



(21)申請案號：105132591

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 10 月 07 日

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

G01N33/53 (2006.01)

(30)優先權：2015/10/07 美國

62/238,667

(71)申請人：奧托德里克有限公司(美國) AUTOTELIC LLC (US)

美國

(72)發明人：翠伍 弗恩 TRIEU, VUONG (US)；朴 哲浩 PARK, CHULHO (US)

(74)代理人：惲軼群；劉法正

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：20 項 圖式數：11 共 194 頁

(54)名稱

用於結合紫杉醇之以抗體為主的親和性試劑

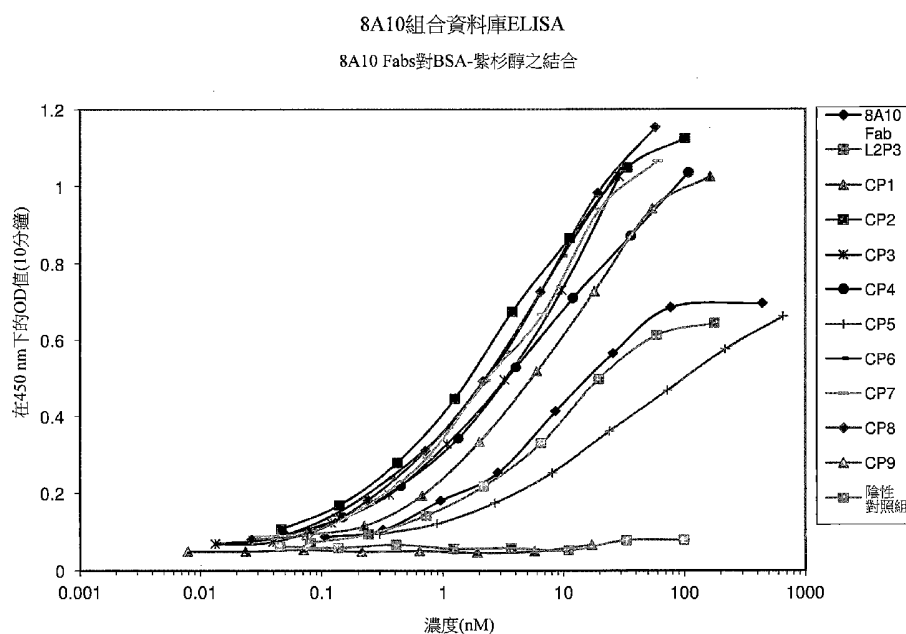
ANTIBODY-BASED AFFINITY REAGENTS FOR BINDING PACLITAXEL

(57)摘要

本案揭露內容是針對用於結合紫杉醇的最佳化親和性試劑組成物，諸如抗體、抗體片段以及抗體衍生物，以及相關的使用方法。

The disclosure is directed to optimized affinity reagent compositions, such as antibodies, antibody fragments, and antibody derivatives, for binding paclitaxel, and related methods of use.

指定代表圖：



【圖7】

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於結合紫杉醇之以抗體為主的親和性試劑

【英文發明名稱】

ANTIBODY-BASED AFFINITY REAGENTS FOR
BINDING PACLITAXEL

【技術領域】

【0001】 相關案件的交叉引述

本申請案主張於2015年10月7日提申的美國臨時專利申請案號62/238,667的利益，該案於此被併入以作為參考。

【0002】 發明領域

本發明提供用於結合紫杉醇的最佳化親和性試劑組成物，諸如抗體、抗體片段以及抗體衍生物。

【先前技術】

【0003】 發明背景

紫杉醇，原本分離自太平洋紫杉，已被建立為用於一系列癌症類型(包含肺癌、卵巢癌以及乳癌)的最有效化學治療藥劑之一。紫杉醇之一主要限制是它的低溶解度以及需要被配方於有毒的有機溶劑之內，典型地是被配方於聚氧乙基化蓖麻油(polyoxyethylated castor oil)與脫水乙醇(dehydrated ethanol)混合物之內(以汰癌勝[®](Taxol[®])而知名)。為避免溶劑毒性，紫杉醇已與各式各樣的賦形劑來配方，還有使用可改善疏水性藥物(諸如紫

杉醇)之溶解度的奈米粒子遞送系統(nanoparticle delivery systems)。

【0004】 亞伯杉 (Abraxane[®])，一種紫杉醇白蛋白結合的奈米粒子配方 (paclitaxel albumin bound nanoparticle formulation)，已於2005年被美國的食品藥物管理局(FDA)批准且為當今用於化學治療的紫杉醇的最佳配方之一。用於遞送紫杉醇的其他系統已被研究或正在發展中，例如，使用聚合性奈米粒子、以液體為基礎的奈米粒子配方、聚合物綴合物(polymer conjugates)、無機性奈米粒子、奈米碳管(carbon nanotubes)、奈米晶體(nanocrystals)或環糊精奈米粒子(cyclodextrin nanoparticles)(參見，例如，Ping Ma *et al.*, 2013, *J Nanomed. Nanotechnology* : 4 : 2)。

【0005】 雖然亞伯杉 (Abraxane[®])是一被廣泛使用的化學治療劑且實際上適用於所有的癌症類型，對亞伯杉 (Abraxane[®])的反應卻可低達只有20%。在某些病患身上所發現到的對紫杉醇之相對不敏感性可能是低反應率之一促成因素。但是，這個不敏感性可能不是該低反應率的主要原因。當以各種不同的批准劑量(轉移性乳癌為260 mg/m²，胰臟癌為125 mg/m²，以及肺癌為100 mg/m²)來給藥時，於臨床病患的樣品中所監測到的紫杉醇的血液濃度存在有高達10倍的變化(Nyman DW *et al.*, 2005, *J Clin. Oncol.*, 23, 7785-93)。這個變化暗示：絕大多數的患者可能被不正確地給予太高濃度的紫杉醇投藥以致必須

脫離治療，或是被投藥以太低的劑量以致得不到治療的益處。即令病患對紫杉醇是敏感的，具有不足的藥物水平將使得他們不起反應並且治療無效。給藥不足的群組 (under-dosed group) 是最脆弱的病患族群，因為不容易判定他們是否對紫杉醇不敏感或者未被施予足夠的紫杉醇。完整的藥物動力學 (PK) 概況分析 (Full pharmacokinetic (PK) profiling) 是在該等狀況之下要根據個人的藥物動力學變化來提供適當的藥物劑量之引導的唯一方式。

【0006】 目前無可用的方法來執行紫杉醇之一完整的PK定量分析(full PK quantitation)而不用將病患招募於需要住院的全面臨床試驗(comprehensive clinical testing)之中。該PK試驗的典型持續時間可能會超過一為48小時的期間並且包含重複抽血。目前，要分析紫杉醇的血液濃度需要使用複雜的實驗室設備，包含液相層析/質譜分析(LC/MS)方法。這些方法非常昂貴，目前超過(美金) \$ 120/樣品，而且設備成本係在每台儀器超過(美金) \$ 150K~\$ 200K的範圍之內。亦經證實的是，要將各個特定的病患的PK參數充分地特徵化，需要在一為48至72小時的時段內收集到最少4個數據點。讓病患待在醫院以供PK試驗動輒會將成本推高至每名病患大致為(美金) \$ 10,000。一要證實PK引導的給藥(PK guided dosing)的臨床療效之經充分動員的第III期臨床試驗(sufficiently powered Phase III clinical trial)會需要500名病患(250

名病患來供BSA給藥以及250名病患來供PK引導的給藥)。單獨生物分析成本(bioanalytical cost)就要(美金) \$ 1.5M [500個數據點 × 6個週期的化學治療 × 4次採血(blood samplings)以供PK分析 × (美金) \$ 120/樣品分析]。試驗的其他組件將大概花費每名病患為(美金) \$ 100,000，總計(美金) \$ 50 M。這代表要獲得引導出最佳腫瘤反應的劑量調整所必需之有意義的臨床數據以及裝置的法定認證(regulatory approval of the device)之一顯著障礙。因此，對於要為許多具有一相當狹窄的治療範圍的藥物來建立治療藥物監測(therapeutic drug monitoring, TDM)而言，分析方法和儀器的高成本具有讓人卻步的後果。

【0007】 因此，仍然需要有用以監測病患體內之紫杉醇的藥物動力學之簡單、有效且便宜的試劑和策略，俾得以藉由對個別的患者告知給藥策略之任一調整來適當地訂定個人化療法。本發明力求符合這項需求並且提供進一步的相關優點。

【發明內容】

【0008】 發明概要

提供本案發明概要以介紹一群呈一簡化型式的概念，該等概念將被進一步地描述於後面的詳細說明之內。本案發明概要並非意欲用來鑑別所請專利標的之關鍵特徵，亦非要被用來作為決定所請專利標的之範圍的輔助。

【0009】 在一個方面，本案揭露內容提供一會結合

紫杉醇的親和性試劑。該親和性試劑可為衍生自單株抗體(mAb) 8A10或3C6之一單株抗體、抗體片段或抗體衍生物。在某些具體例中，該親和性試劑包含有介於1個和6個之間的抗體8A10或3C6之互補決定區(complementary determining regions, CDRs)。在某些具體例中，該親和性試劑包含有介於1個和6個之間的CDRs包含有一胺基酸序列，相較於該抗體8A10或3C6之一CDR，帶有至少1個胺基酸差異。在某些具體例中，相對於該抗體8A10或3C6之一可變領域(variable domain)的一個非-CDR區域，該親和性試劑含有至少1個胺基酸差異。

【0010】 在另一個方面，本案揭露內容提供用以偵測一樣品中的紫杉醇的方法，包括令該樣品接觸一被描述於此的親和性試劑以及偵測一介於紫杉醇和該親和性試劑之間的複合物的形成。在一具體例中，該方法一包括定量分析該樣品中的紫杉醇的位準。在一具體例中，當該樣品是一得自於一個體的生物樣品時，該方法亦包含測定該個體體內的紫杉醇之數量。該方法可進一步包括測定是否有足夠或不足的紫杉醇已被或正被投藥給該個體。在又另一個具體例中，該方法進一步包括依據得自於該個體的生物樣品中的紫杉醇之定量分析結果來增高或降低被投藥給該個體的紫杉醇(或以紫杉醇為主的治療劑)之數量。

【0011】 在另一個方面，本案揭露內容提供被配置用以偵測和/或定量一樣品中的紫杉醇的套組與裝置，它們包含有被描述於此的該親和性試劑。

【圖式簡單說明】

【0012】 本發明之前述方面以及許多附帶的優點，當結合附圖時，透過參考下面的詳細說明，將變得更容易被體會且變得更好瞭解，其中：

【0013】 圖1係一圖，圖解說明完整的mAb 8A10 IgG (以及3C6)對一BSA-紫杉醇抗原之一直接結合。

【0014】 圖2係一圖，圖解說明在游離的紫杉醇(free paclitaxel)之存在下測試完整的mAb 8A10 IgG (以及3C6)對一BSA-紫杉醇抗原之結合的競爭性抑制ELISA。

【0015】 圖3係一圖，圖解說明在游離的紫杉醇之存在下，完整的mAb 8A10 IgG (以及3C6)對一BSA-紫杉醇抗原之直接結合。

【0016】 圖4係為一通用化抗體結構的動畫圖解說明，該抗體包含重鏈和輕鏈以及它們各自的CDRs，還有用來為各個CDR發展個別的CDR資料庫的方法，該方法在每個胺基酸位置處引入所有可能的變異，一次一個位置。

【0017】 圖5係為用於篩選被生成於個別的CDR資料庫之內的Fabs的動畫圖解說明，該篩選偵測被生成的Fab變異體(Fab variants)對感興趣的抗原(例如，紫杉醇)之直接結合。

【0018】 圖6A-6G圖解說明用以證明被選定的8A10衍生的Fab變異體(亦即帶有單一的CDR胺基酸變異)對BSA-紫杉醇之結合的ELISA分析。

【0019】 圖7圖解說明一用以證明得自於組合資料庫 (combinatorial library) 之被選定的8A10衍生的Fab變異體對BSA-紫杉醇之結合的ELISA分析。

【0020】 圖8是一有關包含來自參考抗體8A10 (reference 8A10 antibody) 以及得自於組合資料庫的變異體之序列的輕鏈可變區(variable light chain region)和重鏈可變區(variable heavy chain region)的胺基酸序列排比(amino acid sequence alignment)。括弧內的數字是指各個相應序列被載述於序列表(Sequence Listing)之內的參考序列辨識編號(reference SEQ ID NOS)。變異的區域被指明。

【0021】 圖9是有關包含來自參考抗體3C6以及得自於個別的CDR突變資料庫(CDR mutation libraries)的Fab變異體之序列的輕鏈可變區之一系列的胺基酸序列排比。CDR區係以暗色突出(dark highlighting)被顯示於3C6 VL序列之內，而Fab變異體之內的變異係以淺色突出(light highlighting)來顯示。須注意L1a和L1b資料庫的結果被顯示於分開的序列排比之內。括弧內的數字是指各個相應序列被載述於序列表之內的參考序列辨識編號。

【0022】 圖10是有關包含來自參考抗體3C6以及得自於個別的CDR突變資料庫的Fab變異體之序列的重鏈可變區之一系列的胺基酸序列排比。CDR區係以暗色突出被顯示於3C6 VH序列之內，而Fab變異體之內的變異係以淺色突出來顯示。須注意H2a和H2b資料庫的結果被顯

示於分開的序列排比之內。括弧內的數字是指各個相應序列被載述於序列表之內的參考序列辨識編號。

【0023】 圖 11A-11B 圖解說明用以證明被選定的 3C6 衍生的 Fab 變異體(亦即帶有單一的 CDR 胺基酸變異)對 BSA-紫杉醇之結合的 ELISA 分析。

【實施方式】

【0024】 詳細說明

本案揭露內容大致上係有關於會結合紫杉醇的親和性試劑組成物，諸如包含抗體變異體、抗體片段以及抗體衍生物之以抗體為主的組成物。如下面更詳細地描述的，本案發明人起初發展單株抗體，諸如 8A10 以及 3C6，它們被證實會結合紫杉醇而可供用於偵測一樣品中的紫杉醇。本案發明人建構針對抗紫杉醇參考抗體 8A10 以及 3C6 (reference 8A10 and 3C6 anti-paclitaxel antibodies) 的各個 CDR 之內的每一個位置來引入單一胺基酸序列變異的資料庫。8A10 資料庫係就展現出會結合紫杉醇抗原的變型 Fab 領域 (variant Fab domains) 來篩選。具有“陽性”變異的特異性突變被組合於一組合資料庫之內且被再次篩選以確認結合。這些結果顯示：可用來當作，例如，用以結合、分離和/或偵測紫杉醇的組成物之親和性試劑可以從已知的紫杉醇-結合抗體(諸如 8A10 以及 3C6) 而被生成。

【0025】 根據前述，在一個方面本案揭露內容提供一會結合紫杉醇的親和性試劑。在本文中所描述的任一個

具體例中，該親和性試劑會結合紫杉醇，這可用本技藝中已知的任一種技術來確認。一有關於紫杉醇結合的示例性技術將會於下面被更詳細地描述。在一具體例中，該親和性試劑是一單株抗體、抗體片段或抗體衍生物。該親和性試劑可為一會結合紫杉醇的已知抗體(諸如8A10或3C6)之一抗體片段或抗體衍生物。

【0026】 在一具體例中，該親和性試劑包含有6個互補決定區，亦即有3個是位在輕鏈架構上(亦被稱為CDRL1、CDRL2和CDRL3)，以及有3個是位在重鏈架構上(亦被稱為CDRH1、CDRH2和CDRH3)。

8A10-衍生的親和性試劑：

【0027】 在一具體例中，該親和性試劑包含有被包含在該8A10 mAb之內的1、2、3、4、5個或全部6個互補決定區。特別地，該親和性試劑可包含有一具有如序列辨識編號：11內所載述之胺基酸序列的CDRL1，一具有如序列辨識編號：31內所載述之胺基酸序列的CDRL2，一具有如序列辨識編號：45內所載述之胺基酸序列的CDRL3，一具有如序列辨識編號：58內所載述之胺基酸序列的CDRH1，一具有如序列辨識編號：68內所載述之胺基酸序列的CDRH2，和/或一具有如序列辨識編號：99內所載述之胺基酸序列的CDRH3，和/或此等之任一組合。

【0028】 在又一具體例中，如將於下面更詳細描述的，該親和性試劑相對於該8A10 mAb的胺基酸序列包含

有至少1個胺基酸差異。該mAb的序列是已知的且為具有本技藝中之通常技術者可辨別的。在一具體例中，該親和性試劑包含有至少1個胺基酸差異位在該mAb 8A10的重鏈或輕鏈之可變區的架構(亦即非-CDR)序列之內。

【0029】 在又一具體例中，該親和性試劑包含有1、2、3、4、5個或全部6個CDRs係對應於該8A10 mAb的CDRs，但相對於該8A10 mAb，在該6個CDRs之一或多者之內亦包含有呈任一種組合的至少1個突變(例如，1個胺基酸差異)。特別地，相對於：一具有如序列辨識編號：11內所載述之胺基酸序列的CDRL1、一具有如序列辨識編號：31內所載述之胺基酸序列的CDRL2、一具有如序列辨識編號：45內所載述之胺基酸序列的CDRL3、一具有如序列辨識編號：58內所載述之胺基酸序列的CDRH1、一具有如序列辨識編號：68內所載述之胺基酸序列的CDRH2和/或一具有如序列辨識編號：99內所載述之胺基酸序列的CDRH3，和/或此等之任一組合，該親和性試劑可在該等CDRs的至少一者內包含有至少1個胺基酸差異。

【0030】 在一具體例中，該親和性試劑特別地包含有：

一具有如序列辨識編號：1 內所載述之胺基酸序列 KPXQXVXSXVX 的輕鏈互補決定區 CDR1，

其中位在位置 3 處的 X 是 S 或 V，

其中位在位置 5 處的 X 是 N、T、D、M、
R 或 K，

其中位在位置 7 處的 X 是 G 或 F，

其中位在位置 9 處的 X 是 A、P 或 R，

其中位在位置 11 處的 X 是 T、N 或 A；

一具有如序列辨識編號：2 內所載述之胺
基酸序列 XXXRYX 的輕鏈互補決定區
CDR2，

其中位在位置 1 處的 X 是 S 或 Y，

其中位在位置 2 處的 X 是 A、H 或 T，

其中位在位置 3 處的 X 是 S 或 T，

其中位在位置 4 處的 X 是 N 或 R，

其中位在位置 7 處的 X 是 T、M 或 R；

一具有如序列辨識編號：3 內所載述之胺
基酸序列 QQYXSXPYX 的輕鏈互補決定區
CDR3，

其中位在位置 4 處的 X 是 S 或 P，

其中位在位置 6 處的 X 是 Y、K、R 或 V，

其中位在位置 9 處的 X 是 T 或 R；

一具有如序列辨識編號：4 內所載述之胺
基酸序列 GXXFXDXXXX 的重鏈互補決定區
CDR1，

其中位在位置 2 處的 X 是 Y 或 S，

其中位在位置 3 處的 X 是 T 或 R，

其中位在位置 5 處的 X 是 T、S 或 H，

其中位在位置 7 處的 X 是 S 或 Y，

其中位在位置 8 處的 X 是 T 或 R，

其中位在位置 9 處的 X 是 M 或 T，

其中位在位置 10 處的 X 是 N 或 K；

一具有如序列辨識編號：5 內所載述之胺
基酸序列 **XIXPXXXXXXXXNQXFXX** 的重鏈互
補決定區 **CDR2**，

其中位在位置 1 處的 X 是 E 或 K，

其中位在位置 3 處的 X 是 D、F、W 或 A，

其中位在位置 5 處的 X 是 N、T、M、S、
K、W 或 R，

其中位在位置 6 處的 X 是 N、S、D 或 R，

其中位在位置 7 處的 X 是 G 或 L，

其中位在位置 8 處的 X 是 G、W 或 R，

其中位在位置 9 處的 X 是 T 或 A，

其中位在位置 10 處的 X 是 N、R 或 A，

其中位在位置 11 處的 X 是 Y 或 T，

其中位在位置 14 處的 X 是 K 或 N，

其中位在位置 16 處的 X 是 K 或 S，

其中位在位置 17 處的 X 是 G 或 L；和/或

一具有如序列辨識編號：6 內所載述之胺
基酸序列 **ARXXWG** 的重鏈互補決定區 **CDR3**，

其中位在位置 3 處的 X 是 G、R 或 P，

其中位在位置 4 處的 X 是 V、P 或 S；

其中該單株抗體、抗體片段或抗體衍生物會結合紫杉醇。

【0031】 如此處所用的，術語“抗體”涵蓋會專一性地結合一感興趣之標的(例如，紫杉醇)或它的某部分之完整抗體暨其功能性抗體片段，衍生自任一種可產生抗體的哺乳動物(例如，小鼠、大鼠、兔子、駱駝，以及包含人類之靈長類動物)或是被合成地或重組地產生。例示性抗體包含：多株型、單株型以及重組型抗體，多特異性抗體(multispecific antibodies) (例如，雙特異性抗體)，人類化抗體(humanized antibodies)；鼠源抗體(murine antibodies)，嵌合型小鼠-人類、小鼠-靈長類、靈長類-人類單株抗體，以及抗個體基因型抗體(anti-idiotypic antibodies)，且可為任一種完整分子或其片段，諸如一抗原結合片段。如此處所描述的，單株抗體是有利的因為它們在選定的抗原(諸如一治療性藥物，例如紫杉醇)之結合上提供增高的專一性。然而，僅包含有一種抗體片段或衍生物的“單源性(clonal)”組成物亦為可能的。

【0032】 如此處所用的，術語“抗體片段”可意指“抗原結合片段”。術語“抗原結合片段”意指來自於一全長抗體(full length antibody)或與之有關的抗原結合區或可變區。抗體片段的例示性實例包含 Fab、Fab'、F(ab)₂、F(ab')₂，以及 Fv 片段、scFv 片段、雙價抗體(diabodies)、奈米抗體(nanobodies)、直鏈抗體(linear

antibodies)、單鏈抗體分子(single chain antibody molecules)，以及由抗體片段所形成的多特異性抗體。

【0033】 如此處所用的，一“單鏈Fv”或“scFv”抗體片段包含有一抗體之VH和VL領域，其中這些領域是存在於一個單一的多肽鏈之內。一般而言，該Fv多肽進一步包含有一介於該VH和VL領域之間的多肽連接子，它讓該scFv得以形成用於抗原結合的所欲結構。

【0034】 如此處所用的，一“嵌合型抗體”是一重組型蛋白質，它含有衍生自一非人類物種(例如，嚙齒類動物)的可變領域以及互補決定區，而該抗體分子的其餘部分則是衍生自一人類抗體。

【0035】 如此處所用的，一“人類化抗體”是一嵌合型抗體，它包含有一最小序列符合衍生自被移植到一人類抗體架構中的非人類免疫球蛋白之特異性互補決定區。人類化抗體典型地是重組型蛋白質，其中僅有抗體互補決定區係為非人類來源。

【0036】 如此處所用的，術語“衍生物”表示該抗體或抗體片段已從一參考抗體被生成。舉例來說，有時候會想要修改或增進一參考抗體的結合特性，諸如參照抗-紫杉醇單株抗體8A10(或單株抗體3C6，如下所述)而被揭露於此處者。如下面更詳細地描述的，抗體8A10和3C6被進行各種不同的修飾，包含對編碼DNA來進行的突變，俾以改變結合性質。所形成帶有經改變的性質之抗體產物於是被稱為該參考抗體之一“衍生物”。舉例而言，

一抗體衍生物可為一含有由被施加至該參考抗體(或編碼該參考抗體之核酸)的親和力成熟方法(affinity maturation processes)所造成之突變的抗體。這樣的突變可導致帶有經改變的(例如，被改善的)結合親和性、選擇性等等之抗體。

【0037】 在某些具體例中，該輕鏈互補決定區CDR1具有如序列辨識編號：1內所載述之胺基酸序列KPXQXVXSXVX，其中位在位置3處的X是S或V，其中位在位置5處的X是N、R或K，其中位在位置7處的X是G，其中位在位置9處的X是A、P或R，以及位在位置11處的X是T、N或A。

【0038】 在某些具體例中，該輕鏈互補決定區CDR2具有如序列辨識編號：2內所載述之胺基酸序列XXXXRYX，其中位在位置1處的X是S，其中位在位置2處的X是A或T，其中位在位置3處的X是S或T，其中位在位置4處的X是N或R，以及其中位在位置7處的X是T或R。

【0039】 在某些具體例中，該輕鏈互補決定區CDR3具有如序列辨識編號：3內所載述之胺基酸序列QQYXSXPYX，其中位在位置4處的X是S，其中位在位置6處的X是Y、K、R或V，以及其中位在位置9處的X是T。

【0040】 在某些具體例中，該重鏈互補決定區CDR1具有如序列辨識編號：4內所載述之胺基酸序列

GXXFXDXXXX，其中位在位置2處的X是Y，其中位在位置3處的X是T或R，其中位在位置5處的X是T或H，其中位在位置7處的X是S，其中位在位置8處的X是T或R，其中位在位置9處的X是M，以及其中位在位置10處的X是N。

【0041】 在某些具體例中，該重鏈互補決定區CDR2具有如序列辨識編號：5內所載述之胺基酸序列XIXPXXXXXXXXNQXFXX，其中位在位置1處的X是E，其中位在位置3處的X是D、F、W或A，其中位在位置5處的X是N、S、K、W或R，其中位在位置6處的X是N或R，其中位在位置7處的X是G，其中位在位置8處的X是G、W或R，其中位在位置9處的X是T，其中位在位置10處的X是N，其中位在位置11處的X是Y，其中位在位置14處的X是K，其中位在位置16處的X是K，以及其中位在位置17處的X是G。

【0042】 在某些具體例中，該重鏈互補決定區CDR3具有如序列辨識編號：6內所載述之胺基酸序列ARXXWG，其中位在位置3處的X是G，以及其中位在位置4處的X是V或S。

【0043】 如此處所描述的，在某些具體例中，該親和性試劑相對於該mAb 8A10的CDR領域包含有位於該6個CDR領域之內的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多的突變。

【0044】 如上面所指明的，在某些具體例中，該親

和性試劑可為一不同於該8A10抗體的單株抗體、抗體片段或抗體衍生物。在某些具體例中，該親和性試劑是一不同於一8A10抗體片段的單株抗體、抗體片段或抗體衍生物。在此具體例中，該親和性試劑具有一胺基酸序列係不同於該 mAb 8A10 的任何單個連續子序列 (single contiguous subsequence)。

【0045】 在某些具體例中，該親和性試劑是一單株抗體、抗體片段或抗體衍生物，它在一CDR胺基酸序列內包含有至少一個胺基酸差異有別於該8A10抗體之一如序列辨識編號：11、31、45、58、68以及99內所載述之對應的CDR胺基酸序列。

