



(21)申請案號：106112884

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 11 月 30 日

(51)Int. Cl. : C07K16/44 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

(30)優先權：2010/11/30 日本

2010-266121

2011/09/30 日本

2011-217886

(71)申請人：中外製藥股份有限公司(日本) CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA (JP)
日本(72)發明人：井川智之 IGAWA, TOMOYUKI (JP)；石井慎也 ISHII, SHINYA (JP)；舩木美步
FUNAKI, MIHO (JP)；廣庭奈緒香 HIRONIWA, NAOKA (JP)；前田敦彦 MAEDA,
ATSUHIKO (JP)；根津淳一 NEZU, JUNICHI (JP)；類家慶直 RUIKE, YOSHINAO
(JP)；馬場威 BABA, TAKESHI (JP)；清水駿 SHIMIZU, SHUN (JP)

(74)代理人：洪澄文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：18 項 圖式數：56 共 568 頁

(54)名稱

具有鈣依存性的抗原結合能力之抗體

ANTIBODY HAVING CALCIUM-DEPENDENT ANTIGEN-BINDING ABILITY

(57)摘要

本發明的課題在於提供：促進利用抗原結合分子使抗原攝入細胞內之方法、增加 1 分子的抗原結合分子對於抗原的結合次數之方法、利用抗原結合分子之投予促進血漿中抗原濃度減少之方法、改善抗原結合分子的血漿中滯留性之方法、促進抗原攝入細胞內之抗原結合分子、增加對抗原的結合次數之抗原結合分子、能利用投予而促進血漿中之抗原濃度減少之抗原結合分子、改善血漿中滯留性之抗原結合分子、含有該抗原結合分子之醫藥組成物、及此等之製造方法。

本案發明人等發現藉由使用顯示具鈣依存性之抗原抗體反應的抗原結合分子，能解決上述課題。

An objective of the present invention is to provide methods for promoting antigen uptake into cells by antigen-binding molecules, methods for increasing the number of times of antigen binding by one antigen-binding molecule, methods for promoting reduction of the antigen concentration in plasma by administering antigen-binding molecules, and methods for improving the plasma retention of an antigen-binding molecule, as well as antigen-binding molecules that allow enhanced antigen uptake into cells, antigen-binding molecules having an increased number of times of antigen binding, antigen-binding molecules that can promote reduction of the antigen concentration in plasma when administered, antigen-binding molecules with improved plasma retention, pharmaceutical compositions comprising the above antigen-binding molecules, and methods for producing them. The present inventors revealed that the above objective can be achieved by using antigen-binding molecules that show calcium-dependent antigen-antibody reaction.

指定代表圖：

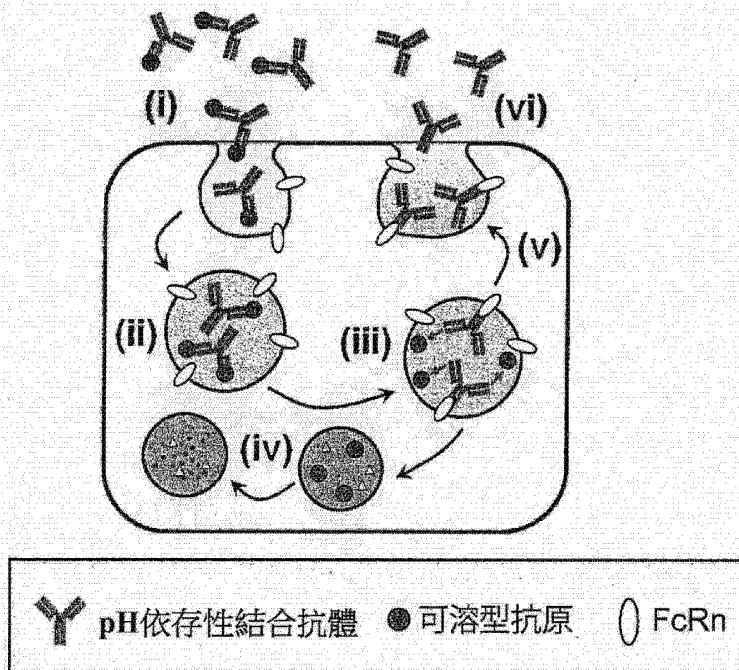


圖1

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

具有鈣依存性的抗原結合能力之抗體/ANTIBODY HAVING
CALCIUM-DEPENDENT ANTIGEN-BINDING ABILITY

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種抗原結合分子及其製造方法與醫藥用途。

【先前技術】

【0002】 抗體在血漿中的安定性高、副作用少，因此當做醫藥品受重視。其中 IgG 型之抗體醫藥已有多數上市，現在也有多數抗體醫藥正在開發中(非專利文獻 1、非專利文獻 2)。另一方面，就適用於第 2 世代之抗體醫藥的技術而言已開發出各種技術，已有使效應子機能、抗原結合能力、藥物動態、安定性提高、或使免疫原性風險減低的技術等報告(非專利文獻 3)。抗體醫藥一般由於投予量非常高，故難製作皮下投予製劑，且製造成本高等據認為係課題。就減低抗體醫藥之投予量的方法而言，有人考慮提高抗體之藥物動態之方法，及提高抗體與抗原之親和性(affinity)之方法。

