 Δ GK、M14 Δ GK 或 M17 Δ GK 交互作用。測量係使用 Recombinant Human FcRIIB/C(R&D systems)作為人類衍生之 Fc γ RIIb，以及 IgG1、IgG2、IgG4、M11 Δ GK、M14 Δ GK 與 M17 Δ GK 作為樣品進行。Fc γ RIIb 藉由胺偶合方法經固定至感應晶片 CM5 (BIACORE)。經固定 Fc γ RIIb 之最終量為 4300 RU。然後，注射泳動緩衝液直到基線穩定為止。測量於基線穩定後進行。使經固定之 Fc γ RIIa 與作為分析物之各 IgG 同型物(IgG1、IgG2 或 IgG4)之抗體或導入突變之抗體(M11 Δ GK、M14 Δ GK 或 M17 Δ GK)。觀察結合的抗體量。泳動緩衝液(running buffer)使用 HBS-EP+，且流速為 $20 \mu\text{l/min}$ 。測量溫度為 25°C 。各 IgG 或其經改變型式之濃度調整為 $200 \mu\text{g/ml}$ 。注射 $20 \mu\text{l}$ 分析物且使其

與固定之 FcγRIIb 交互作用。交互作用後，分析物由 FcγRIIb 分離且該感應晶片藉由注射 200 μl 泳動緩衝液而更新。作為分析物，依序注射 IgG1、IgG2、IgG4、M11Δ GK、M14Δ GK 與 M17Δ GK。此注射系列重複兩次。測定結合抗體量之數據比較結果示於第 9 圖。比較結果顯示結合抗體量依下述次序降低：IgG4 > IgG1 > IgG2 > M11Δ GK = M14Δ GK = M17Δ GK。因此，其顯示 M11Δ GK、M14Δ GK 與 M17Δ GK 之 FcγRIIb 結合較野生型 IgG1、IgG2 與 IgG4 弱。

FcγRIIIa 結合係藉由下述步驟估算。使用 Using Biacore T100，人類衍生之 Fcγ受體 IIIa（後文稱為 FcγRIIIa）經固定至感應晶片使其與作為分析物之 IgG1、IgG2、IgG4、M11Δ GK、M14Δ GK 或 M17Δ GK 交互作用。測量係使用 hFcγRIIIaV-His6（申請人的公司所製備之重組 hFcγRIIIaV-His6）作為人類衍生之 FcγRIIIa，以及 IgG1、IgG2、IgG4、M11Δ GK、M14Δ GK 與 M17Δ GK 作為樣品進行。FcγRIIIa 藉由胺偶合方法經固定至感應晶片 CM5（BIAcore）。經固定 hFcγRIIIaV-His6 之最終量為 8200RU。泳動緩衝液（running buffer）使用 HBS-EP+，且流速為 5 μl/min。樣品濃度使用 HBS-EP+ 調整為 250 μg/ml。分析包含下述兩步驟：兩分鐘締合相（association phase），其中注射 10 μl 抗體溶液；以及後續的四分鐘分離相（dissociation phase），其中注射物換為 HBS-EP+。分離相後，感應晶片藉由注射 20 μl 之 5 mM 氫氧化鈉與更新（regenerate）。締合、分離與更新構成一個循環。注射各

種抗體溶液以獲得感應圖譜(sensorgram)。作為分析物，依次序注射 IgG4、IgG2、IgG1、M11 Δ GK、M14 Δ GK 或 M17 Δ GK。測定結合抗體量之數據比較結果示於第 10 圖。比較結果顯示結合抗體量依下述次序降低：IgG1>> IgG4>IgG2>M17 Δ GK>M11 Δ GK = M14 Δ GK。因此，其顯示 M11 Δ GK、M14 Δ GK 與 M17 Δ GK 之 Fc γ RIIIa 結合較野生型 IgG1、IgG2 與 IgG4 弱。再者，M11 Δ GK 與 M14 Δ GK 之 Fc γ RIIIa 結合發現比含有報導於 Eur. J. Immunol. 1999 Aug;29(8): 2613-24 之突變 G1 Δ ab 的 M17 Δ GK 者為弱。

上述此發現顯示，WT-M14 Δ GK、WT-M17 Δ GK 與 WT-M11 Δ GK 之 Fc γ 受體結合，相較於野生型 IgG1，顯著地降低。由於 Fc γ 受體媒介之交互作用於 APC 之免疫性風險以及由例如 ADCC 之效應子作用所引起之不良作用，可藉由使用 WT-M14 Δ GK、WT-M17 Δ GK 或 WT-M11 Δ GK 作為固定區而避免。因此，WT-M14 Δ GK、WT-M17 Δ GK 與 WT-M11 Δ GK 有用於作為目標為中和抗原之抗體醫藥品的固定區。

WT-M14 Δ GK、WT-M17 Δ GK 與 WT-M11 Δ GK 對於高濃度安定性之估算

估算 WT-M14 Δ GK、WT-M17 Δ GK 與 WT-M11 Δ GK 對於高濃度之安定性。WT-IgG1、WT-M14 Δ GK、WT-M17 Δ GK 與 WT-M11 Δ GK 之經純化抗體，相對於 20 mM 組胺酸氯、150 mM NaCl，pH 6.5 (EasySEP, TOMY)之溶液透析，然後藉由超過濾濃縮。測試抗體於高濃度之安定性。條件如下述。

抗體：WT-IgG1、WT-M14 Δ GK、WT-M17 Δ GK 與
WT-M11 Δ GK 緩衝液：20 mM 組胺酸氯、150 mM NaCl，pH
6.5

濃度：61 mg/ml

儲存溫度與時間期間：40°C 兩週，40°C 一個月，40°C
兩個月

凝集物估算方法：

系統：Waters Alliance

管柱：G3000SWx1 (TOSOH)

移動相：50 mM 磷酸鈉，300 mM KCl，pH 7.0

流速，波長：0.5 ml/min，220 nm

分析稀釋 100 倍之樣品

於起始配方物(製備後立即)中及於各種條件儲存後
之配方物中之凝集物含量，係藉由上述之凝膠過濾層析法
估算。相對起始配方之凝集物含量的差異(增加量)顯示
於第 11 圖。結果顯示，相較於 WT-IgG1，WT-M14 Δ GK、
WT-M17 Δ GK 與 WT-M11 Δ GK 之凝集物量些為增加且約為 WT
含量之一半。再者，如第 12 圖所示，增加的 Fab 片段量
於 WT-IgG1 與 WT-M17 Δ GK 之間為相當的，WT-M14 Δ GK
與 WT-M11 Δ GK 中的增加量為約 WT 中的量的四分之一。IgG
型抗體配方物之代謝途徑包含揭示於 WO 2003/039485 之
凝集物的形成與 Fab 降解的產生。根據該二標準，凝集物
與 Fab 片段產生，相較於 WT-IgG1，WT-M14 Δ GK 與
WT-M11 Δ GK 顯示配方物具有優異安定性。因此，即便具有

為不佳安定性之 IgG1 固定區且無法以高濃度液體配方物製備為抗體醫藥品的抗體，使用 WT-M14 Δ GK、WT-M17 Δ GK 與 WT-M11 Δ GK 作為固定區，期望能產生更安定之高濃度液體配方物。

特別地，WT-M14 Δ GK 期望為非常有用於作為新穎固定區序列，其可(1)克服原始 IgG2 分子於酸性條件下之不安定性；(2)改良源自鉸鏈區雙硫鍵之性；(3)不結合至 Fc γ 受體；(4)具有最小數目之有潛力作為 T-細胞抗原決定基肽之 9 個胺基酸之新穎肽序列；以及(5) 於高濃度配方物具有較佳於 IgG1 之安定性。

實施例 5：M31 Δ GK 之製備與估算

製備於實施例 4 之 M14 Δ GK 係藉由取代 IgG2 序列於 Eu 編號系統中之位置 330、331 與 339 而構築 M31 Δ GK (M31 Δ GK，序列編號：7)。藉由參考例 1 揭示之方法構築用於其可變區為 WT 且固定區序列為 M31 Δ GK(WT-M31 Δ GK，序列編號：22)之抗體 H 鏈之序列的表現載體。使用 WT-M31 Δ GK 作為 H 鏈與 WT 作為 L 鏈，藉由參考例 1 揭示之方法表現與純化 WT-M31 Δ GK。

除了同時表純化 WT-M31 Δ GK、WT-IgG2 與 WT-M14 Δ GK 之外，且藉由下述步驟之陽離子交換層析法分析。使用於陽離子交換層析法分析之條件係如下述。比較 WT-IgG2、WT-M14 Δ GK 與 WT-M31 Δ GK 之色譜圖。

管柱： ProPac WCX-10 (Dionex)

移動相 A： 25 mmol/l MES/NaOH, pH 6.1

B: 25 mmol/l MES/NaOH, 250 mmol/l NaCl,
pH 6.1

流速: 0.5 ml/min

梯度: 0% B (5 min) -> (65 min) -> 100% B -> (1
min)

偵測: 280 nm

WT-IgG2、WT-M14 Δ GK 與 WT-M31 Δ GK 之分析結果示於第 13 圖。如同 WT-M14 Δ GK, WT-M31 Δ GK 顯示經溶洗為單峰, 而 WT-IgG2 獲得多波峰。此酯式衍生自 IgG2 鉸雙硫鍵之異質性亦可避免於 WT-M31 Δ GK。

實施例 6: WT-M14 之血漿停留時間之估算

用於計算人類血漿中停留時間之方法

IgG 分子於想將中之延長的停留時間(慢速廓清(slow elimination))已知起因於 FcRn 作用(FcRn 已知為 IgG 分子之補救受體(salvage receptor))(Nat. Rev. Immunol. 2007 Sep;7(9): 715-25)。當經由吞飲作用(pinocytosis)併入內體(endosomes)時, 於內體中之酸性條件下(約 pH 6.0), IgG 分子結合製表現於內體之 FcRn。雖然不結合至 FcRn 之 IgG 分子經轉移且降解於溶小體(lysosomes), 結合至 FcRn 者則轉位至細胞表面且然後由 FcRn 釋放回返至血漿而對抗血漿之中性條件(約 pH 7.4)。

已知 IgG-型抗體包含 IgG1、IgG2、IgG3 與 IgG4 同型物。人類中該等同型物之血漿半衰期已報導對於 IgG1 與 IgG2 為約 36 日; 對於 IgG3 為約 29 日; 以及對於 IgG4

為約 16 日 (Nat. Biotechnol. 2007 Dec; 25(12) : 1369-72)。因此，IgG1 與 IgG2 於血漿值停留時間相信為最長者。一般而言，使用於醫藥劑之抗體同型物為 IgG1、IgG2 與 IgG4。用於進一步延長 IgG 抗體於血漿中之停留時間的方法包括用於改良上述對於人類 FcRn 之結合活性的方法，且此係藉由改變 IgG 固定區之序列而達成 (J. Biol. Chem. 2007 Jan 19; 282(3) : 1709-17; J. Immunol. 2006 Jan 1; 176(1) : 346-56)。

於小鼠 FcRn 與人類 FcRn 之間有種特異性的差異 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006 Dec 5; 103(49) : 18709-14)。因此，為了預測經改變之人類固定區序列之 IgG 抗體的血漿停留時間，期望於人類 FcRn 基因轉殖鼠中估算對人類 FcRn 之結合與血漿中停留時間 (Int. Immunol. 2006 Dec; 18(12) : 1759-69)。

對人類 FcRn 之結合的估算

FcRn 為 FcRn 與 $\beta 2$ -微球蛋白之複合物。根據已揭示之人類 FcRn 基因序列 (J. Exp. Med. (1994) 180 (6), 2377-2381)，製備寡-DNA 引子。編碼全基因之 DNA 片段，使用人類 cDNA (Human Placenta Marathon-Ready cDNA, Clontech) 作為模板以及所製備之引子藉由 PCR 製備。使用所獲得之 DNA 片段作為模板，將含有信號區 (Met1-Leu290) 之細胞外域 (extracellular domain) 藉由 PCR 擴增，且插入動物細胞表現載體 (人類 FcRn 之胺基酸

序列如前述序列編號：24)。同樣地，根據已揭示之人類 $\beta 2$ -微球蛋白基因序列(Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (2002) 99 (26), 16899-16903)，製備寡-DNA 引子。編碼全基因之 DNA 片段，使用人類 cDNA(Human Placenta Marathon-Ready cDNA, Clontech)作為模板以及所製備之引子藉由 PCR 製備。使用所獲得之 DNA 片段作為模板，含有信號區(Met1-Met119)之編碼全 $\beta 2$ -微球蛋白之 DNA 片段藉由 PCR 擴增，且插入動物細胞表現載體(人類 $\beta 2$ -微球蛋白之胺基酸序列如前述序列編號：25)。

可溶之人類 FcRn 藉由下述步驟表現。構築用於 FcRn 與 $\beta 2$ -微球蛋白之質體，藉由微脂粒感染以 10%胎牛血清(Invitrogen)，導入至人類胚胎腎癌衍生之細胞株 HEK293H (Invitrogen)。收集所得培養上清液，且藉由揭示於 J. Immunol. 2002 Nov 1;169(9): 5171-80 之方法，使用 IgG Sepharose 6 Fast Flow (Amersham Biosciences) 純化，接著使用 HiTrap Q HP (GE Healthcare)進一步純化。

使用 Biacore 3000 估算對人類 FcRn 之結合。結合至 Protein L 或兔子抗-人類 IgG Kappa 鏈抗體之抗體，經固定於感應晶片，添加人類 FcRn 作為分析物與抗體交互作用，且由結合人類 FcRn 之量計算親和性(KD)。具體地，Protein L 或兔子抗-人類 IgG Kappa 鏈抗體係藉由胺偶合方法，使用含有 150mM NaCl 之 50mM Na-磷酸鹽緩衝液(pH 6.0)作為泳動緩衝液，固定於感應晶片 CM5 (BIACORE)。

然後，抗體以含有 0.02% Tween20 之泳動緩衝液稀釋，且注射以結合至該晶片。然後注射人類 FcRn 且估算人類 FcRn 對抗體之結合活性。

使用 BIAevaluation Software 計算親和性。所獲得之感應圖譜用於計算最終人類 FcRn 注射前之立即的結合至抗體的 hFcRn 的量。抗體對於人類 FcRn 之親和性，藉由相當的恆定狀態親和性方法計算。

人類 FcRn 基因轉殖鼠中血漿停留時間的估算

人類 FcRn 基因轉殖鼠中之藥物動力學(活體內動力學)(B6.mFcRn-/- .hFcRn Tg line 276 +/- mice; Jackson Laboratories)界下述步驟估算。抗體以劑量 1 mg/kg，靜脈內對老鼠投藥一次，且於合適時間點收集血液。所收集血液立即以 15,000 rpm 於 4℃ 離心 15 分鐘以獲得血漿。分離之血漿直至使用前儲存於 -20℃ 或更低溫之冷凍櫃。血漿濃度藉由 ELISA 測定。

WT-M14 於人類之血漿停留時間的預言性估算

WT-IgG1 與 WT-M14 對結合至人類 FcRN 之活性，藉由 BIAcore 估算。如表 1 所示，結果顯示 WT-M14 之結合活性些略高於 WT-IgG1 之結合活性。

表 1

	<i>KD</i> (μ M)
WT-IgG1	2.07
WT-M14	1.85

如示於第 14 圖，當使用人類 FcRn 基因轉殖鼠估算時，WT-IgG1 與 WT-M14 之間的血漿停留時間為相當的。此發現建議人類 M14 固定區之血漿停留時間為相當於 IgG1 固定區之血漿停留時間。

實施例 7：具有良好血漿中停留時間之 WT-M44、WT-M58 與 WT-M73 的製備

WT-M58 分子之製備

如實施例 6 所揭示者，人類 FcRn 基因轉殖鼠中 WT-M14 之血漿停留時間為相當於 WT-IgG1 之血漿停留時間。用於改良血漿停留時間之已知方法包含該等用於降低抗體之等電點者以及增強對 FcRn 結合者。此處，導入下述修改以改良 WT-M14 之血漿停留時間。具體地，導入下述取代至 WT-M31 Δ GK，其係如實施例 4 所揭示，由 WT-M14 製備：於 EU 編號系統中，於位置 397 的纈胺酸取代為甲硫胺酸；於位置 268 的組胺酸取代為麩胺醯胺；於位置 355 的精胺酸取代為麩胺醯胺；以及於位置 419 的麩胺醯胺取代為麩胺酸。此四個取代導入至 WT-M31 Δ GK 以產生 WT-M58（序列編號：26 之胺基酸序列）。表現載體藉由實施例 1 所揭示之方法製備。WT-M58 與 L(WT)分別使用作為 H 鏈與 L 鏈。藉由實施例 1 所揭示之方法表現與純化 WT-M58。

WT-M73 分子之構築

另一方面，WT-M44（序列編號：27 之胺基酸序列），

係藉由將 EU 編號系統中，於位置 434 的胺基酸取代為丙胺酸之取代導入至 IgG1。WT-M83 (序列編號：58 之胺基酸序列)亦藉由刪除 EU 編號系統中於位置 446 的甘胺酸以及於位置 447 的離胺酸而產生，以降低 H 鏈 C-終端異質性。再者，WT-M73 (序列編號：28 之胺基酸序列)意藉由將 EU 編號系統中，於位置 434 的胺基酸取代為丙胺酸之取代導入至 WT-M83 而產生。

上述抗體之表現載體係藉由實施例 1 揭示之方法構築。WT-M44、WT-M58 或 WT-M73 使用作為 H 鏈，而 L (WT) 使用作為 L 鏈。WT-M44、WT-M58 與 WT-M73 藉由實施例 1 揭示之方法表現與純化。

人類中 WT-M44、WT-M58 與 WT-M73 之血漿停留時間之預測性估算

WT-IgG1、WT-M44、WT-M58 與 WT-M73 對人類 FcRn 之結合活性，藉由 BIAcore 估算。如表 2 所示，結果顯示 WT-M44、WT-M58 與 WT-M73 之結合活性較大於 WT-IgG1，且分別為 WT-IgG1 之約、2.7 倍、1.4 倍與 3.8 倍。

表 2

	<i>KD</i> (μ M)
WT-IgG1	1.62
WT-M44	0.59
WT-M58	1.17
WT-M73	0.42

作為人類 FcRn 基因轉殖鼠中，WT-IgG1、WT-M14 與 WT-M58 之血漿停留時間之估算結果，如第 24 圖所示。相對於 WT-IgG1 與 WT-M14，WT-M58 確認具有增加的血漿停留時間。再者，估算 WT-IgG1、WT-M44、WT-M58 與 WT-M73 於人類基因轉殖鼠之血漿停留時間。如第 15 圖所示，相較於 WT-IgG1，WT-M44、WT-M58 與 WT-M73 皆確認具有改良的血漿中停留時間。血漿停留時間改良效果，相關於對於人類 FcRn 的結合活性。特別地，WT-M73 於第 28 日之血漿濃度改良約為 WT-IgG1 的 16 倍。相較於具有 IgG1 固定區之抗體，具有 M73 固定區之抗體於人類之血漿停留時間，亦顯著地增加。

實施例 8：新穎固定區 M14 與 M58 於各種抗體對於降低異質性的效果

如實施例 4 所示者，其顯示源自 IgG2 鉸鏈區之異質性，於人源化抗-IL-6 受體 PM1 抗體 (WT) 中，可藉由將 IgG2 鉸鏈區轉換為 M14 而降低。亦測試人源化 PM1 抗體以外的 IgG2 型抗體，以估算異質性是否可藉由將其固定區轉換為 M14 或 M58 而降低。

人源化 PM1 抗體以外的抗體為：抗 IL-6 受體抗體 F2H/L39 (F2H/L39_VH 與 F2H/L39_VL 之胺基酸序列分別如前述序列編號：29 與 30)；抗-IL-31 受體抗體 H0L0 H0L0_VH 與 H0L0_VL 之胺基酸序列分別如前述序列編號：31 與 32)；以及抗-RANKL 抗體 DNS (DNS_VH 與 DNS_VL 之胺基

酸序列分別如前述序列編號：33 與 34)。對於該等抗體之各者，產生具有 IgG1 固定區(序列編號：1)、IgG2 固定區(序列編號：2)或 M14 (序列編號：5)或 M58 (序列編號：35)之抗體。