【0046】 在某些具體例中，該親和性試劑是一單株抗體、抗體片段或抗體衍生物，它在一CDR內包含有一胺基酸序列係選自於下列序列辨識編號：12-30、32-44、46-57、59-67、69-90、92-98以及100-103。

【0047】 在某些具體例中，該親和性試劑是一單株抗體、抗體片段或抗體衍生物，它包含有至少一個或多個下列取代：對於序列辨識號：11，N5R、N5K、A9R、T11N以及T11A；對於序列辨識號：31，A2T、S3T、N4R以及T7R；對於序列辨識號：45，Y6R、Y6K以及Y6V；對於序列辨識號：58，T3R、T5H以及T8R；對於序列辨識號：68，D3F、D3W、D3A、N6R、G8R以及G8W。在又一具體例中，該單株抗體、抗體片段或抗體衍生物要不然包含有該8A10抗體之如序列辨識編號：

11、31、45、58、68以及99內所載述之相同的CDR序列。

【0048】 如將於下面更詳細描述的，個別的CDRs之進一步的具體例，它們是根據一組合資料庫篩選的結果，現在將做更詳細地描述。明顯可知的是，除非另有說明，一特定的CDR之任一特別的具體例可在該親和性試劑之內被組合以此處所載述的另一個特定的CDR之任何其他特別的具體例。

【0049】 在某些具體例中，該親和性試劑包含有一輕鏈CDR1帶有一胺基酸序列係選自於序列辨識編號：104-110。

【0050】 在某些具體例中，該親和性試劑包含有一輕鏈CDR2帶有一胺基酸序列係選自於序列辨識編號：111-117。

【0051】 在某些具體例中，該親和性試劑包含有一重鏈CDR1帶有一胺基酸序列係選自於序列辨識編號：118-124。

【0052】 在某些具體例中，該親和性試劑包含有一重鏈CDR2帶有一胺基酸序列係選自於序列辨識編號：125-132。

【0053】 如上面一般所指明的，被揭示的親和性試劑之具體例可衍生自該8A10抗體，且具有至少某個胺基酸序列差異有別於該8A10抗體。相較於該mAb 8A10之一CDR（如序列辨識編號：11、31、45、58、68和99內

所載述者)、該8A10抗體的可變輕鏈或重鏈序列之架構(非-CDR)區或該mAb 8A10之其他領域,該親和性試劑可包含有一或多個突變,例如,胺基酸取代刪除、加入和/或取代。該8A10抗體的可變輕鏈和重鏈序列係分別為如此處所述的序列辨識編號:8以及10。在某些具體例中,該親和性試劑具有一組合的CDR序列(考慮到全部6個CDR序列)係至少大約60、65、70、75、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%相同於該8A10抗體之組合的CDR序列。在其他的具體例中,該親和性試劑具有一可變輕鏈或重鏈帶有一胺基酸序列係至少大約60、65、70、75、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%相同於該8A10抗體之可變輕鏈或重鏈序列的序列。對具有本領域通常技術者而言會是明顯可知的是,該親和性試劑係有別於該8A10參考序列,且當一領域與該8A10參考序列之對應的領域具有一完美的相同性時,那麼有一差異被併入至一不同的領域中。

【0054】 如此處所用的,當就一多肽而被使用時,術語“百分比相同性”或“百分比相同的”係被定義為:在排比序列以達到最大的百分比相同性之後,一多肽內的胺基酸殘基相同於一指定的參考多肽(諸如序列辨識編號:8的胺基酸序列)之胺基酸序列的百分比。胺基酸序列相同性可依據本技藝中已知的任一種運算式或技術而被決定。

【0055】 如此處所用的,一“胺基酸”係指在蛋白質

中所發現的20種天然發生的胺基酸之任一者、該等天然發生的胺基酸之D-立體異構物(例如，D-蘇胺酸)、非天然的胺基酸以及經化學修飾的胺基酸。這些型式的胺基酸之每一者不是相互排斥的。 α -胺基酸包含有一個碳原子被鍵結以一個胺基基團、一個羧基基團、一個氫原子以及一個被稱為一“側鏈”的區別性基團(distinctive group)。天然發生的胺基酸之側鏈已被詳知於本技藝中，並且包含，例如，氫(例如，在甘胺酸中)、烷基((例如，在丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸中)、經取代的烷基(例如，在蘇胺酸、絲胺酸、甲硫胺酸、半胱胺酸、天冬胺酸、天冬醯胺、麩胺酸、麩胺醯胺、精胺酸以及離胺酸中)、芳烷基(例如，在苯丙胺酸以及色胺酸中)、經取代的芳烷基(例如，在酪胺酸中)以及雜芳烷基(例如，在組胺酸中)。

【0056】 下面的縮寫被使用於該20種天然發生的胺基酸：丙胺酸(Ala；A)、天冬醯胺(Asn；N)、天冬胺酸(Asp；D)、精胺酸(Arg；R)、半胱胺酸(Cys；C)、麩胺酸(Glu；E)、麩胺醯胺(Gln；Q)、甘胺酸(Gly；G)、組胺酸(His；H)、異白胺酸(Ile；I)、白胺酸(Leu；L)、離胺酸(Lys；K)、甲硫胺酸(Met；M)、苯丙胺酸(Phe；F)、脯胺酸(Pro；P)、絲胺酸(Ser；S)、蘇胺酸(Thr；T)、色胺酸(Trp；W)、酪胺酸(Tyr；Y)以及纈胺酸(Val；V)。

【0057】 經常地，相對於該8A10參考序列(或如下所

述的該3C6序列)的任一部分之所欲的胺基酸取代包含一使用一相似胺基酸的取代，該相似胺基酸係藉由一為參考以及取代的殘基(reference and substituted residues)所展現的相似特徵來定義。因此，在某些具體例中，相較於該8A10參考序列(或該3C6序列)，該變型親和性試劑包含有一守恆的胺基酸取代(conservative amino acid substitution)。任何一種取代突變是守恆的，因為它最低限度地破壞蛋白質的生物化學性質。被引入以替代守恆性胺基酸殘基的突變之非限制性實例包含：以帶正電荷的殘基(例如，H、K以及R)來取代帶正電荷的殘基；以帶負電荷的殘基(例如，D和E)來取代帶負電荷的殘基；以中性極性殘基(例如，C、G、N、Q、S、T以及Y)來取代中性極性殘基；以及以中性非極性殘基(例如，A、F、I、L、M、P、V以及W)來取代中性非極性殘基。非守恆性取代(例如，用脯胺酸來取代甘胺酸)亦可被為之。

【0058】 胺基酸，且更明確地說，它們的側鏈可藉由它們的化學特性而被特徵化。舉例而言，胺基酸側鏈可為帶正電荷的、帶負電荷的或中性的。如具有本領域技術之人士已知的，一溶液的pH值會影響某些側鏈的帶電性質(charged nature)。可為帶正電荷的側鏈之非限制性實例包含組胺酸、精胺酸以及離胺酸。可為帶負電荷的側鏈之非限制性實例包含天冬胺酸以及麩胺酸。可被特徵化為中性的側鏈之非限制性實例包含甘胺酸、丙胺酸、苯丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、半胱胺酸、天冬醯胺、

麩胺醯胺、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、甲硫胺酸、脯胺酸以及色胺酸。

【0059】 側鏈的位阻(sterics)亦可被用來特徵化一胺基酸。原子直徑之表(tables of atom diameters)可幫助吾人來確定一側鍊是否大於另一者。計算機模型也可以幫助這個確定。

【0060】 胺基酸亦可藉由它們的側鏈之極性而被特徵化。典型地要比非極性側鏈更為親水性的極性側鏈包含，例如，那些為絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、半胱胺酸、天冬醯胺以及麩胺醯胺所具者。典型地要比極性側鏈更為疏水性的非極性側鏈包含，例如，那些為甘胺酸、丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸以及色胺酸所具者。吾人可使用本技藝中已知的涉及側鏈之原子負電性確認(atom electronegativity determinations)以及三維結構評估(three-dimensional structural assessments)之傳統技術來決定一側鏈的極性。吾人亦可使用本技藝中已知的傳統技術來比較側鏈的疏水性/親水性，譬如比較各個胺基酸的辛醇/水分佈係數(octanol/water partition coefficient)。

【0061】 任擇地，吾人可考慮胺基酸的疏水性指數(hydrophobic index)。每個胺基酸已根據它們的疏水性和/或電荷特徵而被指定一疏水性指數，這些是：異白胺酸(+4.5)；纈胺酸(+4.2)；白胺酸(+3.8)；苯丙胺酸(+2.8)；半胱胺酸/胱胺酸(+2.5)；甲硫胺酸(+1.9)；丙胺

酸(+1.8)；甘胺酸(-0.4)；蘇胺酸(-0.7)；絲胺酸(-0.8)；色胺酸(-0.9)；酪胺酸(-1.3)；脯胺酸(-1.6)；組胺酸(-3.2)；麩胺酸鹽(-3.5)；麩胺醯胺(-3.5)；天冬胺酸鹽(-3.5)；天冬醯胺(-3.5)；離胺酸(-3.9)；和/或精胺酸(-4.5)。胺基酸疏水性指數在賦予蛋白質相互作用的生物功能(interactive biological function)上的重要性是本技藝中已普遍理解的。已知某些胺基酸可被用來替代其他具有一相似的疏水性指數和/或計分和/或仍維持一相似的生物活性之胺基酸。在根據疏水性指數來製造改變時，取代的胺基酸所具疏水性指數可為居於 ± 2 之內、 ± 1 之內或 ± 0.5 之內。

【0062】亦為本技藝已理解的是，相似胺基酸的取代可根據親水性(hydrophilicity)而被有效地進行。如美國專利第4,554,101 號(在此被併入本案以作為參考)內所詳述的，下面的親水性數值已被指定給胺基酸殘基：精胺酸(+3.0)；離胺酸(+3.0)；天冬胺酸鹽(+3.0 \pm 1)；麩胺酸鹽(+3.0 \pm 1)；絲胺酸(+0.3)；天冬醯胺(+0.2)；麩胺醯胺(+0.2)；甘胺酸(0)；蘇胺酸(-0.4)；脯胺酸(-0.5 \pm 1)；丙胺酸(-0.5)；組胺酸(-0.5)；半胱胺酸(-1.0)；甲硫胺酸(-1.3)；纈胺酸(-1.5)；白胺酸(-1.8)；異白胺酸(-1.8)；酪胺酸(-2.3)；苯丙胺酸(-2.5)；色胺酸(-3.4)。在根據相似的親水性數值來製造改變時，吾人所預期的是，取代的胺基酸所具親水性數值可為居於 ± 2 之內、 ± 1 之內或 ± 0.5 之內。

3C6-衍生的親和性試劑

【0063】 在一具體例中，該親和性試劑包含有被包含在該mAb 3C6之內的該等互補決定區之1、2、3、4、5個或全部6個。特別地，該親和性試劑可包含有一具有如序列辨識編號：143內所載述之胺基酸序列的CDRL1，一具有如序列辨識編號：155內所載述之胺基酸序列的CDRL2，一具有如序列辨識編號：160內所載述之胺基酸序列的CDRL3，一具有如序列辨識編號：166內所載述之胺基酸序列的CDRH1，一具有如序列辨識編號：172內所載述之胺基酸序列的CDRH2，和/或一具有如序列辨識編號：184內所載述之胺基酸序列的CDRH3，和/或此等之任一組合。

【0064】 在又一具體例中，該親和性試劑相對於該mAb 3C6的胺基酸序列包含有至少1個胺基酸差異。該mAb的序列是已知的且為具有本技藝中之通常技術者可辨別的。在一具體例中，該親和性試劑包含有至少1個胺基酸差異位在該mAb 3C6的重鏈或輕鏈之可變區的架構(亦即非-CDR)序列之內。

【0065】 在另一具體例中，該親和性試劑包含有1、2、3、4、5個或全部6個CDRs係對應於該mAb 3C6的CDRs，但相對於該mAb 3C6，在該6個CDRs之任一者或多者之內亦包含有至少1個突變，例如1個胺基酸差異。特別地，相對於：一具有如序列辨識編號：143內所載述之胺基酸序列的CDRL1、一具有如序列辨識編號：155

內所載述之胺基酸序列的CDRL2、一具有如序列辨識編號：160內所載述之胺基酸序列的CDRL3、一具有如序列辨識編號：166內所載述之胺基酸序列的CDRH1、一具有如序列辨識編號：172內所載述之胺基酸序列的CDRH2和/或一具有如序列辨識編號：184內所載述之胺基酸序列的CDRH3，和/或此等之任一組合，該親和性試劑可在該等CDRs的至少一者內包含有至少1個胺基酸差異。

【0066】 在一具體例中，該親和性試劑特別地包含有：

一具有如序列辨識編號：133 內所載述之胺基酸序列 X SXQLXHX XGNXYXH 的輕鏈互補決定區 CDR1，

其中位在位置 1 處的 X 是 R 或 H，

其中位在位置 3 處的 X 是 R、G 或 N，

其中位在位置 5 處的 X 是 S、M 或 G，

其中位在位置 7 處的 X 是 V 或 L，

其中位在位置 9 處的 X 是 S 或 I，

其中位在位置 10 處的 X 是 N 或 V，

其中位在位置 13 處的 X 是 T 或 S，

其中位在位置 15 處的 X 是 L 或 W；

一具有如序列辨識編號：134 內所載述之胺基酸序列 XVSXXXS 的輕鏈互補決定區 CDR2，

其中位在位置 1 處的 X 是 K 或 N，

其中位在位置 4 處的 X 是 N 或 R，

其中位在位置 5 處的 X 是 R 或 L，

其中位在位置 6 處的 X 是 F 或 R；

一具有如序列辨識編號：135 內所載述之
胺基酸序列 SXSTHXXPX 的輕鏈互補決定區
CDR3，

其中位在位置 2 處的 X 是 Q 或 P，

其中位在位置 6 處的 X 是 V 或 G，

其中位在位置 7 處的 X 是 P 或 S，

其中位在位置 9 處的 X 是 T 或 R；

一具有如序列辨識編號：136 內所載述之
胺基酸序列 XDSITXGYXX 的重鏈互補決定區
CDR1，

其中位在位置 1 處的 X 是 G 或 P，

其中位在位置 6 處的 X 是 S 或 I，

其中位在位置 9 處的 X 是 W 或 F，

其中位在位置 10 處的 X 是 N、R 或 K；

一具有如序列辨識編號：137 內所載述之
胺基酸序列 XISYXGXXYXXPXLKX 的重鏈互
補決定區 CDR2，

其中位在位置 1 處的 X 是 Y 或 F，

其中位在位置 5 處的 X 是 S、R 或 T，

其中位在位置 7 處的 X 是 S 或 D，

其中位在位置 8 處的 X 是 T 或 I，
其中位在位置 10 處的 X 是 Y 或 F，
其中位在位置 11 處的 X 是 N 或 K，
其中位在位置 13 處的 X 是 S 或 F，
其中位在位置 16 處的 X 是 S 或 N；和/或
一具有如序列辨識編號：138 內所載述之
胺基酸序列 XXXXY 的重鏈互補決定區 CDR3，
其中位在位置 1 處的 X 是 G、A 或 E，
其中位在位置 2 處的 X 是 D 或 W，
其中位在位置 3 處的 X 是 G 或 T，
其中位在位置 4 處的 X 是 A、D、G 或 Q；
其中該單株抗體、抗體片段或抗體衍生物會結
合紫杉醇。

【0067】 如上面所指明的，在某些具體例中，該親和性試劑可為一不同於該3C6抗體的單株抗體、抗體片段或抗體衍生物。在某些具體例中，該親和性試劑是一不同於一3C6抗體片段的單株抗體、抗體片段或抗體衍生物。在此具體例中，該親和性試劑具有一胺基酸序列係不同於該mAb 3C6的任何單個連續子序列。

【0068】 在某些具體例中，該親和性試劑是一單株抗體、抗體片段或抗體衍生物，它在一CDR胺基酸序列內包含有至少一個胺基酸差異有別於該3C6抗體之一如序列辨識編號：143、155、160、166、172以及184內所載述之對應的CDR胺基酸序列。

【0069】 在某些具體例中，該親和性試劑是一單株抗體、抗體片段或抗體衍生物，它在一CDR內包含有一胺基酸序列係選自於下列序列辨識編號：145-149、151-154、156-159、161-165、167-171、174-178、180-183、185-189以及246-248。

【0070】 如上面一般所指明的，被揭示的親和性試劑之具體例可衍生自該3C6抗體，且具有至少某個胺基酸序列差異有別於該3C6抗體。相較於該mAb 3C6之一CDR (如序列辨識編號：143、155、160、166、172以及184內所載述者)、該3C6抗體的可變輕鏈或重鏈序列之架構(非-CDR)區或該mAb 3C6之其他領域，該親和性試劑可包含有一或多個突變，例如，胺基酸取代刪除、加入和/或取代。該3C6抗體的可變輕鏈和重鏈序列係分別為如此處所述的序列辨識編號：140以及142。在某些具體例中，該親和性試劑具有一組合的CDR序列(考慮到全部6個CDR序列)係至少大約60、65、70、75、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%相同於該3C6抗體之組合的CDR序列。在其他的具體例中，該親和性試劑具有一可變輕鏈或重鏈帶有一胺基酸序列係至少大約60、65、70、75、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%相同於該3C6抗體之可變輕鏈或重鏈序列的胺基酸序列。

【0071】 在一具體例中，衍生自該3C6抗體的該親和性試劑是一單株抗體、抗體片段或抗體衍生物，它包含有

至少一個或多個下列取代：對於序列辨識號：143或序列辨識號：144，S5G；以及對於序列辨識號：184，A4Q和A4G。

偵測方法

【0072】 在另一方面，本案揭露內容提供一種用於偵測一樣品中的紫杉醇或以紫杉醇為主的治療劑的方法。該方法可為併入有任一種被描述於此的紫杉醇-結合親和性試劑(例如，以抗體為主的親和性試劑)來作為一捕捉和/或偵測試劑(capture and/or detection reagent)的任何免疫分析法。一般來說，該方法包括：令該樣品接觸該紫杉醇-結合親和性試劑，偵測一介於該親和性試劑和紫杉醇之間的複合物的形成。一複合物的形成是該樣品內存在有紫杉醇的指標。

【0073】 在某些具體例中，該樣品是一生物樣品，諸如任一種來自一個體的生物流體。例示性的非限制性生物樣品包含血液、血漿、血清、腦脊髓液(CSF)以及類似之物。在某些具體例中，該個體是一哺乳動物，諸如人類。

【0074】 在某些具體例中，該方法亦包括定量該樣品中的紫杉醇或以紫杉醇為主的治療劑的位準。該定量步驟包括：決定一介於該紫杉醇-結合親和性試劑和紫杉醇之間的複合物形成之位準，以及比較該位準以及得自於一或多個具有已知濃度的紫杉醇之樣品的複合物形成之位準。具有已知濃度的紫杉醇之樣品可被同時地或分開地測

試。被偏好的是，為了標準化之目的，該等對照組樣品使用相同的一般規程。在某些情況下，該樣品中的紫杉醇的數量可藉由比較所觀察到的位準以及一於先前已建立的查對表(look up table)。

【0075】有關於適用的免疫分析法之格式是本技藝中已詳知且被實施的。該等用於紫杉醇(或以抗體為主的親和性試劑)的偵測和/或定量分析之分析法典型地涉及潛在地含有紫杉醇的樣品與該親和性試劑之培育，以及經由一介於該親和性試劑和紫杉醇之間的複合物之形成的偵測。在各種不同的具體例中，該生物樣品之組份(包含標的紫杉醇)或者該親和性試劑被固定化。在某些具體例中，該親和性試劑或者標的紫杉醇的某個組份以一會提供一可偵測的信號之方式被修飾。例示性技術包含免疫分析法，諸如原位雜交法(*in situ* hybridization)、西方墨點轉漬法(western blots)、免疫沉澱法(immunoprecipitation)，接續以十二烷基硫酸鈉聚丙稀醯胺凝膠電泳法(SDS-PAGE electrophoresis)、免疫細胞化學法(immunocytochemistry)、酵素聯結免疫吸附分析法(ELISA)、橫向流動分析(lateral flow assays)等等，當中有些方法將詳述於下。

【0076】在競爭性免疫分析法(competitive immunoassays)中，來自一生物樣品的未標記的分析物(unlabeled analyte)，諸如紫杉醇，與該分析物之一經標記的型式(labeled version)來競爭對一親和性試劑的結

合。經標記的未結合分析物的數量接而被量測。該生物樣品內的未標記的分析物越多會導致更多的被取代或從該親和性試劑被競爭掉(competed off)之經標記的分析物。因此，可被沖洗掉之經標記的未結合分析物的數量係正比於該生物樣品內的未標記的分析物之數量。在此具體例之一變化中，經標記之被結合的分析物之數量被量測，與存在於該生物樣品內的未標記的分析物之數量成反比。在某些具體例中，該親和性試劑被固定化以促進該試劑的洗滌而不失去被結合的分析物。

【0077】 在一例示的非競爭型免疫分析法中，該生物樣品可被帶至與一固相支撐物或一載體(諸如硝化纖維素、一塑膠井、珠粒、磁性粒子以及類似之物)接觸並被固定於上。該固相支撐物或載體能夠固定細胞、細胞粒子或可溶性蛋白質。該固相支撐物或載體接而可以合適的緩衝液來清洗，繼而為使用該可偵測之經標記的親和性試劑之處理。該固相支撐物或載體接而可以該緩衝液來進行第二次的清洗以移除未結合的親和性試劑。位在該固相支撐物或載體之上的被結合的標記之數量可接而藉由傳統方式來偵測且係直接地政比於標的分析物(諸如紫杉醇)之數量。

【0078】 術語“固相支撐物或載體”係意欲表示任何能夠結合紫杉醇或一如此處所描述之會結合紫杉醇的親和性試劑之支撐物或載體。已詳知的支撐物或載體包含玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、葡聚醣(dextran)、尼

龍(nylon)、澱粉酶(amylases)、天然的和經改質的纖維素(natural and modified celluloses)、聚丙烯醯胺(polyacrylamides)、輝長石(gabbros)和磁鐵石(magnetite)以及類似之物。就本案揭露內容之目的而言，一當作一載體來用的基材可為能溶解至某個程度或者為不可溶的。該支撐物或載體材料可實際上具有任何可能的結構配置以符合任何分析格式，只要被偶合的標的或親和性試劑能夠分別地結合至對應的親和性試劑或標的分子。因此，該支撐物或載體可以基本上是球形的，就像一珠粒或磁性粒子，或者為圓柱形，就像一根試管或一個多井盤(multi-well plate)之井的內側表面。任擇地，該表面可以是平的，諸如一薄片(sheet)、試紙條(test strip)等等，它在一橫向流動分析格式中是會是適當的。那些熟習本項技藝者會認知到，許多其他合適的載體可用於結合親和性試劑或標的紫杉醇(或以紫杉醇為主的治療劑)，或者能夠藉由例行實驗來探查此等之物。

【0079】 在某些具體例中，紫杉醇或該親和性試劑依據本技藝中之標準規程而被直接地固定至該固相支撐物或載體。在其他具體例中，紫杉醇或該親和性試劑被間接地固定於該固相支撐物或載體之上。舉例而言，如將於下面更詳細描述的，以抗體為主的紫杉醇親和性試劑可被捕捉並固定至該固相支撐物。有時候會偏好使用已知的封阻試劑(blocking reagents)來防止假的或升高的背景結合(spurious or elevated background binding)。該支撐物

可被併入至一含有一介質(matrix)的裝置內，該介質容許該包含紫杉醇的生物樣品通過一帶有被固定的親和性試劑之區域的移動。由於此處所描述的分析格式之任一者，諸如夾心式測定法(sandwich assays)、競爭型分析(competitive assays)以及類似之物，結合的偵測可被視觀。

【0080】 在某些具體例中，紫杉醇或該親和性試劑被綴合至一粒子(諸如一珠粒或磁性粒子)上，俾以促進收集或固定來供進一步的分析。

【0081】 另一個例示性非競爭型免疫分析格式被稱為“夾心式”測定法。在一夾心式測定法中，一親和性試劑典型地被固定在一固相支撐物或載體上。該生物樣品藉由被固定的親和性試劑(而因此被稱之為“捕捉試劑”)而被捕捉。一被可偵測地標記的第二親和性試劑(亦被稱之為“偵測試劑”)亦被加入。該捕捉親和性試劑可以相同於該偵測親和性試劑。在其他具體例中，該捕捉親和性試劑可以不同於該偵測親和性試劑。

【0082】 如此處所用的，術語“經標記的”可意指該親和性試劑或紫杉醇之直接的標記化(direct labeling)，此係經由，例如，將依可偵測的物質偶合至該親和性試劑或紫杉醇。該術語亦可指該親和性試劑之間接的標記化(indirect labeling)，此係藉由與另一已被直接標記的親和性試劑之反應力。舉例而言，一對紫杉醇具有專一性的抗體親和性試劑本身可以被一已被可偵測地標記的第二抗

體來專一性地結合。

【0083】 在某些具體例中，該可偵測的標記可包括一酵素的偶合，該酵素當作用於一特定的基質時 (specific substrate) 能夠產生一可偵測的信號。以酵素為基礎的免疫分析法 (enzyme-based immunoassays) 之一些具體例被稱為酵素聯結免疫吸附分析法 (ELISAs) 且為本技藝中已詳知的。參見，例如，Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)," 1978, *Diagnostic Horizons* 2:1-7, Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, MD; Voller, A. *et al.*, 1978, *J. Clin. Pathol.*, 31:507-520; Butler, J.E., 1981, *Meth. Enzymol.*, 73:482-523; Maggio, E. (ed.), 1980, *Enzyme Immunoassay*, CRC Press, Boca Raton, FL; Ishikawa, E. *et al.*, (eds.), 1981, *Enzyme Immunoassay*, Kigaku Shoin, Tokyo)。被結合至該抗體的酵素可與一適當的基質，較佳為一產色的基質 (chromogenic substrate)，以一可產生一化學部分 (chemical moiety) 之方式來起反應，該化學部分可藉由，例如，分光光度測量 (spectrophotometric)、螢光測量 (fluorimetric) 或目測 (visual) 方式而被偵測。

【0084】 在其他具體例中，該可偵測的標記可為一發螢光的 (fluorescent) 或化學發光的 (chemiluminescent) 化合物。發螢光的化合物之一非限制的例示性表單包含螢光素異硫氰酸鹽 (fluorescein isothiocyanate)、玫紅