【0003】 就提高抗體之藥物動態之方法而言，有人報告恆定區的人工胺基酸取代(非專利文獻 4、5)。就增強抗原結合能力、抗原中和能力之技術而言，有人報告親和性成熟技術(非專利文獻 6)，可藉由對於可變區之 CDR 區等導入胺基酸變異而增加對於抗原之結合活性。藉由增加抗原結合能力，可使於

體外(in vitro)之生物活性提高，或減少投予量，而且也可提高於體內(in vivo)之藥效(非專利文獻 7)。

【0004】 另一方面，抗體每 1 分子能中和之抗原量取決於親和性，藉由強化親和性能以少抗體量中和抗原，且可利用各種方法強化抗體之親和性(非專利文獻 6)。再者，若能對於抗原共價鍵結並使親和性為無限大，則能以 1 分子抗體中和 1 分子抗原(2 價時為 2 分子抗原)。但是，至今為止的方法，以 1 分子抗體中和 1 分子抗原(2 價時為 2 分子抗原)之化學理論中和反應為極限，不可能以抗原量以下的抗體量將抗原完全中和。亦即，強化親和性之效果存在極限(非專利文獻 9)。中和抗體時，為了使其中和效果持續固定期間，需要在此期間投予比起活體內所產生之抗原量更多的抗體量，僅是上述抗體之藥物動態提高、或親和性成熟技術，於必要抗體投予量之減少存在極限。是以，為了以抗原量以下的抗體量於目的期間持續抗原之中和效果，必須以 1 個抗體中和多數抗原。

【0005】 就達成此效果的新方法有人最近報告對於抗原為 pH 依存性結合的抗體(專利文獻 1)。對於抗原在血漿中之中性條件下強力結合，且於核內體內之酸性條件下從抗原解離之 pH 依存性抗原結合抗體，可於核內體內從抗原解離。pH 依存性抗原結合抗體，可於將抗原解離後，將抗體利用 FcRn 再度循環於血漿中而再度結合於抗原，故能以 1 個抗體反復結合於多數抗原。

【0006】 又，抗原之血漿中滯留性，比起結合於 FcRn 而再度循環的抗體，非常之短。血漿中滯留性長之抗體若結合於如

此於血漿中滯留性短的抗原，則抗體抗原複合體之血漿中滯留性會與抗體同樣增長。因此，藉由抗原與抗體結合，血漿中滯留性增長，且血漿中抗原濃度升高。於如此的情形，即使提高抗體對於抗原之親和性，也無法促進抗原從血漿中消失。上述 pH 依存性抗原結合抗體比起通常之抗體，當做促進抗原從血漿中消失之方法據報告為有效(專利文獻 1)。

【0007】 如上所述，pH 依存性抗原結合抗體以 1 個抗體結合於多數抗原，且比起通常的抗體能促進抗原從血漿中消失，故具有通常的抗體無法獲得的作用。但是至今為止，為了達成該 pH 依存性抗原結合抗體能反復結合於抗原之效果，及達成促進抗原從血漿中消失之效果，僅知道利用血漿中與核內體內之 pH 的差異而對於抗原抗體反應賦予 pH 依存性之方法。

【0008】 又，本發明之先前技術文獻如下。

【先前技術文獻】

【專利文獻】

【0009】

【專利文獻 1】 WO 2009/125825, ANTIGEN-BINDING MOLECULE CAPABLE OF BINDING TO TWO OR MORE ANTIGEN MOLECULES REPEATEDLY

【非專利文獻】

【0010】

【非專利文獻 1】 Monoclonal antibody successes in the clinic, Janice M Reichert, Clark J Rosensweig, Laura B Faden & Matthew C Dewitz, Nature Biotechnology 23, 1073 - 1078 (2005)

【非專利文獻 2】 Pavlou AK, Belsey MJ., The therapeutic antibodies market to 2008., Eur J Pharm Biopharm. 2005 Apr;59(3):389-96.

【非專利文獻 3】 Kim SJ, Park Y, Hong HJ., Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies., Mol Cells. 2005 Aug 31;20(1):17-29. Review.