所產生的抗體，使用充足的梯度與合適的流速，於 ProPac WCX-10 (Dionex)管注(移動相 A：20 mM 乙酸鈉(pH 5.0)，移動相 B：20 mM 乙酸鈉/1M NaCl (pH 5.0))，藉由陽離子交換層析法估算異質性。由陽離子交換層析法(IEC)獲得之估算，結果如第 16 圖所示。

如第 16 圖所示，固定區由 IgG1 型轉換為 IgG 型顯示增加異質性不僅於人源化抗-IL-6 受體 PM1 抗體(WT)，亦於抗-IL-6 受體抗體 F2H/L39、抗-IL-31 受體抗體 H0L0 與抗-RANKL 抗體 DNS。相對地，可藉由將其固定區轉換為 M14 或 M58 而於所有該等抗體降低異質性。因此，其顯示，無論抗原的型態或抗體可變區序列，源自天然 IgG2 之異質性，可藉由將 H-鏈 CH1 域之 EU 編號系統之位置 131 的半胱胺酸取代為絲胺酸，以及將 H 鏈之上鉸鏈之 EU 編號系統之位置 219 的半胱胺酸取代為絲胺酸而降低。

實施例 9：新穎固定區 M58 於各種抗體中對於改良血漿停留時間的效果

如實施例 7 所示，其顯示於人源化抗-IL-6 受體 PM1 抗體(WT) 中，將固定區由 IgG1 轉換為 M58，改良 FcRn 基因轉殖鼠中對 FcRn 的結合活性與血漿停留時間。因此，

亦測試人源化 PM1 抗體以外的 IgG1 型抗體，以估算其血漿中停留時間是否可藉由將其固定區轉換為 M58 而改良。

人源化 PM1 抗體以外的抗體為抗-IL-31 受體抗體 H0L0 (H0L0_VH 與 H0L0_VL 之胺基酸序列分別如前述序列編號：31 與 32)以及抗-RANKL 抗體 DNS (DNS_VH 與 DNS_VL 之胺基酸序列分別如前述序列編號：33 與 34)。對於該等抗體之各者，產生具有 IgG1 固定區(序列編號：1)或 M58 (序列編號：35)之抗體，且藉由實施例 6 揭示之方法估算其對於人類 FcRn 之結合活性。結果如表 3 所示。

表 3

	<i>KD</i> (μ M)		
	WT	H0L0	DNS
IgG1	1.42	1.07	1.36
M58	1.03	0.91	1.03

如表 3 所示，其顯示固定於由 IgG1 型轉換為 M58 之結果，和

抗-IL-6 受體抗體 WT 相同，抗-IL-31 受體抗體 H0L0 與抗-RANKL 抗體 DNS 兩者對人類 FcRn 之結合活性改良。此建議，無論抗原的型態或抗體可變區序列，藉由將固定區由 IgG1 轉換為 M58 而改良血漿中停留時間之可能性。

實施例 10：CH1 域中半胱胺酸對於異質性與安定性之效果

如實施例 2 所示，將 IgG2 之鉸鏈區與 CH1 域之半胱胺酸予以取代以降低天然 IgG2 之異質性。各種經改變抗

體之估算顯現，可藉由使用 SKSC（序列編號：38）降低異質性而不減少安定性。SKSC（序列編號：38）為藉由於野生型 IgG2 固定區序列之 H-鏈 CH1 域中，EU 編號系統之位置 131 的半胱胺酸取代為絲胺酸以及位置 133 的精胺酸取代為離胺酸，以及 H-鏈上鉸鏈中，EU 編號系統之位置 219 的半胱胺酸取代為絲胺酸，所獲得之經改變固定區。

同時，用於降低異質性之另一可能方法為於 H-鏈上鉸鏈中，EU 編號系統之位置 219 的半胱胺酸取代為絲胺酸，或位置 220 的半胱胺酸取代為絲胺酸。藉由於 IgG2 中，EU 編號系統之位置 219 的半胱胺酸取代為絲胺酸製備之經改變 IgG2 固定區 SC（序列編號：39），以及 EU 編號系統之位置 220 的半胱胺酸取代為絲胺酸製備之經改變 IgG2 固定區 CS（序列編號：40）。由不同於 WT 之抗 IL-6 受體抗體之 F2H/L39（分別如前述胺基酸序列：29 與 30 之 F2H/L39_VH 與 F2H/L39_VL），分別製備具有 SC 與 CS 之 WT-SC（序列編號：41）與 WT-CS（序列編號：42），且與 WT-IgG1、WT-IgG2、WT-SKSC 與 WT-M58 比較異質性與熱安定性。再者，分別具有 IgG1（序列編號：1）、IgG2（序列編號：2）、SC（序列編號：39）、CS（序列編號：40）、SKSC（序列編號：38）或 M14（序列編號：5）之 F2H/L39-IgG1、F2H/L39-IgG2、F2H/L39-SC、F2H/L39-CS、F2H/L39-SKSC 與 F2H/L39-M14。抗體比較相關之異質性。

WT-IgG1、WT-IgG2、WT-SC、WT-CS、WT-SKSC、WT-M58、F2H/L39-IgG1、F2H/L39-IgG2、F2H/L39-SC、F2H/L39-CS、

F2H/L39-SKSC 與 F2H/L39-M14，使用充足的梯度與合適的流速，於 ProPac WCX-10 (Dionex)管柱(移動相 A：20 mM 乙酸鈉(pH 5.0)，移動相 B：20 mM 乙酸鈉/1M NaCl (pH 5.0))，藉由陽離子交換層析法，估算異質性。藉由陽離子交換層析法之估算，結果如第 17 圖所示。

如第 17 圖所示，固定區由 IgG1 型轉換為 IgG2 型，顯示於 WT 與 F2H/L39 兩者降低異質性。相對地，異質性藉由將固定區轉換為 SKSC 與 M14 或 M58 而顯著地降低。同時，如同於 SKSC 的情況，固定區轉換為 SC，顯著地降低異質性。然而，轉換為 CS 未顯著地改良異質性。

除了低異質性，一般而言，當抗體醫藥品開發中製備安定的配方物時，亦期望高安定性。因此，為了估算安定性，藉由示差掃描熱量計(DSC)(VP-DSC; Microcal)測定熱變形之中點溫度(T_m 值)。熱變形之中點溫度(T_m 值)作為安定性指標。為了製備安定配方物作為醫藥劑，較高的熱變形之中點溫度(T_m 值)為較佳(J. Pharm. Sci. 2008 Apr;97(4): 1414-26)。WT-IgG1、WT-IgG2、WT-SC、WT-CS、WT-SKSC 與 WT-M58，相對於 20 mM 乙酸鈉、150 mM NaCl，pH 6.0(EasySEP; TOMY)之溶液透析。DSC 測量係以 1°C/min 之加熱速率於 40 至 100°C 的範圍，且於蛋白質濃度約 0.1 mg/ml 進行。由 DSC 所獲得之變型曲線示於第 18 圖。Fab 域之 T_m 值如表 4 所示。

表 4

T _m /°C

WT-IgG1	94.8
WT-IgG2	93.9
WT-SC	86.7
WT-CS	86.4
WT-SKSC	93.7
WT-M58	93.7

WT-IgG1 與 WT-IgG2 之 T_m 值約為相同 (約 94°C ; IgG2 之 T_m 約低 1°C)。同時，WT-SC 與 WT-CS 之 T_m 值約為 86°C ，其顯著低於 WT-IgG1 與 WT-IgG2 之 T_m 值。另一方面，WT-M58 與 WT-SKSC 之 T_m 值約為 94°C ，與 WT-IgG1 與 WT-IgG2 之 T_m 值相當。相較於 IgG2，WT-SC 與 WT-CS 明顯地不安定，且因此兩者皆包括 CH1 域之半胱氨酸取代為絲氨酸之 WT-SKSC 與 WT-M58，於抗體醫藥品開發中為較佳。相對於 IgG2，顯著地降低 WT-SC 與 WT-CS 之 T_m 的理由，咸信為 WT-SC 或 WT-CS 與 IgG2 之間雙硫鍵型式的差異。

再者，DSC 變性曲線之比較顯示，WT-IgG1、WT-SKSC 與 WT-M58 對於 Fab 域，各具有尖銳且單一的變性峰。相對地，WT-SC 與 WT-CS 對於 Fab 域，各獲得較寬廣的變性峰。WT-IgG2 亦於 Fab 域變性峰之較低溫度測獲得肩峰。一般而言，認為單一組成分獲得尖銳 DSC 變性峰，而當有不同 T_m 值之兩個或更多個組成分時 (亦即為異質性) 存在時，變性峰變為較寬廣。具體而言，上述結果建議 WT-IgG2、WT-SC 與 WT-CS 之各者含有兩個或更多個組成份之可能性，且因此天然-IgG2 異質性未顯著地於 WT-SC 與

WT-CS 中降低。此發現建議不僅是鉸鏈區的半胱胺酸，CH1 域的半胱胺酸亦相關於野生型-IgG 異質性，且不僅鉸鏈區的半胱胺酸需要改變，CH1 域的半胱胺酸亦需要改變以降低 DSC 異質性。再者，如上所述，與野生型 IgG2 相當的安定性，僅當鉸鏈區與 CH1 域的半胱胺酸兩者皆被取代時始可為之降低。

由上述可發現，異質性與安定性的觀點，固定區僅將絲胺酸取代鉸鏈區的半胱胺酸之 SC 與 CS，不足以作為降低源自 IgG2 鉸鏈區之異質性的固定區。因而發現異質性可顯著地降低而維持 IgG2-相等的安定性，僅當除了鉸鏈區的半胱胺酸之外，CH1 域中，EU 編號系統之位置 131 的半胱胺酸取代為絲胺酸時。該等固定區包含上述之 M14、M31、M58 與 M73。特別地，M58 與 M73 為安定的且較少異質性，且顯現改良的血漿中停留時間，且因此期望非常有用於作為抗體醫藥品之固定區。

實施例 11：具有改良的 PK/KD 之完全人源化抗-IL-6 受體抗體之產生

為了產生具有改良的 PK/KD 之完全人源化抗-IL-6 受體抗體，藉由改變 TOCILIZUMAB (H 鏈，WT-IgG1 (序列編號：12)；L 鏈，WT (序列編號：15)創造下述分子。使用實施例 7 所製備之 M73 或 M83 作為固定區，製備下述完整地人源化 IL-6 受體抗體： Fv3-M73 (H 鏈，VH4-M73，序列編號：48；L 鏈，VL1-kappa，序列編號：49)、Fv4-M73 (H 鏈，VH3-M73，序列編號：46；L 鏈，VL3-kappa，序

列編號：47)與 Fv5-M83 (H 鏈，VH5-M83，序列編號：44；
L 鏈，VL5-kappa，序列編號：45)。

比較所製備之 Fv3-M73、Fv4-M73 與 Fv5-M83 抗 IL-6 受體之親和性與 TOCILIZUMAB。測定該等抗-IL-6 受體抗體之親和性，如表 5 所示(參照參考例之方法)。再者，其等之 BaF/gp130-中和活性與 TOCILIZUMAB 及對照組(揭示於參考例之已知高親和性抗-IL-6 受體抗體，以及揭示於 US 2007/0280945 之 VQ8F11-21 hIgG1)相比較(參照參考例之方法)。使用 BaF/gp130 測定該等抗體之生物活性所獲得的結果顯示於第 19 圖(TOCILIZUMAB、對照組與具有最終 IL-6 濃度為 300 ng/ml 之 Fv5-M83)與第 20 圖(TOCILIZUMAB 與具有最終 IL-6 濃度為 30 ng/ml 之 Fv3-M73 與 Fv4-M73)。如表 5 所示，Fv3-M73 與 Fv4-M73 比 TOCILIZUMAB 具有約 2 至 3 倍較高的親和性，而 Fv5-M83 顯現比 TOCILIZUMAB 較高 100 倍之親和性(由於難以測量 Fv5-M83 之親和性，取代使用 Fv5-IgG1 測量親和性，Fv5-IgG1 具有 IgG1-型固定區；一般認為該固定區對於親和性無效果)。如第 20 圖所示，Fv3-M73 與 Fv4-M73 較 TOCILIZUMAB 顯現較強活性。如第 19 圖所示，Fv5-M83 具有非常強活性，由 50%抑制濃度的觀點，其較 TOCILIZUMAB 為高 100 倍。由 50%抑制濃度的觀點，相較於對照組(已知高親和性抗-IL-6 受體抗體)，Fv5-M83 亦顯示約 10 倍的較高中和活性。

表 5

	$k_a(1/MS)$	$k_d(1/s)$	$KD(M)$
TOCILIZUMAB	4.0E+05	1.1E-03	2.7E-09
Fv3-M73	8.5E+05	8.7E-04	1.0E-09
Fv4-M73	7.5E+05	1.0E-03	1.4E-09
Fv5-M83	1.1E+06	2.8E-05	2.5E-011

TOCILIZUMAB、對照組、Fv3-M73、Fv4-M73 與 Fv5-M83 之等電點，使用此項技術領域中已知方法藉由等電點沉澱法(isoelectric focusing)測定。結果顯示 TOCILIZUMAB 之等電點為約 9.3；對照組為約 8.4 至 8.5；Fv3-M73 為約 5.7 至 5.8；Fv4-M73 為約 5.6 至 5.7；且 Fv5-M83 為約 5.4 至 5.5。因此，相較於 TOCILIZUMAB 與對照組，各抗體具有顯著較低的等電點。再者，可變區 VH/VL 的理論等電點由 GENETYX (GENETYX CORPORATION) 計算。結果顯示 TOCILIZUMAB 之理論等電點為 9.20；對照組為 7.79；Fv3-M73 為 5.49；Fv4-M73 為 5.01；以及 Fv5-M83 為 4.27。因此，當相較於 TOCILIZUMAB 與對照組，各抗體具有顯著較低的等電點。因此，當相較於 TOCILIZUMAB 與對照組，認為 Fv3-M73、Fv4-M73 與 Fv5-M83 之血將停留時間有改良。

使用 TEPITOPE (Methods. 2004 Dec;34(4) : 468-75)，分析 TOCILIZUMAB、Fv3-M73、Fv4-M73 或 Fv5-M83 之可變區序列中之 T-細胞抗原決定基。其結果，推測 TOCILIZUMAB 具有 T-細胞抗原決定基，其中多者可結合至

HLA。相對地，推測結合至 T-細胞抗原決定基之序列的數目，於 Fv3-M73、Fv4-M73 與 Fv5-M83 中顯著降低。此外，Fv3-M73、Fv4-M73 或 Fv5-M83 之框架沒有老鼠序列且因而為完全人源化。相較於 TOCILIZUMAB，Fv3-M73、Fv4-M73 與 Fv5-M83 的免疫性風險顯著地降低。

實施例 12：完全人源化之抗-IL-6 受體抗體於猴中之 PK/PD 測試

TOCILIZUMAB、Fv3-M73、Fv4-M73 與 Fv5-M83 各者，以 1 mg/kg 之劑量，對食蟹猴靜脈內投藥一次以估算其血漿濃度之時間歷程（參照參考例之方法）。靜脈投藥後，TOCILIZUMAB、Fv3-M73、Fv4-M73 與 Fv5-M83 之血漿濃度時間歷程如第 21 圖所示。比較 TOCILIZUMAB，Fv3-M73、Fv4-M73 與 Fv5-M83 之各者於食蟹猴顯現顯著地經改良的血漿停留時間，其中，相較於 TOCILIZUMAB，Fv3-M73 與 Fv4-M73 顯現實質上經改良的血漿停留時間。

估算各抗體對中和膜結合食蟹猴 IL-6 受體之效用。於抗體投藥後第 6 日至第 18 日（第 3 日至第 10 日為 TOCILIZUMAB），以每日降低 5 μ g/kg，皮下投藥食蟹猴 IL-6 受體，且於各動物中之 CRP 濃度於 24 小時後測定（參照參考例之方法）。各動物投藥後之 CRP 濃度的時間歷程示於第 22 圖。為了估算各動物對中和可溶食蟹猴 IL-6 受體之效用，測定食蟹猴中游離可溶食蟹猴 IL-6 受體的血漿濃度，以及計算可溶 IL-6 受體中和的百分比（參照參考例之

方法)。各動物投藥後，可溶 IL-6 受體中和的百分比之時間歷程示於第 23 圖。

相較於 TOCILIZUMAB 與對照組(已知高親和性抗-IL-6 受體抗體)，Fv3-M73、Fv4-M73 與 Fv5-M83 之各者，中和膜結合食蟹猴 IL-6 受體為較持續的方式，且於長時期壓抑 CRP 的增加。再者，相較於 TOCILIZUMAB 與對照組，Fv3-M73、Fv4-M73 與 Fv5-M83 中和膜結合食蟹猴 IL-6 受體為較持續的方式，且於長時期抑制游離可溶食蟹猴 IL-6 受體的增加。該等發現顯示，相較於 TOCILIZUMAB 與對照組，Fv3-M73、Fv4-M73 與 Fv5-M83 皆為優異於膜結合與可溶 IL-6 受體之持續的中和。其中，Fv3-M73 與 Fv4-M73 為顯著地優異於持續中和。同時，Fv5-M83 比 Fv3-M73 與 Fv4-M73，更強力地壓抑 CRP 與游離可溶食蟹猴 IL-6 受體。因此，Fv5-M83 於中和膜結合與可溶 IL-6 受體，比 Fv3-M73、Fv4-M73 及對照組(已知高親和性抗-IL-6 受體抗體)更強。考慮該等食蟹猴之活體結果，反映 Fv5-M83 對於 IL-6 受體之較強親和性以及 Fv5-M83 於 BaF/gp130 分析系統中，相對於對照組之較強的生物活性。

相較於 TOCILIZUMAB 與對照組，Fv3-M73 與 Fv4-M73 為高度優異於持續其作為抗-IL-6 受體中和抗體之活性，且因此能顯著地降低投藥的劑量與頻率。再者，由作為抗-IL-6 受體-中和抗體而言，Fv5-M83 顯示顯著的強力活性以及持續其活性。因此，Fv3-M73、Fv4-M73 與 Fv5-M83 期望有用於作為醫藥之 IL-6 拮抗劑。

參考例

可溶重組食蟹猴(cynomolgus monkey)IL-6 受體(cIL-6R)之製備

寡-DNA 引子根據揭示於恆河猴(Rhesus monkeys)IL-6 受體之基因序列而製備(Birney *et al.*, Ensembl 2006, Nucleic Acids Res. 2006 Jan 1;34 (Database issue): D556-61)。編碼完整之食蟹猴 IL-6 受體的 DNA 片段，使用引子、以及由食蟹猴之胰臟所製備之 cDNA 作為模板，藉由 PCR 製備。所得 DNA 片段插入動物細胞表現載體，且使用載體製備穩定表現 CHO 細胞株(cyno.sIL-6R-產生 CHO 細胞株)。cyno.sIL-6R-產生 CHO 細胞株之培養基，使用 HisTrap column (GE Healthcare Bioscience)純化後以 Amicon Ultra-15 Ultracel-10k (Millipore)濃縮。經由 Superdex200pg16/60 凝膠過濾管柱(GE Healthcare Bioscience)之進一步純化，獲得可溶食蟹猴 IL-6 受體(後文稱為 cIL-6R)之最終經純化樣品。

重組食蟹猴 IL-6(cIL-6)之製備

食蟹猴 IL-6 藉由下述步驟製備。製備寄存於 SWISSPROT 存取編號 P79341 之編碼 212 個胺基酸之核苷酸且經純株化至動物表現載體。所得載體導入 CHO 細胞以製備穩定表現 CHO 細胞株(cyno. IL-6R-產生 CHO 細胞株)。cyno.sIL-6R-產生 CHO 細胞株之培養基，使用 SP-Sepharose/FF 管柱(GE Healthcare Bioscience)純化

後以 Amicon Ultra-15 Ultracel-5k (Millipore)濃縮。經由 Superdex75pg26/60 凝膠過濾管柱(GE Healthcare Bioscience)之進一步純化，且以 Amicon Ultra-15 Ultracel-5k (Millipore)濃縮後，獲得可溶食蟹猴 IL-6(後文稱為 cIL-6)之最終經純化樣品。