(rhodamine)、藻紅素(phycoerythrin)、藻藍素(phyocyanin)、別藻藍蛋白(allophyocyanin)、鄰二醛苯甲酸(*o*-phthaldehyde)以及螢光胺(fluorescamine)。特別有用的化學發光標記化合物之例示用非限制性實例是發光胺(luminol)、異發光胺(isoluminol)、色羅馬提克吡啶酯(theromatic acridinium ester)、咪唑(imidazole)、吡啶鹽(acridinium salt)以及草酸酯(oxalate ester)。

【0085】在一個特別的具體例中，該方法可以根據被載述於WO 2015/154091 (其全部內容在此被併入本案以作為參考)內的一般格式(general format)來執行。簡要地描述，該生物樣品，典型地一液體，被施加至一橫向流動裝置(lateral flow device)的接受區域(receiving zone)。該偵測親和性試劑，例如被描述於此的紫杉醇結合親和性試劑，被沉積在一與該樣品接受區域係呈液體相通而且以流動方向而言是位在該樣品接受區域下游處的偵測試劑區域之內。在某些具體例中，該紫杉醇結合親和性試劑被標記以一可偵測的部分(detectable moiety)或報導基團(reporting group)。在某些具體例中，該紫杉醇結合親和性試劑具有一為大約 10^4 至大約 10^7 的 K_{on} 值，以及一為大約 10^{-3} 至大約 10^{-7} 的 K_{off} 值。該裝置亦具有一與該偵測試劑區域呈液體相通而且以流動方向而言是位在該偵測試劑區域下游處的捕捉區域(capture zone)。該捕捉區域包含有被固定在它的上面的第一和第二捕捉試劑。該第一

捕捉試劑[試驗線(test line)]是一能夠結合該偵測試劑的紫杉醇材料，而該第二捕捉試劑[控制線(control line)]是一能夠結合該偵測試劑的抗體或類似試劑。該第一捕捉試劑以流動方向而言被放置在一位於該捕捉區域的上游端部之下游處的第一距離之處，該第二捕捉試劑以流動方向而言被放置在一位於該捕捉區域的上游端部之下游處的第二距離之處，其中該第二距離大於該第一距離。典型地，當該 K_{on} 值係高於大約 2.0×10^5 而該 K_{off} 值係低於大約 1.0×10^{-3} 之時，該第一距離對該第二距離之比率係為大約0.0至大約0.4，而當該 K_{on} 值係高於大約 2.0×10^4 而該 K_{off} 值係低於大約 2.0×10^{-4} 之時，該第一距離對該第二距離之比率係為大約0.2至大約1.0。

【0086】 在實施上，該樣品被允許流過該該樣品接受區域通經該偵測試劑區域以將該偵測試劑提供給紫杉醇。然後帶有該偵測試劑和紫杉醇的該樣品被允許流動通經該捕捉區域，藉此該第一捕捉試劑(試驗線)與該分析物(紫杉醇)來競爭跟該偵測試劑的結合，以及藉此該第二捕捉試劑(控制線)結合過量的偵測試劑。該第一捕捉試劑(試驗線)相對於該第二捕捉試劑(控制線)與該偵測試劑結合的數量被觀察。

【0087】 在一具體例中，該紫杉醇結合親和性試劑(亦即偵測試劑)是一如此處所描述的8A10-衍生的親和性試劑。在另一具體例中，該紫杉醇結合親和性試劑是一如此處所描述的3C6-衍生的親和性試劑。

裝置以及套組

【0088】 在另一個方面，本案揭露內容提供一用以偵測和/或定量一樣品中的紫杉醇的裝置。該裝置包括衍生自mAbs 8A10或3C6之一或多個如此處所描述的紫杉醇結合親和性試劑。在某些具體例中，該裝置進一步包括一固相支撐物。

【0089】 在一具體例中，該裝置是一橫向流動裝置，包括：

- (a) 一樣品接受區域用以接受一液體樣品；
- (b) 一偵測試劑區域與該樣品接受區域呈液體相通而且以流動方向而言是位在該樣品接受區域下游處，其中該偵測試劑區域包含有被沉積於上以作為偵測試劑之一或多個衍生自mAbs 8A10 或 3C6 的紫杉醇結合親和性試劑；
- (c) 一捕捉區域與該偵測試劑區域呈液體相通而且以流動方向而言是位在該偵測試劑區域下游處，其中該捕捉區域包含有一或多個被固定於上的捕捉試劑；以及
- (d) 一吸收區域(absorbent zone) 與該捕捉區域呈液體相通而且以流動方向而

言是位在該捕捉試劑區域下游處。

【0090】 下面描述衍生自該8A10以及3C6抗體之以抗體為主的親和性試劑的成功生成。

【0091】 為了有效地利用以抗體為主的親和性試劑，譬如在檢驗以及相關應用上，一動態的結合/偵測範圍應被達成。為達最佳化的兩個關鍵因素是抗體對於被標靶的抗原之專一性以及親和性。專一性可藉由使用以一高度均勻方式來專一性地結合至被標靶的抗原之一單個表位(epitope)的單株抗體(mAbs)或它的抗原結合衍生物而被達成。此專一性亦幫助消除可能引起關注的交互反應問題。關於專一性，單株抗體或它的抗原結合衍生物對於被標靶的抗原必須具有最佳化與改善的親和性，俾以在檢驗試驗中達到一動態偵測範圍，這可藉由親和力成熟方法被達成。下面描述參考抗體8A10和3C6以及它們的Fab衍生物(經由一親和力成熟方法而併入有一或多個取代)之生成：

抗體生成與處理：令細胞生長在具有5-10%胎牛血清(FBS)和1X青黴素/鏈黴素(Pen/Strep)的培養基CCM1(Hyclone)內。一旦細胞達到密度 $> 1 \times 10^6$ 個細胞/mL之時將之分開(1:4)。然後將細胞冷凍並儲存在兩個分開的液態氮低溫冷凍槽(cryogenic tanks)中作為備用品(backups)。細胞被培養在滾瓶(roller bottles)中直到密度達到 1×10^6 個細胞/mL。於該時，培養物不再被餵養並且每天監測細胞存活率(cell viability)。一旦細胞存活率

降低至<50%，將細胞移除並收穫富含抗體的培養基(antibody-rich medium)。

抗體的親和性純化：使用pH 7.4的磷酸鹽緩衝液(PBS)來進行透析過濾(diafiltration)，並使用50Kd截留膜(cut-off membrane)將所收穫的抗體濃縮10倍。親和性純化係使用MabSelect (GE Healthcare, Pittsburgh, PA)。就容量(capacity)和流通量(throughput)以及重組型蛋白質A配位體(rProtein A ligand)的定向偶合(oriented coupling)而被最佳化的親水性高流速瓊脂糖珠粒(hydrophilic, high-flow agarose bead)提供了一具高純度與高產率的產物池。

純化操作程序(Purification run program)：

管柱：XK 16/40 (內徑為 16 mm，床高度為 20 cm)，

樣品：融合瘤用過的澄清化培養基(clarified hybridoma spent media)。

裝填緩衝液(loading buffer) A：20 mM 磷酸二氫鈉，0.15M 氯化鈉，pH 7.2，

洗提緩衝液(elution buffer) B：0.1 M 檸檬酸三鈉，pH 3.6。

參考抗體結合的特徵鑑定：圖1例示說明一有關參考mAb 8A10還有mAb 3C6之結合分析的結果，證明Kd值(對於兩個抗體而言大約為10-20 nM)與先前所報導者係可相比的。這確認了該mAb 8A10以一為大約100-200

ng/mL的靈敏度極限(sensitivity limit)而直接地結合BSA-紫杉醇抗原。

【0092】 如所證明的，該mAbs 8A10和3C6對於紫杉醇具有高專一性和親和性，這表示這些各自以一高度均勻方式來專一性地結合至被標靶的紫杉醇抗原之一單個表位。此專一性幫助消除一偵測分析中的交互反應問題。再者，一競爭性抑制分析(competitive inhibition assay)被執行以證明該參考mAbs 8A10和3C6在該一偵測分析格式中的實用性。圖2例示說明一ELISA的結果，其中在增高的游離紫杉醇之存在下，mAbs 8A10和3C6對經標記的BSA-紫杉醇抗原之結合降低。

用以工程化/最佳化以抗體為主的試劑之例示性方法的概述

【0093】 關於專一性，以單株抗體為主的親和性試劑亦可被最佳化以提供對於抗原之改善的親和性和/或達到增進的性質，諸如在檢驗試驗中提供一動態偵測範圍，這可藉由親和力成熟方法被達成。為了得到具有改善的親和性之以單株抗體為主的親和性試劑之一集合，該mAbs 8A10和3C6被工程化以改變/改善它們對於紫杉醇的親和性。

【0094】 作為一例示性實例，一個包含親和力成熟之用於抗體最佳化之簡單、有效且穩健的方法被執行。此方法之一優點是，它不需要該mAbs 8A10和3C6的抗體結構之詳細特徵鑑定。一般而言，此方法包含：1)藉由序列

分析由融合瘤細胞株所生成的抗體來做抗體的特徵鑑定；
2) 構建聚焦在CDR區域上的抗體資料庫；3) 篩選有益的突變；以及4) 組合有益的突變。

【0095】 這個程序遵循自然界中有關於蛋白質的功能改進之迭代過程(iterative process)，包含抗體的親和力成熟。如揭示的數據所證明的，個別的突變可被組合以進一步改善一抗體的親和性。現今用於抗體最佳化的方法之特點(distinguishing feature)是所構建的資料庫的大小極小。典型地，該等資料庫含有少於400個變異體，容易被建構，並且容許可能在其他方面不適合於親和性加強策略(affinity enrichment strategy)的各種不同的功能篩選。

【0096】 此抗體工程化方法的第一個步驟是使用cDNA端部的快速擴增(Rapid Amplification of cDNA Ends, RAGE)法來序列分析mAbs 8A10和3C6的編碼可變區域。在從融合瘤細胞萃取出總RNA (total RNA)之後，執行一第一回合的反轉錄酶-聚合酶連鎖反應(RT-PCR)並接續以一第二回合的半-巢式聚合酶連鎖反應(semi-nested PCR)。PCR陽性反應帶(PCR positive bands)被複製(cloned)並序列分析，繼之以CDR分析，俾以鑑定輕鏈和重鏈可變區序列。經鑑定的序列進一步藉由N-胺基酸序列分析(N-terminal amino acid sequencing)來做確認。

【0097】 一旦鑑定出重鏈和輕鏈可變序列，下一個

步驟是建構焦點式抗體資料庫(focused antibody libraries)。由於一抗體的抗原結合位(antigen-binding site)係由6個CDR環(CDR loops)所形成，6個CDR突變資料庫被同時地建構。參見，例如，圖4。使用帶有修改之以密碼子為基礎的突變誘發方法(codon-based mutagenesis approach with modification)來合成寡核苷酸，此法在各個CDR的每個胺基酸位置處導入突變。此法允許編碼單一突變(single mutation)的寡核苷酸之合成。

【0098】 編碼親代mAbs 8A10和3C6的核酸被選殖到一含有前導序列(leader sequences)以及IgG1 CH1/ κ 恆定區(kappa constant regions)之以M13為基礎的噬菌體載體(M13-based phage vector)上。每個CDR區分別地藉由雜交突變誘發(hybridization mutagenesis)而被刪除。接著，編碼帶有突變之對應的CDR區之被合成的寡核苷酸被黏合(annealed)回至該載體以供構建該CDR突變資料庫。Fab片段的變異體藉由以噬菌體資料庫來感染大腸桿菌(*E. coli*) XL-1 Blue菌株而被表現，而被蓄積在細胞周質空間(periplasmic space)內的Fab片段被進行篩選。參見，例如，圖5當中的例示性流程。

【0099】 關於親和力成熟，觀察到單一突變CDR資料庫是較佳且足夠的，因為有限的突變誘發容許維持原始的結合領域(original binding domain)並且導致一小型的資料庫(small-size library)。再者，此法模仿一抗體的活

體內親和力成熟(*in vivo* affinity maturation)。典型地，一有益的單一突變可將該抗體的親和力改善2-5倍。由於每個CDR資料庫的大小通常是低於400個突變體，關於有益的突變之篩選可在一短時間內被容易地完成。最後的步驟是組合來自每個CDR環之有益的單一突變。多重位址雜交突變誘發(multiple-site hybridization mutagenesis)被用來建構該組合資料庫。累積的功效可以徹底地增強親和力。

【0100】 一般而言，抗體的親和力成熟可為兩個因素所掌控：結合速率常數(association rate constant, K_{on})以及解離速率常數(dissociation rate constant, K_{off})。平衡解離常數(equilibrium dissociation constant, K_d)係由 $K_d=K_{off}/K_{on}$ 來計算的。在活體內親和力成熟的大多數情況下，親和性壓倒性地係經由 K_{off} 的下降而被改善。

【0101】 被描述於此之所述的親和力成熟程序藉由生成可當作適用於結合、偵測和分離紫杉醇的親和性試劑之高性能變型抗體衍生物而能夠延伸抗-紫杉醇 8A10 和 3C6 抗體的應用潛力。即令在沒有抗體的詳細結構資訊之下，於此所執行的組合方法導致快速的抗體最佳化。

方法與結果

【0102】 在此更詳細地描述上述策略的具體細節。

【0103】 步驟 1：作為一 Fabs 的抗紫杉醇 mAbs 8A10 和 3C6 的選殖以及表現

A. 融合瘤細胞所生成的mAbs 8A10和3C6的可變區
之序列分析

i. 總 RNA 萃取 以及 mRNA 變性 (mRNA
denaturation)

使用 QIAGEN RNeasy Mini Kit 而從融合瘤細胞
8A10 和 3C6 萃取出總 RNA。mRNA 混合物(如下所述)
在 72°C 下被培育歷時 3 分鐘，接而被冷卻至 42°C 歷時 2
分鐘。在冷卻之後，試管在 14,000×g 下被短暫旋轉 10 秒
以便收集管底的內含物。

mRNA 混合物

RNA 模板(RNA template) (0.2-0.4 μg)	1-2.75 μL
5'-RACE引子A (5'-RAGE primer A)	1 μL
不含核糖核酸酶的水 (RNase-free water)	加至 3.75 μL

ii. 互補DNA合成(cDNA synthesis)以及5'-RAGE反
應

如下所示來進行 cDNA 合成和 5'-RAGE 反應。

<u>cDNA 合成</u>		<u>5'-RAGE 反應</u>	
SMARTer II A寡核苷酸	1 μL	2X PCR混合物	10 μL
5X 第一股緩衝液 (first-strand buffer)	2 μL	cDNA	1 μL
二硫代蘇糖醇 (DTT)(20 mM)	1 μL	10X 通用引子混合 物 (Universal Primer mix)	2 μL
dNTP 混合物 (dNTP mix)(10 mM)	1 μL	反向引子(Reverse primer)	1 μL
RNase 抑制劑 (RNase inhibitor)	0.25 μL	不含RNase的水	6 μL
SMARTScribe反轉錄酶	1 μL		

變性後的mRNA混合物	3.75 μL	
總量	10 μL	20 μL

iii. 藉由瓊脂糖凝膠電泳 (agarose gel electrophoresis) 的PCR分析

PCR 擴增反應(PCR amplification)的產物於一瓊脂糖凝膠上被電泳，俾以確認對應於 mAbs 8A10 和 3C6 的輕鏈和重鏈可變區之擴增物(amplicons)的存在。

iv. 選殖、序列分析以及CDR分析

PCR 陽性反應帶被選殖至一載體內並且被序列分析。抗體序列分析鑑定出 8A10 的一條輕鏈和一條重鏈。

8A10 融合瘤序列分析結果如下：

8A10 可變輕鏈核酸序列於此被載述為序列辨識編號：7 並且被提供於下：

GAC ATT GTG ATG ACC CAG TCT CAA AAA
TTC ATG TCC ATA ACA CTA GGA GAG AGG
GTC AGC ATC ACC TGC AAG CCC AGT CAG
AAT GTG GGT TCT GCT GTA ACC TGG TGG
CAA CAG AAA CCA GGA CAA TCT CCT AAA
CTA CTG ATT TAC TCA GCT TCC AAT CGG TAT
ACT GGA GTC CCT GAT CGC TTC ACA GGC
AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC
ACC ATT AGT AAT GTG CAG TCT GAA GAC
CTG GCA GAT TAT TTC TGT CAA CAA TAT
AGC AGC TAT CCG TAC ACG TTC GGA GGG

GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CG (序列辨識編號：7)。

編碼 CDR 1、2 和 3 領域的序列被劃底線標示出來。

對應的 8A10 可變輕鏈胺基酸序列於此被載述為序列辨識編號：8 並且被提供於下：

DIVMTQSQKFMSITLGERVSITCKPSQNVGSAV
TWWQQKPGQSPKLLIYSASNRYTGVPDRFTGS
SGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYSSYPYTF
 GGTKLEIK (序列辨識編號：8)。

CDR 1、2 和 3 領域的序列被劃底線標示出來(亦即 CDRL1 是被載述為序列辨識編號：11 的 KPSQNVGSAVT，CDRL2 是被載述為序列辨識編號：31 的 SASNRYT，以及 CDRL3 是被載述為序列辨識編號：45 的 QQYSSYPYT)。

8A10 可變重鏈核酸序列於此被載述為序列辨識編號：9 並且被提供於下：

GAG GTC CAG CTG CAA CAA TCT GGA CCT
 GAA CTG GTG AAG CCT GGG GCT TCA GTG
 AAG ATT TCC TGT AAG GCT TCT GGA TAC
ACG TTC ACT GAC TCC ACC ATG AAC TGG
 GTG AAG CAG AGC CAT GGA AAG AGC CTT
 GAG TGG ATT GGA GAG ATT GAT CCT AAC
AAT GGT GGT ACT AAC TAC AAT CAG AAG
TTC AAG GGC AAG GCC ACA TTG ACT GTA

GAC AAG TCC TCC AGC ACA GCC TAT ATG
 GAG CTC CGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC
 TCT GCA GTC TAT TAC TGT GCA AGA GGG
GTC TGG GGC CAA GGC ACC ACT CTC ACA
 GTC TCC TCA (序列辨識編號：9)。

編碼 CDR 1、2 和 3 領域的序列被劃底線標示出來。

對應的 8A10 可變重鏈胺基酸序列於此被載述為序列
 辨識編號：10 並且被提供於下：

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDST
MNWVKQSHGKSLEWIGEIDPNNGGTNYNQKFK
GKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCA
RGVWGQGTTTLTVSS (序列辨識編號：10)。

CDR 1、2 和 3 領域的序列被劃底線標示出來(亦即
 CDRH1 是被載述為序列辨識編號：58 的
 GYTFTDSTMN，CDRH2 是被載述為序列辨識編號：68
 的 EIDPNNGGTNYNQKFKG，以及 CDRH3 是被載述為
 序列辨識編號：99 的 ARGVWG)。

另外，抗體序列分析鑑定出 3C6 的一條輕鏈和一條重
 鏈。

3C6 融合瘤序列分析結果如下：

3C6 可變輕鏈核酸序列於此被載述為序列辨識編號：
 139 並且被提供於下：

GAT GTT GTG ATG ACC CAA ACT CCA CTC
 TCC CTG CCT GTC AGT CTG GGA GAT CAA

GCC TCC ATC TCT TGC AGA TCT CGT CAG
AGC CTT GTA CAC AGT AAT GGA AAC ACC
TAT TTA CAT TGG TAC CTG CAG AAG CCA
 GGC CAG TCT CCA AAG CTC CTG ATC TAC
AAA GTT TCC AAC CGA TTT TCT GGG GTC
 CCA GAC AGG TTC AGT GGT AGT GGA TCA
 GGG ACA GAA TTC ACA CTC GAG ATC AGC
 AGA GTG GAG GCT GAG GAT CTG GGA GTT
 TAT TTC TGC TCT CAA AGT ACA CAT GTT CCT
CCG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG
 GAA ATC AAA C (序列辨識編號：139)。

編碼 CDR 區域的序列被劃底線標示出來。

對應的 3C6 可變輕鏈胺基酸序列是序列辨識編號：140 並且被提供於下：

DVVM TQTPLSLPVSLGDQASISCRSRQSLVHSN
GNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRFS SGVPD
RFSGSGSGTEFTLEISRVEAEDLGVYFCSQSTHV
PPTFGGGTKLEIK (序列辨識編號：140)。

CDR 1、2 和 3 領域的序列被劃底線標示出來(亦即 CDRL1 是於此被載述為序列辨識編號：142 的 RSRQSLVHSNGNTYLH，CDRL2 是於此被載述為序列辨識編號：155 的 KVS NRFS，以及 CDRL3 是於此被載述為序列辨識編號：160 的 SQSTHVPPT)。

3C6 可變重鏈核酸序列為序列辨識編號：141 並且被提供於下：

GAG GTG CAG CTT CAG GAG TCG GGA CCT
 AGT CTC GTG AAA CCT TCT CAG ACT CTG
 TCC CTC ACC TGT TCT GTC ACT GGC GAC TCC
ATC ACC AGT GGT TAC TGG AAC TGG ATC
 CGG AAA TTC CCA GGG AAT AGA CTT GAG
 TAC ATG GGG TAC ATA AGC TAC AGT GGT
AGC ACT TAC TAC AAT CCG TCT CTC AAA
AGT CGA ATC TCC ATC ACT CGA GAC ACA
 TCC AAG AAC CAG TAC TAC CTA CAT TTG
 ACT TCT GTG ACT ACT GAG GAC ACA GCC
 ACA TAT TAC TGT GCC CAA GGG GAT GGC
GCC TAC TGG GGC CAA GGC ACC ACT CTC
 ACA GTC TCC TCA (序列辨識編號：141)。

編碼 CDR 區域的序列被劃底線標示出來。

對應的 3C6 可變重鏈胺基酸序列是序列辨識編號：

142 並且被提供於下：

EVQLQESGPSLVKPSQTL~~SL~~TCSVTGDSITSGY
WNWIRKFPGNRLEYMGYISYSGSTYYNPSLKSR
 ISITRDTSKNQYYLHLTSVTTEDTATYYCAQGD
GAYWGQGTTTLTVSS (序列辨識編號：142)。

CDR 1、2 和 3 領域區域被劃底線標示出來(亦即 CDRH1 是於此被載述為序列辨識編號：166 的

GDSITSGYWN，CDRH2 是於此被載述為序列辨識編號：172 的 YISYSGSTYYNPSLKS，以及 CDRH3 是於此被載述為序列辨識編號：184 的 GDGAY)。

B. 將 mAb 的可變區轉殖到 M13 工程化載體內
(Cloning of variable regions of mAb into M13 engineering vector)

編碼 mAbs 8A10 和 3C6 的 V_L 、 C_K 以及 V_H 區域的 DNA 使用 PCR 以及特定的引子予以擴增。所形成的 PCR 產物被凝膠-純化(gel-purified)並針對受 *lacZ* 啟動子所控制之以 M13 為基礎的噬菌體載體的特定位址而被限制消化(restriction digested)。編碼 mAbs 8A10 和 3C6 的 V_L 、 C_K 以及 V_H 區域的雙股 DNAs 被接合至該以噬菌體為基礎的載體之內，該載體含有編碼一人類 IgG1 的 CH1 區之恆定區的基因。該 DNA 被轉形至大腸桿菌之內，而所形成的含有噬菌體之溶菌斑(plaques)被詳細地檢查。溶菌斑被隨機地挑取，而 DNA 被分離並且序列分析。選殖株(clones)被確認具有相同於 mAbs 8A10 和 3C6 所具之 V_L 、 C_K 以及 V_H 區域序列(未示出)。

C. 由 M13 工程化載體所產生的 Fabs 的紫杉醇結合活性之確認

大腸桿菌 XL1-Blue (革蘭氏陰性)之一個選殖株 8A10_1 或選殖株 3C6_1 噬菌體-感染的培養物(phage-infected culture)被培養同時以異丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)予以誘導，經由離心來收穫，而細胞周

質內含物(periplasmic contents)藉由滲壓衝擊(osmotic shock)(periprep)而被釋出。自培養物分出被釋出的 Fab 產物。藉由 ELISA 來定量 Fab 濃度。Fab 的抗原專一性結合係使用紫杉醇 ELISA 連同完整的 IgGs 來執行。完整的 8A10 IgG 之 Kd 值(大約 10-20 nM)與 8A10 Fab 的 Kd 值相當。參見圖 3。這些結果暗示：親代 mAbs 8A10 和 3C6 的正確可變區序列存在於本案的 8A10 和 3C6 Fabs 之內並被正確地折疊，而且呈 Fab 格式而從該 M13 工程化載體被表現。注意到的是：8A10 Fab 在一競爭性抑制分析中通常會展現一 IC₅₀ 值相當於完整的 8A10 IgG 所具者，雖然一輕微的偏移被觀察到(未示出)。

Fab 在細胞周質製品(periplasmic prep)中被充分完好地表現以證明對於 BSA-紫杉醇綴合物塗覆的井(BSA-paclitaxel conjugate coated wells)之濃度依賴性結合(concentration-dependent binding)。

【0104】 步驟 2：個別的 CDR 資料庫之生成與篩選

A. 個別的 CDR 資料庫之生成

對於每個 CDR 資料庫建構，親代 CDR 區首先被刪除以避免該資料庫為親代 8A10 或 3C6 選殖株所控制。舉例而言，在一成功的單位址雜交突變誘發(single-site hybridization mutagenesis)中，突變誘發率通常是介於 50-80%。如果親代抗體被使用作為一用於資料庫建構的模板，20-50%的資料庫族群將會是親代選殖株，而這會升高篩選的困難度。

每個 CDR 區藉由突變誘發而被個別地刪除。在含有該刪除的選殖株被製造出之後，它被使用作為一模板以供建構它的對應 CDR 資料庫(參見下面的節段 D)。總共 6 個對應於每個個別的 CDR 資料庫(對於 8A10 和 3C6 親代抗體的每一者)之 CDR-刪除的模板被製備出。

為了建構焦點式 CDR 資料庫，使用以密碼子為基礎的突變誘發方法來合成編碼 CDR 突變的寡核苷酸。資料庫藉由黏合一池的寡核苷酸而被建構出，該等寡核苷酸將該 CDR 領域中的一個位置完全地隨機化而同時保留其他殘基不變。所形成的資料庫使得個別的 CDR 的每個位置被改變為所有可能的胺基酸替代物，而同時保留該個別的 CDR 之內的剩餘胺基酸以及其餘 CDRs。因此，全部地，在所有的 CDRs 的每一個單一位置被突變為每一個單一替代物。參見圖 4。

可理解到的是，利用修飾，寡核苷酸可被合成以分別地包含雙重、三重突變等等。該等寡核苷酸接而被使用於藉由雜交突變誘發的資料庫建構。關於親和力成熟，單一突變資料庫是足夠的。但是，如果顯著的特徵改變是為抗體衍生物所想要的，雙重以及更多的突變可被容易地產生。