【非專利文獻 4】 Hinton PR, Xiong JM, Johlfs MG, Tang MT, Keller S, Tsurushita N., An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life., J Immunol. 2006 Jan 1;176(1):346-56

【非專利文獻 5】 Ghetie V, Popov S, Borvak J, Radu C, Matesoi D, Medesan C, Ober RJ, Ward ES., Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis., Nat Biotechnol. 1997 Jul;15(7):637-40

【非專利文獻 6】 Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jun 14;102(24):8466-71. Epub 2005 Jun 6. A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries. Rajpal A, Beyaz N, Haber L, Cappuccilli G, Yee H, Bhatt RR, Takeuchi T, Lerner RA, Crea R.

【非專利文獻 7】 Wu H, Pfarr DS, Johnson S, Brewah YA, Woods RM, Patel NK, White WI, Young JF, Kiener PA. Development of Motavizumab, an Ultra-potent Antibody for the Prevention of Respiratory Syncytial Virus Infection in the Upper and Lower Respiratory Tract. J Mol Biol. 2007, 368,

652-665

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

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

【發明內容】

【發明欲解決之課題】

【0011】 本發明係有鑑於如此的狀況而產生，其目的在於提供促進利用抗原結合分子使抗原攝入細胞內之方法、增加 1 分子之抗原結合分子對於抗原之結合次數之方法、利用抗原結合分子之投予促進血漿中之抗原濃度減少之方法、改善抗原結合分子之血漿中滯留性之方法、促進抗原攝入細胞內之抗原結合分子、增加對於抗原之結合次數之抗原結合分子、能利用投予而促進血漿中之抗原濃度減少之抗原結合分子、改善血漿中滯留性之抗原結合分子、含有該抗原結合分子之醫藥組成物、及此等之製造方法。

【解決課題之方式】

【0012】 本案發明人等針對促進利用抗原結合分子(具有抗原結合能力之多胜肽等分子)使抗原攝入細胞內之方法、使 1 分子抗原結合分子對於抗原之結合次數增加方法、促進利用抗

原結合分子之投予減少血漿中之抗原濃度之方法、改善抗原結合分子之血漿中滯留性之方法努力研究。其結果，本案發明人等著眼於血漿中與早期核內體內的鈣濃度的差異，藉由使用具有顯示鈣依存性之抗原抗體反應的抗原結合分子，能夠促進利用抗原結合分子使抗原攝入細胞內、藉由抗原結合分子多次結合於抗原使 1 分子抗原結合分子對於抗原的結合次數增加、利用抗原結合分子之投予促進血漿中之抗原濃度減少、及改善抗原結合分子之血漿中滯留性。

【0013】 亦即本發明係關於藉由顯示具鈣依存性之抗原抗體反應之抗原結合分子，促進抗原攝入細胞內之方法、增加 1 分子抗原結合分子對於抗原之結合次數之方法、利用抗原結合分子之投予促進血漿中之抗原濃度減少之方法、改善抗原結合分子之血漿中滯留性之方法、抗原攝入細胞內受促進之抗原結合分子、對於抗原之結合次數經增加之抗原結合分子、能藉由其投予促進血漿中之抗原濃度減少之抗原結合分子、血漿中滯留性經改善之抗原結合分子、含有該抗原結合分子之醫藥組成物、及該等之製造方法等，更具體而言，係關於以下：

[1] 一種抗原結合分子，其包含抗原結合域與人類 FcRn 結合域，在 2 種不同鈣濃度條件下的抗原結合活性不同，抗原結合分子在低鈣濃度條件下的抗原結合活性比起在高鈣濃度條件下的抗原結合活性為低，且於中性 pH 條件下對於人類 FcRn 具結合活性。