已知高親和性抗-IL-6 受體抗體之製備

構築表現 VQ8F11-21 hIgG1(已知高親和性抗-IL-6 受體抗體)之動物細胞表現載體。VQ8F11-21 hIgG1 揭示於美國專利 US 2007/0280945 A1 (US 2007/0280945 A1; H 鏈與 L 鏈之胺基酸序列 分別如前述序列編號:19 與 27)。抗體可變區使用合成寡 DNAs 之組合藉由 PCR 構築(組裝 PCR(assembly PCR)。IgG1 使用作為固定區。抗體可變區與固定區藉由組裝 PCR 一起組合後，插入動物細胞表現載體以構築感興趣之 H 鏈與 L 鏈之表現載體。所得表現載體之核苷酸序列藉由此項技術領域具有通常知識者已知方法測定。高親和性抗-IL-6 受體抗體(後文簡稱為「對照組」)，藉由實施例 1 揭示之方法使用所構築之表現載體表現與純化。

藉由人類 gp130-表現 BaF3 細胞(BaF/gp130)估算生物活性

IL-6 受體中和活性，係使用 IL-6/IL-6 受體-依賴方式增殖之 BaF3/gp130 估算。以補充有 10%FBS 之 RPMI1640

清洗三次後，BaF3/gp130 細胞以 5×10^4 細胞/ml 懸浮於補充有 600 ng/ml 或 60 ng/ml 之人類介白素-6 (TORAY) (分別為 300 ng/ml 或 30 ng/ml 之最終濃度)、合適量的重組可溶人類 IL-6 受體 (SR344) 與 10%FBS 之 RPMI1640。細胞懸浮液分散於 ($50 \mu\text{l}$ /孔) 96-孔盤 (CORNING)。然後，經純化之抗體以含有 10%FBS 之 RPMI1640 稀釋，且添加至各孔 ($50 \mu\text{l}$ /孔)。細胞於 37°C 、5% CO_2 培養 3 日。WST-8 Reagent (Cell Counting Kit-8; Dojindo Laboratories) 以 PBS 稀釋兩倍。於 $20 \mu\text{l}$ 之該試劑添加至各孔後，使用 SUNRISE CLASSIC (TECAN) 立即測定波長 450nm (參考波長 620 nm) 之吸收。培養 2 小時後，再次測定波長 450nm (參考波長 620 nm) 之吸收。使用兩小時間波長的變化作為指標，估算 IL-6 受體中和活性。

結合至 IL-6 受體之 Biacore 為基準之分析

抗原-抗體反應動力學使用 Biacore T100 (GE Healthcare) 分析。SR344-抗體交互作用，係藉由將合適量之抗-IgG (γ -鏈專一性) F(ab')₂ 以胺偶合法固定至感應晶片，感興趣之抗體於 pH7.4 結合至晶片，然後於晶片流入於 pH7.4 經調整為各種濃度之 IL-6 受體 SR344 作為分析物。所有測量於 37°C 進行。動力學參數、結合速率常數 k_a (1/MS) 及解離速率常數 k_d (1/s)，由測量所獲得之感應圖譜計算。然後，根據速率常數決定 K_D (M)。使用 Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare) 決

定各別參數。

於猴中決定抗體、CRP與游離可溶 IL-6 受體之血漿濃度之 PK/PD 測試

於食蟹猴中之血漿濃度，係使用此項技術領域中具有通常知識者習知之方法藉由 ELISA 測定。

CRP 之濃度，使用 Cias R CRP (KANTO CHEMICAL CO., INC.)，以自動分析儀 (TBA-120FR; Toshiba Medical Systems Co.) 測定。

游離可溶食蟹猴 IL-6 受體於食蟹猴之血漿濃度係藉由下述步驟測定。血漿中所有 IgG 抗體 (食蟹猴 IgG、抗-人類 IL-6 受體抗體與抗-人類 IL-6 受體抗體-可溶食蟹猴 IL-6 受體複合物)，藉由上料 30 μ l 之食蟹猴血漿至合適量之經 0.22- μ m 過濾杯 (Millipore) 乾燥之 rProtein A Sepharose Fast Flow resin (GE Healthcare)，而吸附至 Protein A。然後，杯中的溶液使用高速離心機旋轉以收集通過之溶液。通過之溶液不含有 Protein A-結合之抗-人類 IL-6 受體抗體-可溶食蟹猴 IL-6 受體複合物。因此，游離可溶 IL-6 受體之濃度，可藉由測量通過 Protien A 之溶液中可溶食蟹猴 IL-6 受體之濃度而測定。可溶食蟹猴 IL-6 受體之濃度係使用此項技術領域中具有通常知識者習知之用於測量可溶人類 IL-6 受體之方法測定。如上述所製備之可溶食蟹猴 IL-6 受體 (cIL-6R) 係使用作為標準品。

然後可溶 IL-6 受體中和之百分比係由下述公式計算。

$$\frac{\text{抗體投藥後之游離的可溶IL-6受體濃度}}{\text{抗體投藥前之可溶IL-6受體濃度}} \times 100$$

【圖式簡單說明】

第 1 圖顯示使用凝膠過濾層析法分析經氫氯酸溶出液純化之 WT-IgG1、WT-IgG2、WT-IgG4、IgG2-M397V 與 IgG4-R409K 中凝集物含量的結果圖。

第 2 圖顯示 WT-IgG1、WT-IgG2 與 WT-IgG4 之陽離子交換樹脂(IEC)的結果圖。

第 3 圖顯示 WT-IgG2 之鉸鏈區中雙硫鍵的預測圖。

第 4 圖顯示 IgG2-SKSC 之鉸鏈區中雙硫鍵的預測圖。

第 5 圖顯示 WT-IgG2 與 IgG2-SKSC 之陽離子交換樹脂(IEC)的結果圖。

第 6 圖顯示人源化 PM-1 抗體、H 鏈 C-終端 Δ K 抗體以及 H 鏈 C-終端 Δ GK 抗體之陽離子交換樹脂(IEC)的結果圖。

第 7 圖顯示 WT-IgG1、WT-IgG2、WT-IgG4、WT-M14 Δ GK、WT-M17 Δ GK 與 WT-M11 Δ GK 結合至 Fc γ RI 之量的比較圖。

第 8 圖顯示 WT-IgG1、WT-IgG2、WT-IgG4、WT-M14 Δ GK、WT-M17 Δ GK 與 WT-M11 Δ GK 結合至 Fc γ RIIa 之量的比較圖。

第 9 圖顯示 WT-IgG1、WT-IgG2、WT-IgG4、WT-M14 Δ GK、WT-M17 Δ GK 與 WT-M11 Δ GK 結合至 Fc γ RIIb 之量的比較圖。

第 10 圖顯示 WT-IgG1、WT-IgG2、WT-IgG4、

WT-M14 Δ GK、WT-M17 Δ GK 與 WT-M11 Δ GK 結合至 Fc γ R IIIa (Val)之量的比較圖。

第 11 圖顯示於高濃度對於 WT-IgG1、WT-IgG2、WT-IgG4、WT-M14 Δ GK、WT-M17 Δ GK 與 WT-M11 Δ GK 之安定性測試中凝集增加的結果圖。

第 12 圖顯示於高濃度對於 WT-IgG1、WT-IgG2、WT-IgG4、WT-M14 Δ GK、WT-M17 Δ GK 與 WT-M11 Δ GK 之安定性測試中 Fab 片段增加的結果圖。

第 13 圖顯示於高濃度對於 WT-IgG2、WT-M14 Δ GK 與 WT-M31 Δ GK 之陽離子交換樹脂(IEC)的結果圖。

第 14 圖顯示對人類 FcRn 基因轉殖鼠靜脈投藥 WT-IgG1 與 WT-M14 後之血漿濃度時程圖。

第 15 圖顯示對人類 FcRn 基因轉殖鼠靜脈投藥 WT-IgG1、WT-M44、WT-M58 與 WT-M73 後之血漿濃度時程圖。

第 16 圖顯示藉由抗 IL-6 受體抗體 WT 與 F2H/L39、抗 -IL-31 受體抗體 H0L0 以及抗 RANKL 抗體 DNS 之對於異質性之陽離子交換層析為主之效果評估圖。

第 17 圖顯示藉由抗 IL-6 受體抗體 WT 與 F2H/L39 之 CH1 域半胱胺酸對於異質性之陽離子交換層析為主之效果評估圖。

第 18 圖顯示藉由抗 IL-6 受體抗體 WT 之 CH1 域半胱胺酸對於變性峰(denaturation peak)之 DSC 為主之效果評估圖。

第 19 圖顯示 TOCILIZUMAB、對照組與 Fv5-M83 中和

BaF/g130 之活性圖。

第 20 圖顯示 TOCILIZUMAB、Fv3-M73 與 Fv4-M73 中和 BaF/gp130 之活性圖。

第 21 圖顯示於食蟹猴靜脈投藥後 TOCILIZUMAB、對照組、Fv3-M73、Fv4-M73 與 Fv5-M83 之血漿濃度時程。

第 22 圖顯示於食蟹猴之 TOCILIZUMAB、對照組、Fv3-M73、Fv4-M73 或 Fv5-M83 之靜脈投藥後，CRP 濃度的時程圖。

第 23 圖顯示食蟹猴之 TOCILIZUMAB、對照組、Fv3-M73、Fv4-M73 或 Fv5-M83 之靜脈投藥後，可溶 IL-6 受體中和百分比的時程圖。

第 24 圖顯示對人類 FcRn 基因轉殖鼠靜脈投藥 WT-IgG1、WT-M44 與 WT-M58 後之血漿濃度時程圖。

【主要元件符號說明】

無

序列表

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Antibody constant region mutant

<130> C1-A0709P

<150> JP 2007-250147

<151> 2007-09-26

<160> 58

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190His 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> 2
<211> 326
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

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> 3
<211> 327
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 3

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 Pro 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> 4
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

<223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 4

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

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

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

Val Ser 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

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala 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 Val 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> 5
<211> 324
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 5

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

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

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

Val Ser 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

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala 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 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro

<210> 6
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 6

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140
Val Ser 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 Val 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> 7
<211> 324
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 7

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 Glu₃₅ Pro Val Thr Val Ser₄₀ Trp Asn Ser Gly₄₅ Ala Leu Thr Ser
 Gly Val₅₀ His Thr Phe Pro Ala₅₅ Val Leu Gln Ser Ser₆₀ Gly Leu Tyr Ser
 Leu₆₅ Ser Ser Val Val Thr₇₀ Val Pro Ser Ser₇₅ Asn Phe Gly Thr Gln Thr₈₀
 Tyr Thr Cys Asn₈₅ Val Asp His Lys Pro Ser₉₀ Asn Thr Lys Val Asp₉₅ Lys
 Thr Val Glu Arg₁₀₀ Lys Ser Cys Val Glu₁₀₅ Cys Pro Pro Cys Pro₁₁₀ Ala Pro
 Pro Val Ala₁₁₅ Gly Pro Ser Val Phe₁₂₀ Leu Phe Pro Pro Lys₁₂₅ Pro Lys Asp
 Thr Leu₁₃₀ Met Ile Ser Arg Thr₁₃₅ Pro Glu Val Thr Cys₁₄₀ Val Val Val Asp
 Val₁₄₅ Ser His Glu Asp Pro₁₅₀ Glu Val Gln Phe Asn₁₅₅ Trp Tyr Val Asp Gly₁₆₀
 Val Glu Val His Asn₁₆₅ Ala Lys Thr Lys Pro₁₇₀ Arg Glu Glu Gln Phe₁₇₅ Asn
 Ser Thr Phe Arg₁₈₀ Val Val Ser Val Leu₁₈₅ Thr Val Val His Gln₁₉₀ Asp Trp
 Leu Asn Gly₁₉₅ Lys Glu Tyr Lys Cys₂₀₀ Lys Val Ser Asn Lys₂₀₅ Gly Leu Pro
 Ala Pro₂₁₀ Ile Glu Lys Thr Ile₂₁₅ Ser Lys Thr Lys Gly₂₂₀ Gln Pro Arg Glu
 Pro₂₂₅ Gln Val Tyr Thr Leu₂₃₀ Pro Pro Ser Arg Glu₂₃₅ Glu Met Thr Lys Asn₂₄₀
 Gln Val Ser Leu Thr₂₄₅ Cys Leu Val Lys Gly₂₅₀ Phe Tyr Pro Ser Asp₂₅₅ Ile
 Ala Val Glu Trp₂₆₀ Glu Ser Asn Gly Gln₂₆₅ Pro Glu Asn Asn Tyr₂₇₀ Lys Thr
 Thr Pro Pro₂₇₅ Val Leu Asp Ser Asp₂₈₀ Gly Ser Phe Phe Leu₂₈₅ Tyr Ser Lys
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 Ser₃₀₅ Val Met His Glu Ala₃₁₀ Leu His Asn His Tyr₃₁₅ Thr Gln Lys Ser Leu₃₂₀
 Ser Leu Ser Pro

<210> 8
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 8

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 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

Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

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

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140

Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu 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

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255

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

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

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 9
<211> 324
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 9

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 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

Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

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

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn

165170175

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp

180185190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro

195200205

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu

210215220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn

225230235240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

245250255

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

260265270

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys

275280285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys

290295300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu

305310315320

Ser Leu Ser Leu

<210> 10

<211> 329

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 10

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

151015

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

202530

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

354045

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

505560

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65707580

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

<210> 11
<211> 327
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 11

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
Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
115 120 125
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
130 135 140
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
145 150 155 160
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
165 170 175
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
180 185 190
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
195 200 205
Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
210 215 220
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
225 230 235 240
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
245 250 255
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
260 265 270
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
275 280 285
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val

290 295 300

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 305 310 315 320

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325

<210> 12
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 12

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

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

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

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

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

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

Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser 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> 13
- <211> 445
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> An artificially synthesized peptide sequence
- <400> 13

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 Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

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

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

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

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

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

<210> 14
<211> 446
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 14

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 Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser 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 Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly 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 Gln Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe 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 Gly Leu Pro Ser Ser 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 Gln Glu Glu Met 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 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Glu 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 Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 15
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 15

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu
100 105

<210> 16
<211> 445
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 16

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 Cys Ser Arg	Ser Thr Ser Glu Ser	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
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly	Val His Thr Phe Pro Ala Val	Leu	
	165	170	175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu	Ser Ser Val Val Thr Val	Pro Ser	
	180	185	190
Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr	Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro		
	195	200	205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys	Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu		
	210	215	220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro	Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu		
	225	230	235
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr	Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro	Glu	
	245	250	255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val	Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln		
	260	265	270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val	Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
	275	280	285
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser	Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu		
	290	295	300
Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu	Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
	305	310	315
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
	325	330	335

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

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

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

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

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

<210> 17
<211> 446
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 17

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 Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser 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 Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro					
	195	200	205		
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro					
	210	215	220		
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly 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 Gln Glu Asp Pro Glu Val					
	260	265	270		
Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr					
	275	280	285		
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe 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	
	325	330	335		
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro					
	340	345	350		
Ser Gln Glu Glu Met 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 Glu 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 Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 18
<211> 445
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 18

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 Glu Ser Thr Ala Ala Leu
130 135 140

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

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

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

Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
195 200 205

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

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu

225

230

235

240

Phe

Pro

Pro

Lys

Pro₂₄₅

Lys

Asp

Thr

Leu

Met₂₅₀

Ile

Ser

Arg

Thr

Pro₂₅₅

Glu

Val

Thr

Cys

Val₂₆₀

Val

Val

Asp

Val

Ser₂₆₅

His

Glu

Asp

Pro

Glu₂₇₀

Val

Gln

Phe

Asn

Trp₂₇₅

Tyr

Val

Asp

Gly

Val₂₈₀

Glu

Val

His

Asn

Ala₂₈₅

Lys

Thr

Lys

Pro

Arg₂₉₀

Glu

Glu

Gln

Phe

Asn₂₉₅

Ser

Thr

Phe

Arg

Val₃₀₀

Val

Ser

Val

Leu

Thr₃₀₅

Val

Val

His

Gln

Asp₃₁₀

Trp

Leu

Asn

Gly

Lys₃₁₅

Glu

Tyr

Lys

Cys

Lys₃₂₀

Val

Ser

Asn

Lys

Gly₃₂₅

Leu

Pro

Ala

Pro

Ile₃₃₀

Glu

Lys

Thr

Ile

Ser₃₃₅

Lys

Thr

Lys

Gly

Gln₃₄₀

Pro

Arg

Glu

Pro

Gln₃₄₅

Val

Tyr

Thr

Leu

Pro₃₅₀

Pro

Ser

Arg

Glu

Glu₃₅₅

Met

Thr

Lys

Asn

Gln₃₆₀

Val

Ser

Leu

Thr

Cys₃₆₅

Leu

Val

Lys

Gly

Phe₃₇₀

Tyr

Pro

Ser

Asp

Ile₃₇₅

Ala

Val

Glu

Trp

Glu₃₈₀

Ser

Asn

Gly

Gln

Pro₃₈₅

Glu

Asn

Asn

Tyr

Lys₃₉₀

Thr

Thr

Pro

Pro

Met₃₉₅

Leu

Asp

Ser

Asp

Gly₄₀₀

Ser

Phe

Phe

Leu

Tyr₄₀₅

Ser

Lys

Leu

Thr

Val₄₁₀

Asp

Lys

Ser

Arg

Trp₄₁₅

Gln

Gln

Gly

Asn

Val₄₂₀

Phe

Ser

Cys

Ser

Val₄₂₅

Met

His

Glu

Ala

Leu₄₃₀

His

Asn

His

Tyr

Thr₄₃₅

Gln

Lys

Ser

Leu

Ser₄₄₀

Leu

Ser

Pro

Gly

Lys₄₄₅

<210>

19

<211>

443

<212>

PRT

<213>

Artificial

<220>

<223>

An artificially synthesized peptide sequence

<400>

19

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 Trp₃₅ Ser Trp Val Arg Gln₄₀ Pro Pro Gly Arg Gly₄₅ Leu Glu Trp
 Ile Gly₅₀ Tyr Ile Ser Tyr Ser₅₅ Gly Ile Thr Thr Tyr₆₀ Asn Pro Ser Leu
 Lys₆₅ Ser Arg Val Thr Met₇₀ Leu Arg Asp Thr Ser₇₅ Lys Asn Gln Phe Ser₈₀
 Leu Arg Leu Ser Ser₈₅ Val Thr Ala Ala Asp₉₀ Thr Ala Val Tyr Tyr₉₅ Cys
 Ala Arg Ser Leu₁₀₀ Ala Arg Thr Thr Ala₁₀₅ Met Asp Tyr Trp Gly₁₁₀ Gln Gly
 Ser Leu Val₁₁₅ Thr Val Ser Ser Ala₁₂₀ Ser Thr Lys Gly Pro₁₂₅ Ser Val Phe
 Pro Leu₁₃₀ Ala Pro Ser Ser Lys₁₃₅ Ser Thr Ser Gly Gly₁₄₀ Thr Ala Ala Leu
 Gly₁₄₅ Cys Leu Val Lys Asp₁₅₀ Tyr Phe Pro Glu Pro₁₅₅ Val Thr Val Ser Trp₁₆₀
 Asn Ser Gly Ala Leu₁₆₅ Thr Ser Gly Val His₁₇₀ Thr Phe Pro Ala Val₁₇₅ Leu
 Gln Ser Ser Gly₁₈₀ Leu Tyr Ser Leu Ser₁₈₅ Ser Val Val Thr Val₁₉₀ Pro Ser
 Ser Asn Phe₁₉₅ Gly Thr Gln Thr Tyr₂₀₀ Thr Cys Asn Val Asp₂₀₅ His Lys Pro
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys₂₁₅ Thr Val Glu Arg Lys₂₂₀ Ser Cys Val Glu
 Cys₂₂₅ Pro Pro Cys Pro Ala₂₃₀ Pro Pro Val Ala Gly₂₃₅ Pro Ser Val Phe Leu₂₄₀
 Phe Pro Pro Lys Pro₂₄₅ Lys Asp Thr Leu Met₂₅₀ Ile Ser Arg Thr Pro₂₅₅ Glu
 Val Thr Cys Val₂₆₀ Val Val Asp Val Ser₂₆₅ His Glu Asp Pro Glu₂₇₀ Val Gln
 Phe Asn Trp₂₇₅ Tyr Val Asp Gly Val₂₈₀ Glu Val His Asn Ala₂₈₅ Lys Thr Lys
 Pro Arg₂₉₀ Glu Glu Gln Phe Asn₂₉₅ Ser Thr Phe Arg Val₃₀₀ Val Ser Val Leu
 Thr₃₀₅ Val Val His Gln Asp₃₁₀ Trp Leu Asn Gly Lys₃₁₅ Glu Tyr Lys Cys Lys₃₂₀
 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys

325 330 335
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440
 <210> 20
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> An artificially synthesized peptide sequence
 <400> 20
 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										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	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser														
				230							235				240														
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg														
				245					250					255															
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro														
			260					265					270																
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala														
		275					280						285																
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val														
	290					295					300																		
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr														
	305				310						315				320														
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr														
				325					330					335															
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu														
			340					345					350																
Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys														
		355					360						365																
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser														
		370				375							380																
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp														
					390						395				400														
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser														
				405					410					415															
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala														
			420					425					430																

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

<210> 21
<211> 443
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 21

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 Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
195 200 205

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

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys ^{Pro}₂₄₅ Lys Asp Thr Leu ^{Met}₂₅₀ Ile Ser Arg Thr ^{Pro}₂₅₅ Glu

Val Thr Cys ^{Val}₂₆₀ Val Val Asp Val ^{Ser}₂₆₅ Gln Glu Asp Pro ^{Glu}₂₇₀ Val Gln

Phe Asn ^{Trp}₂₇₅ Tyr Val Asp Gly ^{Val}₂₈₀ Glu Val His Asn ^{Ala}₂₈₅ Lys Thr Lys

Pro ^{Arg}₂₉₀ Glu Glu Gln Phe ^{Asn}₂₉₅ Ser Thr Tyr Arg ^{Val}₃₀₀ Val Ser Val Leu

^{Thr}₃₀₅ Val Leu His Gln ^{Asp}₃₁₀ Trp Leu Asn Gly ^{Lys}₃₁₅ Glu Tyr Lys Cys ^{Lys}₃₂₀

Val Ser Asn Lys ^{Gly}₃₂₅ Leu Pro Ser Ser ^{Ile}₃₃₀ Glu Lys Thr Ile ^{Ser}₃₃₅ Lys

Ala Lys Gly ^{Gln}₃₄₀ Pro Arg Glu Pro ^{Gln}₃₄₅ Val Tyr Thr Leu ^{Pro}₃₅₀ Pro Ser

Gln Glu ^{Glu}₃₅₅ Met Thr Lys Asn ^{Gln}₃₆₀ Val Ser Leu Thr ^{Cys}₃₆₅ Leu Val Lys

Gly ^{Phe}₃₇₀ Tyr Pro Ser Asp ^{Ile}₃₇₅ Ala Val Glu Trp ^{Glu}₃₈₀ Ser Asn Gly Gln

^{Pro}₃₈₅ Glu Asn Asn Tyr ^{Lys}₃₉₀ Thr Thr Pro Pro ^{Val}₃₉₅ Leu Asp Ser Asp ^{Gly}₄₀₀

Ser Phe Phe Leu ^{Tyr}₄₀₅ Ser Lys Leu Thr ^{Val}₄₁₀ Asp Lys Ser Arg ^{Trp}₄₁₅ Gln

Glu Gly Asn ^{Val}₄₂₀ Phe Ser Cys Ser ^{Val}₄₂₅ Met His Glu Ala ^{Leu}₄₃₀ His Asn

His Tyr ^{Thr}₄₃₅ Gln Lys Ser Leu ^{Ser}₄₄₀ Leu Ser Leu

<210> 22
<211> 443
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 22

Gln Val Gln Leu ^{Gln}₅ Glu Ser Gly Pro ^{Gly}₁₀ Leu Val Arg Pro ^{Ser}₁₅ Gln

Thr Leu Ser ^{Leu}₂₀ Thr Cys Thr Val ^{Ser}₂₅ Gly Tyr Ser Ile ^{Thr}₃₀ Ser Asp

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

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 Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

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

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

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

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

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

<210> 23
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 23

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 24
<211> 267
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

Ala Glu Ser His Leu Ser Leu Leu Tyr His Leu Thr Ala Val Ser Ser
1 5 10 15

Pro Ala Pro Gly Thr Pro Ala Phe Trp Val Ser Gly Trp Leu Gly Pro
20 25 30

Gln Gln Tyr Leu Ser Tyr Asn Ser Leu Arg Gly Glu Ala Glu Pro Cys
35 40 45

Gly Ala Trp Val Trp Glu Asn Gln Val Ser Trp Tyr Trp Glu Lys Glu
50 55 60

Thr Thr Asp Leu Arg Ile Lys Glu Lys Leu Phe Leu Glu Ala Phe Lys
65 70 75 80

Ala Leu Gly Gly Lys Gly Pro Tyr Thr Leu Gln Gly Leu Leu Gly Cys
85 90 95

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

<210> 25
<211> 99
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 25
Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg His Pro Ala Glu
1 5 10 15
Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser Gly Phe His Pro
20 25 30
Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu Arg Ile Glu Lys
35 40 45
Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Leu
50 55 60
Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala Cys
65 70 75 80
Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp Asp

85

90

95

Arg Asp Met

<210> 26
<211> 443
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 26

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 Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
195 200 205

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

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
260 265 270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300
Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335
Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350
Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440

<210> 27
<211> 449
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 27
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 Val₃₂₅ Ser Asn Lys Ala Leu₃₃₀ Pro Ala Pro Ile Glu₃₃₅ Lys
 Thr Ile Ser Lys₃₄₀ Ala Lys Gly Gln Pro₃₄₅ Arg Glu Pro Gln Val₃₅₀ Tyr Thr
 Leu Pro Pro₃₅₅ Ser Arg Asp Glu Leu₃₆₀ Thr Lys Asn Gln Val₃₆₅ Ser Leu Thr
 Cys Leu₃₇₀ Val Lys Gly Phe Tyr₃₇₅ Pro Ser Asp Ile Ala₃₈₀ Val Glu Trp Glu
 Ser₃₈₅ Asn Gly Gln Pro Glu₃₉₀ Asn Asn Tyr Lys Thr₃₉₅ Thr Pro Pro Val Leu₄₀₀
 Asp Ser Asp Gly Ser₄₀₅ Phe Phe Leu Tyr Ser₄₁₀ Lys Leu Thr Val Asp₄₁₅ Lys
 Ser Arg Trp Gln₄₂₀ Gln Gly Asn Val Phe₄₂₅ Ser Cys Ser Val Met₄₃₀ His Glu
 Ala Leu His₄₃₅ Ala His Tyr Thr Gln₄₄₀ Lys Ser Leu Ser Leu₄₄₅ Ser Pro Gly
 Lys

<210> 28
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 28

Gln Val Gln Leu₅ Gln Glu Ser Gly Pro Gly₁₀ Leu Val Arg Pro Ser₁₅ Gln
 Thr Leu Ser₂₀ Leu Thr Cys Thr Val Ser₂₅ Gly Tyr Ser Ile Thr₃₀ Ser Asp
 His Ala Trp₃₅ Ser Trp Val Arg Gln₄₀ Pro Pro Gly Arg Gly₄₅ Leu Glu Trp
 Ile Gly₅₀ Tyr Ile Ser Tyr Ser₅₅ Gly Ile Thr Thr Tyr₆₀ Asn Pro Ser Leu
 Lys Ser Arg Val Thr Met₇₀ Leu Arg Asp Thr Ser₇₅ Lys Asn Gln Phe Ser₈₀
 Leu Arg Leu Ser Ser₈₅ Val Thr Ala Ala Asp₉₀ Thr Ala Val Tyr Tyr₉₅ Cys
 Ala Arg Ser Leu₁₀₀ Ala Arg Thr Thr Ala₁₀₅ Met Asp Tyr Trp Gly₁₁₀ Gln Gly

Ser Leu Val₁₁₅ Thr Val Ser Ser Ala₁₂₀ Ser Thr Lys Gly Pro₁₂₅ Ser Val Phe
Pro Leu₁₃₀ Ala Pro Ser Ser Lys₁₃₅ Ser Thr Ser Gly Gly₁₄₀ Thr Ala Ala Leu
Gly₁₄₅ Cys Leu Val Lys Asp₁₅₀ Tyr Phe Pro Glu Pro₁₅₅ Val Thr Val Ser Trp₁₆₀
Asn Ser Gly Ala Leu₁₆₅ Thr Ser Gly Val His₁₇₀ Thr Phe Pro Ala Val₁₇₅ Leu
Gln Ser Ser Gly₁₈₀ Leu Tyr Ser Leu Ser₁₈₅ Ser Val Val Thr Val₁₉₀ Pro Ser
Ser Asn Phe₁₉₅ Gly Thr Gln Thr Tyr₂₀₀ Thr Cys Asn Val Asp₂₀₅ His Lys Pro
Ser Asn₂₁₀ Thr Lys Val Asp Lys₂₁₅ Thr Val Glu Arg Lys₂₂₀ Ser Cys Val Glu
Cys₂₂₅ Pro Pro Cys Pro Ala₂₃₀ Pro Pro Val Ala Gly₂₃₅ Pro Ser Val Phe Leu₂₄₀
Phe Pro Pro Lys Pro₂₄₅ Lys Asp Thr Leu Met₂₅₀ Ile Ser Arg Thr Pro₂₅₅ Glu
Val Thr Cys Val₂₆₀ Val Val Asp Val Ser₂₆₅ Gln Glu Asp Pro Glu₂₇₀ Val Gln
Phe Asn Trp₂₇₅ Tyr Val Asp Gly Val₂₈₀ Glu Val His Asn Ala₂₈₅ Lys Thr Lys
Pro Arg₂₉₀ Glu Glu Gln Phe Asn₂₉₅ Ser Thr Phe Arg Val₃₀₀ Val Ser Val Leu
Thr₃₀₅ Val Val His Gln Asp₃₁₀ Trp Leu Asn Gly Lys₃₁₅ Glu Tyr Lys Cys Lys₃₂₀
Val Ser Asn Lys Gly₃₂₅ Leu Pro Ala Pro Ile₃₃₀ Glu Lys Thr Ile Ser₃₃₅ Lys
Thr Lys Gly Gln₃₄₀ Pro Arg Glu Pro Gln₃₄₅ Val Tyr Thr Leu Pro₃₅₀ Pro Ser
Gln Glu Glu₃₅₅ Met Thr Lys Asn Gln₃₆₀ Val Ser Leu Thr Cys₃₆₅ Leu Val Lys
Gly Phe₃₇₀ Tyr Pro Ser Asp Ile₃₇₅ Ala Val Glu Trp Glu₃₈₀ Ser Asn Gly Gln
Pro₃₈₅ Glu Asn Asn Tyr Lys₃₉₀ Thr Thr Pro Pro Met₃₉₅ Leu Asp Ser Asp Gly₄₀₀
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

405

410

415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala
420 425 430

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

<210> 29
<211> 119
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 29

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

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

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

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

Gln Asp Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

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

Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 30
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 30

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80
Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu
100 105

<210> 31
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 31

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

<210> 32
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 32

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 Thr Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Phe
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Lys Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Glu Ser Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 33
<211> 122
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 33

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

<210> 34
<211> 108
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 34

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Phe Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

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

<210> 35
<211> 324
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 35

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

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

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

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

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

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro

<210> 36
<211> 330
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 36

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
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
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 Ala His Tyr Thr		
305	310	315
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
325	330	

<210> 37
 <211> 324
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 37

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 Glu₃₅ Pro Val Thr Val Ser₄₀ Trp Asn Ser Gly₄₅ Ala Leu Thr Ser
 Gly Val₅₀ His Thr Phe Pro₅₅ Ala Val Leu Gln Ser Ser₆₀ Gly Leu Tyr Ser
 Leu Ser Ser Val Val Thr₇₀ Val Pro Ser Ser₇₅ Asn Phe Gly Thr Gln Thr₈₀
 Tyr Thr Cys Asn₈₅ Val Asp His Lys Pro Ser₉₀ Asn Thr Lys Val Asp₉₅ Lys
 Thr Val Glu Arg₁₀₀ Lys Ser Cys Val Glu₁₀₅ Cys Pro Pro Cys Pro₁₁₀ Ala Pro
 Pro Val Ala₁₁₅ Gly Pro Ser Val Phe₁₂₀ Leu Phe Pro Pro Lys₁₂₅ Pro Lys Asp
 Thr Leu₁₃₀ Met Ile Ser Arg Thr₁₃₅ Pro Glu Val Thr Cys₁₄₀ Val Val Val Asp
 Val₁₄₅ Ser Gln Glu Asp Pro₁₅₀ Glu Val Gln Phe Asn₁₅₅ Trp Tyr Val Asp Gly₁₆₀
 Val Glu Val His Asn₁₆₅ Ala Lys Thr Lys Pro₁₇₀ Arg Glu Glu Gln Phe₁₇₅ Asn
 Ser Thr Phe Arg₁₈₀ Val Val Ser Val Leu₁₈₅ Thr Val Val His Gln₁₉₀ Asp Trp
 Leu Asn Gly₁₉₅ Lys Glu Tyr Lys Cys₂₀₀ Lys Val Ser Asn Lys₂₀₅ Gly Leu Pro
 Ala Pro₂₁₀ Ile Glu Lys Thr Ile₂₁₅ Ser Lys Thr Lys Gly₂₂₀ Gln Pro Arg Glu
 Pro₂₂₅ Gln Val Tyr Thr Leu₂₃₀ Pro Pro Ser Gln Glu₂₃₅ Glu Met Thr Lys Asn₂₄₀
 Gln Val Ser Leu Thr₂₄₅ Cys Leu Val Lys Gly₂₅₀ Phe Tyr Pro Ser Asp₂₅₅ Ile
 Ala Val Glu Trp₂₆₀ Glu Ser Asn Gly Gln₂₆₅ Pro Glu Asn Asn Tyr₂₇₀ Lys Thr
 Thr Pro Pro₂₇₅ Met Leu Asp Ser Asp₂₈₀ Gly Ser Phe Phe Leu₂₈₅ Tyr Ser Lys
 Leu Thr₂₉₀ Val Asp Lys Ser Arg₂₉₅ Trp Gln Glu Gly Asn₃₀₀ Val Phe Ser Cys
 Ser₃₀₅ Val Met His Glu Ala₃₁₀ Leu His Ala His Tyr₃₁₅ Thr Gln Lys Ser Leu₃₂₀
 Ser Leu Ser Pro

<10> 38
 <11> 326
 <12> PRT
 <13> Artificial

<20>
 <23> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 38

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 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 Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

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

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140

Val Ser 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> 39
<211> 326
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 39

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 Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110
Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140
Val Ser 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> 40
<211> 326
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 40
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 Ser 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> 41
<211> 445
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 41

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

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 Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
130 135 140

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

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

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

Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
195 200 205

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

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

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

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

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

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 42
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> An artificially synthesized peptide sequence
 <400> 42

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 Leu₁₀₀ Ala Arg Thr Thr Ala₁₀₅ Met Asp Tyr Trp Gly₁₁₀ Gln Gly
Ser Leu Val₁₁₅ Thr Val Ser Ser Ala₁₂₀ Ser Thr Lys Gly Pro₁₂₅ Ser Val Phe
Pro Leu₁₃₀ Ala Pro Cys Ser Arg₁₃₅ Ser Thr Ser Glu Ser₁₄₀ Thr Ala Ala Leu
Gly₁₄₅ Cys Leu Val Lys Asp₁₅₀ Tyr Phe Pro Glu Pro₁₅₅ Val Thr Val Ser Trp₁₆₀
Asn Ser Gly Ala Leu₁₆₅ Thr Ser Gly Val His₁₇₀ Thr Phe Pro Ala Val₁₇₅ Leu
Gln Ser Ser Gly₁₈₀ Leu Tyr Ser Leu Ser₁₈₅ Ser Val Val Thr Val₁₉₀ Pro Ser
Ser Asn Phe₁₉₅ Gly Thr Gln Thr Tyr₂₀₀ Thr Cys Asn Val Asp₂₀₅ His Lys Pro
Ser Asn₂₁₀ Thr Lys Val Asp Lys₂₁₅ Thr Val Glu Arg Lys₂₂₀ Cys Ser Val Glu
Cys₂₂₅ Pro Pro Cys Pro Ala₂₃₀ Pro Pro Val Ala Gly₂₃₅ Pro Ser Val Phe Leu₂₄₀
Phe Pro Pro Lys Pro₂₄₅ Lys Asp Thr Leu Met₂₅₀ Ile Ser Arg Thr Pro₂₅₅ Glu
Val Thr Cys Val₂₆₀ Val Val Asp Val Ser₂₆₅ His Glu Asp Pro Glu₂₇₀ Val Gln
Phe Asn Trp₂₇₅ Tyr Val Asp Gly Val₂₈₀ Glu Val His Asn Ala₂₈₅ Lys Thr Lys
Pro Arg₂₉₀ Glu Glu Gln Phe Asn₂₉₅ Ser Thr Phe Arg Val₃₀₀ Val Ser Val Leu
Thr₃₀₅ Val Val His Gln Asp₃₁₀ Trp Leu Asn Gly Lys₃₁₅ Glu Tyr Lys Cys Lys₃₂₀
Val Ser Asn Lys Gly₃₂₅ Leu Pro Ala Pro Ile₃₃₀ Glu Lys Thr Ile Ser₃₃₅ Lys
Thr Lys Gly Gln₃₄₀ Pro Arg Glu Pro Gln₃₄₅ Val Tyr Thr Leu Pro₃₅₀ Pro Ser
Arg Glu Glu₃₅₅ Met Thr Lys Asn Gln₃₆₀ Val Ser Leu Thr Cys₃₆₅ Leu Val Lys
Gly Phe₃₇₀ Tyr Pro Ser Asp Ile₃₇₅ Ala Val Glu Trp Glu₃₈₀ Ser Asn Gly Gln

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

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

<210> 43
<211> 328
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 43

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 Ala His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 44
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 44

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

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

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

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

Gln Asp Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Leu Leu Ala Arg Ala Thr Ala Met Asp Val Trp Gly Glu Gly

100					105					110					
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
	115						120					125			
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu
	130					135					140				
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
	145					150					155				
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				
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				
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				

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

<210> 45
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

195200205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 46

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 46

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

151015

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp

202530

His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp

354045

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu

505560

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65707580

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

859095

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly

100105110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115120125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130135140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145150155160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165170175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180185190

Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195200205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu

210215220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415
 Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala
 420 425 430
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440

<210> 47
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 47

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Thr Asp Ile Ser Ser His
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Gly Ser His Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80
Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 48
<211> 443
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 48

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
195 200 205

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

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

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

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
260 265 270

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

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

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

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

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

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala
420 425 430

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

<210> 49
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 49

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 50
<211> 445
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized peptide sequence
<400> 50

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	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr
	195					Tyr
						200
						Thr
						Cys
						Asn
						Val
						Asp
						205
						His
						Lys
						Pro
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
	210					215
						Thr
						Val
						Glu
						Arg
						Lys
						220
						Ser
						Cys
						Val
						Glu
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
	225				230	
						Pro
						Pro
						Val
						Ala
						Gly
						235
						Pro
						Ser
						Val
						Phe
						Leu
						240
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
						245
						Thr
						Leu
						Met
						250
						Ile
						Ser
						Arg
						Thr
						Pro
						255
						Glu
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
						260
						Val
						Asp
						Val
						Ser
						265
						His
						Glu
						Asp
						Pro
						270
						Glu
						Val
						Gln
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
						275
						Val
						Glu
						Val
						His
						Asn
						285
						Lys
						Thr
						Lys
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn
						295
						Ser
						Thr
						Phe
						Arg
						Val
						300
						Val
						Ser
						Val
						Leu
Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp
						310
						Leu
						Asn
						Gly
						Lys
						315
						Glu
						Tyr
						Lys
						Cys
						Lys
						320
Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro
						325
						Ser
						Ser
						Ile
						330
						Glu
						Lys
						Thr
						Ile
						Ser
						335
						Lys
Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
						340
						Pro
						Gln
						345
						Val
						Tyr
						Thr
						Leu
						Pro
						350
						Pro
						Ser
Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
						355
						Gln
						360
						Val
						Ser
						Leu
						Thr
						Cys
						365
						Leu
						Val
						Lys
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
						375
						Ala
						Val
						Glu
						Trp
						Glu
						380
						Ser
						Asn
						Gly
						Gln
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
						390
						Thr
						Pro
						Pro
						Met
						395
						Leu
						Asp
						Ser
						Asp
						Gly
						400
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
						405
						Leu
						Thr
						Val
						410
						Asp
						Lys
						Ser
						Arg
						Trp
						415
						Gln
Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
						420
						Ser
						Val
						425
						Met
						His
						Glu
						Ala
						Leu
						430
						His
						Asn
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
						435
						Ser
						440
						Leu
						Ser
						Pro
						Gly
						Lys
						445