B. BSA-紫杉醇的生物素化(biotinylation)

BSA-紫杉醇綴合物被生物素化以供用於篩選 CDR 資料庫。10 μg 的 BSA-紫杉醇起初在不同的生物素：BSA-紫杉醇之莫耳過量濃度(molar excess concentrations)(20

X、60 X 以及 100 X)下被生物素化，俾以決定用於生物素化的最佳條件。結合 ELISA 分析被執行，俾以評估不同的生物素化條件對於 Fab 活性的效用。

C. 使用生物素化的 BSA-紫杉醇之濾紙轉印分析 (Filter lift assays) 的最佳化

使用在前面的章節內被鑑定出的生物素化的 BSA-紫杉醇之最佳濃度，一濾紙轉印試驗被執行，俾以決定用於篩選 CDR 資料庫的 BSA-紫杉醇-生物素的最佳濃度。一相等比率的親代 8A10 或 3C6 噬菌體備料(phage stock) 和陰性對照組(negative control) Fab 噬菌體備料根據它們的噬菌體形成單位(pfu)數值而被混合。所形成的噬菌體備料混合物被用來感染大腸桿菌並且於一 LB 培養平板 (LB plate)上生成大約 500 個溶菌斑。一被塗覆以抗人類 κ (anti-human kappa)的濾紙藉由將之覆蓋在該培養平板上而被用來捕捉由該等溶菌斑所分泌的 Fabs。帶有被捕捉的 Fabs 之濾紙使用由 10 nM 至 0.3 nM 之不同位準的 BSA-紫杉醇-生物素來培育。使用中性卵白素-鹼性磷酸酶(NeutrAvidin-AP)來偵測被結合的 BSA-紫杉醇-生物素。一般而言，參見圖 5。陽性選殖株被顯示為位在該等濾紙上的紫色斑點。被確認的是，對於偵測陽性(Fab 結合)選殖株而言，在 5 nM 的 BSA-紫杉醇-生物素抗原之下來篩選該等資料庫是最佳的。

D. 在每個 CDR 之內併入一個終止密碼子(stop codon)

親代 8A10 或 3C6 選殖株被使用作為模板，於該模板之上建構出 CDR 資料庫(參見上面的 A 節)。對於每個 CDR 特異性資料庫，一終止密碼子被引入至 CDR 之內，而使得任何未被誘發突變的選殖株不會表現 Fab。特別地，一個帶有一用 DNA 序列“TAAG”來取代該等胺基酸當中一者之序列的寡核苷酸被使用於每個 CDR 以引入該終止密碼子並將隨後的序列推出架構之外(put the following sequence out of frame)。親代 8A10 或 3C6 選殖株藉由將這個寡核苷酸來個別地黏合每個 CDR 而被誘發突變，而經誘發突變的 DNA 被轉形至大腸桿菌內。所形成的溶菌斑被分離出並序列分析之。所形成的轉殖株被使用作為其各自的 CDR 資料庫的模板。

E. 個別的CDR資料庫的產生

在分離出帶有終止密碼子的選殖株之後，資料庫藉由黏合一池的寡核苷酸而被建構出，該等寡核苷酸將該 CDR 領域中的一個位置完全地隨機化而同時保留其他殘基不變。參見圖 4。所形成的資料庫使得個別的 CDR 的每個位置被改變為所有可能的胺基酸，一次一個位置。每個資料庫之可能的轉殖株的數目大約為 CDR 中的胺基酸位置之數目的 32 倍。例如，一個帶有 10 個位置的 CDR 具有 320 個可能的選殖株。經誘發突變的 DNA 被轉形至大腸桿菌內，而所形成的溶菌斑被進行一濾紙轉印分析，其中血球凝集素標記(HA tag)的偵測確認每個轉殖株是否

已有併入誘發突變的寡核苷酸。HA 陽性轉殖株被隨機地挑選、分離以及序列分析。

F. 個別的8A10 CDR資料庫之篩選

藉由溶菌斑轉印法(plaque lift)來篩選產生自前面步驟之個別的 CDR 資料庫(總共 7 個資料庫，因為 8A10 重鏈 CDR2 資料庫由於 CDR 的大小而被分成兩半)，俾以尋找經誘發突變的 Fabs 對於生物素化的 BSA-紫杉醇 (BSA-紫杉醇-生物素)之增高的親和性。濾紙轉印分析被設計用來捕捉相同數量之來自每個溶菌斑的 Fab。如圖 5 當中所例示說明的，一被塗覆以抗人類 κ 的濾紙藉由將之覆蓋在培養平板上而被用來捕捉由該等溶菌斑所分泌的 Fabs。以 BSA-紫杉醇-生物素，使用一如前述而被最佳化的濃度，來培育帶有被捕捉的 Fabs 之濾紙。使用 NeutrAvidin-AP 來偵測被結合的 BSA-紫杉醇-生物素。濾紙上的紫色斑點表示為陽性選殖株。每個資料庫被重複篩選(over-screened)至少 5 倍於可能的選殖株之數目。亦即，如果一 CDR 資料庫內的選殖株之理論值為 300 個，那麼篩選>1500 個選殖株。

G. 使用抗原-專一性來驗證 CDR 資料庫“命中物 (hits)”

被選定為“陽性”命中物的選殖株被分離出來，並藉由序列分析 DNA 來鑑定突變。每個經選定的 CDR 資料庫“陽性”命中物之一噬菌體感染的大腸桿菌培養物被收穫，而細胞周質內含物藉由滲壓衝擊(periprep)而被釋

出。培養物亦被隨機地採樣以便確認該技術確實地在被標靶的 CDR 領域內生成隨機的變異(random variations)。來自每個 8A10 CDR 資料庫之被選定的代表性命中物之序列被分別地載述於表 1-6 內，其中有提供共同序列 (consensus sequence)，還有相對於特定的 CDR 領域之位置編號以及輕鏈和重鏈之整個被揭示的可變領域。

表1: 得自CDR突變資料庫的8A10 CDRL1區域內之序列變異

L1 資料庫														
型式	選殖株的名稱	序列											備註	
		24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	相對於序列辨識編號:8 的位置	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	共同位置	
	共同的	K	P	X	Q	X	V	X	S	X	V	X	序列辨識編號:1	
	8A10 (野生型)	K	P	S	Q	N	V	G	S	A	V	T	序列辨識編號:11	
隨機的	L1 R1	K	P	S	Q	N	V	F	S	A	V	T	序列辨識編號:12	
	L1 R2	K	P	S	Q	T	V	G	S	A	V	T	序列辨識編號:13	
	L1 R3	K	P	V	Q	N	V	G	S	A	V	T	序列辨識編號:14	
	L1 R4	K	P	S	Q	N	V	F	S	A	V	T	序列辨識編號:15	
	L1 R5	K	P	S	Q	D	V	G	S	A	V	T	序列辨識編號:16	
	L1 R6	K	P	S	Q	N	V	F	S	A	V	T	序列辨識編號:17	
	L1 R7	K	P	S	Q	M	V	G	S	A	V	T	序列辨識編號:18	
陽性	L1 P1	K	P	S	Q	N	V	G	S	P	V	N	序列辨識編號:19	
	L1 P2	K	P	S	Q	R	V	G	S	A	V	T	序列辨識編號:20	
	L1 P3	K	P	S	Q	R	V	G	S	A	V	T	序列辨識編號:21	
	L1 P4	K	P	S	Q	K	V	G	S	A	V	T	序列辨識編號:22	
	L1 P5	K	P	S	Q	N	V	G	S	A	V	T	野生型，相同於序列辨識編號:11	
	L1 P6	K	P	S	Q	N	V	G	S	R	V	T	序列辨識編號:23	
	L1 P7	K	P	S	Q	K	V	G	S	A	V	T	序列辨識編號:24	
	L1 P8	K	P	S	Q	N	V	G	S	A	V	N	序列辨識編號:25	
	L1 P9	K	P	S	Q	N	V	G	S	A	V	A	序列辨識編號:26	
	L1 P10	K	P	S	Q	N	V	G	S	R	V	T	序列辨識編號:27	
	L1 P11	K	P	S	Q	N	V	G	S	R	V	T	序列辨識編號:28	
	L1 P12	K	P	V	Q	N	V	G	S	A	V	T	序列辨識編號:29	
	L1 P13	K	P	S	Q	K	V	G	S	A	V	T	序列辨識編號:30	
	L1 P14	K	P	S	Q	N	V	G	S	A	V	T	野生型，相同於序列辨識編號:11	

表2: 得自CDR突變資料庫的8A10 CDRL2區域內之序列變異

L2 資料庫										
型式	選植株的名稱	序列							備註	
		50	51	52	53	54	55	56		相對於序列辨識編號:8 的位置
		1	2	3	4	5	6	7	共同位置	
	共同的	X	X	X	X	R	Y	X	序列辨識編號: 2	
	8A10 (野生型)	S	A	S	N	R	Y	T	序列辨識編號: 31	
隨機的	L2 R1	S	A	T	N	R	Y	T	序列辨識編號: 32	
	L2 R2	S	A	S	N	R	Y	M	序列辨識編號: 33	
	L2 R3	Y	A	S	N	R	Y	T	序列辨識編號: 34	
	L2 R4	S	H	S	N	R	Y	T	序列辨識編號: 35	
陽性	L2 P1	S	T	S	N	R	Y	T	序列辨識編號: 36	
	L2 P2	S	A	T	N	R	Y	T	序列辨識編號: 37	
	L2 P3	S	T	S	N	R	Y	T	序列辨識編號: 38	
	L2 P4	S	A	S	N	R	Y	T	野生型, 相同於序列辨識編號:31	
	L2 P5	S	A	S	R	R	Y	T	序列辨識編號: 39	
	L2 P6	S	A	S	R	R	Y	T	序列辨識編號: 40	
	L2 P7	S	A	S	R	R	Y	T	序列辨識編號: 41	
	L2 P8	S	A	S	R	R	Y	T	序列辨識編號: 42	
	L2 P9	S	A	S	N	R	Y	R	序列辨識編號: 43	
	L2 P10	S	A	S	R	R	Y	T	序列辨識編號: 44	

表3: 得自CDR突變資料庫的8A10 CDRL3區域內之序列變異

L3 資料庫											
型式	選植株的名稱	序列									備註
		89	90	91	92	93	94	95	96	97	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	共同位置
	共同的	Q	Q	Y	X	S	X	P	Y	X	序列辨識編號: 3
	8A10 (野生型)	Q	Q	Y	S	S	Y	P	Y	T	序列辨識編號: 45
隨機的	L3 R1	Q	Q	Y	S	S	K	P	Y	T	序列辨識編號: 46
	L3 R2	Q	Q	Y	P	S	Y	P	Y	T	序列辨識編號: 47
	L3 R3	Q	Q	Y	S	S	Y	P	Y	R	序列辨識編號: 48
陽性	L3 P1	Q	Q	Y	S	S	R	P	Y	T	序列辨識編號: 49
	L3 P2	Q	Q	Y	S	S	R	P	Y	T	序列辨識編號: 50
	L3 P3	Q	Q	Y	S	S	R	P	Y	T	序列辨識編號: 51
	L3 P4	Q	Q	Y	S	S	R	P	Y	T	序列辨識編號: 52
	L3 P5	Q	Q	Y	S	S	K	P	Y	T	序列辨識編號: 53
	L3 P6	Q	Q	Y	S	S	K	P	Y	T	序列辨識編號: 54
	L3 P7	Q	Q	Y	S	S	V	P	Y	T	序列辨識編號: 55
	L3 P8	Q	Q	Y	S	S	R	P	Y	T	序列辨識編號: 56
	L3 P9	Q	Q	Y	S	S	K	P	Y	T	序列辨識編號: 57

表4:得自CDR突變資料庫的8A10 CDRH1區域內之序列變異

H1 資料庫												
型式	選殖株的名稱	序列										備註
		相對於序列辨識編號:10的位置										
		26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	共同位置
	共同的	G	X	X	F	X	D	X	X	X	X	序列辨識編號:4
	8A10 (野生型)	G	Y	T	F	T	D	S	T	M	N	序列辨識編號:58
隨機的	H1 R1	G	Y	T	F	T	D	S	T	M	N	野生型, 相同於序列辨識編號:58
	H1 R2	G	Y	T	F	T	D	Y	T	M	N	序列辨識編號:59
	H1 R3	G	Y	T	F	T	D	S	T	M	N	野生型, 相同於序列辨識編號:58
	H1 R4	G	S	T	F	T	D	S	T	M	N	序列辨識編號:60
	H1 R5	G	Y	T	F	T	D	S	T	T	N	序列辨識編號:61
	H1 R6	G	Y	T	F	S	D	S	T	M	N	序列辨識編號:62
	H1 R7	G	Y	T	F	T	D	S	T	M	K	序列辨識編號:63
陽性	H1 P1	G	Y	T	F	T	D	S	T	M	N	野生型, 相同於序列辨識編號:58
	H1 P3	G	Y	R	F	T	D	S	T	M	N	序列辨識編號:64
	H1 P4	G	Y	T	F	T	D	S	T	M	N	野生型, 相同於序列辨識編號:58
	H1 P6	G	Y	T	F	H	D	S	T	M	N	序列辨識編號:65
	H1 P7	G	Y	T	F	T	D	S	T	M	N	野生型, 相同於序列辨識編號:58
	H1 P8	G	Y	T	F	T	D	S	T	M	N	野生型, 相同於序列辨識編號:58
	H1 P9	G	Y	T	F	T	D	S	T	M	N	野生型, 相同於序列辨識編號:58
	H1 P11	G	Y	T	F	T	D	S	T	M	N	野生型, 相同於序列辨識編號:58
	H1 P12	G	Y	T	F	T	D	S	T	M	N	野生型, 相同於序列辨識編號:58
	H1 P13	G	Y	T	F	T	D	S	T	M	N	野生型, 相同於序列辨識編號:58
	H1 P14	G	Y	R	F	T	D	S	T	M	N	序列辨識編號:66
	H1 P15	G	Y	T	F	T	D	S	R	M	N	序列辨識編號:67

表5: 得自CDR突變資料庫(A部分)的8A10 CDRH2區域內
之序列變異

H2A 資料庫										
型式	選殖株的名稱	序列								備註
		50	51	52	53	54	55	56	57	相對於序列辨識編號:10 的位置
		1	2	3	4	5	6	7	8	共同位置
	共同的	X	I	X	P	X	X	X	X	序列辨識編號:5 (前半部)
	8A10 (野生型)	E	I	D	P	N	N	G	G	序列辨識編號:69
隨機的	H2A R1	E	I	D	P	T	N	G	G	序列辨識編號:70
	H2A R2	E	I	D	P	N	N	L	G	序列辨識編號:71
	H2A R3	E	I	D	P	N	N	G	W	序列辨識編號:72
	H2A R4	E	I	D	P	N	S	G	G	序列辨識編號:73
	H2A R5	K	I	D	P	N	N	G	G	序列辨識編號:74
	H2A R6	E	I	D	P	M	N	G	G	序列辨識編號:75
	H2A R7	E	I	D	P	N	D	G	G	序列辨識編號:76
陽性	H2A P1	E	I	D	P	S	N	G	G	序列辨識編號:77
	H2A P2	E	I	D	P	K	N	G	G	序列辨識編號:78
	H2A P3	E	I	D	P	N	N	G	G	野生型, 相同於序列辨識編號:69
	H2A P4	E	I	D	P	W	N	G	G	序列辨識編號:79
	H2A P5	E	I	D	P	N	N	G	G	野生型, 相同於序列辨識編號:69
	H2A P6	E	I	D	P	R	N	G	G	序列辨識編號:80
	H2A P7	E	I	D	P	N	N	G	R	序列辨識編號:81
	H2A P8	E	I	D	P	R	N	G	G	序列辨識編號:82
	H2A P9	E	I	D	P	W	N	G	G	序列辨識編號:83
	H2A P10	E	I	D	P	N	N	G	G	野生型, 相同於序列辨識編號:69
	H2A P11	E	I	F	P	N	N	G	G	序列辨識編號:84
	H2A P12	E	I	F	P	N	N	G	G	序列辨識編號:85
	H2A P13	E	I	W	P	N	N	G	G	序列辨識編號:86
	H2A P14	E	I	A	P	N	N	G	G	序列辨識編號:87
	H2A P15	E	I	D	P	N	R	G	G	序列辨識編號:88
	H2A P16	E	I	W	P	N	N	G	G	序列辨識編號:89
	H2A P17	E	I	D	P	N	N	G	W	序列辨識編號:90

表6: 得自CDR突變資料庫(B部分)的8A10 CDRH2區域內
之序列變異

H2B 資料庫												
型式	選殖株的名稱	序列										備註
		58	59	60	61	62	63	64	65	66	相對於序列辨識編號: 10 的位置	
		9	10	11	12	13	14	15	16	17	共同位置	
	共同的	X	X	X	N	Q	X	F	X	X	序列辨識編號: 5 (後半部)	
	8A10 (野生型)	T	N	Y	N	Q	K	F	K	G	序列辨識編號: 91	
隨機的	H2B R1	T	N	Y	N	Q	K	F	K	G	野生型, 相同於序列辨識編號: 91	
	H2B R2	T	R	Y	N	Q	K	F	K	G	序列辨識編號: 92	
	H2B R3	T	N	T	N	Q	K	F	K	G	序列辨識編號: 93	
	H2B R4	A	N	Y	N	Q	K	F	K	G	序列辨識編號: 94	
	H2B R5	T	N	Y	N	Q	K	F	S	G	序列辨識編號: 95	
	H2B R6	T	N	Y	N	Q	N	F	K	G	序列辨識編號: 96	
	H2B R7	T	A	Y	N	Q	K	F	K	G	序列辨識編號: 97	
	H2B R8	T	N	Y	N	Q	K	F	K	L	序列辨識編號: 98	
陽性	H2B P1	T	N	Y	N	Q	K	F	K	G	野生型, 相同於序列辨識編號: 91	
	H2B P2	T	N	Y	N	Q	K	F	K	G	野生型, 相同於序列辨識編號: 91	
	H2B P3	T	N	Y	N	Q	K	F	K	G	野生型, 相同於序列辨識編號: 91	

表7: 得自CDR突變資料庫的8A10 CDRH3區域內之序列變異

H3 資料庫									
型式	選殖株的名稱	序列						備註	
		97	98	99	100	101	102		相對於序列辨識編號: 10 的位置
		1	2	3	4	5	6	共同位置	
	共同的	A	R	X	X	W	G	序列辨識編號: 6	
	8A10 (野生型)	A	R	G	V	W	G	序列辨識編號: 99	
隨機的	H3 R1	A	R	G	V	W	G	野生型, 相同於序列辨識編號: 99	
	H3 R2	A	R	G	V	W	G	野生型, 相同於序列辨識編號: 99	

	H3 R3	A	R	G	V	W	G	野生型，相同於序列辨識編號:99
	H3 R4	A	R	G	V	W	G	野生型，相同於序列辨識編號:99
	H3 R5	A	R	G	V	W	G	野生型，相同於序列辨識編號:99
	H3 R6	A	A	R	V	W	G	序列辨識編號：100
	H3 R7	A	R	G	V	W	G	野生型，相同於序列辨識編號:99
	H3 R8	A	R	G	V	W	G	野生型，相同於序列辨識編號:99
	H3 R9	A	R	G	P	W	G	序列辨識編號：101
	H3 R10	A	R	P	V	W	G	序列辨識編號：102
陽性	H3 P1	A	R	G	S	W	G	序列辨識編號：103
	H3 P2	A	R	G	V	W	G	野生型，相同於序列辨識編號:99
	H3 P3	A	R	G	V	W	G	野生型，相同於序列辨識編號:99

藉由定量 ELISA (Quant ELISA) 來定量 Fab 濃度。Fab 變異體的抗體專一性結合係使用前述的結合 ELISA 來執行。圖 6A-6G 圖解說明被選定的 8A10-衍生的 Fab 變異體之結合。如所解說的，相較於參考 8A10 Fab，該等 8A10-衍生的 Fab 變異體對於紫杉醇抗原通常展現出可比擬的，且有時為增高的結合親和性。

此外，3C6 CDR 資料庫之培養序列被隨機地選擇並序列分析。該等序列被載述於表 8-15 中。

表8: 得自CDR突變資料庫(A部分)之3C6 CDRL1區域的
前半部之內的序列變異

L1A 資料庫										
型式	選殖株的名稱	序列								備註
		24	25	26	27	28	29	30	31	
		相對於序列辨識編號:140 的位置								
		1	2	3	4	5	6	7	8	共同位置
	共同的	X	S	X	Q	X	L	X	H	序列辨識編號:133 (前半部)
	3C6 (野生型)	R	S	R	Q	S	L	V	H	序列辨識編號:144
隨機的	L1A R1	R	S	R	Q	M	L	V	H	序列辨識編號:145
	L1A R5	R	S	R	Q	S	L	L	H	序列辨識編號:146
	L1A R2	H	S	R	Q	S	L	V	H	序列辨識編號:147
	L1A R3	R	S	G	Q	S	L	V	H	序列辨識編號:148
	L1A R4	R	S	N	Q	S	L	V	H	序列辨識編號:149
陽性	L1A P1	R	S	R	Q	G	L	V	H	序列辨識編號:246

表9: 得自CDR突變資料庫(B部分)之3C6 CDRL1區域的
後半部之內的序列變異

L1B 資料庫										
選殖株的名稱	序列								備註	
	32	33	34	35	36	37	38	39		
		相對於序列辨識編號:140 的位置								
		9	10	11	12	13	14	15	16	共同位置
	共同的	X	X	G	N	X	Y	X	H	序列辨識編號:133 (後半部)
	3C6 (野生型)	S	N	G	N	T	Y	L	H	序列辨識編號:150
	L1B R1	S	N	G	N	S	Y	L	H	序列辨識編號:151
	L1B R2	S	N	G	N	T	Y	L	H	野生型, 相同於序列辨識編號:150
	L1B R3	I	N	G	N	T	Y	L	H	序列辨識編號:152
	L1B R5	S	N	G	N	T	Y	W	H	序列辨識編號:153
	L1B R4	S	V	G	N	T	Y	L	H	序列辨識編號:154

表10: 得自CDR突變資料庫的3C6 CDRL2區域內之序列
變異

L2 資料庫										
選殖株的名稱	序列							備註		
	55	56	57	58	59	60	61	相對於序列辨識編號:140 的位置		
	1	2	3	4	5	6	7	共同位置		
共同的	X	V	S	X	X	X	S	序列辨識編號: 134		
3C6 (野生型)	K	V	S	N	R	F	S	序列辨識編號: 155		
L2 R3	N	V	S	N	R	F	S	序列辨識編號: 156		
L2 R1	K	V	S	R	R	F	S	序列辨識編號: 157		
L2 R2	K	V	S	N	R	R	S	序列辨識編號: 158		
L2 R4	K	V	S	N	R	F	S	野生型, 相同於序列辨識編號:155		
L2 R5	K	V	S	N	L	F	S	序列辨識編號: 159		

表11: 得自CDR突變資料庫的3C6 CDRL3區域內之序列
變異

L3 資料庫										
選殖株的名稱	序列									備註
	94	95	96	97	98	99	100	101	102	相對於序列辨識編號:140 的位置
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	共同位置
共同的	S	X	S	T	H	X	X	P	X	序列辨識編號: 135
3C6 (野生型)	S	Q	S	T	H	V	P	P	T	序列辨識編號: 160
L3 R5	S	Q	S	T	H	V	S	P	T	序列辨識編號: 161
L3 R2	S	Q	S	T	H	V	P	P	R	序列辨識編號: 162
L3 R3	S	Q	S	T	H	G	P	P	T	序列辨識編號: 163
L3 R4	S	P	S	T	H	V	P	P	T	序列辨識編號: 164
L3 R1	S	Q	S	T	H	V	S	P	T	序列辨識編號: 165

表12: 得自CDR突變資料庫的3C6 CDRH1區域內之序列變異

H1 資料庫											
選殖株的名稱	序列										備註
	相對於序列辨識編號:142 的位置										
	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	共同位置
共同的	X	D	S	I	T	X	G	Y	X	X	序列辨識編號:136
3C6 (野生型)	G	D	S	I	T	S	G	Y	W	N	序列辨識編號:166
H1 R1	P	D	S	I	T	S	G	Y	W	N	序列辨識編號:167
H1 R2	G	D	S	I	T	S	G	Y	W	R	序列辨識編號:168
H1 R3	G	D	S	I	T	S	G	Y	F	N	序列辨識編號:169
H1 R5	G	D	S	I	T	S	G	Y	W	K	序列辨識編號:170
H1 R4	G	D	S	I	T	F	G	Y	W	N	序列辨識編號:171

表13: 得自CDR突變資料庫(A部分)之3C6 CDRH2區域的前半部之內的序列變異

H2A 資料庫									
選殖株的名稱	序列								備註
	相對於序列辨識編號:142 的位置								
	50	51	52	53	54	55	56	57	
	1	2	3	4	5	6	7	8	共同位置
共同的	X	I	S	Y	X	G	X	X	序列辨識編號:137 (前半部)
3C6 (野生型)	Y	I	S	Y	S	G	S	T	序列辨識編號:173
H2A R5	F	I	S	Y	S	G	S	T	序列辨識編號:174
H2A R1	Y	I	S	Y	R	G	S	T	序列辨識編號:175
H2A R2	Y	I	S	Y	S	G	S	I	序列辨識編號:176
H2A R3	Y	I	S	Y	S	G	D	T	序列辨識編號:177
H2A R4	Y	I	S	Y	T	G	S	T	序列辨識編號:178

表14: 得自CDR突變資料庫(B部分)之3C6 CDRH2區域的
後半部之內的序列變異

H2B 資料庫									
選植株的名稱	序列								備註
	58	59	60	61	62	63	64	65	
	9	10	11	12	13	14	15	16	共同位置
共同的	Y	X	X	P	X	L	K	X	序列辨識編號:137 (後半部)
3C6 (野生型)	Y	Y	N	P	S	L	K	S	序列辨識編號:179
H2B R1	Y	Y	K	P	S	L	K	S	序列辨識編號:180
H2B R2	Y	Y	N	P	F	L	K	S	序列辨識編號:181
H2B R3	Y	F	N	P	S	L	K	S	序列辨識編號:182
H2B R4	Y	Y	N	P	S	L	K	N	序列辨識編號:183
H2B R5	Y	Y	N	P	S	L	K	S	野生型, 相同於序列辨識編號:179