[2] 如[1]之抗原結合分子，其中低鈣濃度為離子化鈣濃度 $0.1\mu\text{M}\sim 30\mu\text{M}$ 。

[3]如[1]之抗原結合分子，其中高鈣濃度為離子化鈣濃度 $100\mu\text{M}\sim 10\text{ mM}$ 。

[4]如[1]或[2]之抗原結合分子，其中低鈣濃度為核內體內之離子化鈣濃度。

[5]如[1]或[3]之抗原結合分子，其中高鈣濃度為血漿中之離子化鈣濃度。

[6]如[1]至[5]中任一項之抗原結合分子，其中前述 FcRn 結合域為 Fc 區域。

[7]如[1]至[6]中任一項之抗原結合分子，其中，於酸性 pH 條件下之抗原結合活性比起於中性 pH 條件下之抗原結合活性低。

[8]如[7]之抗原結合分子，其中至少 1 個胺基酸經組胺酸取代，或至少有 1 個組胺酸插入。

[9]如[1]至[8]中任一項之抗原結合分子，其係結合於膜抗原或可溶型抗原。

[10]如[1]至[9]中任一項之抗原結合分子，其中，該抗原係選自於由 IL-6R、IL-6、IgA、人類 Glypican3、及 IgE 構成的群組。

[11]一種抗原結合分子，其包含抗原結合域與人類 FcRn 結合域，於 2 種不同的鈣濃度條件下的抗原結合活性不同，抗原結合分子在低鈣濃度條件下的抗原結合活性比起在高鈣濃度條件下的抗原結合活性為低，且包含於抗原結合域的輕鏈或重鏈含有來自於人類抗體之鈣結合模體(motif)。

[12]如[11]之抗原結合分子，其中鈣結合模體包含於抗原

結合域之輕鏈 CDR1、CDR2 及/或 CDR3。

[13]如[12]之抗原結合分子，其中鈣結合模體包含於輕鏈 CDR1 之以 Kabat 編號法表示之 30 位、31 位及/或 32 位。

[14]如[12]或[13]之抗原結合分子，其中鈣結合模體包含於輕鏈 CDR2 之以 Kabat 編號法表示之 50 位。

[15]如[12]至[14]中任一項之抗原結合分子，其中鈣結合模體包含於輕鏈 CDR3 之以 Kabat 編號法表示之 92 位。

[16]如[12]至[15]中任一項之抗原結合分子，其中抗原結合分子為 IgA、或人類 Glypican3 任一者。

[17]如[11]之抗原結合分子，其中，鈣結合模體包含於抗原結合域之重鏈 CDR1、CDR2 及/或 CDR3。

[18]如[16]之抗原結合分子，其中，鈣結合模體包含於重鏈 CDR3 之以 Kabat 編號法表示之 95 位、96 位、100a 位、及/或 101 位。

[19]如[17]或[18]之抗原結合分子，其中抗原結合分子為 IL-6R、或 IL-6 任一者。

[20]如[11]至[19]中任一項之抗原結合分子，其包含於 pH 中性域之條件下對於 FcRn 具結合活性之 FcRn 結合域。

[21]如[20]之抗原結合分子，其中前述 FcRn 結合域為 Fc 區域。

[22]如[1]至[10]、[20]或[21]中任一項之抗原結合分子，其中，前述 Fc 區域之胺基酸序列當中，以 EU 編號法表示之 248、250、252、254、255、256、257、258、265、286、289、297、303、305、307、308、309、311、312、314、315、317、332、

334、360、376、380、382、384、385、386、387、389、424、428、433、434、及 436 中任一者以上之胺基酸為與天然型 Fc 區域之胺基酸不同之 Fc 區域。

[23]如[22]之抗原結合分子，其中，前述 Fc 區域之以 EU 編號法表示之胺基酸為；

237 位之胺基酸為 Met、

248 位之胺基酸為 Ile、

250 位之胺基酸為 Ala、Phe、Ile、Met、Gln、Ser、Val、Trp、或 Tyr、

252 位之胺基酸為 Phe、Trp、或 Tyr、

254 位之胺基酸為 Thr、

255 位之胺基酸為 Glu、

256 位之胺基酸為 Asp、Glu、或 Gln、

257 位之胺基酸為 Ala、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr、或 Val、

258 位之胺基酸為 His、

265 位之胺基酸為 Ala、

286 位之胺基酸為 Ala 或 Glu、

289 位之胺基酸為 His、

297 位之胺基酸為 Ala、

303 位之胺基酸為 Ala、

305 位之胺基酸為 Ala、

307 位之胺基酸為 Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、Trp、或 Tyr、

308 位之胺基酸為 Ala、Phe、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、
或 Thr、

309 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Pro、或 Arg、

311 位之胺基酸為 Ala、His、或 Ile、

312 位之胺基酸為 Ala 或 His、

314 位之胺基酸為 Lys 或 Arg、

315 位之胺基酸為 Ala、Asp 或 His、

317 位之胺基酸為 Ala、

332 位之胺基酸為 Val、

334 位之胺基酸為 Leu、

360 位之胺基酸為 His、

376 位之胺基酸為 Ala、

380 位之胺基酸為 Ala、

382 位之胺基酸為 Ala、

384 位之胺基酸為 Ala、

385 位之胺基酸為 Asp 或 His、

386 位之胺基酸為 Pro、

387 位之胺基酸為 Glu、

389 位之胺基酸為 Ala 或 Ser、

424 位之胺基酸為 Ala、

428 位之胺基酸為 Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、
Leu、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、Trp、或 Tyr、