<210> 51
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

<223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 51

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 Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
195 200 205

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

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

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

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

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

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440

<210> 52
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> An artificially synthesized peptide sequence
 <400> 52

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

•

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

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

<210> 53
<211> 443
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 53

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 Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
195 200 205

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

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

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

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

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

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

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

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

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

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

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

- <210> 54
- <211> 326
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 54

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

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

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

Val Ser 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

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala 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> 55
<211> 324
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 55

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

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

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

Val Ser 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

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala 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

<210> 56
<211> 326
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 56

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140
Val Ser 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> 57
<211> 324
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 57

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140
 Val Ser 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

<210> 58
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 58

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 Phe₂₄₅ Pro Pro Lys Pro Lys₂₅₀ Asp Thr Leu Met Ile₂₅₅ Ser
 Arg Thr Pro Glu₂₆₀ Val Thr Cys Val Val₂₆₅ Val Asp Val Ser His₂₇₀ Glu Asp
 Pro Glu Val₂₇₅ Lys Phe Asn Trp Tyr₂₈₀ Val Asp Gly Val Glu₂₈₅ Val His Asn
 Ala Lys₂₉₀ Thr Lys Pro Arg Glu₂₉₅ Glu Gln Tyr Asn Ser₃₀₀ Thr Tyr Arg Val
 Val₃₀₅ Ser Val Leu Thr Val₃₁₀ Leu His Gln Asp Trp₃₁₅ Leu Asn Gly Lys Glu₃₂₀
 Tyr Lys Cys Lys Val₃₂₅ Ser Asn Lys Ala Leu₃₃₀ Pro Ala Pro Ile Glu₃₃₅ Lys
 Thr Ile Ser Lys₃₄₀ Ala Lys Gly Gln Pro₃₄₅ Arg Glu Pro Gln Val₃₅₀ Tyr Thr
 Leu Pro Pro₃₅₅ Ser Arg Asp Glu Leu₃₆₀ Thr Lys Asn Gln Val₃₆₅ Ser Leu Thr
 Cys Leu₃₇₀ Val Lys Gly Phe Tyr₃₇₅ Pro Ser Asp Ile Ala₃₈₀ Val Glu Trp Glu
 Ser₃₈₅ Asn Gly Gln Pro Glu₃₉₀ Asn Asn Tyr Lys Thr₃₉₅ Thr Pro Pro Val Leu₄₀₀
 Asp Ser Asp Gly Ser₄₀₅ Phe Phe Leu Tyr Ser₄₁₀ Lys Leu Thr Val Asp₄₁₅ Lys
 Ser Arg Trp Gln₄₂₀ Gln Gly Asn Val Phe₄₂₅ Ser Cys Ser Val Met₄₃₀ His Glu
 Ala Leu His₄₃₅ Ala His Tyr Thr Gln₄₄₀ Lys Ser Leu Ser Leu₄₄₅ Ser Pro

十、申請專利範圍：

1. 一種 IgG2 固定區，其中於序列編號：2 之胺基酸序列之位置 20(於 EU 編號系統之位置 137)及 21(於 EU 編號系統之位置 138)的胺基酸分別經 Gly 及 Gly 取代。

2. 一種 IgG2 固定區，其中序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 209(於 EU 編號系統之位置 330)、210(於 EU 編號系統之位置 331)、218(於 EU 編號系統之位置 339)、276(於 EU 編號系統之位置 397)、14(於 EU 編號系統之位置 131)、16(於 EU 編號系統之位置 133)、102(於 EU 編號系統之位置 219)、20(於 EU 編號系統之位置 137)、及 21(於 EU 編號系統之位置 138)的胺基酸分別經 Ser、Ser、Ala、Val、Ser、Lys、Ser、Gly、及 Gly 取代。

3. 如申請專利範圍第 2 項之 IgG2 固定區，更包括刪除於位置 325(於 EU 編號系統之位置 446)的 Gly 及位置 326(於 EU 編號系統之位置 447)的 Lys 兩者。

4. 一種 IgG2 固定區，其中序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 276(於 EU 編號系統之位置 397)、14(於 EU 編號系統之位置 131)、16(於 EU 編號系統之位置 133)、102(於 EU 編號系統之位置 219)、20(於 EU 編號系統之位置 137)、及 21(於 EU 編號系統之位置 138)的胺基酸分別經 Val、Ser、Lys、Ser、Gly、及 Gly 取代。

5. 如申請專利範圍第 4 項之 IgG2 固定區，更包括刪除於位置 325(於 EU 編號系統之位置 446)的 Gly 及位置 326(於 EU 編號系統之位置 447)的 Lys 兩者。

6. 一種 IgG2 固定區，其中序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 14(於 EU 編號系統之位置 131)的 Cys、於位置 16(於 EU 編號系統之位置 133)的 Arg、於位置 102(於 EU 編號系統之位置 219)的 Cys、於位置 20(於 EU 編號系統之位置 137)的 Glu、於位置 21(於 EU 編號系統之位置 138)的 Ser、於位置 147(於 EU 編號系統之位置 268)的 His、於位置 234(於 EU 編號系統之位置 355)的 Arg、及於位置 298(於 EU 編號系統之位置 419)的 Gln 分別經 Ser、Lys、Ser、Gly、Gly、Gln、Gln、及 Glu 取代。

7. 如申請專利範圍第 6 項之 IgG2 固定區，更包括刪除於位置 325(於 EU 編號系統之位置 446)的 Gly 及位置 326(於 EU 編號系統之位置 447)的 Lys 兩者。

8. 一種 IgG2 固定區，其中序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 14(於 EU 編號系統之位置 131)的 Cys、於位置 16(於 EU 編號系統之位置 133)的 Arg、於位置 102(於 EU 編號系統之位置 219)的 Cys、於位置 20(於 EU 編號系統之位置 137)的 Glu、於位置 21(於 EU 編號系統之位置 138)的 Ser、於位置 147(於 EU 編號系統之位置 268)的 His、於位置 234(於 EU 編號系統之位置 355)的 Arg、於位置 298(於 EU 編號系統之位置 419)的 Gln、及於位置 313(於 EU 編號系統之位置 434)的 Asn 分別經 Ser、Lys、Ser、Gly、Gly、Gln、Gln、Glu、及 Ala 取代。

9. 如申請專利範圍第 8 項之 IgG2 固定區，更包括刪除於位置 325(於 EU 編號系統之位置 446)的 Gly 及位置

326(於 EU 編號系統之位置 447)的 Lys 兩者。

10. 一種 IgG2 固定區，其中序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 209(於 EU 編號系統之位置 330)的 Ala、於位置 210(於 EU 編號系統之位置 331)的 Pro、於位置 218(於 EU 編號系統之位置 339)的 Thr、於位置 14(於 EU 編號系統之位置 131)的 Cys、於位置 16(於 EU 編號系統之位置 133)的 Arg、於位置 102(於 EU 編號系統之位置 219)的 Cys、於位置 20(於 EU 編號系統之位置 137)的 Glu、及於位置 21(於 EU 編號系統之位置 138)的 Ser 分別經 Ser、Ser、Ala、Ser、Lys、Ser、Gly、及 Gly 取代。

11. 如申請專利範圍第 10 項之 IgG2 固定區，更包括刪除於位置 325(於 EU 編號系統之位置 446)的 Gly 及位置 326(於 EU 編號系統之位置 447)的 Lys 兩者。

12. 一種 IgG2 固定區，其中序列編號：2 之胺基酸序列中於位置 14(於 EU 編號系統之位置 131)的 Cys、於位置 16(於 EU 編號系統之位置 133)的 Arg、於位置 102(於 EU 編號系統之位置 219)的 Cys、於位置 20(於 EU 編號系統之位置 137)的 Glu、及於位置 21(於 EU 編號系統之位置 138)的 Ser 分別經 Ser、Lys、Ser、Gly、及 Gly 取代。

13. 如申請專利範圍第 12 項之 IgG2 固定區，更包括刪除於位置 325(於 EU 編號系統之位置 446)的 Gly 及位置 326(於 EU 編號系統之位置 447)的 Lys 兩者。

14. 一種人類抗體固定區，包括序列編號：5 之胺基酸序列。

15. 一種人類抗體固定區，包括序列編號：7 之胺基酸序列。

16. 一種人類抗體固定區，包括序列編號：9 之胺基酸序列。

17. 一種人類抗體固定區，包括序列編號：35 之胺基酸序列。

18. 一種人類抗體固定區，包括序列編號：37 之胺基酸序列。

19. 一種人類抗體固定區，包括序列編號：57 之胺基酸序列(M40ΔGK)。

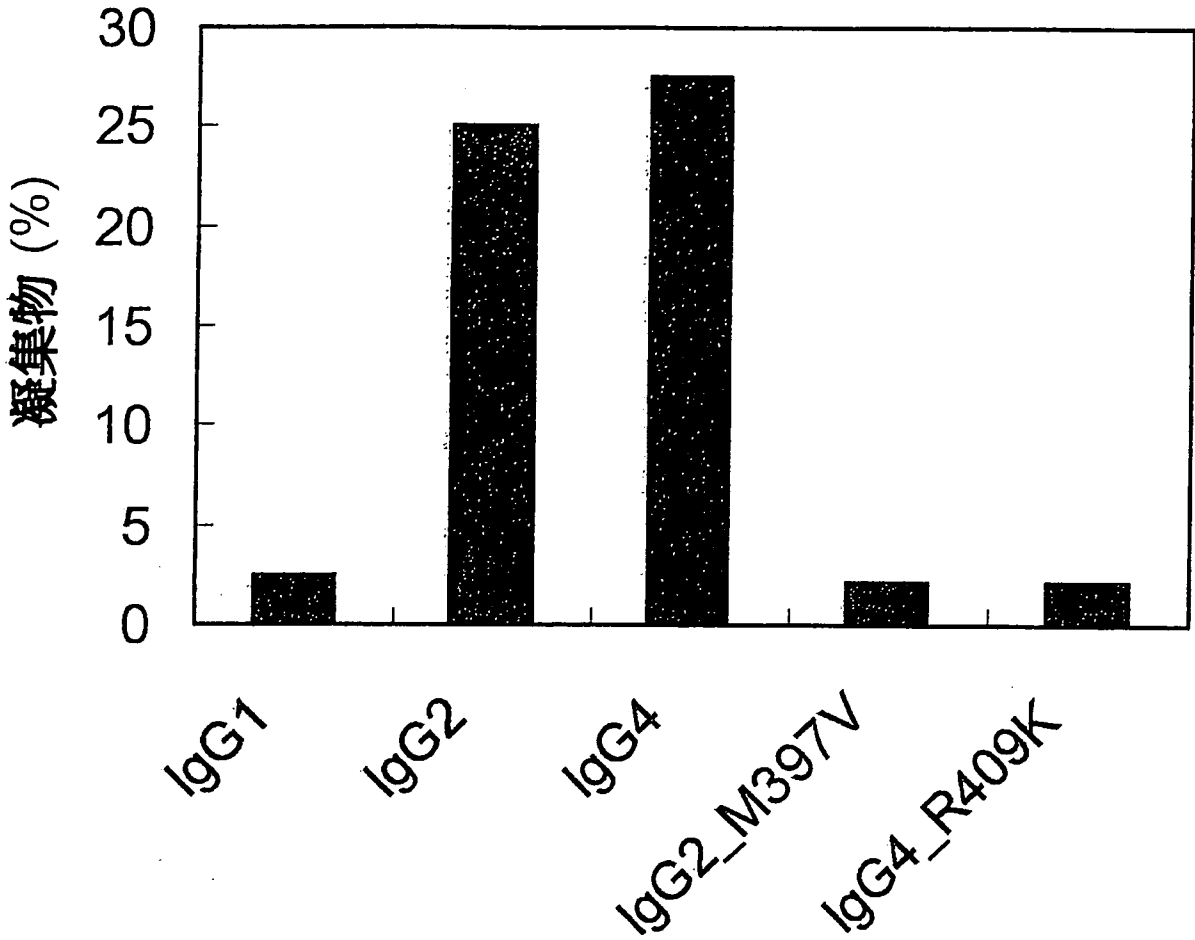
20. 一種人類抗體固定區，包括序列編號：55 之胺基酸序列(M86)。

21. 一種抗體，包括申請專利範圍為第 1 至 20 項中任一項之固定區。

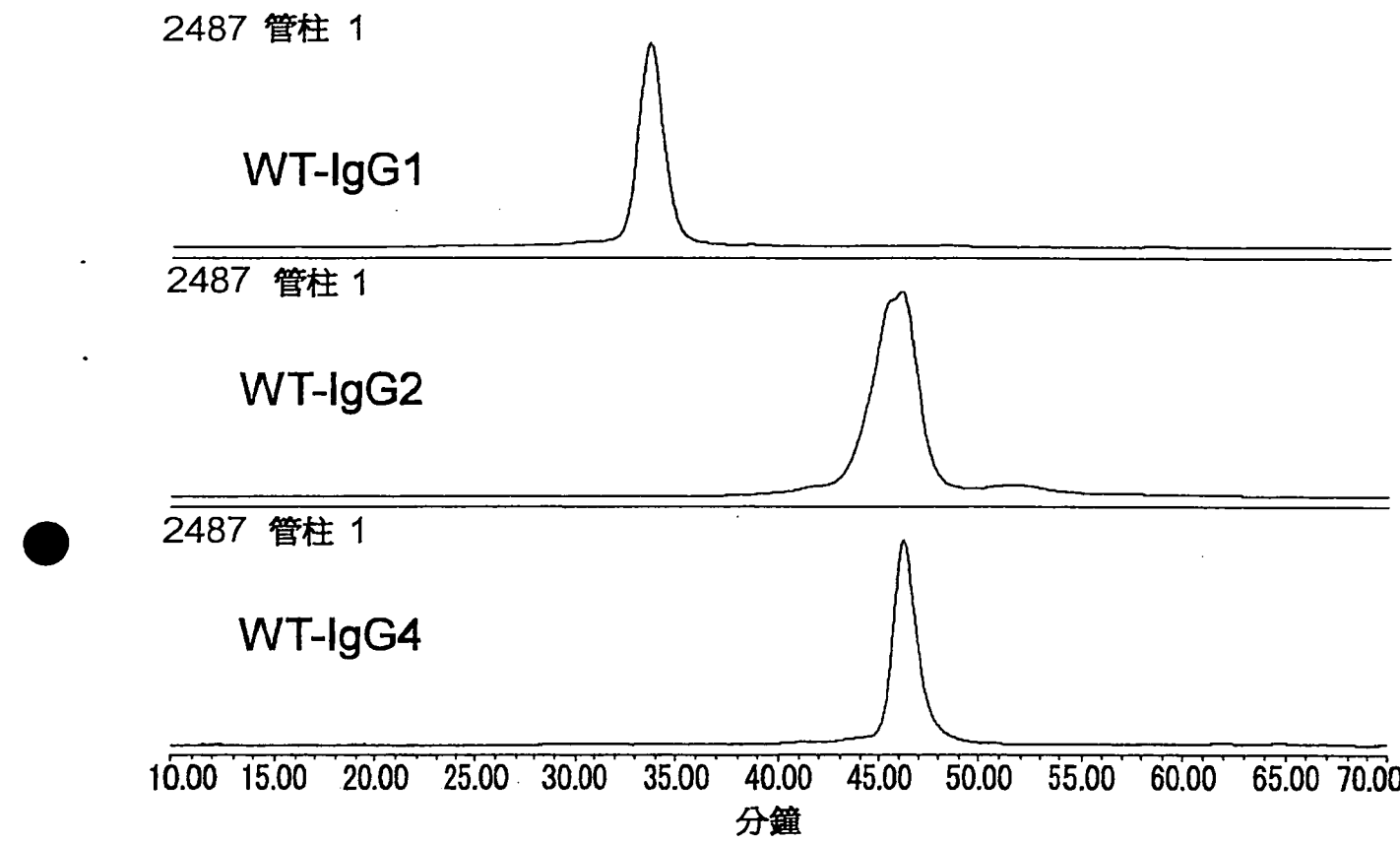
22. 一種抗-IL-6-受體之抗體，包括申請專利範圍為第 1 至 20 項中任一項之固定區。