表15: 得自CDR突變資料庫的3C6 CDRH3區域內之序列
變異

H3 資料庫							
型式	選植株的名稱	序列					備註
		98	99	100	101	102	
		1	2	3	4	5	共同位置
	共同的	X	X	X	X	Y	序列辨識編號:138
	3C6 (野生型)	G	D	G	A	Y	序列辨識編號:184
隨機的	H3 R2	G	D	G	D	Y	序列辨識編號:185
	H3 R5	G	D	T	A	Y	序列辨識編號:186
	H3 R1	A	D	G	A	Y	序列辨識編號:187
	H3 R4	G	W	G	A	Y	序列辨識編號:188
	H3 R3	E	D	G	A	Y	序列辨識編號:189
陽性	H3 P1	G	D	G	Q	Y	序列辨識編號:247
	H3 P5	G	D	G	G	Y	序列辨識編號:248

圖 9 和圖 10 分別地解說有關於被選定的 3C6 變異體之整個可變輕鏈和重鏈的序列排比。圖 11A 和 11B 圖解說明被選定的 3C6-衍生的 Fab 變異體之結合。如所解說的，相較於參考 3C6 Fab，該等 3C6-衍生的 Fab 變異體對於紫杉醇抗原通常展現出可比擬的，且有時為增高的結合親和性。

這些結果證明：個別的 CDR 變異體資料庫能夠在被標靶的 CDR 領域處生成單一突變，俾以便達成衍生自己知會結合紫杉醇的參考抗體(例如，8A10 以及 3C6)之另擇的親和性試劑之生成。

【0105】步驟 3：8A10 組合資料庫的建構與篩選

A. 組合資料庫的產生

親和力成熟方法中的一個額外步驟涉及隨機組合來自單個 CDR 資料庫之“最佳”突變。這些產生自單個 CDR 資料庫篩選之 CDR 突變被使用作為一“組合”資料庫的基礎。被包含在該組合資料庫內的 CDR 突變係根據它們在多重抗原專一性 ELISAs (multiple antigen-specific ELISAs)中的活性而被挑選出。

注意到的是：另一個在為這樣一個組合資料庫來挑選突變而被考慮的因素是可能有問題的殘基(諸如 Asn、Met 和 Cys)的替換。特別地，一個 Asn 殘基有可能被進行脫醯胺作用(deamidation)，特別是當有一個小型 R-基團(諸如 Gly 或 His)跟隨在它的後面之時。該脫醯胺作用可能負面地衝擊該抗體的親和性。端視修飾的位置而定，

Met 殘基可能導致不必要的氧化事件(oxidation event)，這可能潛在地降低該抗體的活性。另又，Cys 殘基有可能藉由與另一個 Cys 殘基形成不想要的雙硫鍵(disulfide bond)以致導致抗體結構的改變而成為有問題的。

本案的組合資料庫是以親代 Fab 選殖株 Clone 8A10_1 為背景而被建立的。被挑選的 CDR 突變係使用寡核苷酸突變誘發(oligonucleotide mutagenesis)而被隨機地引入。組合資料庫的大小被控制，俾以產生大約 1,000 或更少的突變株來促進篩選過程。

B. 組合資料庫的篩選

如前面對於個別的 CDR 變異體資料庫所大致說明的，藉由一具有變化條件的之濾紙轉印分析來大量地篩選組合資料庫(> 5 倍的可能變異體)。再次地，生物素化的 BSA-紫杉醇的濃度以及清洗時間被變化以使該篩選達最佳化。陽性選殖株被分離出並且藉由 DNA 序列分析來確認它們的序列。在這個特別的篩選中，僅有位於輕鏈和重鏈的 CDR 1 和 CDR 2 領域內的突變被選來供篩選之用。

來自該組合資料庫之被選定的代表性命中物之序列分別地就輕鏈和重鏈而被載述於表 7 和表 8 中，位置編號分別相對於輕鏈和重鏈之整個被揭示的可變領域。

表8: 8A10組合資料庫內的輕鏈序列變化

8A10 組合資料庫																				
輕鏈 CDR																				
L1																				
L2																				
相對於序列辨識編號:8 的位置	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	50	51	52	53	54	55	56		
Fab	序列辨識編號:											序列辨識編號:								
野生型	K	P	S	Q	N	V	G	S	A	V	T	11	S	A	S	N	R	Y	T	31
CP2	K	P	S	Q	K	V	G	S	R	V	T	104	S	A	I	N	R	Y	T	111
CP3	K	P	S	Q	R	V	G	S	R	V	T	105	S	T	I	N	R	Y	T	112
CP4	K	P	S	Q	K	V	G	S	A	V	T	106	S	T	N	N	R	Y	T	113
CP5	K	P	S	Q	N	V	G	S	A	V	T	11	S	A	S	N	R	Y	T	31
CP6	K	P	S	Q	K	V	G	S	A	V	T	107	S	T	I	R	R	Y	T	114
CP7	K	P	S	Q	K	V	G	S	R	V	T	108	S	A	N	N	R	Y	T	115
CP8	K	P	S	Q	K	V	G	S	R	V	T	109	S	T	N	N	R	Y	T	116
CP9	K	P	S	Q	K	V	G	S	A	V	T	110	S	A	N	R	R	Y	T	117

表9: 8A10組合資料庫內的重鏈序列變化

8A10 組合資料庫																													
CDR																													
H1																													
H2																													
相對於序列辨識編號:10 的位置	2	27	28	29	30	31	32	33	34	35	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66		
Fab	序列辨識編號:										序列辨識編號:																		
野生型	G	Y	T	F	T	D	S	T	M	N	58	E	I	D	P	N	N	G	G	T	N	Y	N	Q	K	F	K	G	69
CP2	G	Y	R	F	T	D	S	T	M	N	118	E	I	W	P	N	N	G	G	T	N	Y	N	Q	K	F	K	G	125
CP3	G	Y	R	F	T	D	S	T	M	N	119	E	I	F	P	N	N	G	G	T	N	Y	N	Q	K	F	K	G	126
CP4	G	Y	R	F	T	D	S	T	M	N	120	E	I	F	P	N	N	G	G	T	N	Y	N	Q	K	F	K	G	127
CP5	G	Y	T	F	T	D	S	T	M	N	58	E	I	D	P	N	N	G	G	T	N	Y	N	Q	K	F	K	G	128
CP6	G	Y	R	F	T	D	S	T	M	N	121	E	I	F	P	N	N	G	G	T	N	Y	N	Q	K	F	K	G	129
CP7	G	Y	R	F	T	D	S	T	M	N	122	E	I	W	P	N	N	G	G	T	N	Y	N	Q	K	F	K	G	130
CP8	G	Y	R	F	T	D	S	T	M	N	123	E	I	W	P	N	N	G	G	T	N	Y	N	Q	K	F	K	G	131
CP9	G	Y	R	F	T	D	S	T	M	N	124	E	I	F	P	N	N	G	G	T	N	Y	N	Q	K	F	K	G	132

圖 8 圖解說明有關於參考 8A10 Fab 以及被選定的組合陽性選殖株之整個輕鏈和重鏈的可變區之序列排比，而展現出分歧的序列之位置被示出。

C. 使用抗原專一性ELISA來驗證最終的組合資料庫 “命中物”

被挑選為最終的“命中物”之選殖株被分離出，並如前面所述使用紫杉醇抗原來進行直接結合和競爭性抑制的測試。每個被選定的“命中物”之一噬菌體感染的大腸桿菌培養物被收穫，而細胞周質內含物藉由滲壓衝擊(periprep)而被釋出。藉由 Quant ELISA 來定量 Fab 濃度，而 Fab 的抗體專一性結合係使用如前所述的結合 ELISA 來執行。圖 7 圖解說明該組合資料庫中所得之被選定的 Fabs 的直接結合。如所解說的，相較於參考 8A10 Fab，大部分的組合 Fab 變異體展現出增高的紫杉醇結合。

結論：

如前所述的，含有來自抗-紫杉醇參考 mAb 8A10 和 3C6 的變型 CDR 序列被產生。來自該等 8A10 資料庫之被選定的命中物進一步被證實對於紫杉醇具有可比擬的或增進的結合親和性。再者，在篩選中被發現之個別的 8A10 突變被組合以進一步增進該結合親和性，因而證明被揭示的序列變異體之多種組合可被組合於有用的試劑內，俾以結合、檢測和分離紫杉醇。

雖然本發明之較佳具體例已被例示和詳述，吾人將會理解到：各種不同的變化可在不逸脫出本發明的精神和範圍之下被完成。

序列的索引：

【0106】 下面是被載述於隨文檢附的序列表之內的序列之一索引。該等序列係以它們被條列在序列表之中的各自序列辨識編號來稱之。

1. 8A10 CDRL1 之共同胺基酸序列
2. 8A10 CDRL2 之共同胺基酸序列
3. 8A10 CDRL3 之共同胺基酸序列
4. 8A10 CDRH1 之共同胺基酸序列
5. 8A10 CDRH2 之共同胺基酸序列
6. 8A10 CDRH3 之共同胺基酸序列
7. 編碼 8A10 VLC 區域的核酸
8. 8A10 VLC 區域的胺基酸序列
9. 編碼 8A10 VHC 區域的核酸
10. 8A10 VHC 區域的胺基酸序列
11. 8A10 CDRL1 的胺基酸序列
12. 8A10 CDRL1 變異體的胺基酸序列
13. 8A10 CDRL1 變異體的胺基酸序列
14. 8A10 CDRL1 變異體的胺基酸序列
15. 8A10 CDRL1 變異體的胺基酸序列
16. 8A10 CDRL1 變異體的胺基酸序列
17. 8A10 CDRL1 變異體的胺基酸序列

18. 8A10 CDRL1 變異體的胺基酸序列
19. 8A10 CDRL1 變異體的胺基酸序列
20. 8A10 CDRL1 變異體的胺基酸序列
21. 8A10 CDRL1 變異體的胺基酸序列
22. 8A10 CDRL1 變異體的胺基酸序列
23. 8A10 CDRL1 變異體的胺基酸序列
24. 8A10 CDRL1 變異體的胺基酸序列
25. 8A10 CDRL1 變異體的胺基酸序列
26. 8A10 CDRL1 變異體的胺基酸序列
27. 8A10 CDRL1 變異體的胺基酸序列
28. 8A10 CDRL1 變異體的胺基酸序列
29. 8A10 CDRL1 變異體的胺基酸序列
30. 8A10 CDRL1 變異體的胺基酸序列
31. 8A10 CDRL2 的胺基酸序列
32. 8A10 CDRL2 變異體的胺基酸序列
33. 8A10 CDRL2 變異體的胺基酸序列
34. 8A10 CDRL2 變異體的胺基酸序列
35. 8A10 CDRL2 變異體的胺基酸序列
36. 8A10 CDRL2 變異體的胺基酸序列
37. 8A10 CDRL2 變異體的胺基酸序列
38. 8A10 CDRL2 變異體的胺基酸序列
39. 8A10 CDRL2 變異體的胺基酸序列
40. 8A10 CDRL2 變異體的胺基酸序列
41. 8A10 CDRL2 變異體的胺基酸序列

42. 8A10 CDRL2 變異體的胺基酸序列
43. 8A10 CDRL2 變異體的胺基酸序列
44. 8A10 CDRL2 變異體的胺基酸序列
45. 8A10 CDRL3 的胺基酸序列
46. 8A10 CDRL3 變異體的胺基酸序列
47. 8A10 CDRL3 變異體的胺基酸序列
48. 8A10 CDRL3 變異體的胺基酸序列
49. 8A10 CDRL3 變異體的胺基酸序列
50. 8A10 CDRL3 變異體的胺基酸序列
51. 8A10 CDRL3 變異體的胺基酸序列
52. 8A10 CDRL3 變異體的胺基酸序列
53. 8A10 CDRL3 變異體的胺基酸序列
54. 8A10 CDRL3 變異體的胺基酸序列
55. 8A10 CDRL3 變異體的胺基酸序列
56. 8A10 CDRL3 變異體的胺基酸序列
57. 8A10 CDRL3 變異體的胺基酸序列
58. 8A10 CDRH1 的胺基酸序列
59. 8A10 CDRH1 變異體的胺基酸序列
60. 8A10 CDRH1 變異體的胺基酸序列
61. 8A10 CDRH1 變異體的胺基酸序列
62. 8A10 CDRH1 變異體的胺基酸序列
63. 8A10 CDRH1 變異體的胺基酸序列
64. 8A10 CDRH1 變異體的胺基酸序列
65. 8A10 CDRH1 變異體的胺基酸序列

66. 8A10 CDRH1 變異體的胺基酸序列
67. 8A10 CDRH1 變異體的胺基酸序列
68. 8A10 CDRH2 的胺基酸序列
69. 8A10 CDRH2 區段 A 的胺基酸序列
70. 8A10 CDRH2 區段 A 變異體的胺基酸序列
71. 8A10 CDRH2 區段 A 變異體的胺基酸序列
72. 8A10 CDRH2 區段 A 變異體的胺基酸序列
73. 8A10 CDRH2 區段 A 變異體的胺基酸序列
74. 8A10 CDRH2 區段 A 變異體的胺基酸序列
75. 8A10 CDRH2 區段 A 變異體的胺基酸序列
76. 8A10 CDRH2 區段 A 變異體的胺基酸序列
77. 8A10 CDRH2 區段 A 變異體的胺基酸序列
78. 8A10 CDRH2 區段 A 變異體的胺基酸序列
79. 8A10 CDRH2 區段 A 變異體的胺基酸序列
80. 8A10 CDRH2 區段 A 變異體的胺基酸序列
81. 8A10 CDRH2 區段 A 變異體的胺基酸序列
82. 8A10 CDRH2 區段 A 變異體的胺基酸序列
83. 8A10 CDRH2 區段 A 變異體的胺基酸序列
84. 8A10 CDRH2 區段 A 變異體的胺基酸序列
85. 8A10 CDRH2 區段 A 變異體的胺基酸序列
86. 8A10 CDRH2 區段 A 變異體的胺基酸序列
87. 8A10 CDRH2 區段 A 變異體的胺基酸序列
88. 8A10 CDRH2 區段 A 變異體的胺基酸序列
89. 8A10 CDRH2 區段 A 變異體的胺基酸序列

90. 8A10 CDRH2 區段 A 變異體的胺基酸序列
91. 8A10 CDRH2 區段 B 的胺基酸序列
92. 8A10 CDRH2 區段 B 變異體的胺基酸序列
93. 8A10 CDRH2 區段 B 變異體的胺基酸序列
94. 8A10 CDRH2 區段 B 變異體的胺基酸序列
95. 8A10 CDRH2 區段 B 變異體的胺基酸序列
96. 8A10 CDRH2 區段 B 變異體的胺基酸序列
97. 8A10 CDRH2 區段 B 變異體的胺基酸序列
98. 8A10 CDRH2 區段 B 變異體的胺基酸序列
99. 8A10 CDRH3 的胺基酸序列
100. 8A10 CDRH3 變異體的胺基酸序列
101. 8A10 CDRH3 變異體的胺基酸序列
102. 8A10 CDRH3 變異體的胺基酸序列
103. 8A10 CDRH3 變異體的胺基酸序列
104. 8A10 組合變異體 CP2 的 CDRL1 的胺基酸序列
105. 8A10 組合變異體 CP3 的 CDRL1 的胺基酸序列
106. 8A10 組合變異體 CP4 的 CDRL1 的胺基酸序列
107. 8A10 組合變異體 CP6 的 CDRL1 的胺基酸序列
108. 8A10 組合變異體 CP7 的 CDRL1 的胺基酸序列
109. 8A10 組合變異體 CP8 的 CDRL1 的胺基酸序列
110. 8A10 組合變異體 CP9 的 CDRL1 的胺基酸序列
111. 8A10 組合變異體 CP2 的 CDRL2 的胺基酸序列
112. 8A10 組合變異體 CP3 的 CDRL2 的胺基酸序列
113. 8A10 組合變異體 CP4 的 CDRL2 的胺基酸序列

114. 8A10 組合變異體 CP6 的 CDRL2 的胺基酸序列
115. 8A10 組合變異體 CP7 的 CDRL2 的胺基酸序列
116. 8A10 組合變異體 CP8 的 CDRL2 的胺基酸序列
117. 8A10 組合變異體 CP9 的 CDRL2 的胺基酸序列
118. 8A10 組合變異體 CP2 的 CDRH1 的胺基酸序列
119. 8A10 組合變異體 CP3 的 CDRH1 的胺基酸序列
120. 8A10 組合變異體 CP4 的 CDRH1 的胺基酸序列
121. 8A10 組合變異體 CP6 的 CDRH 1 的胺基酸序列
122. 8A10 組合變異體 CP7 的 CDRH1 的胺基酸序列
123. 8A10 組合變異體 CP8 的 CDRH1 的胺基酸序列
124. 8A10 組合變異體 CP9 的 CDRH1 的胺基酸序列
125. 8A10 組合變異體 CP2 的 CDRH2 的胺基酸序列
126. 8A10 組合變異體 CP3 的 CDRH2 的胺基酸序列
127. 8A10 組合變異體 CP4 的 CDRH2 的胺基酸序列
128. 8A10 組合變異體 CP5 的 CDRH2 的胺基酸序列
129. 8A10 組合變異體 CP6 的 CDRH2 的胺基酸序列
130. 8A10 組合變異體 CP7 的 CDRH2 的胺基酸序列
131. 8A10 組合變異體 CP8 的 CDRH2 的胺基酸序列
132. 8A10 組合變異體 CP9 的 CDRH2 的胺基酸序列
133. 3C6 CDRL1 的共同胺基酸序列
134. 3C6 CDRL2 的共同胺基酸序列
135. 3C6 CDRL3 的共同胺基酸序列
136. 3C6 CDRH1 的共同胺基酸序列
137. 3C6 CDRH2 的共同胺基酸序列

138. 3C6 CDRH3 的共同胺基酸序列
139. 編碼 3C6 VLC 區域的核酸
140. 3C6 VLC 區域的胺基酸序列
141. 編碼 3C6 VHC 區域的核酸
142. 3C6 VHC 區域的胺基酸序列
143. 3C6 CDRL1 的胺基酸序列
144. 3C6 CDRL1 區段 A 的胺基酸序列
145. 3C6 CDRL1 區段 A 變異體的胺基酸序列
146. 3C6 CDRL1 區段 A 變異體的胺基酸序列
147. 3C6 CDRL1 區段 A 變異體的胺基酸序列
148. 3C6 CDRL1 區段 A 變異體的胺基酸序列
149. 3C6 CDRL1 區段 A 變異體的胺基酸序列
150. 3C6 CDRL1 區段 B 的胺基酸序列
151. 3C6 CDRL1 區段 B 變異體的胺基酸序列
152. 3C6 CDRL1 區段 B 變異體的胺基酸序列
153. 3C6 CDRL1 區段 B 變異體的胺基酸序列
154. 3C6 CDRL1 區段 B 變異體的胺基酸序列
155. 3C6 CDRL2 的胺基酸序列
156. 3C6 CDRL2 變異體的胺基酸序列
157. 3C6 CDRL2 變異體的胺基酸序列
158. 3C6 CDRL2 變異體胺基酸序列
159. 3C6 CDRL2 變異體的胺基酸序列
160. 3C6 CDRL3 的胺基酸序列
161. 3C6 CDRL3 變異體的胺基酸序列

162. 3C6 CDRL3 變異體的胺基酸序列
163. 3C6 CDRL3 變異體的胺基酸序列
164. 3C6 CDRL3 變異體的胺基酸序列
165. 3C6 CDRL3 變異體的胺基酸序列
166. 3C6 CDRH1 的胺基酸序列
167. 3C6 CDRH1 變異體的胺基酸序列
168. 3C6 CDRH1 變異體的胺基酸序列
169. 3C6 CDRH1 變異體的胺基酸序列
170. 3C6 CDRH1 變異體的胺基酸序列
171. 3C6 CDRH1 變異體的胺基酸序列
172. 3C6 CDRH2 的胺基酸序列
173. 3C6 CDRH2 區段 A 的胺基酸序列
174. 3C6 CDRH2 區段 A 變異體的胺基酸序列
175. 3C6 CDRH2 區段 A 變異體的胺基酸序列
176. 3C6 CDRH2 區段 A 變異體的胺基酸序列
177. 3C6 CDRH2 區段 A 變異體的胺基酸序列
178. 3C6 CDRH2 區段 A 變異體的胺基酸序列
179. 3C6 CDRH2 區段 B 的胺基酸序列
180. 3C6 CDRH2 區段 B 變異體的胺基酸序列
181. 3C6 CDRH2 區段 B 變異體的胺基酸序列
182. 3C6 CDRH2 區段 B 變異體的胺基酸序列
183. 3C6 CDRH2 區段 B 變異體的胺基酸序列
184. 3C6 CDRH3 的胺基酸序列
185. 3C6 CDRH3 變異體的胺基酸序列

186. 3C6 CDRH3 變異體的胺基酸序列
187. 3C6 CDRH3 變異體的胺基酸序列
188. 3C6 CDRH3 變異體的胺基酸序列
189. 3C6 CDRH3 變異體的胺基酸序列
190. 8A10 VLC 區域變異體的胺基酸序列
191. 8A10 VLC 區域變異體的胺基酸序列
192. 8A10 VLC 區域變異體的胺基酸序列
193. 8A10 VLC 區域變異體的胺基酸序列
194. 8A10 VLC 區域變異體的胺基酸序列
195. 8A10 VLC 區域變異體的胺基酸序列
196. 8A10 VLC 區域變異體的胺基酸序列
197. 8A10 VLC 區域變異體的胺基酸序列
198. 8A10 VHC 區域變異體的胺基酸序列
199. 8A10 VHC 區域變異體的胺基酸序列
200. 8A10 VHC 區域變異體的胺基酸序列
201. 8A10 VHC 區域變異體的胺基酸序列
202. 8A10 VHC 區域變異體的胺基酸序列
203. 8A10 VHC 區域變異體的胺基酸序列
204. 8A10 VHC 區域變異體的胺基酸序列
205. 8A10 VHC 區域變異體的胺基酸序列
206. 3C6 VLC 區域變異體的胺基酸序列
207. 3C6 VLC 區域變異體的胺基酸序列
208. 3C6 VLC 區域變異體的胺基酸序列
209. 3C6 VLC 區域變異體的胺基酸序列

210. 3C6 VLC 區域變異體的胺基酸序列
211. 3C6 VLC 區域變異體的胺基酸序列
212. 3C6 VLC 區域變異體的胺基酸序列
213. 3C6 VLC 區域變異體的胺基酸序列
214. 3C6 VLC 區域變異體的胺基酸序列
215. 3C6 VLC 區域變異體的胺基酸序列
216. 3C6 VLC 區域變異體的胺基酸序列
217. 3C6 VLC 區域變異體的胺基酸序列
218. 3C6 VLC 區域變異體的胺基酸序列
219. 3C6 VLC 區域變異體的胺基酸序列
220. 3C6 VLC 區域變異體的胺基酸序列
221. 3C6 VLC 區域變異體的胺基酸序列
222. 3C6 VLC 區域變異體的胺基酸序列
223. 3C6 VLC 區域變異體的胺基酸序列
224. 3C6 VLC 區域變異體的胺基酸序列
225. 3C6 VLC 區域變異體的胺基酸序列
226. 3C6 VHC 區域變異體的胺基酸序列
227. 3C6 VHC 區域變異體的胺基酸序列
228. 3C6 VHC 區域變異體的胺基酸序列
229. 3C6 VHC 區域變異體的胺基酸序列
230. 3C6 VHC 區域變異體的胺基酸序列
231. 3C6 VHC 區域變異體的胺基酸序列
232. 3C6 VHC 區域變異體的胺基酸序列
233. 3C6 VHC 區域變異體的胺基酸序列

- 234. 3C6 VHC 區域變異體的胺基酸序列
- 235. 3C6 VHC 區域變異體的胺基酸序列
- 236. 3C6 VHC 區域變異體的胺基酸序列
- 237. 3C6 VHC 區域變異體的胺基酸序列
- 238. 3C6 VHC 區域變異體的胺基酸序列
- 239. 3C6 VHC 區域變異體的胺基酸序列
- 240. 3C6 VHC 區域變異體的胺基酸序列
- 241. 3C6 VHC 區域變異體的胺基酸序列
- 242. 3C6 VHC 區域變異體的胺基酸序列
- 243. 3C6 VHC 區域變異體的胺基酸序列
- 244. 3C6 VHC 區域變異體的胺基酸序列
- 245. 3C6 VHC 區域變異體的胺基酸序列
- 246. 3C6 CDRL1 區段 A 變異體的胺基酸序列
- 247. 3C6 CDRH3 變異體的胺基酸序列
- 248. 3C6 CDRH3 變異體的胺基酸序列

<210> 2
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <220>
 <221> MISC_特徵
 <222> (1)..(1)
 <223> 其中位在位置 1 處的 X 是 S 或 Y
 <220>
 <221> MISC_特徵
 <222> (2)..(2)
 <223> 其中位在位置 2 處的 X 是 A、H 或 T
 <220>
 <221> MISC_特徵
 <222> (3)..(3)
 <223> 其中位在位置 3 處的 X 是 S 或 T
 <220>
 <221> MISC_特徵
 <222> (4)..(4)
 <223> 其中位在位置 4 處的 X 是 N 或 R
 <220>
 <221> MISC_特徵
 <222> (7)..(7)
 <223> 其中位在位置 7 處的 X 是 T、M 或 R
 <400> 2
 Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Tyr Xaa
 1 5

<210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <220>
 <221> MISC_特徵
 <222> (4)..(4)

- <223> 其中位在位置 8 處的 X 是 G、W 或 R
 <220>
 <221> MISC_特徵
 <222> (9)..(9)
 <223> 其中位在位置 9 處的 X 是 T 或 A
 <220>
 <221> MISC_特徵
 <222> (10)..(10)
 <223> 其中位在位置 10 處的 X 是 N、R 或 A
 <220>
 <221> MISC_特徵
 <222> (11)..(11)
 <223> 其中位在位置 11 處的 X 是 Y 或 T
 <220>
 <221> MISC_特徵
 <222> (14)..(14)
 <223> 其中位在位置 14 處的 X 是 K 或 N
 <220>
 <221> MISC_特徵
 <222> (16)..(16)
 <223> 其中位在位置 16 處的 X 是 K 或 S
 <220>
 <221> MISC_特徵
 <222> (17)..(17)
 <223> 其中位在位置 17 處的 X 是 G 或 L
 <400> 5
 Xaa Ile Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Gln Xaa Phe Xaa Xaa
 1 5 10 15
- <210> 6
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <220>
 <221> MISC_特徵
 <222> (3)..(3)
 <223> 其中位在位置 3 處的 X 是 G、L 或 P

<220>

<221> MISC_特徵

<222> (4)..(4)