433 位之胺基酸為 Lys、

434 位之胺基酸為 Ala、Phe、His、Ser、Trp、或 Tyr、或

436 位之胺基酸為 His 、 Ile 、 Leu 、 Val 、
中任一者以上之組合。

[24]如[1]至[23]中任一項之抗原結合分子，其中，該抗原結合分子為抗體。

[25]一種抗原結合分子之製造方法，該抗原結合分子具有選自於以下中至少 1 種機能：(i)促進抗原攝入細胞內之機能、(ii)對於抗原結合 2 次以上之機能、(iii)促進血漿中之抗原濃度減少之機能、及(iv)優異的血漿中滯留性機能，

包含以下步驟(a)~(e)；

(a) 獲得在低鈣濃度條件下之抗原結合分子之抗原結合活性、

(b) 獲得於高鈣濃度條件下之抗原結合分子之抗原結合活性、

(c) 選擇在低鈣濃度條件下之抗原結合活性比起於高鈣濃度條件下之抗原結合活性低的抗原結合分子、

(d) 獲得編碼為前述步驟(c)所選擇之抗原結合分子的基因、

(e) 使用前述步驟(d)獲得之基因製造抗原結合分子。

[26]一種抗原結合分子之製造方法，該抗原結合分子具有選自於以下中至少 1 種機能：(i) 促進抗原攝入細胞內之機能、(ii)對於抗原結合 2 次以上之機能、(iii)促進血漿中之抗原濃度減少之機能、及(iv)優異的血漿中滯留性機能，

包含以下步驟(a)~(e)；

(a) 於高鈣濃度條件下使抗原結合分子或抗原結合分子

庫接觸抗原、

(b) 將前述步驟(a)中結合於抗原之抗原結合分子置在低鈣濃度條件下、

(c) 取得於前述步驟(b)解離之抗原結合分子、

(d) 獲得編碼為前述步驟(c)取得之抗原結合分子的基因、

(e) 使用前述步驟(d)獲得之基因製造抗原結合分子。

[27]一種抗原結合分子之製造方法，該抗原結合分子具有選自於以下中至少 1 種機能：(i) 促進抗原攝入細胞內之機能、(ii)對於抗原結合 2 次以上之機能、(iii)促進血漿中之抗原濃度減少之機能、及(iv)優異的血漿中滯留性機能，

包含以下步驟(a)~(f)；

(a) 在低鈣濃度條件下使抗原結合分子或抗原結合分子庫接觸抗原、

(b) 選擇於前述步驟(a)未結合於抗原之抗原結合分子、

(c) 使前述步驟(b)選擇之抗原結合分子於高鈣濃度條件下接觸抗原、

(d) 取得於前述步驟(c)結合於抗原之抗原結合分子、

(e) 獲得編碼為前述步驟(d)取得之抗原結合分子之基因、

(f) 使用前述步驟(e)獲得之基因產生抗原結合分子。

[28]如[25]至[27]中任一項之抗原結合分子之製造方法，更包含以下步驟：改變抗原結合分子中之胺基酸，賦予或提高於中性 pH 條件下對於人類 FcRn 之結合活性。

[29]如[25]至[27]中任一項之抗原結合分子之製造方法，更包含以下步驟：改變抗原結合分子中之胺基酸，使於酸性 pH 條

件下之抗原結合活性低於中性 pH 條件下之抗原結合活性。

[30]如[25]至[27]中任一項之抗原結合分子之製造方法，其中，低鈣濃度為離子化鈣濃度 $0.1\mu\text{M}\sim 30\mu\text{M}$ 。

[31]如[25]至[27]中任一項之抗原結合分子之製造方法，其中，高鈣濃度為離子化鈣濃度 $100\mu\text{M}\sim 10\text{mM}$ 。

[32]如[25]至[27]中任一項之抗原結合分子之製造方法，其中，低鈣濃度為核內體內之離子化鈣濃度。

[33]如[25]至[27]中任一項之抗原結合分子之製造方法，其中，高鈣濃度為血漿中之離子化鈣濃度。

[34]如[29]之抗原結合分子之製造方法，其中，抗原結合分子中之胺基酸之改變，係將抗原結合分子中至少 1 個以上之胺基酸以組胺酸取代或插入至少 1 個組胺酸之改變。

[35]如[25]至[34]中任一項之抗原結合分子之製造方法，其中，前述抗原結合分子所結合之抗原係選自於由 IL-6R、IL-6、IgA、人類 Glypican3、及 IgE 構成的群組的抗原。