23. 一種醫藥組合物，包括申請專利範圍為第 1 至 20 項中任一項之固定區。

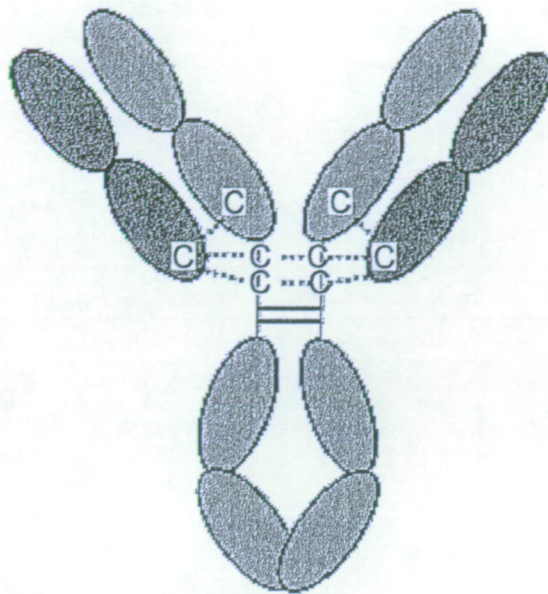
公告奉



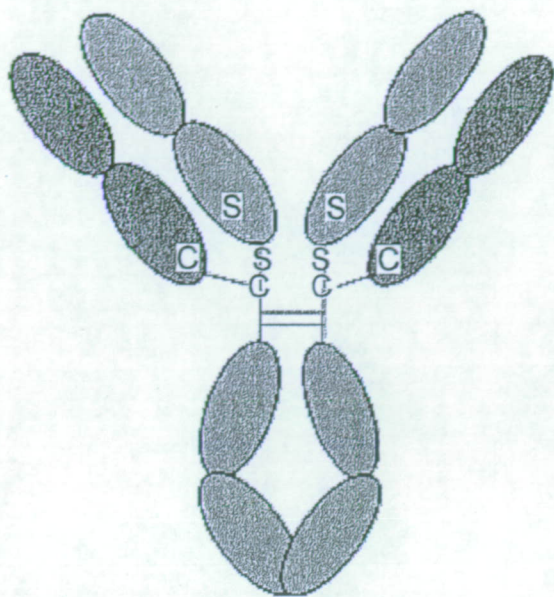
第1圖



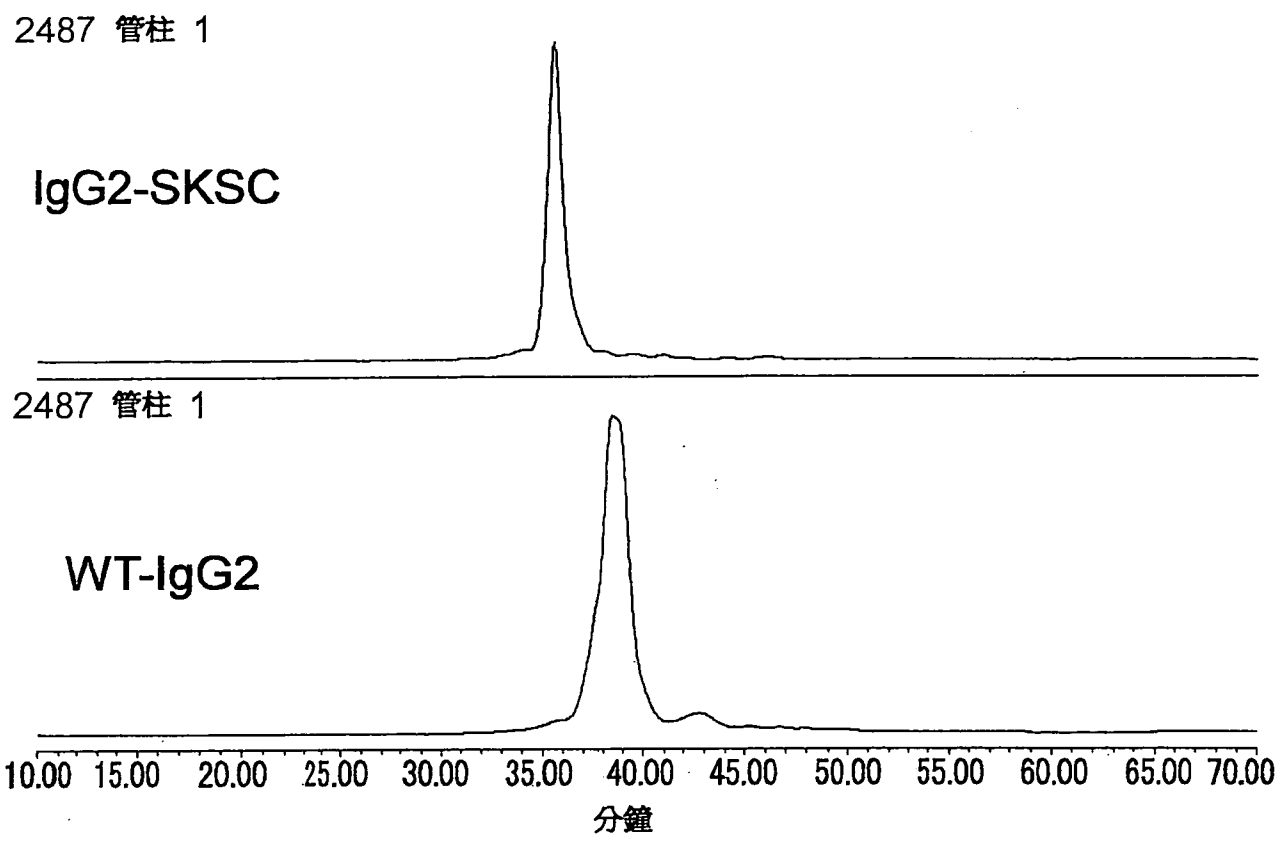
第2圖



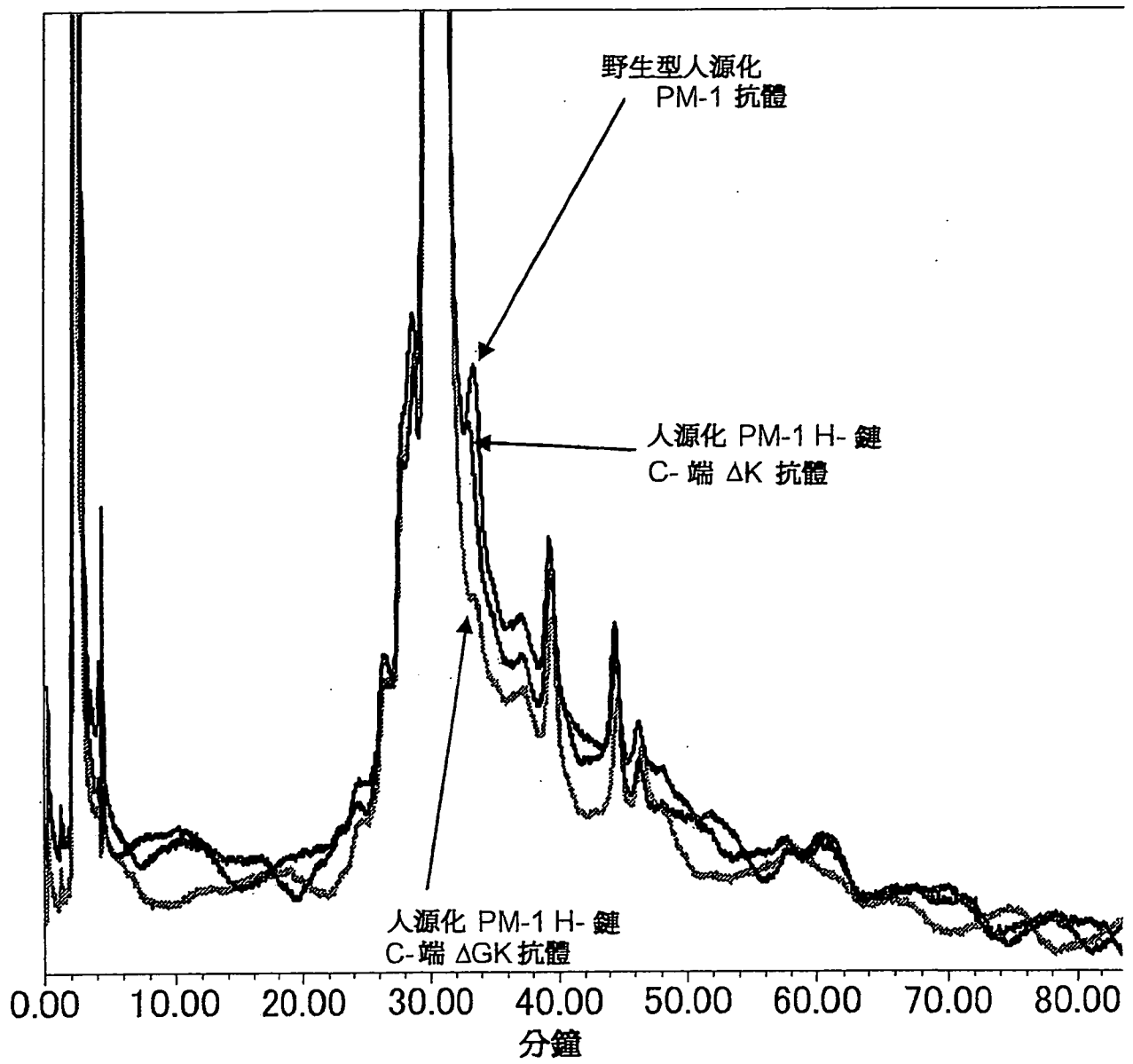
第3圖



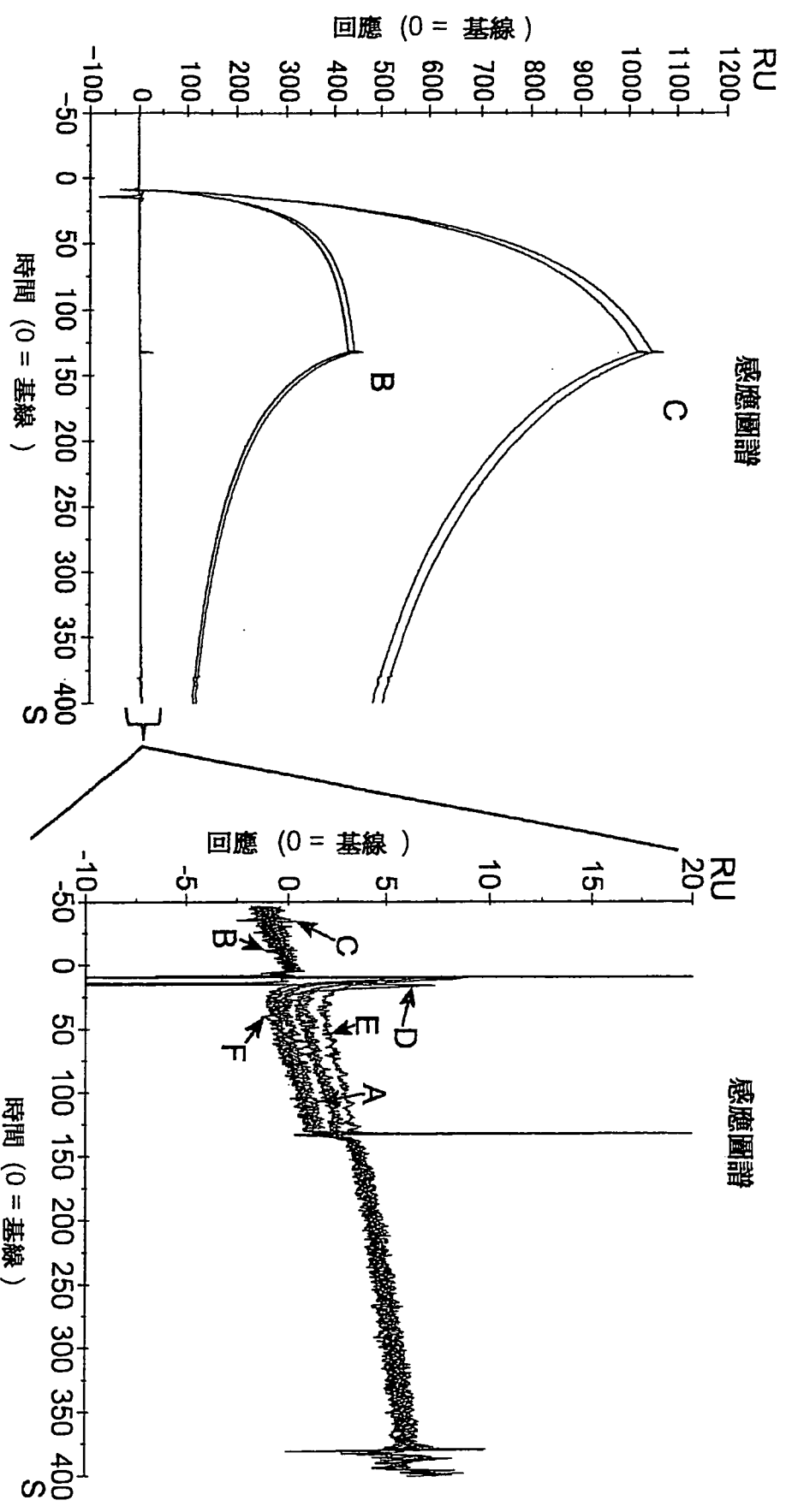
第4圖



第5圖

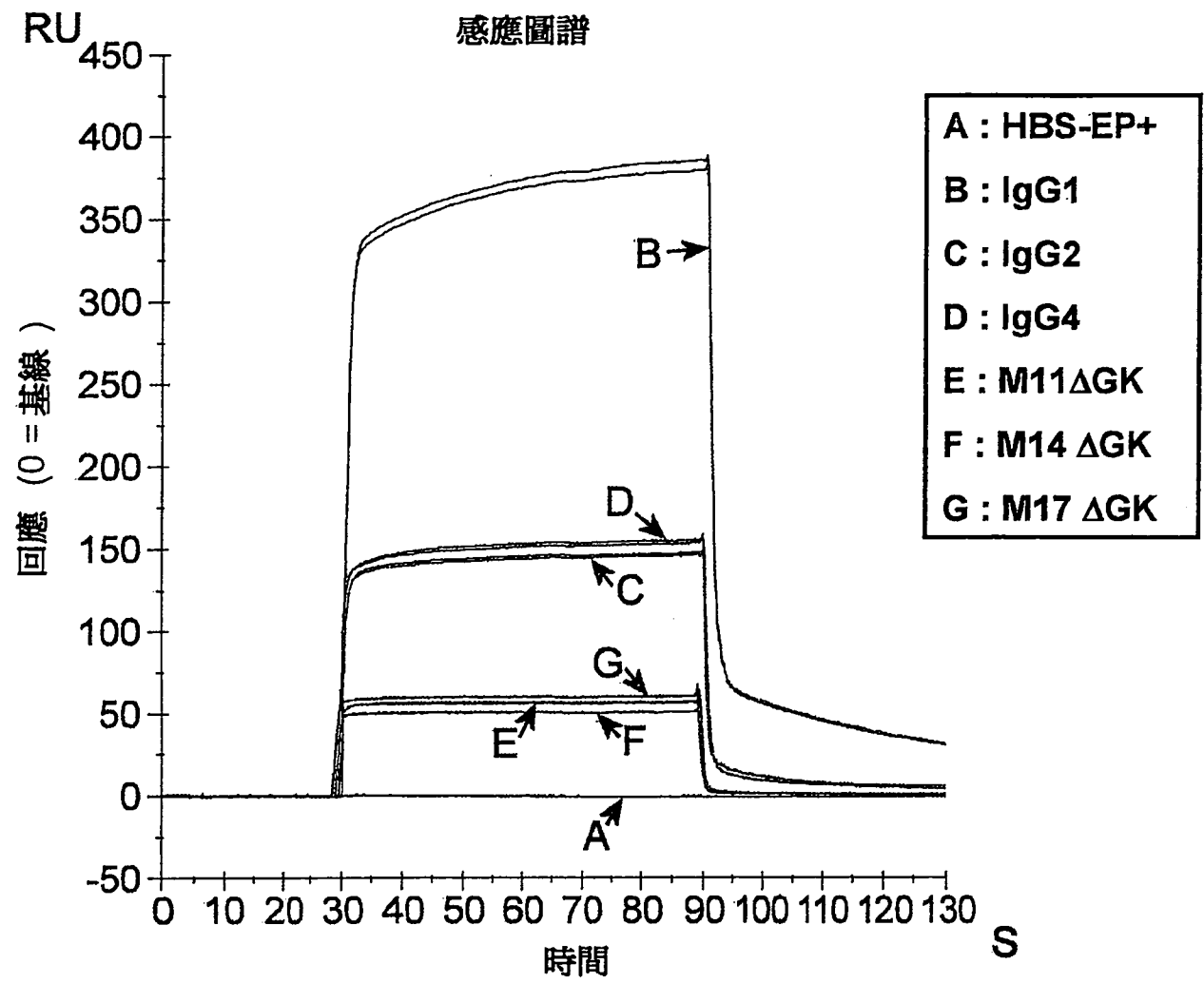


第6圖

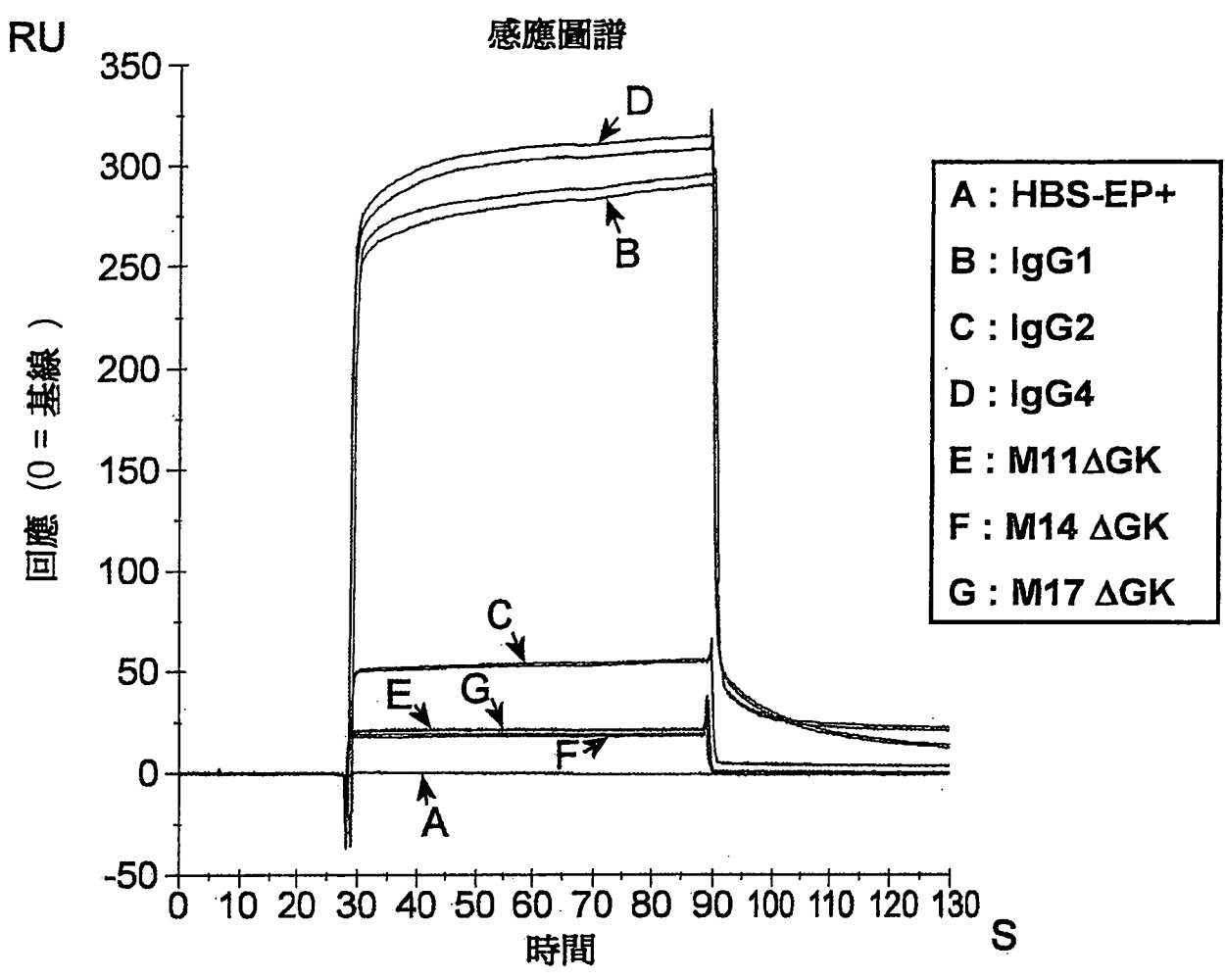


A: M14ΔGK B: IgG4 C: IgG1 D: M11ΔGK E: IgG2 F: M17ΔGK