<223> 其中位在位置4處的X是V、P或S

<400> 6

Ala Arg Xaa Xaa Trp Gly

1 5

<210> 7

<211> 323

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 7

gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccataa cactaggaga gagggtcagc	60
atcacctgca agcccagtca gaatgtgggt tctgctgtaa cctgggtggca acagaaacca	120
ggacaatctc ctaaactact gatttactca gcttccaatc ggtatactgg agtcctgat	180
cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccattagtaa tgtgcagtct	240
gaagacctgg cagattatit ctgtcaacaa tatagcagct atccgtacac gttcggaggg	300
gggaccaagc tggaaataaa acg	323

<210> 8

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 8

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

Ala Arg Gly Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 11

Lys Pro Ser Gln Asn Val Gly Ser Ala Val Thr
 1 5 10

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 12

Lys Pro Ser Gln Asn Val Phe Ser Ala Val Thr
 1 5 10

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 13

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

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 14

Lys Pro Val Gln Asn Val Gly Ser Ala Val Thr

1 5 10

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 15

Lys Pro Ser Gln Asn Val Phe Ser Ala Val Thr

1 5 10

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 16

Lys Pro Ser Gln Asp Val Gly Ser Ala Val Thr

1 5 10

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 17

Lys Pro Ser Gln Asn Val Phe Ser Ala Val Thr

1 5 10

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 18

Lys Pro Ser Gln Met Val Gly Ser Ala Val Thr

1 5 10

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 19

Lys Pro Ser Gln Asn Val Gly Ser Pro Val Asn

1 5 10

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 20

Lys Pro Ser Gln Arg Val Gly Ser Ala Val Thr

1 5 10

<210> 21

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 21

Lys Pro Ser Gln Arg Val Gly Ser Ala Val Thr

1 5 10

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 22

Lys Pro Ser Gln Lys Val Gly Ser Ala Val Thr

1 5 10

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 23

Lys Pro Ser Gln Asn Val Gly Ser Arg Val Thr

1 5 10

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 24

Lys Pro Ser Gln Lys Val Gly Ser Ala Val Thr

1 5 10

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 25

Lys Pro Ser Gln Asn Val Gly Ser Ala Val Asn

1 5 10

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 26

Lys Pro Ser Gln Asn Val Gly Ser Ala Val Ala

1 5 10

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 27

Lys Pro Ser Gln Asn Val Gly Ser Arg Val Thr

1 5 10

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 28

Lys Pro Ser Gln Asn Val Gly Ser Arg Val Thr

1 5 10

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 29

Lys Pro Val Gln Asn Val Gly Ser Ala Val Thr

1 5 10

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 30

Lys Pro Ser Gln Lys Val Gly Ser Ala Val Thr

1 5 10

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 31

Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 32

Ser Ala Thr Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 33

Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Met

1 5

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 34

Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 35

Ser His Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 36

Ser Thr Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 37

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 37

Ser Ala Thr Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 38

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 38

Ser Thr Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 39

Ser Ala Ser Arg Arg Tyr Thr

1 5

<210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 40

Ser Ala Ser Arg Arg Tyr Thr

1 5

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 41

Ser Ala Ser Arg Arg Tyr Thr

1 5

<210> 42

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 42

Ser Ala Ser Arg Arg Tyr Thr

1 5

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 43

Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Arg

1 5

<210> 44

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 44

Ser Ala Ser Arg Arg Tyr Thr

1 5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 45

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 46

Gln Gln Tyr Ser Ser Lys Pro Tyr Thr

1 5

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 47

Gln Gln Tyr Pro Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 48

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr Arg

1 5

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 49

Gln Gln Tyr Ser Ser Arg Pro Tyr Thr

1 5

<210> 50
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 50

Gln Gln Tyr Ser Ser Arg Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 51
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 51

Gln Gln Tyr Ser Ser Arg Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 52
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 52

Gln Gln Tyr Ser Ser Arg Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 53
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 53

Gln Gln Tyr Ser Ser Lys Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 54

Gln Gln Tyr Ser Ser Lys Pro Tyr Thr

1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 55

Gln Gln Tyr Ser Ser Val Pro Tyr Thr

1 5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 56

Gln Gln Tyr Ser Ser Arg Pro Tyr Thr

1 5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 57

Gln Gln Tyr Ser Ser Lys Pro Tyr Thr

1 5

<210> 58
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 58

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser Thr Met Asn
 1 5 10

<210> 59
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 59

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

<210> 60
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 60

Gly Ser Thr Phe Thr Asp Ser Thr Met Asn
 1 5 10

<210> 61
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 61

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser Thr Thr Asn
 1 5 10

<210> 62
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 62

Gly Tyr Thr Phe Ser Asp Ser Thr Met Asn
 1 5 10

<210> 63
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 63

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser Thr Met Lys
 1 5 10

<210> 64
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 64

Gly Tyr Arg Phe Thr Asp Ser Thr Met Asn
 1 5 10

<210> 65
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 65

Gly Tyr Thr Phe His Asp Ser Thr Met Asn
 1 5 10

<210> 66
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 66

Gly Tyr Arg Phe Thr Asp Ser Thr Met Asn
 1 5 10

<210> 67
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 67

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ser Arg Met Asn
 1 5 10

<210> 68
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 68

Glu Ile Asp Pro Asn Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly
 1 5 10 15

<210> 69
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 69

Glu Ile Asp Pro Asn Asn Gly Gly
 1 5

<210> 70

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 70

Glu Ile Asp Pro Thr Asn Gly Gly

1 5

<210> 71

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 71

Glu Ile Asp Pro Asn Asn Leu Gly

1 5

<210> 72

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 72

Glu Ile Asp Pro Asn Asn Gly Trp

1 5

<210> 73

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 73

Glu Ile Asp Pro Asn Ser Gly Gly

1 5

<210> 74
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 74

Lys Ile Asp Pro Asn Asn Gly Gly
1 5

<210> 75
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 75

Glu Ile Asp Pro Met Asn Gly Gly
1 5

<210> 76
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 76

Glu Ile Asp Pro Asn Asp Gly Gly
1 5

<210> 77
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 77

Glu Ile Asp Pro Ser Asn Gly Gly
1 5

<210> 78

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 78

Glu Ile Asp Pro Lys Asn Gly Gly

1 5

<210> 79

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 79

Glu Ile Asp Pro Trp Asn Gly Gly

1 5

<210> 80

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 80

Glu Ile Asp Pro Arg Asn Gly Gly

1 5

<210> 81

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 81

Glu Ile Asp Pro Asn Asn Gly Arg

1 5

<210> 82

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 82

Glu Ile Asp Pro Arg Asn Gly Gly

1 5

<210> 83

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 83

Glu Ile Asp Pro Trp Asn Gly Gly

1 5

<210> 84

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 84

Glu Ile Phe Pro Asn Asn Gly Gly

1 5

<210> 85

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 85

Glu Ile Phe Pro Asn Asn Gly Gly

1 5

<210> 86

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 86

Glu Ile Trp Pro Asn Asn Gly Gly

1 5

<210> 87

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 87

Glu Ile Ala Pro Asn Asn Gly Gly

1 5

<210> 88

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 88

Glu Ile Asp Pro Asn Arg Gly Gly

1 5

<210> 89

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 89

Glu Ile Trp Pro Asn Asn Gly Gly

1 5

<210> 90

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 90

Glu Ile Asp Pro Asn Asn Gly Trp

1 5

<210> 91

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 91

Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly

1 5

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 92

Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly

1 5

<210> 93

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 93

Thr Asn Thr Asn Gln Lys Phe Lys Gly

1 5

<210> 94

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 94

Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly

1 5

<210> 95

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 95

Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Ser Gly

1 5

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 96

Thr Asn Tyr Asn Gln Asn Phe Lys Gly

1 5

<210> 97

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 97

Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly

1 5

<210> 98
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 98

Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Leu
1 5

<210> 99
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 99

Ala Arg Gly Val Trp Gly
1 5

<210> 100
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 100

Ala Ala Arg Val Trp Gly
1 5

<210> 101
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 101

Ala Arg Gly Pro Trp Gly
1 5

<210> 102

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 102

Ala Arg Pro Val Trp Gly

1 5

<210> 103

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 103

Ala Arg Gly Ser Trp Gly

1 5

<210> 104

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 104

Lys Pro Ser Gln Lys Val Gly Ser Arg Val Thr

1 5 10

<210> 105

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 105

Lys Pro Ser Gln Arg Val Gly Ser Arg Val Thr

1 5 10

<210> 106
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 106

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

<210> 107
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 107

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

<210> 108
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 108

Lys Pro Ser Gln Lys Val Gly Ser Arg Val Thr
 1 5 10

<210> 109
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 109

Lys Pro Ser Gln Lys Val Gly Ser Arg Val Thr
 1 5 10

<210> 110

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 110

Lys Pro Ser Gln Lys Val Gly Ser Ala Val Thr

1 5 10

<210> 111

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 111

Ser Ala Ile Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 112

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 112

Ser Thr Ile Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 113

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 113

Ser Thr Asn Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 114

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 114

Ser Thr Ile Arg Arg Tyr Thr

1 5

<210> 115

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 115

Ser Ala Asn Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 116

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 116

Ser Thr Asn Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 117

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 117

Ser Ala Asn Arg Arg Tyr Thr

1 5

<210> 122
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 122

Gly Tyr Arg Phe Thr Asp Ser Thr Met Asn
 1 5 10

<210> 123
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 123

Gly Tyr Arg Phe Thr Asp Ser Thr Met Asn
 1 5 10

<210> 124
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 124

Gly Tyr Arg Phe Thr Asp Ser Thr Met Asn
 1 5 10

<210> 125
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 125

Glu Ile Trp Pro Asn Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly
 1 5 10 15

<210> 126

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 126

Glu	Ile	Phe	Pro	Asn	Asn	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly
1				5					10					15		

<210> 127

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 127

Glu	Ile	Phe	Pro	Asn	Asn	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly
1				5					10					15		

<210> 128

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 128

Glu	Ile	Asp	Pro	Asn	Asn	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly
1				5					10					15		

<210> 129

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 129

Glu	Ile	Phe	Pro	Asn	Asn	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly
1				5					10					15		

<210> 130

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 130

Glu	Ile	Trp	Pro	Asn	Asn	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly
1				5					10						15	

<210> 131

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 131

Glu	Ile	Trp	Pro	Asn	Asn	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly
1				5					10						15	

<210> 132

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 132

Glu	Ile	Phe	Pro	Asn	Asn	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly
1				5					10						15	

<210> 133

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> MISC_特徵

<222> (1)..(1)

<223> 其中位在位置 1 處的 X 是 R 或 H

<222> (1)..(1)
 <223> 其中位在位置 1 處的 X 是 K 或 N
 <220>
 <221> MISC_特徵
 <222> (4)..(4)
 <223> 其中位在位置 4 處的 X 是 N 或 R
 <220>
 <221> MISC_特徵
 <222> (5)..(5)
 <223> 其中位在位置 5 處的 X 是 R 或 L
 <220>
 <221> MISC_特徵
 <222> (6)..(6)
 <223> 其中位在位置 6 處的 X 是 F 或 R
 <400> 134
 Xaa Val Ser Xaa Xaa Xaa Ser
 1 5

<210> 135
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <220>
 <221> MISC_特徵
 <222> (2)..(2)
 <223> 其中位在位置 2 處的 X 是 Q 或 P
 <220>
 <221> MISC_特徵
 <222> (6)..(6)
 <223> 其中位在位置 6 處的 X 是 V 或 G
 <220>
 <221> MISC_特徵
 <222> (7)..(7)
 <223> 其中位在位置 7 處的 X 是 P 或 S
 <220>
 <221> MISC_特徵
 <222> (9)..(9)
 <223> 其中位在位置 9 處的 X 是 T 或 R

<400> 135

Ser Xaa Ser Thr His Xaa Xaa Pro Xaa

1 5

<210> 136

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> MISC_特徵

<222> (1)..(1)

<223> 其中位在位置1處的X是G或P

<220>

<221> MISC_特徵

<222> (6)..(6)

<223> 其中位在位置6處的X是S或I

<220>

<221> MISC_特徵

<222> (9)..(9)

<223> 其中位在位置9處的X是W或F

<220>

<221> MISC_特徵

<222> (10)..(10)

<223> 其中位在位置10處的X是N·R或K

<400> 136

Xaa Asp Ser Ile Thr Xaa Gly Tyr Xaa Xaa

1 5 10

<210> 137

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> MISC_特徵

<222> (1)..(1)

<223> 其中位在位置1處的X是Y或F

<220>
 <221> MISC_特徵
 <222> (5)..(5)
 <223> 其中位在位置 5 處的 X 是 S、R 或 T
 <220>
 <221> MISC_特徵
 <222> (7)..(7)
 <223> 其中位在位置 7 處的 X 是 S 或 D
 <220>
 <221> MISC_特徵
 <222> (8)..(8)
 <223> 其中位在位置 8 處的 X 是 T 或 I
 <220>
 <221> MISC_特徵
 <222> (10)..(10)
 <223> 其中位在位置 10 處的 X 是 Y 或 F
 <220>
 <221> MISC_特徵
 <222> (11)..(11)
 <223> 其中位在位置 11 處的 X 是 N 或 K
 <220>
 <221> MISC_特徵
 <222> (13)..(13)
 <223> 其中位在位置 13 處的 X 是 S 或 F
 <220>
 <221> MISC_特徵
 <222> (16)..(16)
 <223> 其中位在位置 16 處的 X 是 S 或 N
 <400> 137
 Xaa Ile Ser Tyr Xaa Gly Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Pro Xaa Leu Lys Xaa
 1 5 10 15

<210> 138
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <220>
 <221> MISC_特徵

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

<210> 141

<211> 339

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 141

gaggtgcagc ttcaggagtc gggacctagt ctctgaaac ctctcagac tctgtccctc 60
 acctgttctg tcactggcga ctccatcacc agtgggtact ggaactggat cgggaaattc 120
 ccagggaata gacttgagta catggggtac ataagctaca gtggtagcac ttactacaat 180
 ccgtctctca aaagtcgaat ctccatcact cgagacacat ccaagaacca gtactaccta 240
 catttgactt ctgtgactac tgaggacaca gccacatatt actgtgcca aggggatggc 300
 gcctactggg gccaaaggcac cactctcaca gtctcctca 339

<210> 142

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 142

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly
 20 25 30

Arg Ser Arg Gln Met Leu Val His

1 5

<210> 146

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 146

Arg Ser Arg Gln Ser Leu Leu His

1 5

<210> 147

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 147

His Ser Arg Gln Ser Leu Val His

1 5

<210> 148

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 148

Arg Ser Gly Gln Ser Leu Val His

1 5

<210> 149

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 149

Arg Ser Asn Gln Ser Leu Val His

1 5

<210> 150

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 150

Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His

1 5

<210> 151

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 151

Ser Asn Gly Asn Ser Tyr Leu His

1 5

<210> 152

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 152

Ile Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His

1 5

<210> 153

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 153

Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Trp His

1 5

<210> 154

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 154

Ser Val Gly Asn Thr Tyr Leu His

1 5

<210> 155

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 155

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 156

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 156

Asn Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 157

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 157

Lys Val Ser Arg Arg Phe Ser

1 5

<210> 158

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 158

Lys Val Ser Asn Arg Arg Ser

1 5

<210> 159

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 159

Lys Val Ser Asn Leu Phe Ser

1 5

<210> 160

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 160

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Thr

1 5

<210> 161

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 161

Ser Gln Ser Thr His Val Ser Pro Thr

1 5

<210> 162

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 162

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Arg

1 5

<210> 163

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 163

Ser Gln Ser Thr His Gly Pro Pro Thr

1 5

<210> 164

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 164

Ser Pro Ser Thr His Val Pro Pro Thr

1 5

<210> 165

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 165

Ser Gln Ser Thr His Val Ser Pro Thr
1 5

<210> 166

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 166

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

<210> 167

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 167

Pro Asp Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Trp Asn
1 5 10

<210> 168

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 168

Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Trp Arg
1 5 10

<210> 169

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 169

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

<210> 170

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 170

Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Trp Lys
1 5 10

<210> 171

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 171

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

<210> 172

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 172

Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 173

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 173

Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr
1 5

<210> 174

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 174

Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr
1 5

<210> 175

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 175

Tyr Ile Ser Tyr Arg Gly Ser Thr
1 5

<210> 176

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 176

Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Ile
1 5

<210> 177

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 177

Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asp Thr
1 5

<210> 178

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 178

Tyr Ile Ser Tyr Thr Gly Ser Thr
1 5

<210> 179

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 179

Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5

<210> 180

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 180

Tyr Tyr Lys Pro Ser Leu Lys Ser
1 5

<210> 181

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 181

Tyr Tyr Asn Pro Phe Leu Lys Ser
1 5

<210> 182

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 182

Tyr Phe Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5

<210> 183

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 183

Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn
1 5

<210> 184

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 184

Gly Asp Gly Ala Tyr
1 5

<210> 185

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 185

Gly Asp Gly Asp Tyr
1 5

<210> 186

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 186

Gly Asp Thr Ala Tyr
1 5

<210> 187

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 187

Ala Asp Gly Ala Tyr
1 5

<210> 188

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 188

Gly Trp Gly Ala Tyr
1 5

<210> 189

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 189

Glu Asp Gly Ala Tyr
1 5

<210> 190

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 190

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

<210> 191

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 191

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

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

<210> 192

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 192

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

<210> 193

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 193

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Ile Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Pro Ser Gln Asn Val Gly Ser Ala
 20 25 30

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

<210> 194

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 194

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

<210> 195

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 195

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

<210> 196

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 196

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

<210> 197

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 197

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

<210> 198

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 198

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

<210> 199
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 199

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

<210> 200
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 200

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

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 201
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 201

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

<210> 202
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 202

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

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

<210> 203

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 203

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

<210> 204

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 204

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

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

<210> 205

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 205

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

<210> 206

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 206

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

<210> 207

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 207

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

<210> 208
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 208

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

<210> 209
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 209

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

Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Glu Ile Ser Arg Val
 65 70 75 80
 Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val
 85 90 95
 Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 212

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 212

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

<210> 213

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 213

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

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

<210> 214

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 214

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

<210> 215

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 215

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

<210> 216

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 216

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

<210> 217
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 217

```

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

<210> 218
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 218

```

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 219

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 219

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

<210> 220

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 220

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

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Leu Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Glu Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 221
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 221

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

<210> 222
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 222

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

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

<210> 223

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 223

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

<210> 224

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 224

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

<210> 225

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 225

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

<210> 226
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 226

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

<210> 227
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 227

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

Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 50 55 60
 Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu His
 65 70 75 80
 Leu Thr Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
 85 90 95
 Gly Asp Gly Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 230

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 230

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

<210> 231

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 231

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

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

<210> 232

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 232

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

<210> 233

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 233

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

<210> 234

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 234

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

<210> 235
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 235

```

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

<210> 236
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 236

```

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

Leu Thr Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
 85 90 95
 Gly Asp Gly Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 237

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 237

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

<210> 238

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 238

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly
 20 25 30

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

<210> 239

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 239

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

<210> 240

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 240

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

<210> 241

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 241

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

<210> 242

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 242

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

<210> 243

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 243

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

<210> 244
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 244

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly
 20 25 30

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

<210> 245
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 245

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

【發明摘要】

【中文發明名稱】

用於結合紫杉醇之以抗體為主的親和性試劑

【英文發明名稱】

ANTIBODY-BASED AFFINITY REAGENTS FOR BINDING PACLITAXEL

【中文】

本案揭露內容是針對用於結合紫杉醇的最佳化親和性試劑組成物，諸如抗體、抗體片段以及抗體衍生物，以及相關的使用方法。

【英文】

The disclosure is directed to optimized affinity reagent compositions, such as antibodies, antibody fragments, and antibody derivatives, for binding paclitaxel, and related methods of use.

【指定代表圖】 圖7

【代表圖之符號簡單說明】

(無)

【特徵化學式】

(無)

【發明申請專利範圍】

【第 1 項】 一種單株抗體、抗體片段或抗體衍生物，包含有：

一具有如序列辨識編號：1 內所載述之胺基酸序列
KPXQXVXSXVX 的輕鏈互補決定區 CDR1，

其中位在位置 3 處的 X 是 S 或 V，

其中位在位置 5 處的 X 是 N、T、D、M、R 或 K，

其中位在位置 7 處的 X 是 G 或 F，

其中位在位置 9 處的 X 是 A、P 或 R，

其中位在位置 11 處的 X 是 T、N 或 A；

一具有如序列辨識編號：2 內所載述之胺基酸序列
XXXXRYX 的輕鏈互補決定區 CDR2，

其中位在位置 1 處的 X 是 S 或 Y，

其中位在位置 2 處的 X 是 A、H 或 T，

其中位在位置 3 處的 X 是 S 或 T，

其中位在位置 4 處的 X 是 N 或 R，

其中位在位置 7 處的 X 是 T、M 或 R，

一具有如序列辨識編號：3 內所載述之胺基酸序列
QQYXSXPYX 的輕鏈互補決定區 CDR3，

其中位在位置 4 處的 X 是 S 或 P，

其中位在位置 6 處的 X 是 Y、K、R 或 V，

其中位在位置 9 處的 X 是 T 或 R；

一具有如序列辨識編號：4 內所載述之胺基酸序列
GXXFXDXXXX 的重鏈互補決定區 CDR1，

其中位在位置 2 處的 X 是 Y 或 S，

其中位在位置 3 處的 X 是 T 或 R，

其中位在位置 5 處的 X 是 T、S 或 H，

其中位在位置 7 處的 X 是 S 或 Y，

其中位在位置 8 處的 X 是 T 或 R，

其中位在位置 9 處的 X 是 M 或 T，

其中位在位置 10 處的 X 是 N 或 K；

一具有如序列辨識編號：5 內所載述之胺基酸序列
XIXPXXXXXXXXNQXFX 的重鏈互補決定區 CDR2，

其中位在位置 1 處的 X 是 E 或 K，

其中位在位置 3 處的 X 是 D、F、W 或 A，

其中位在位置 5 處的 X 是 N、T、M、S、K、W 或
R，

其中位在位置 6 處的 X 是 N、S、D 或 R，

其中位在位置 7 處的 X 是 G 或 L，

其中位在位置 8 處的 X 是 G、W 或 R，

其中位在位置 9 處的 X 是 T 或 A，

其中位在位置 10 處的 X 是 N、R 或 A，

其中位在位置 11 處的 X 是 Y 或 T，

其中位在位置 14 處的 X 是 K 或 N，

其中位在位置 16 處的 X 是 K 或 S，

其中位在位置 17 處的 X 是 G 或 L；和/或

一具有如序列辨識編號：6 內所載述之胺基酸序列
ARXXWG 的重鏈互補決定區 CDR3，

其中位在位置 3 處的 X 是 G、R 或 P，

其中位在位置 4 處的 X 是 V、P 或 S；

其中該單株抗體、抗體片段或抗體衍生物會結合紫杉醇。

【第 2 項】 如請求項 1 的單株抗體、抗體片段或抗體衍生物，其中該抗體、抗體片段或抗體衍生物係不同於 8A10 抗體。

【第 3 項】 如請求項 2 的單株抗體、抗體片段或抗體衍生物，其中該抗體、抗體片段或抗體衍生物在一 CDR 胺基酸序列內包

含有至少一個胺基酸差異有別於該 8A10 抗體之一如序列辨識編號：11、31、45、58、68 以及 99 內所載述之對應的 CDR 胺基酸序列。

- 【第 4 項】** 如請求項 3 的單株抗體、抗體片段或抗體衍生物，其中該單株抗體、抗體片段或抗體衍生物包含有一或多個下列胺基酸取代：對於序列辨識號：11，N5R、N5K、A9R、T11N 以及 T11A；對於序列辨識號：31，A2T、S3T、N4R 以及 T7R；對於序列辨識號：45，Y6R、Y6K 以及 Y6V；對於序列辨識號：58，T3R、T5H 以及 T8R；對於序列辨識號：68，D3F、D3W、D3A、N6R、G8R 以及 G8W。
- 【第 5 項】** 如請求項 3 的單株抗體、抗體片段或抗體衍生物，其中該輕鏈 CDR1 包含有一胺基酸序列係選自於序列辨識編號：104-110。
- 【第 6 項】** 如請求項 3 的單株抗體、抗體片段或抗體衍生物，其中該輕鏈 CDR2 包含有一胺基酸序列係選自於序列辨識編號：111-117。
- 【第 7 項】** 如請求項 3 的單株抗體、抗體片段或抗體衍生物，其中該重鏈 CDR1 包含有一胺基酸序列係選自於序列辨識編號：118-124。
- 【第 8 項】** 如請求項 3 的單株抗體、抗體片段或抗體衍生物，其中該重鏈 CDR2 包含有一胺基酸序列係選自於序列辨識編號：125-132。
- 【第 9 項】** 如請求項 2 的單株抗體、抗體片段或抗體衍生物，其中該抗體、抗體片段或抗體衍生物在一非-CDR 胺基酸序列內包含有至少一個胺基酸差異有別於該 8A10 抗體之一對應的非-CDR 胺基酸序列。
- 【第 10 項】** 一種單株抗體、抗體片段或抗體衍生物，包含有：

一具有如序列辨識編號：133 內所載述之胺基酸序列
XSXQXLXHXXGNXYXH 的輕鏈互補決定區 CDR1，

其中位在位置 1 處的 X 是 R 或 H，

其中位在位置 3 處的 X 是 R、G 或 N，

其中位在位置 5 處的 X 是 S、M 或 G，

其中位在位置 7 處的 X 是 V 或 L，

其中位在位置 9 處的 X 是 S 或 I，

其中位在位置 10 處的 X 是 N 或 V，

其中位在位置 13 處的 X 是 T 或 S，

其中位在位置 15 處的 X 是 L 或 W；

一具有如序列辨識編號：134 內所載述之胺基酸序列
XVSXXXS 的輕鏈互補決定區 CDR2，

其中位在位置 1 處的 X 是 K 或 N，

其中位在位置 4 處的 X 是 N 或 R，

其中位在位置 5 處的 X 是 R 或 L，

其中位在位置 6 處的 X 是 F 或 R；

一具有如序列辨識編號：135 內所載述之胺基酸序列
SXSTHXXPX 的輕鏈互補決定區 CDR3，

其中位在位置 2 處的 X 是 Q 或 P，

其中位在位置 6 處的 X 是 V 或 G，

其中位在位置 7 處的 X 是 P 或 S，

其中位在位置 9 處的 X 是 T 或 R；

一具有如序列辨識編號：136 內所載述之胺基酸序列
XDSITXGYXX 的重鏈互補決定區 CDR1，

其中位在位置 1 處的 X 是 G 或 P，

其中位在位置 6 處的 X 是 S 或 I，

其中位在位置 9 處的 X 是 W 或 F，

其中位在位置 10 處的 X 是 N、R 或 K；

一具有如序列辨識編號：137 內所載述之胺基酸序列
XISYXGXXYXXPXLKX 的重鏈互補決定區 CDR2，

其中位在位置 1 處的 X 是 Y 或 F，

其中位在位置 5 處的 X 是 S、R 或 T，

其中位在位置 7 處的 X 是 S 或 D，

其中位在位置 8 處的 X 是 T 或 I，

其中位在位置 10 處的 X 是 Y 或 F，

其中位在位置 11 處的 X 是 N 或 K，

其中位在位置 13 處的 X 是 S 或 F，

其中位在位置 16 處的 X 是 S 或 N；和/或

一具有如序列辨識編號：138 內所載述之胺基酸序列
XXXXY 的重鏈互補決定區 CDR3，

其中位在位置 1 處的 X 是 G、A 或 E，

其中位在位置 2 處的 X 是 D 或 W，

其中位在位置 3 處的 X 是 G 或 T，

其中位在位置 4 處的 X 是 A、D、G 或 Q；

其中該單株抗體、抗體片段或抗體衍生物會結合紫杉醇。

【第 11 項】 如請求項 10 的單株抗體、抗體片段或抗體衍生物，其中該抗體、抗體片段或抗體衍生物係不同於 3C6 抗體。

【第 12 項】 如請求項 11 的單株抗體、抗體片段或抗體衍生物，其中該抗體、抗體片段或抗體衍生物在一 CDR 胺基酸序列內包含有至少一個胺基酸差異有別於該 3C6 抗體之一如序列辨識編號：143、155、160、166、172 以及 184 內所載述之對應的 CDR 胺基酸序列。