[36]如[25]至[35]中任一項之抗原結合分子之製造方法，其中，前述抗原結合分子為抗體。

[37]一種醫藥組成物，其包含如[1]至[24]中任一項之抗原結合分子或由如[25]至[36]項中任一項之抗原結合分子之製造方法製造之抗原結合分子、及藥學上可容許之載體。

[38] 如[37]之醫藥組成物，其係用於促進抗原攝入細胞內。

[39] 如[37]之醫藥組成物，其係用於促進血漿中之抗原濃度減少。

[40] 一種醫藥組成物，其用於促進抗原攝入細胞內或促進血漿中之抗原濃度減少，包含抗原結合分子，該抗原結合分子含有抗原結合域與人類 FcRn 結合域且於 2 種不同的鈣濃度條件下的抗原結合活性不同，抗原結合分子在低鈣濃度條件下之抗原結合活性比起於高鈣濃度條件下之抗原結合活性為低。

[41] 如[40]之醫藥組成物，其中，低鈣濃度為離子化鈣濃度 $0.1\mu\text{M}\sim 30\mu\text{M}$ 、。

[42] 如[40]之醫藥組成物，其中，高鈣濃度為離子化鈣濃度 $100\mu\text{M}\sim 10\text{ mM}$ 。

[43] 如[40]或[41]之醫藥組成物，其中，低鈣濃度為核內體內之離子化鈣濃度。

[44] 如[40]或[42]之醫藥組成物，其中，高鈣濃度為血漿中之離子化鈣濃度。

[45] 如[40]至[44]中任一項之醫藥組成物，其中，包含於前述抗原結合分子之 FcRn 結合域為 Fc 區域。

[46] 如[40]至[45]中任一項之醫藥組成物，其中，前述抗原結合分子於酸性 pH 條件下之抗原結合活性低於中性 pH 條件下之抗原結合活性。

[47] 如[46]之醫藥組成物，其中，前述抗原結合分子之至少 1 個胺基酸經組胺酸取代、或至少有 1 個組胺酸插入。

[48] 如[40]至[47]中任一項之醫藥組成物，其中，前述抗原結合分子所結合之抗原，係選自於由 IL-6R、IL-6、IgA、人類 Glypican3、及 IgE 構成的群組的抗原。

[49] 一種抗原結合分子之篩選方法，該抗原結合分子具

有選自於以下中至少 1 種機能:(i) 促進抗原攝入細胞內之機能、(ii)對於抗原結合 2 次以上之機能、(iii)促進血漿中之抗原濃度減少之機能、及(iv)優異的血漿中滯留性機能，

包含以下步驟(a)~(c)；

(a) 獲得在低鈣濃度條件下之抗原結合分子之抗原結合活性、

(b) 獲得於高鈣濃度條件下之抗原結合分子之抗原結合活性、

(c) 選擇在低鈣濃度條件下之抗原結合活性比起於高鈣濃度條件下之抗原結合活性低的抗原結合分子。

[50] 一種抗原結合分子之篩選方法，該抗原結合分子具有選自於以下中至少 1 種機能(i) 促進抗原攝入細胞內之機能、(ii)對於抗原結合 2 次以上之機能、(iii)促進血漿中之抗原濃度減少之機能、及(iv)優異的血漿中滯留性機能，

包含以下步驟(a)~(c)；

(a) 於高鈣濃度條件下使抗原結合分子或抗原結合分子庫接觸抗原、

(b) 將前述步驟(a)中結合於抗原之抗原結合分子置在低鈣濃度條件下、

(c) 取得於前述步驟(b)解離之抗原結合分子。

[51] 一種抗原結合分子之篩選方法，該抗原結合分子具有選自於以下中至少 1 種機能:(i) 促進抗原攝入細胞內之機能、(ii)對於抗原結合 2 次以上之機能、(iii)促進血漿中之抗原濃度減少之機能、及(iv)優異的血漿中滯留性機能，

包含以下步驟(a)~(d)：

(a) 在低鈣濃度條件下使抗原結合分子或抗原結合分子庫接觸抗原、

(b) 選擇於前述步驟(a)未結合於抗原之抗原結合分子、

(c) 使前述步驟(b)選擇之抗原結合分子於高鈣濃度條件下結合於抗原、

(d) 取得於前述步驟(c)結合於抗原之抗原結合分子。

[52] 如[49]至[51]項中任一項之抗原結合分子之篩選方法，其中，低鈣濃度為離子化鈣濃度 $0.1\mu\text{M}\sim 30\mu\text{M}$ 。

[53] 如[49]至[51]項中任一項之抗原結合分子之篩選方法，其中，高鈣濃度為離子化鈣濃度 $100\mu\text{M}\sim 10\text{mM}$ 。