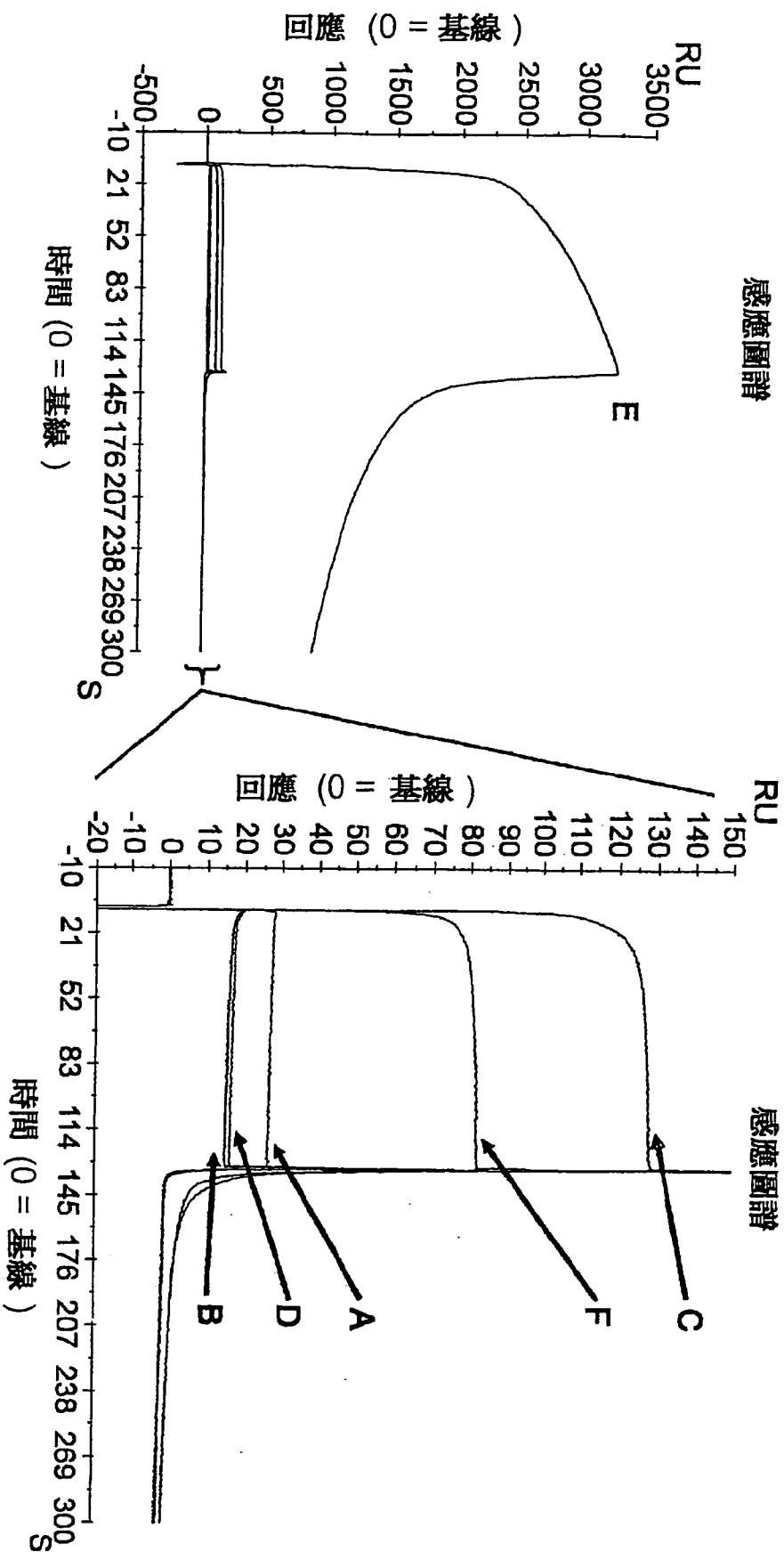
第7圖



第8圖

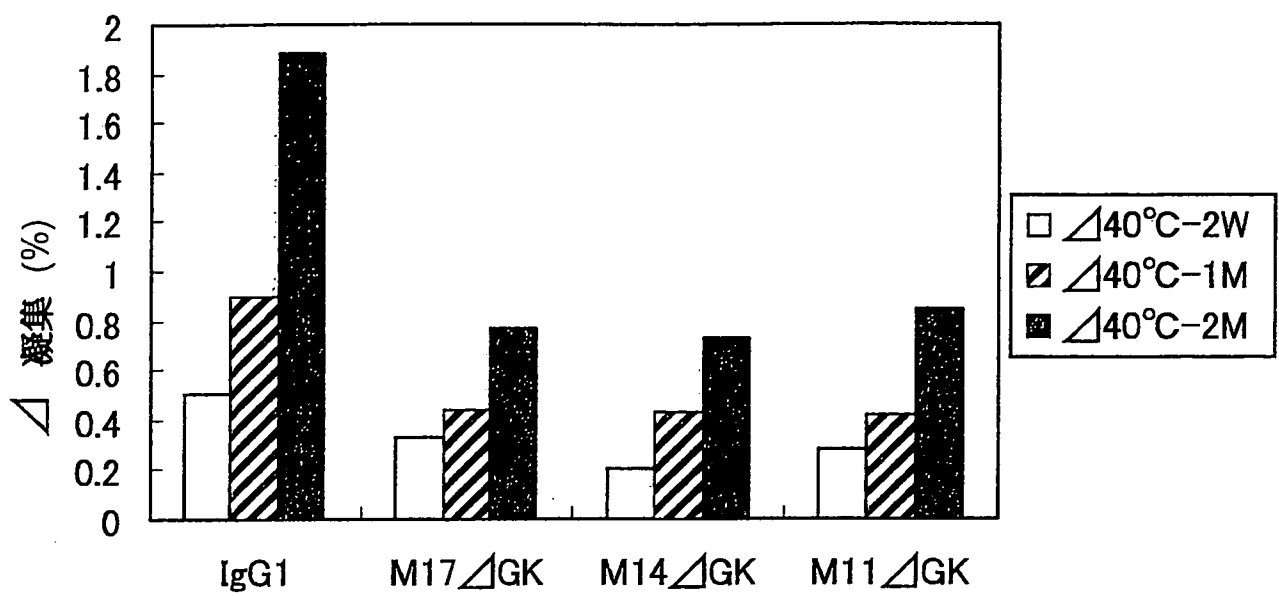


第9圖

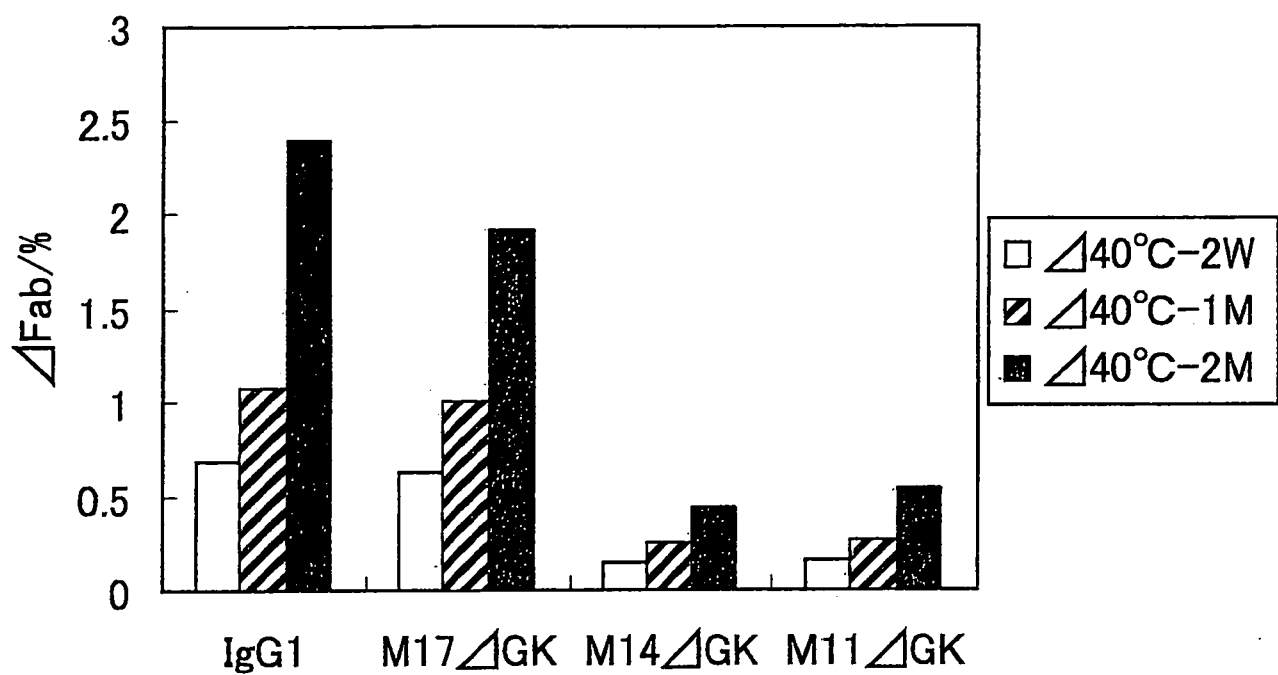


A: M17ΔGK B: M11ΔGK C: IgG4 D: M14ΔGK E: IgG1 F: IgG2

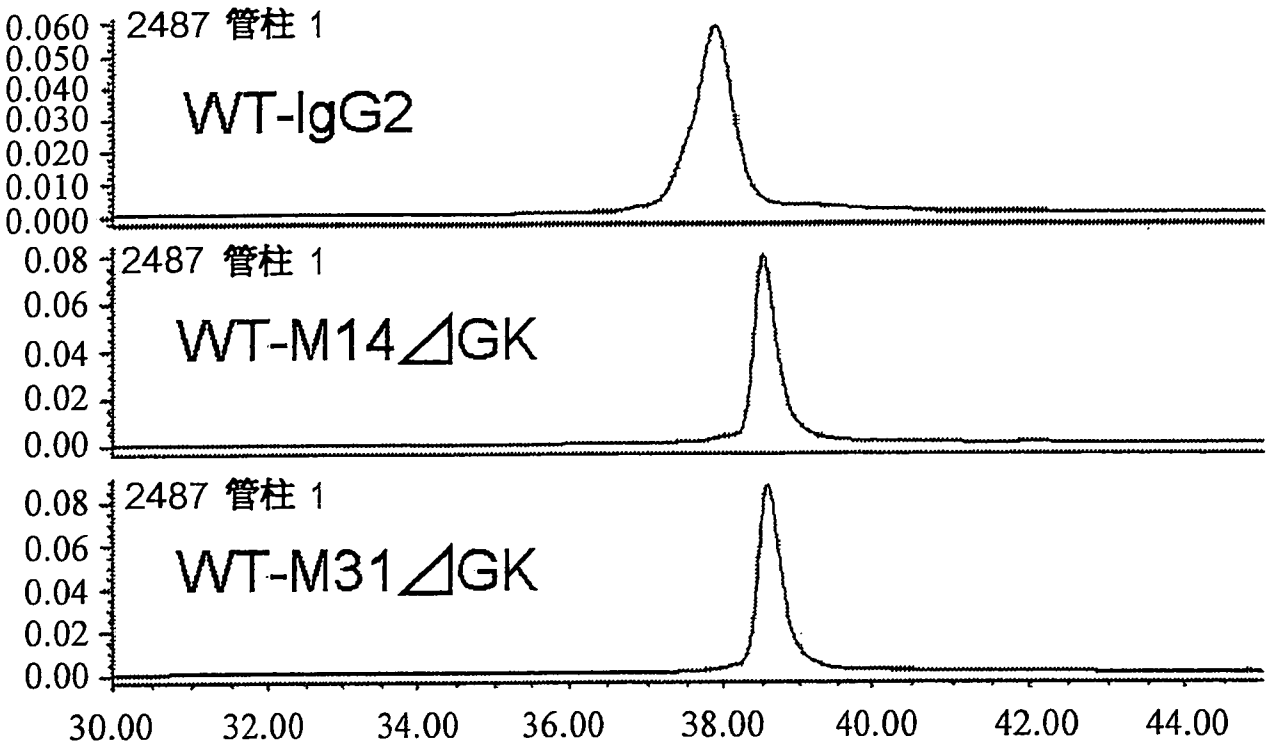
第10圖



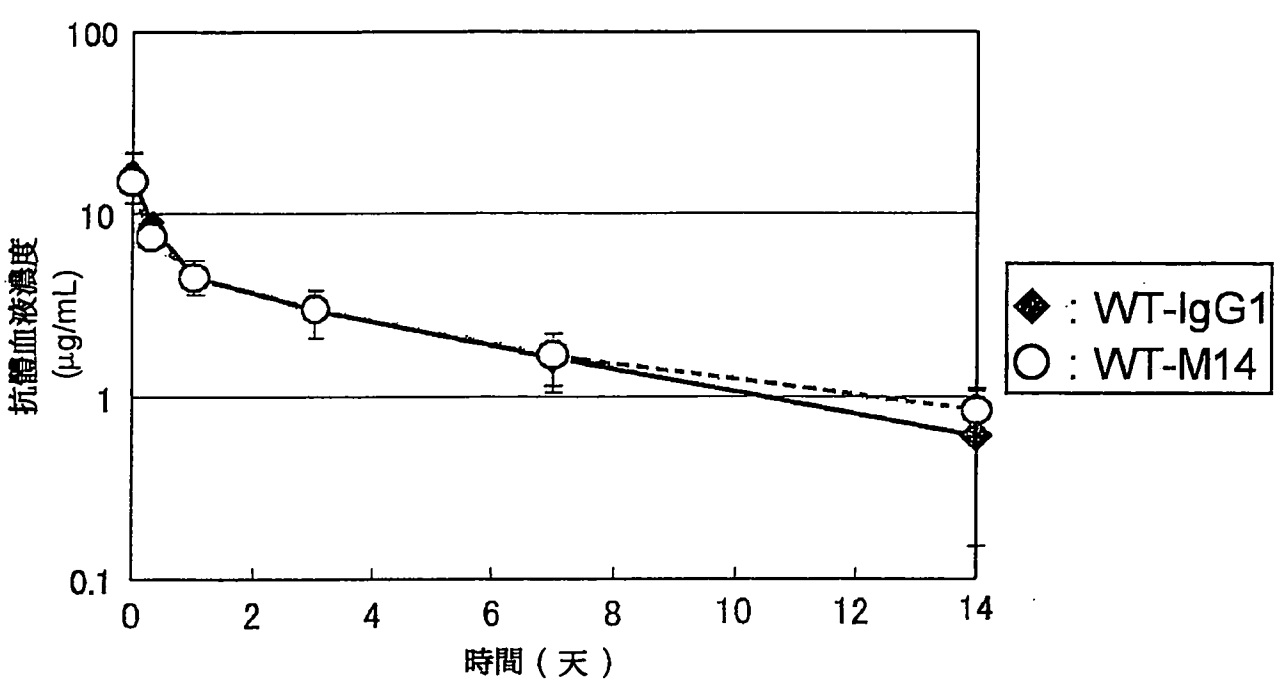
第11圖



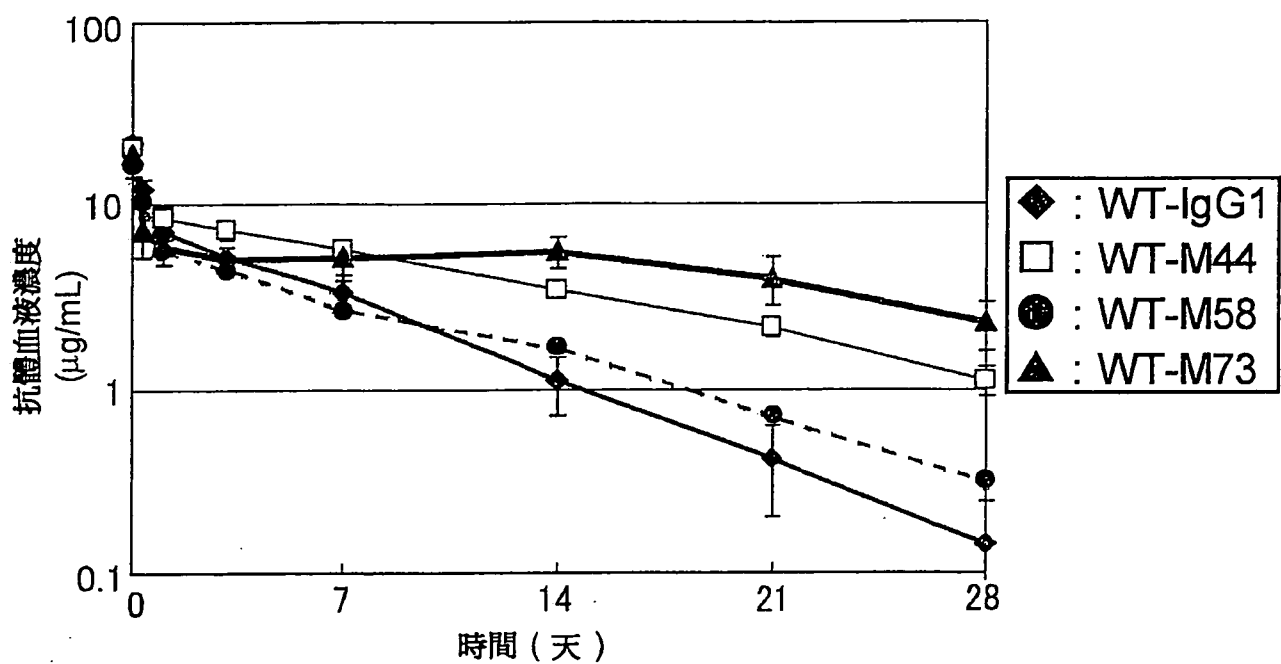
第12圖



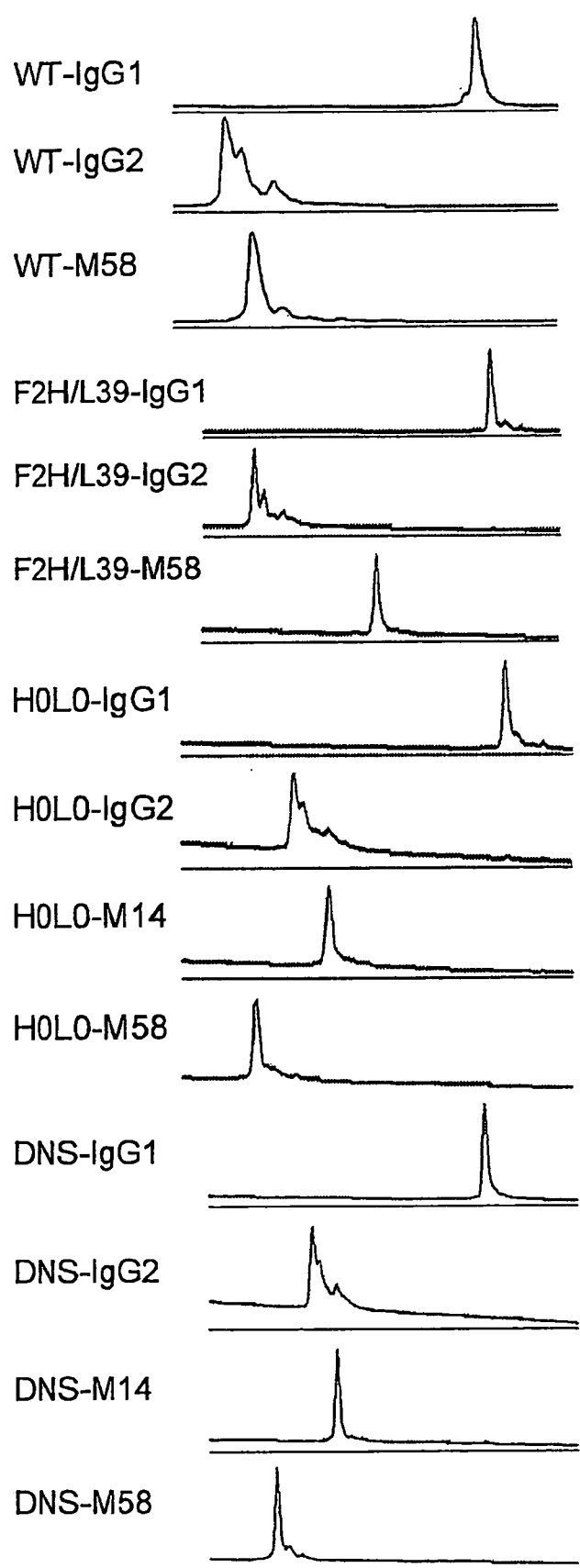
第13圖