【第 13 項】 如請求項 12 的單株抗體、抗體片段或抗體衍生物，其中該單株抗體、抗體片段或抗體衍生物包含有一或多個下列胺基酸取代：對於序列辨識號：143 或序列辨識號：

144, S5G; 以及對於序列辨識號: 184, A4Q 和 A4G。

【第 14 項】 如請求項 11 的單株抗體、抗體片段或抗體衍生物，其中該抗體、抗體片段或抗體衍生物在一非-CDR 胺基酸序列內包含有至少一個胺基酸差異有別於該 3C6 抗體之一對應的非-CDR 胺基酸序列。

【第 15 項】 一種用以偵測一樣品中的紫杉醇的方法，包括：

令該樣品在一免疫分析中接觸一如請求項 1-18 之任一項所述的單株抗體、抗體片段或抗體衍生物，

偵測一介於該單株抗體、抗體片段或抗體衍生物與紫杉醇之間的複合物的形成，

其中一複合物的形成是該樣品內存在有紫杉醇的指標。

【第 16 項】 如請求項 10 的方法，其中該免疫分析是一橫向流動格式。

【第 17 項】 如請求項 10 的方法，其中該樣品是一生物樣品。

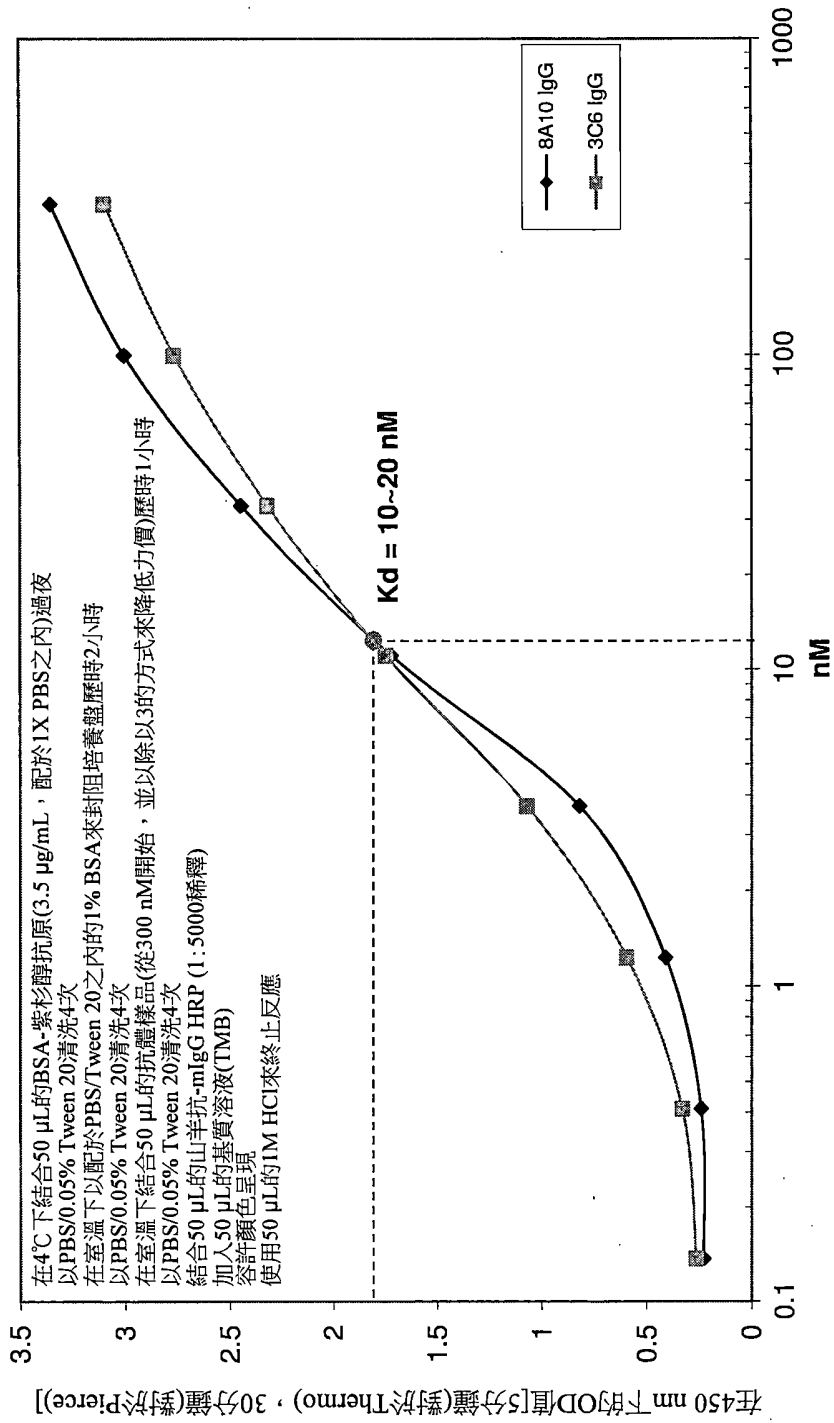
【第 18 項】 如請求項 12 的方法，其中該生物樣品是來自於一先前接受紫杉醇或紫杉醇為主的治療劑之投藥的個體。

【第 19 項】 如請求項 13 的方法，其中該個體是一人類。

【第 20 項】 如請求項 10 的方法，進一步包括定量該樣品中的紫杉醇的數量，其中該定量步驟包括：決定一介於該單株抗體、抗體片段或抗體衍生物與紫杉醇之間的複合物形成之位準，以及比較該位準與得自於一或多個具有已知濃度的紫杉醇之樣品的複合物形成之位準。