[54] 如[49]至[52]項中任一項之抗原結合分子之篩選方法，其中，低鈣濃度為核內體內之離子化鈣濃度。

[55] 如[49]至[51]或[53]項中任一項之抗原結合分子之篩選方法，其中，高鈣濃度為血漿中之離子化鈣濃度。

[56] 如[49]至[55]項中任一項之抗原結合分子之篩選方法，其中，前述抗原結合分子所結合之抗原為選自於由 IL-6R、IL-6、IgA、人類 Glypican3、及 IgE 構成的群組的抗原。

[57] 如[49]至[56]項中任一項之抗原結合分子之篩選方法，其中，抗原結合分子為抗體。

[58] 一種促進利用抗原結合分子使抗原攝入細胞內之方法，其係藉由投予如[1]至[24]項中任一項之抗原結合分子或依照如[25]至[36]中任一項之抗原結合分子之製造方法所製造之抗原結合分子。

[59] 一種促進血漿中之抗原濃度減少之方法，其係藉由投予如[1]至[24]項中任一項之抗原結合分子或依照如[25]至[36]中任一項之抗原結合分子之製造方法所製造之抗原結合分子。

[60] 一種增加 1 分子之抗原結合分子對於抗原之結合次數之方法，其係藉由投予如[1]至[24]項中任一項之抗原結合分子或依照如[25]至[36]中任一項之抗原結合分子之製造方法所製造之抗原結合分子。

[61] 一種改善抗原結合分子之血漿中滯留性之方法，其係藉由投予如[1]至[24]項中任一項之抗原結合分子或依照如[25]至[36]中任一項之抗原結合分子之製造方法所製造之抗原結合分子。

[62] 一種促進利用抗原結合分子使抗原攝入細胞內之方法，其係藉由投予如下的抗原結合分子:包含抗原結合域與人類 FcRn 結合域，且於 2 種不同的鈣濃度條件下的抗原結合活性不同，抗原結合分子之低鈣濃度條件下之抗原結合活性低於高鈣濃度條件下之抗原結合活性。

[63] 一種促進血漿中之抗原濃度減少之方法，其係藉由投予如下的抗原結合分子:包含抗原結合域與人類 FcRn 結合域，且於 2 種不同的鈣濃度條件下的抗原結合活性不同，抗原結合分子之低鈣濃度條件下之抗原結合活性低於高鈣濃度條件下之抗原結合活性。

[64] 一種增加 1 分子之抗原結合分子對於抗原之結合次數之方法，其係藉由使用如下的抗原結合分子:包含抗原結合

域與人類 FcRn 結合域，且於 2 種不同的鈣濃度條件下的抗原結合活性不同，抗原結合分子之低鈣濃度條件下之抗原結合活性低於高鈣濃度條件下之抗原結合活性。

[65] 一種改善抗原結合分子之血漿中滯留性之方法，其係藉由使用如下的抗原結合分子：包含抗原結合域與人類 FcRn 結合域，且於 2 種不同的鈣濃度條件下的抗原結合活性不同，抗原結合分子之低鈣濃度條件下之抗原結合活性低於高鈣濃度條件下之抗原結合活性。