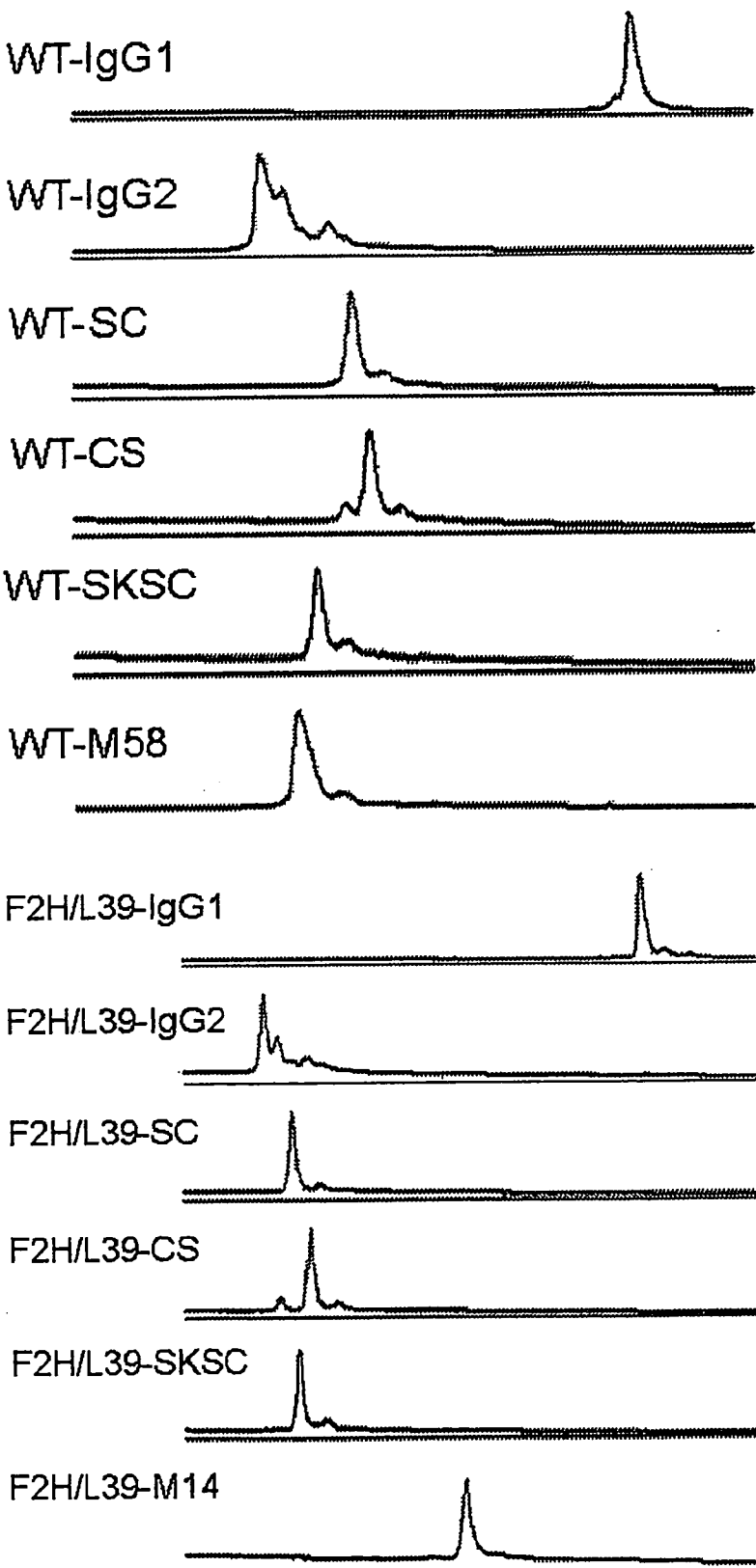
第14圖



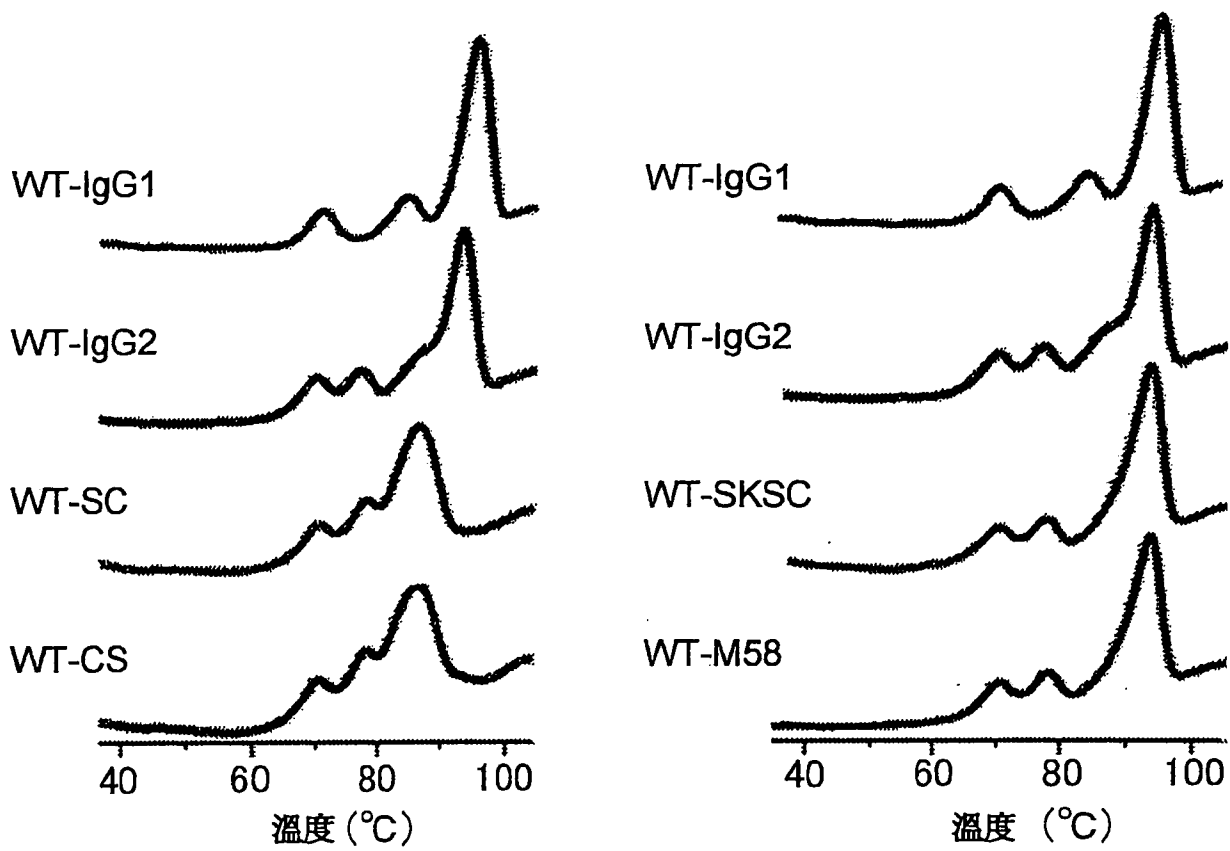
第15圖



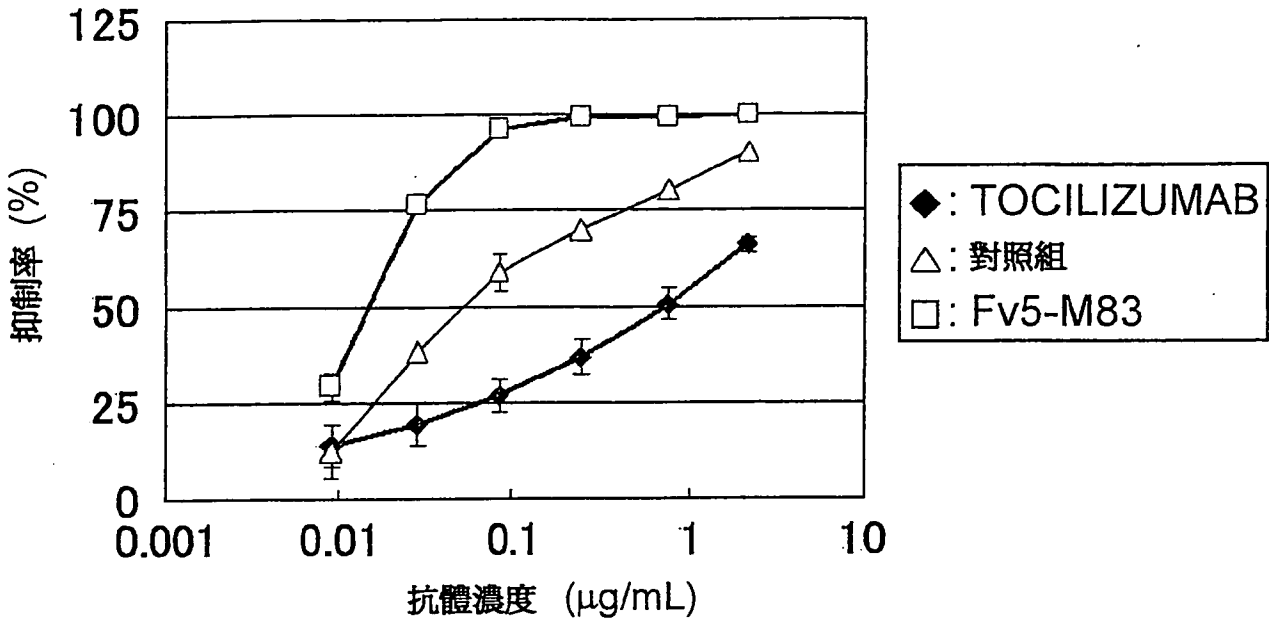
第16圖



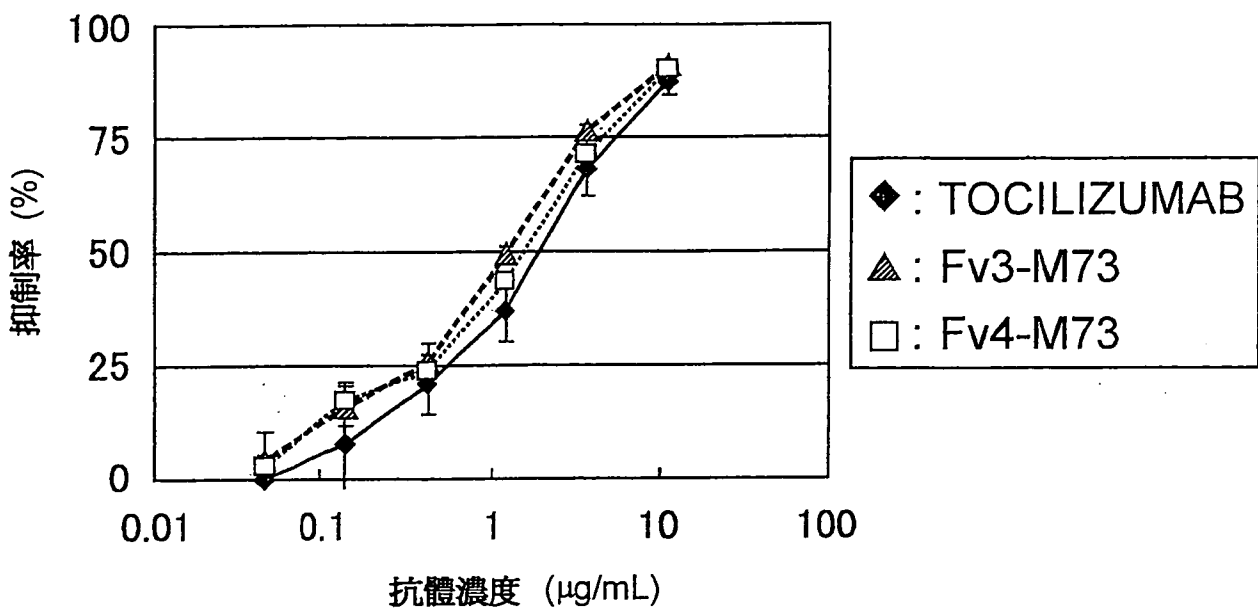
第17圖



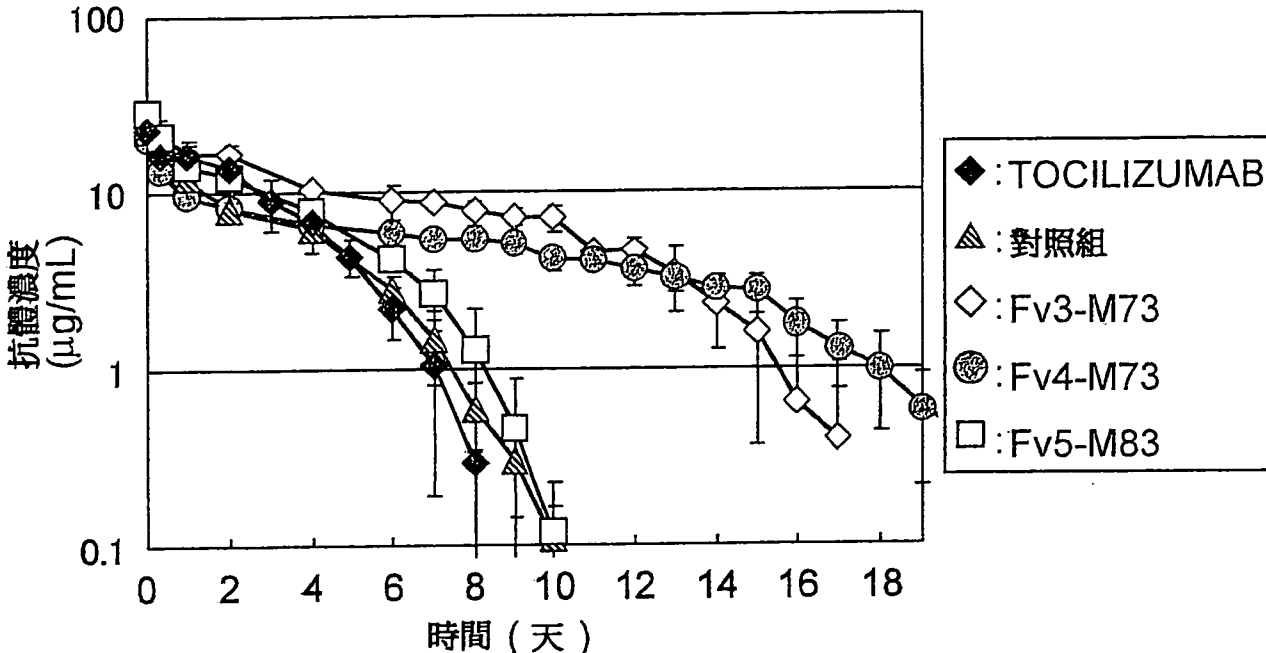
第18圖



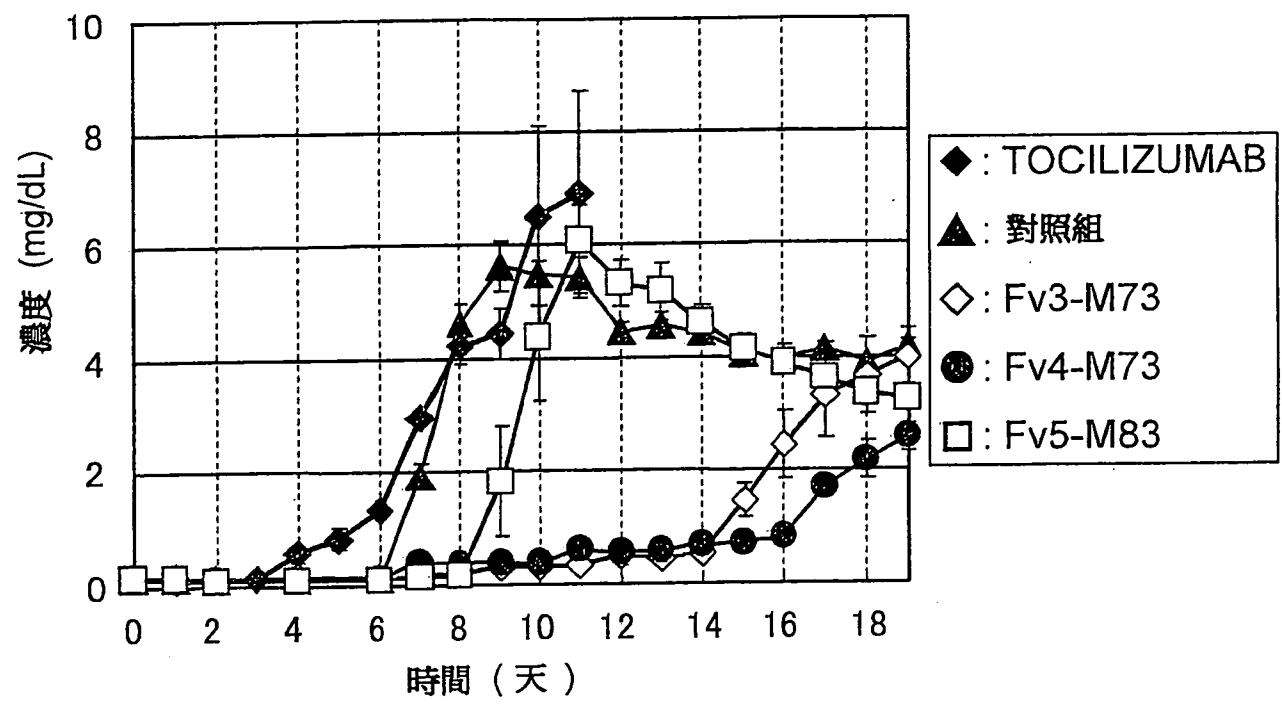
第19圖



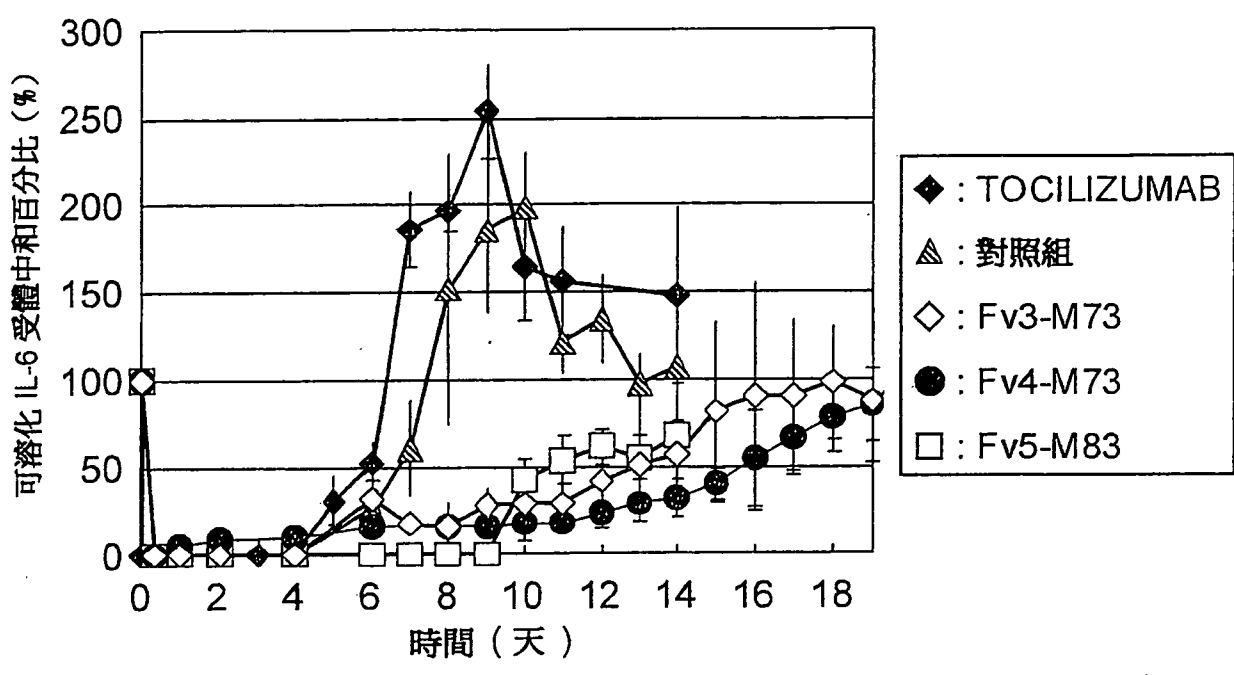
第20圖



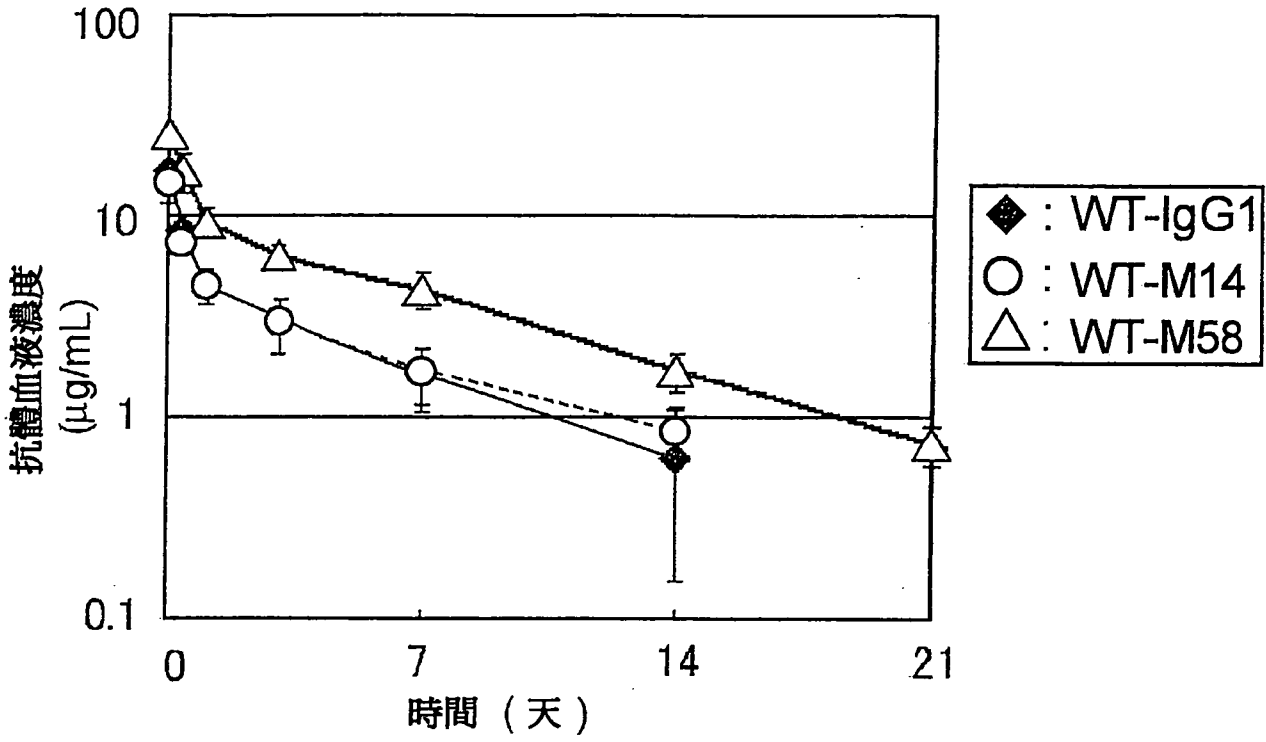
第21圖



第22圖



第23圖



第24圖