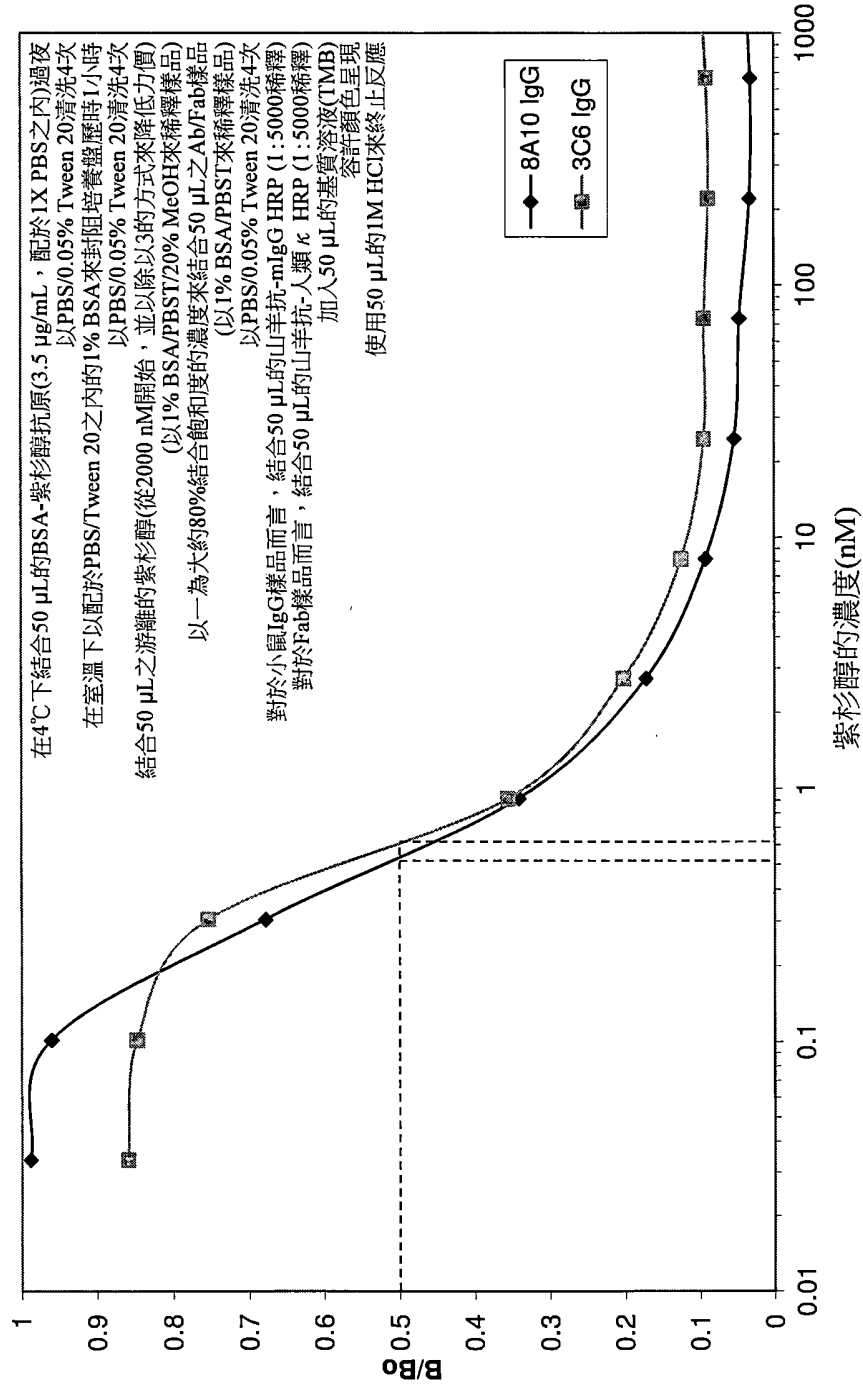
【發明圖式】

抗-紫杉醇單株抗體8A10和3C6對BSA-紫杉醇之直接結合ELISA 8A10/3C6對BSA-紫杉醇之結合



【圖1】

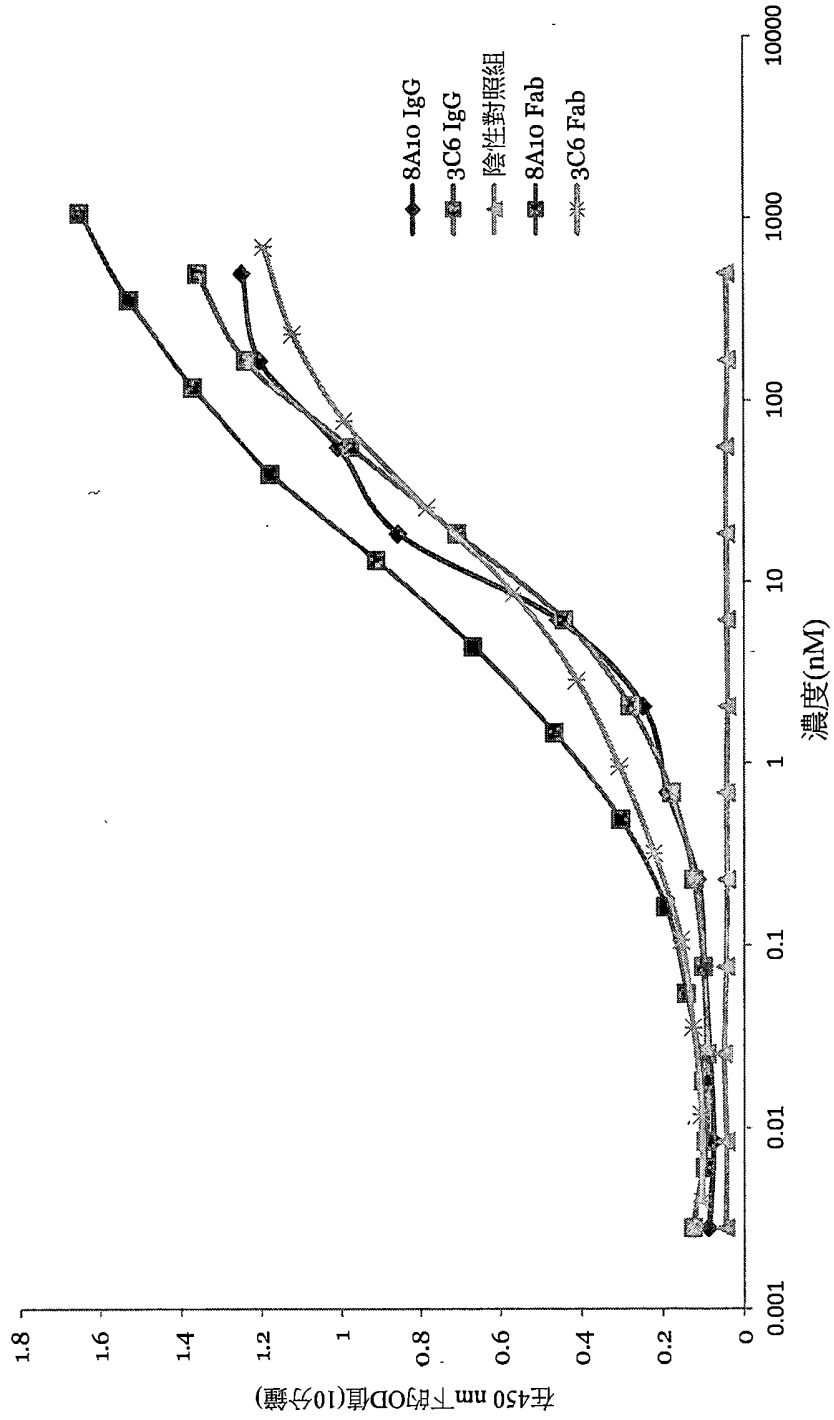
抗-紫杉醇單株抗體8A10和3C6的競爭性抑制ELISA
競爭性抑制ELISA



【圖2】

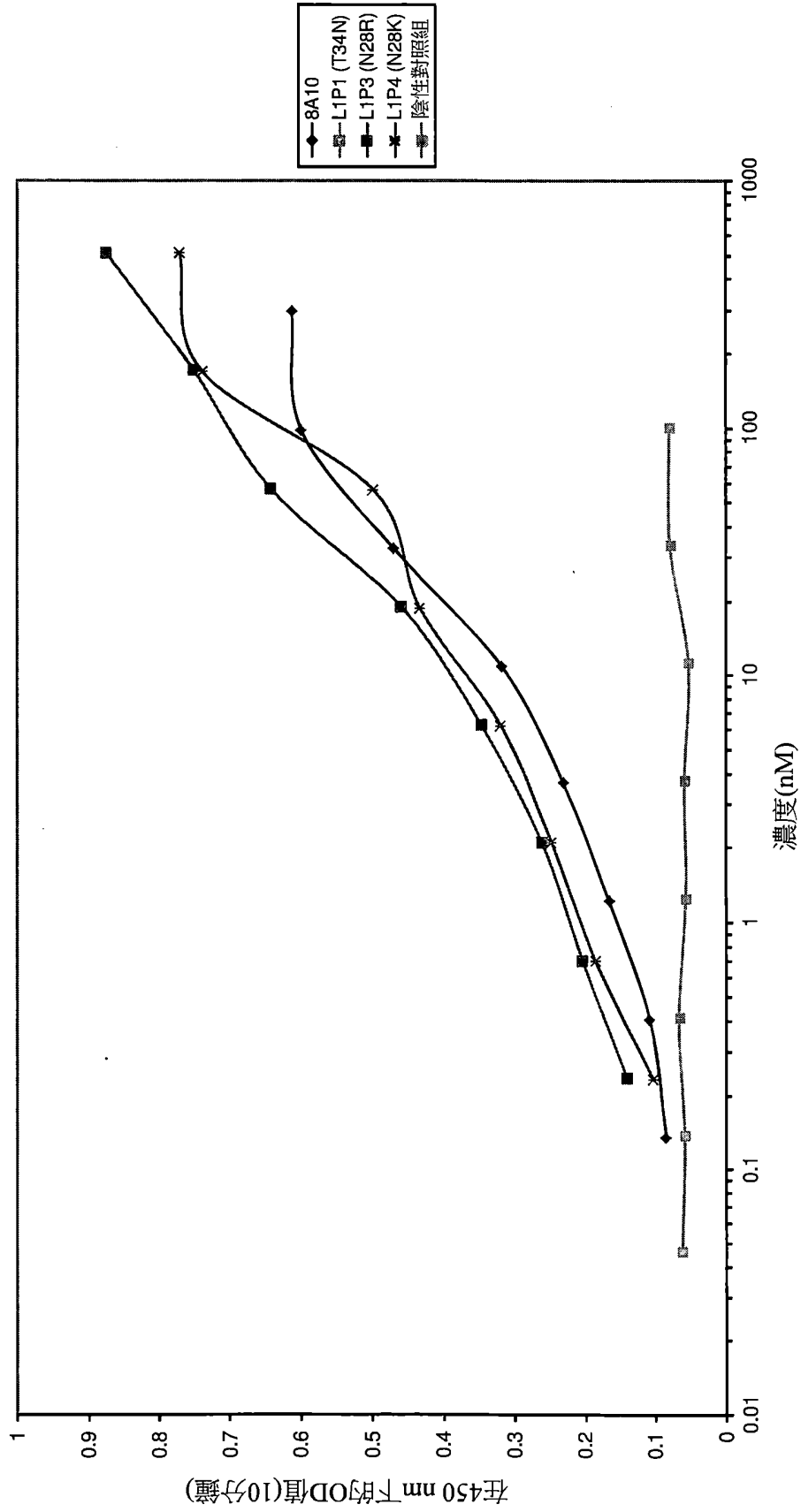
抗-紫杉醇單株抗體8A10和3C6的完整抗體和Fabs之直接結合ELISA

完整抗體/Fabs對BSA-紫杉醇之結合



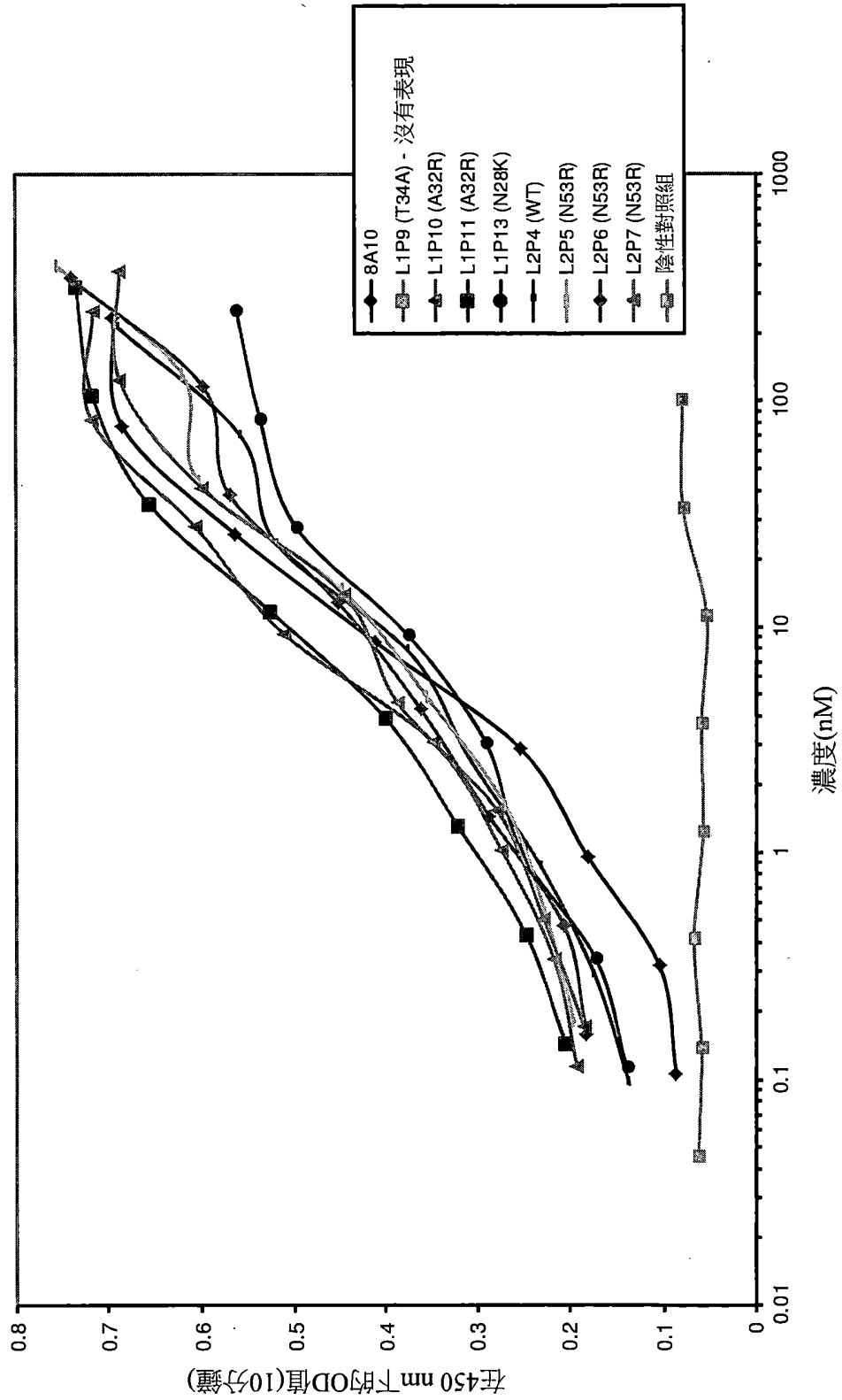
【圖3】

8A10 L1 Fabs對BSA-紫杉醇之結合



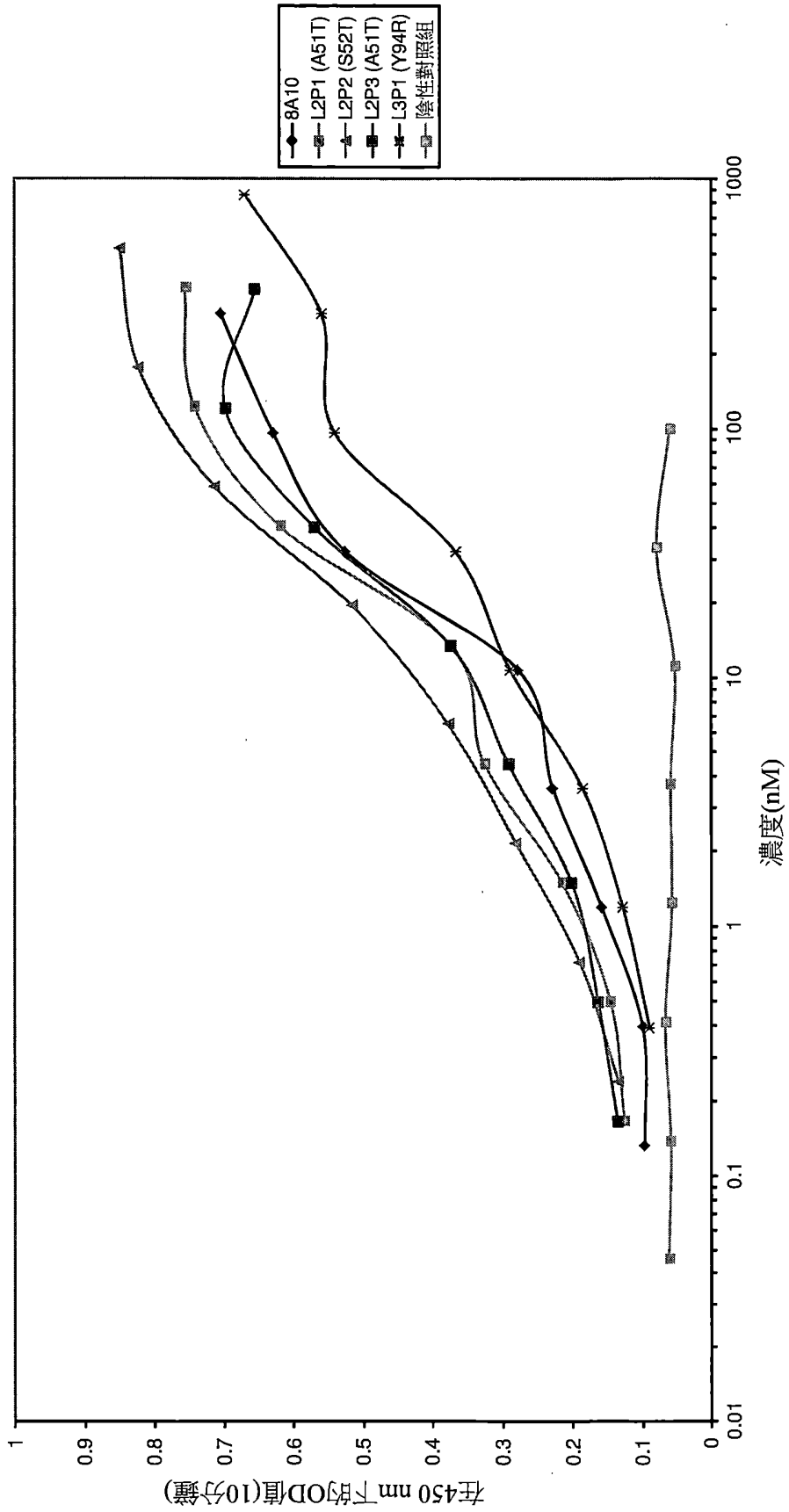
【圖6A】

8A10 Fabs對BSA-紫杉醇之結合



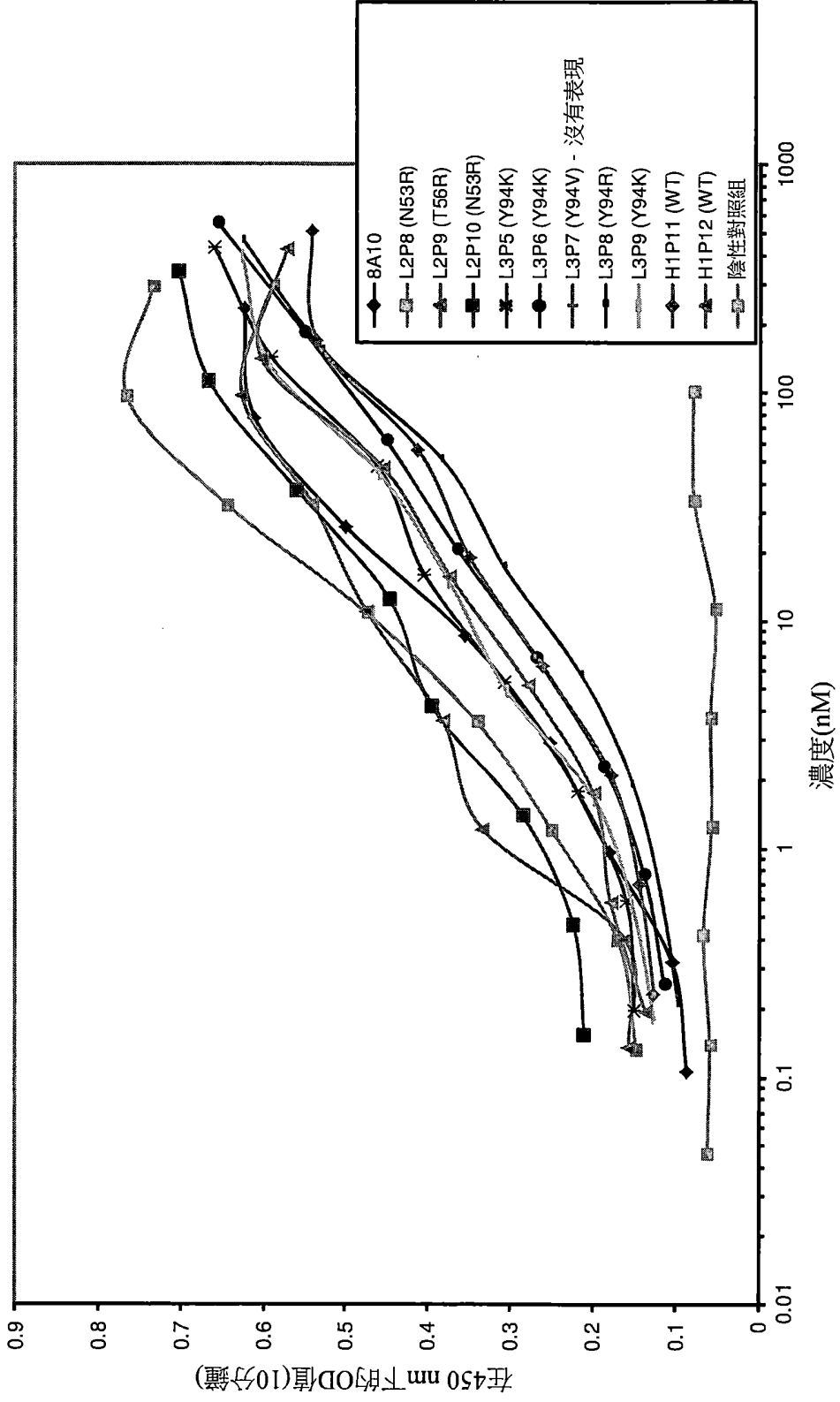
【圖6B】

8A10 L2/L3 Fabs對BSA-紫杉醇之結合



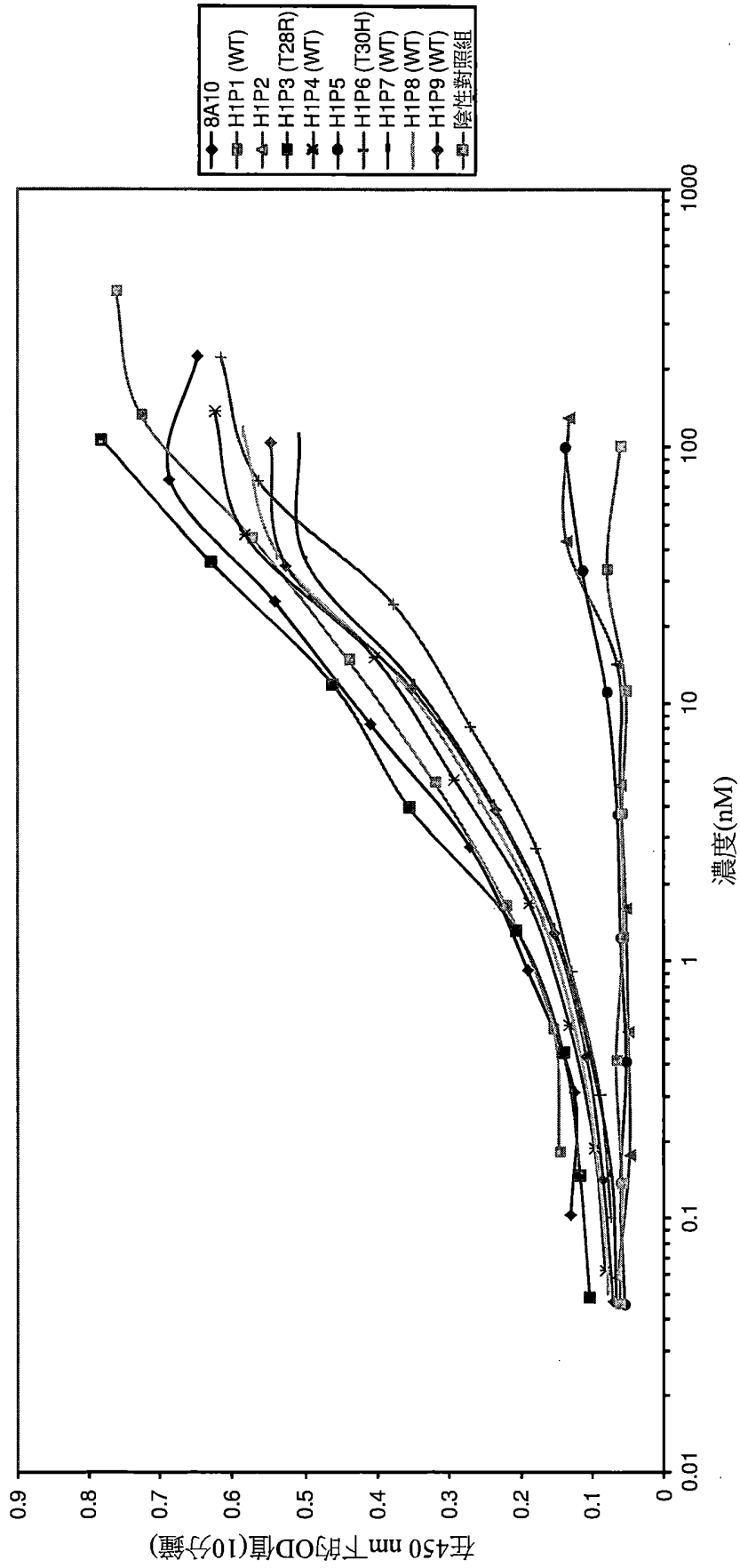
【圖6C】

8A10 Fabs對BSA-紫杉醇之結合



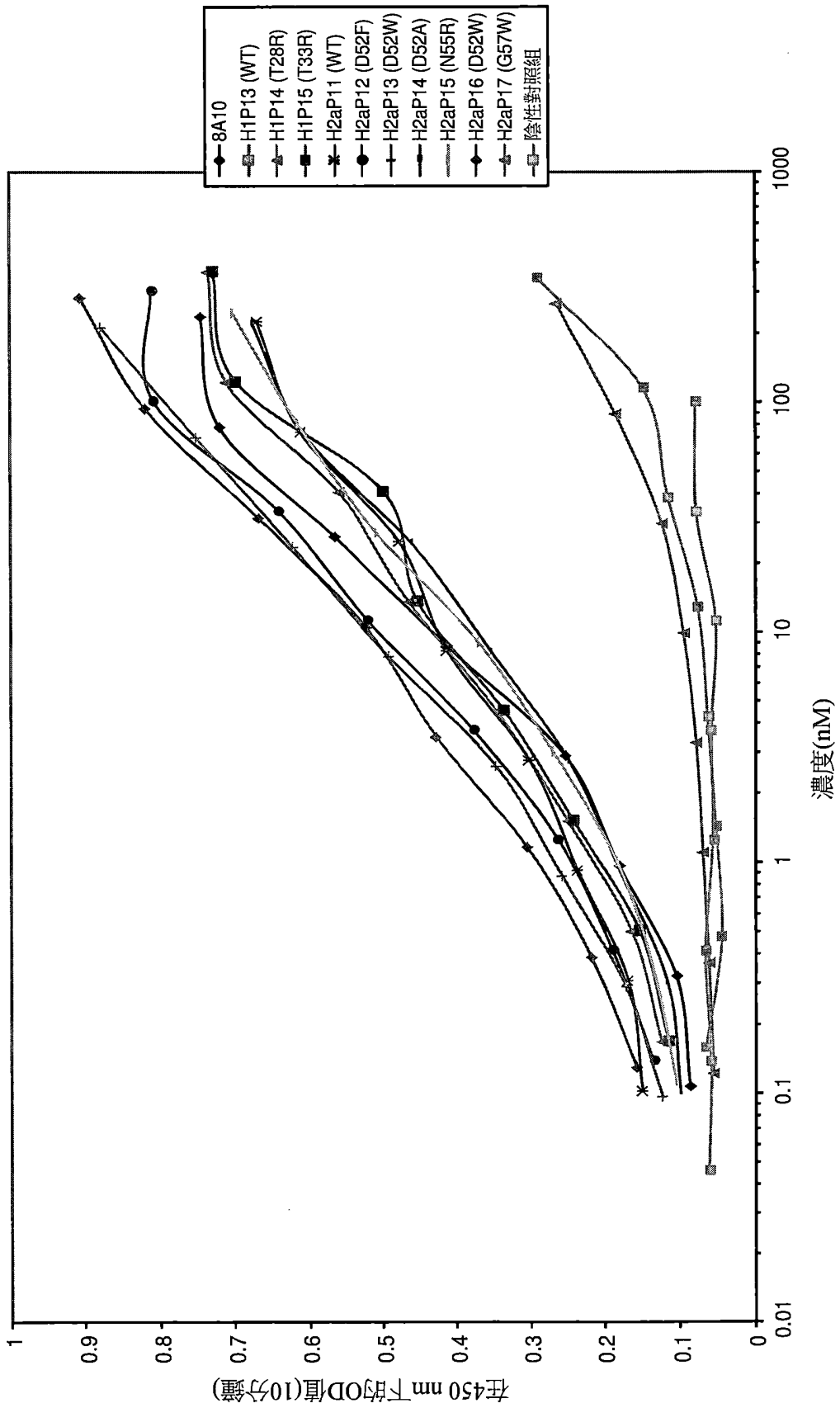
【圖6D】

8A10 HI Fabs對BSA-紫杉醇之結合



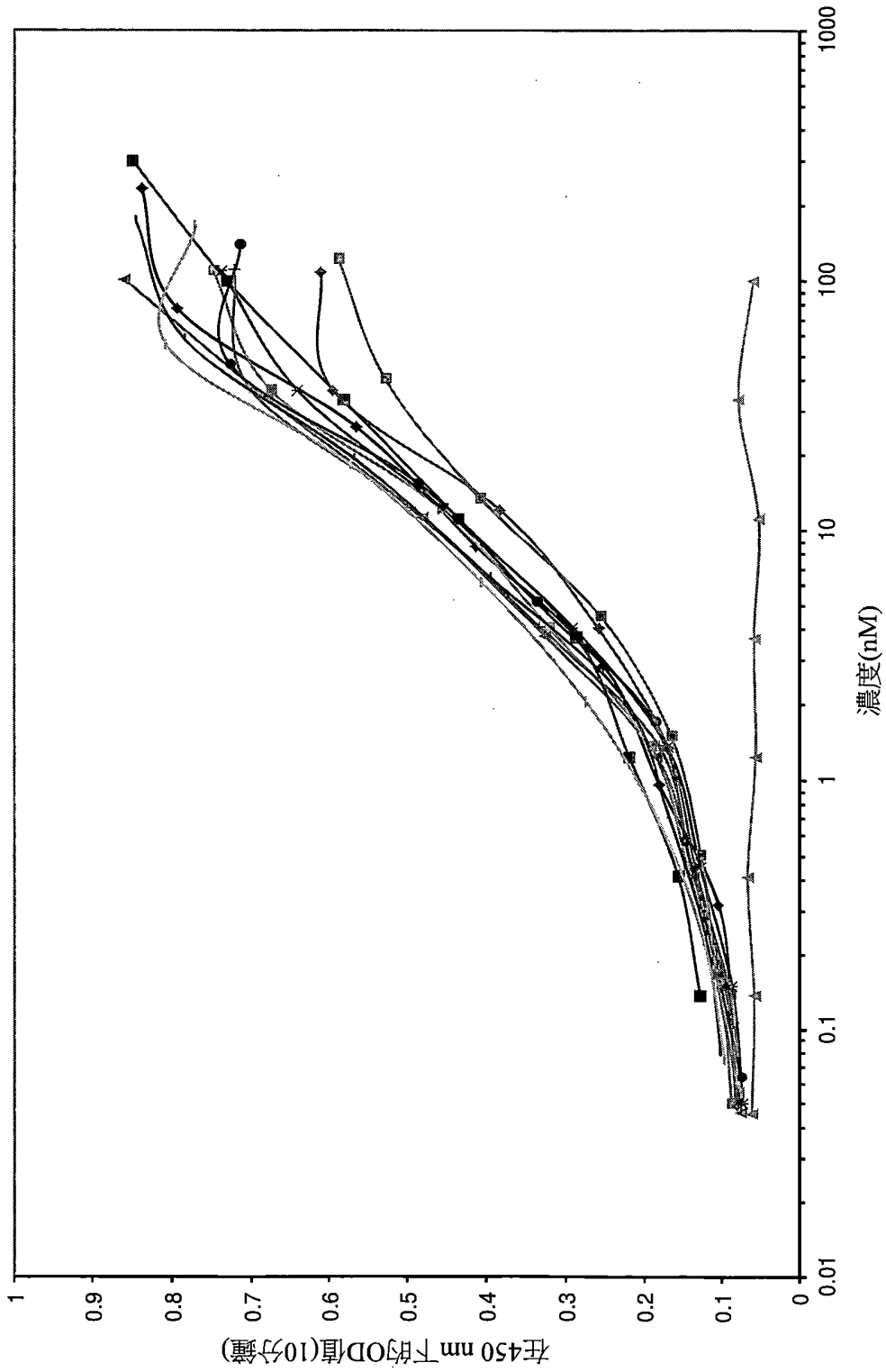
【圖6E】

8A10 Fabs對BSA-紫杉醇之結合



【圖6F】

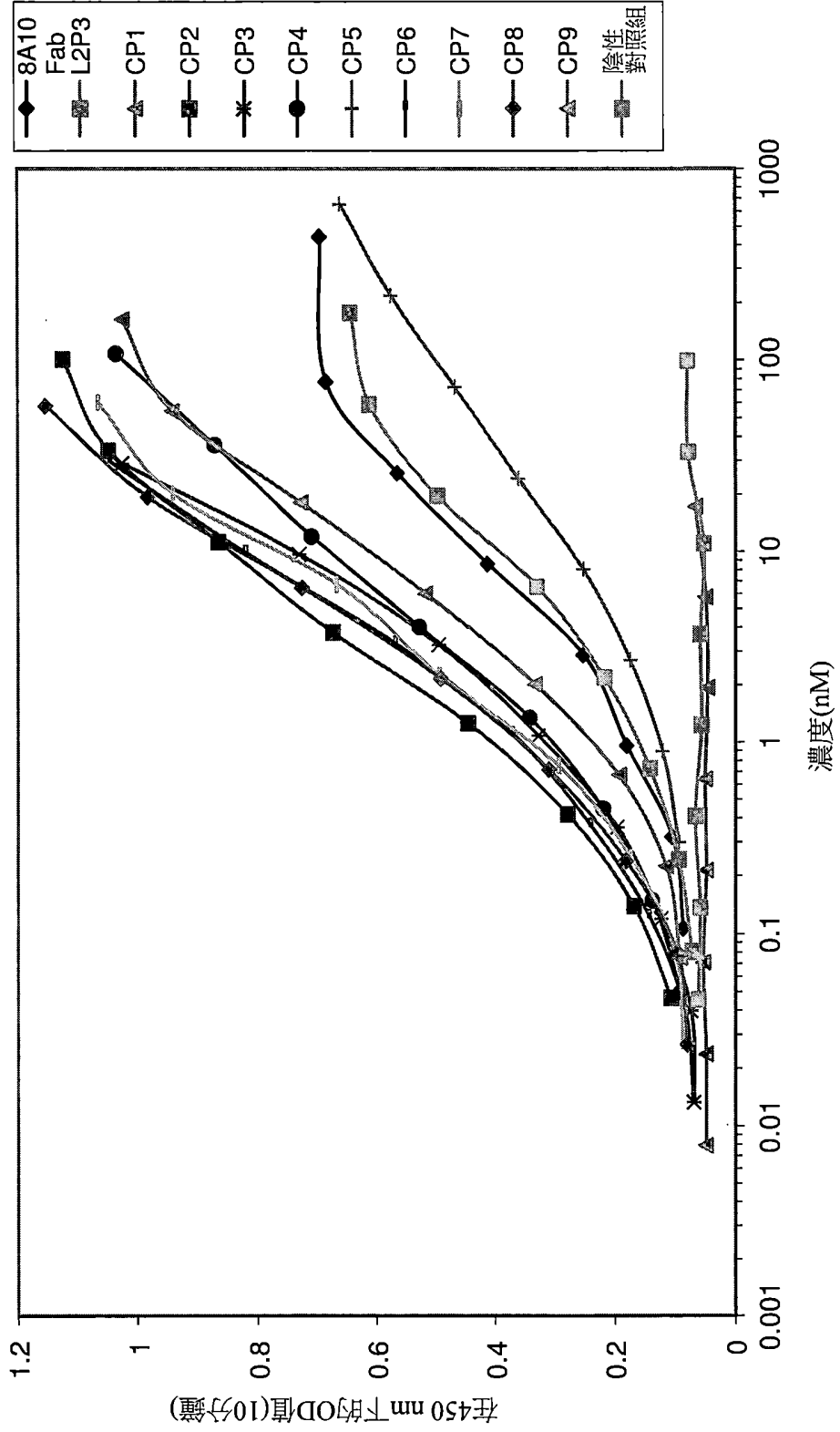
8A10 Fabs對BSA-紫杉醇之結合



【圖6G】

8A10組合資料庫ELISA

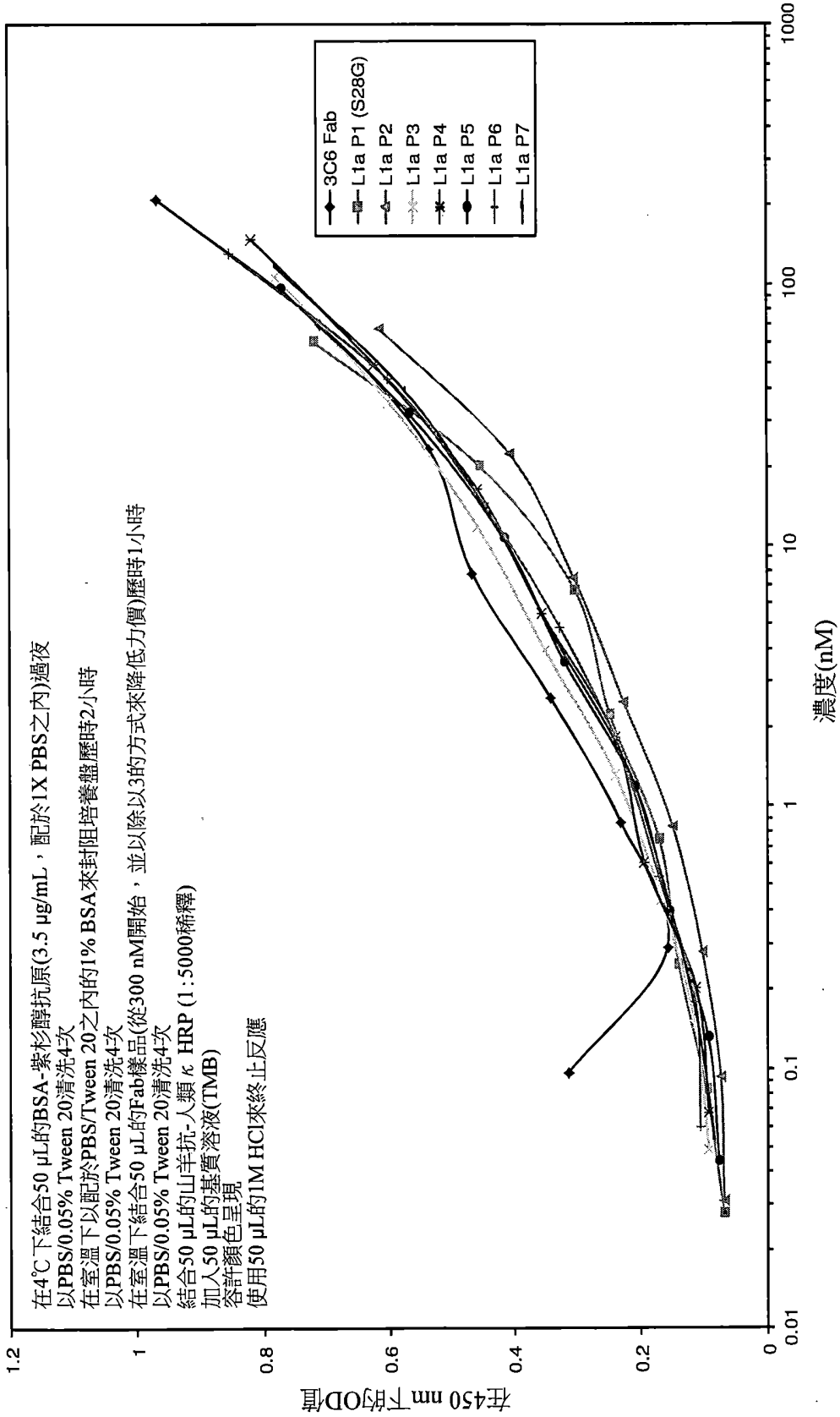
8A10 Fabs對BSA-紫杉醇之結合



【圖7】

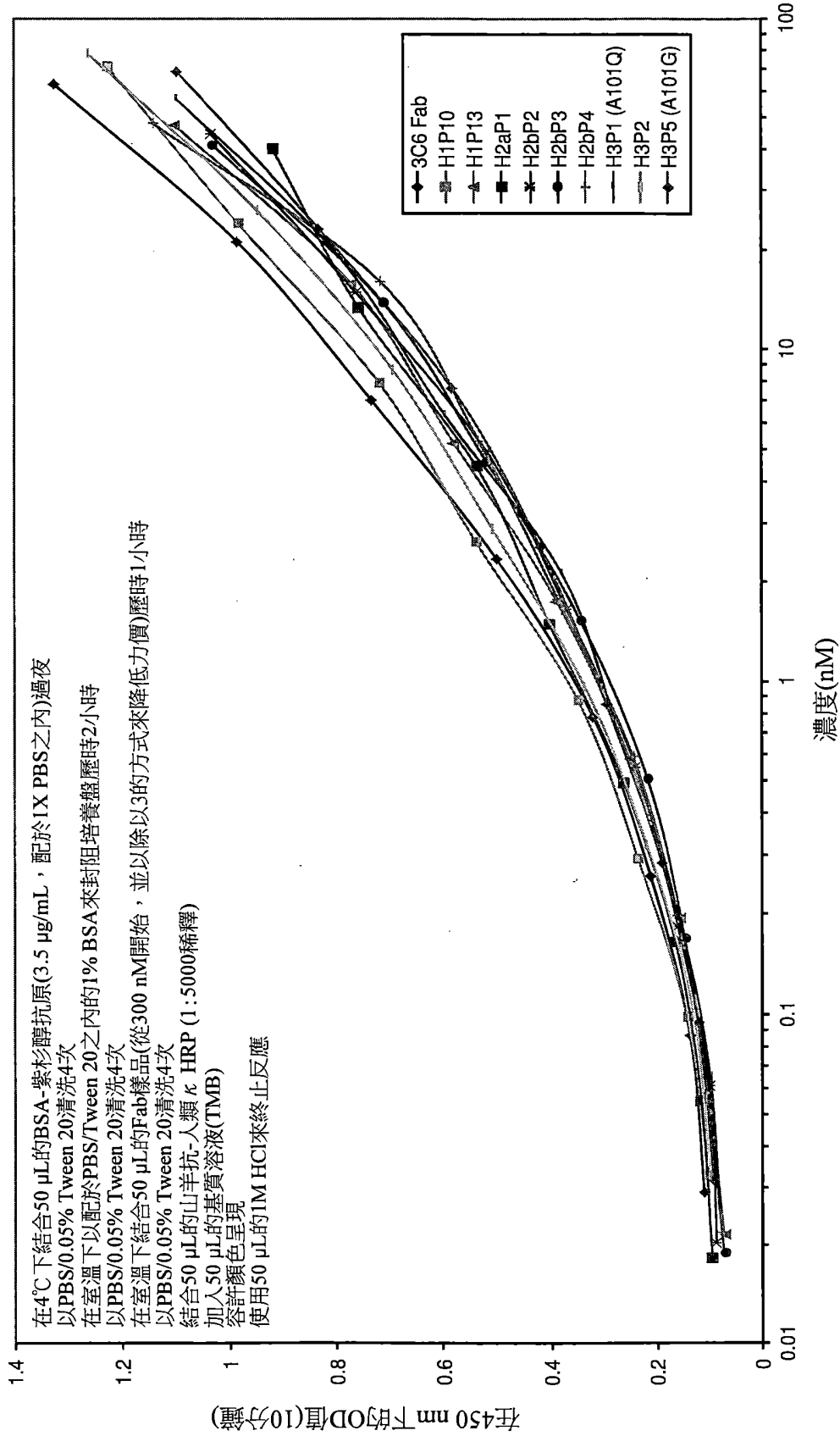
3C6濾紙轉印陽性株對BSA-紫杉醇之直接結合ELISA

3C6 L1a濾紙轉印陽性株對BSA-紫杉醇之結合



【圖11A】

3C6 濾紙轉印陽性株對BSA-紫杉醇之直接結合ELISA 3C6 L1a)濾紙轉印陽性株對BSA-紫杉醇之結合



【圖11B】