[66] 如[62]至[65]中任一項之方法，其中前述低鈣濃度為離子化鈣濃度 $0.1\mu\text{M}\sim 30\mu\text{M}$ 。

[67] 如[62]至[66]中任一項之方法，其中，高鈣濃度為離子化鈣濃度 $100\mu\text{M}\sim 10\text{ mM}$ 。

[68] 如[62]至[67]中任一項之方法，其中，低鈣濃度為核內體內之離子化鈣濃度。

[69] 如[62]至[68]中任一項之方法，其中，高鈣濃度為血漿中之離子化鈣濃度。

[70] 如[62]至[69]中任一項之方法，其中，包含於前述抗原結合分子之 FcRn 結合域為 Fc 區域。

[71] 如[62]至[69]中任一項之方法，其中，前述抗原結合分子於酸性 pH 條件下之抗原結合活性低於中性 pH 條件下之抗原結合活性。

[72] 如[71]之方法，其中，前述抗原結合分子之至少 1 個胺基酸經組胺酸取代、或至少有 1 個組胺酸插入。

[73] 如[62]至[72]中任一項之方法，其中，前述抗原結合

分子所結合之抗原係選自於由 IL-6R、IL-6、IgA、人類 Glypican3、及 IgE 構成的群組。

[74] 如[62]至[73]中任一項之方法，其中，前述抗原結合分子為抗體。

【0014】 又，本發明係關於本發明之方法使用之套組，其包含本發明之抗原結合分子或依照本發明之製造方法製造之抗原結合分子。又，本發明係關於一種利用抗原結合分子使抗原攝入細胞內之促進劑、血漿中之抗原濃度之減少促進劑、1 分子之抗原結合分子對於抗原之結合次數增加劑、或抗原結合分子之血漿中滯留性改善劑，其包含本發明之抗原結合分子或依照本發明之製造方法製造之抗原結合分子當做有效成分。又，本發明係關於一種本發明之抗原結合分子或依照本發明之製造方法製造之抗原結合分子之用途，係用於製造利用抗原結合分子之抗原攝入細胞內促進劑、血漿中之抗原濃度之減少促進劑、1 分子之抗原結合分子對於抗原之結合次數增加劑、或抗原結合分子之血漿中滯留性改善劑。又，本發明係關於用在本發明之方法之本發明之抗原結合分子或依照本發明之製造方法製造之抗原結合分子。

【發明之效果】

【0015】 依照本發明，可提供促進利用抗原結合分子使抗原攝入細胞內之方法、增加 1 分子之抗原結合分子對於抗原之結合次數之方法、利用抗原結合分子之投予而促進血漿中之抗原濃度之減少之方法、改善抗原結合分子之血漿中滯留性之方法。藉由促進以抗原結合分子使抗原攝入細胞內，能促進利用

抗原結合分子之投予而減少抗原之血漿中之抗原濃度，同時可改善抗原結合分子之血漿中滯留性，可增加 1 分子之抗原結合分子對於抗原之結合次數，能於體內(in vivo)比起通常之抗原結合分子發揮更為優異的效果。

【圖式簡單說明】

【0016】

圖 1 顯示 pH 依存性結合抗體返覆結合於可溶型抗原之圖。(i) 抗體與可溶型抗原結合、(ii) 非專一性地利用胞飲作用攝入細胞內、(iii) 於核內體內抗體與 FcRn 結合，可溶型抗原從抗體解離、(iv) 可溶型抗原移到溶體並被分解、(v) 可溶型抗原解離之抗體，由於 FcRn 再循環於血漿中、(vi) 再循環之抗體可再度與可溶型抗原結合。

圖 2 顯示 pH 依存性結合抗體返覆結合於膜型抗原之圖。(i) 抗體與膜型抗原結合、(ii) 抗體與膜型抗原以複合體之狀態內化到細胞內、(iii) 於核內體內從膜型抗原解離、(iv) 膜型抗原移到溶體並被分解、(v) 從膜型抗原解離之抗體再循環到血漿中、(vi) 再循環之抗體可再度與膜型抗原結合。

圖 3 顯示 pH 依存性結合抗體於血漿中(pH7.4)與核內體內(pH6.0)對抗原之交互作用之模式。

圖 4 顯示鈣依存性結合抗體於血漿中(Ca^{2+} 2 mM)與核內體內(Ca^{2+} 3 μM)對抗原之交互作用之模式。

圖 5 顯示 pH 及鈣依存性結合抗體之血漿中(pH7.4、 Ca^{2+} 2 mM)與核內體內(pH6.0、 Ca^{2+} 3 μM)對抗原之交互作用之模式。

圖 6 顯示使用 Biacore 之抗人類 IL-6 受體抗體於 Ca^{2+} 2 mM

及 Ca^{2+} 3 μM 對於可溶型人類 IL-6 受體之交互作用之傳感圖。

圖 7 顯示 H54/L28-IgG1 於 Ca^{2+} 2 mM 及 Ca^{2+} 3 μM 對於可溶型人類 IL-6 受體之交互作用之 Biacore 傳感圖。

圖 8 顯示 FH4-IgG1 於 Ca^{2+} 2 mM 及 Ca^{2+} 3 μM 對於可溶型人類 IL-6 受體之交互作用之 Biacore 傳感圖。

圖 9 顯示 6RL#9-IgG1 於 Ca^{2+} 2 mM 及 Ca^{2+} 3 μM 對於可溶型人類 IL-6 受體之交互作用之 Biacore 傳感圖。

圖 10 顯示 H54/L28-IgG1、FH4-IgG1、及、6RL#9-IgG1 於正常小鼠之血漿中抗體濃度變化。

圖 11 顯示 H54/L28-IgG1、FH4-IgG1、及、6RL#9-IgG1 於正常小鼠之血漿中可溶型人類 IL-6 受體(hsIL-6R)濃度變化。

圖 12 顯示 H54/L28-N434W、FH4-N434W、及、6RL#9-N434W 於正常小鼠之血漿中抗體濃度變化。

圖 13 顯示 H54/L28-N434W、FH4-N434W、及、6RL#9-N434W 於正常小鼠之血漿中可溶型人類 IL-6 受體(hsIL-6R)濃度變化。

圖 14 顯示以 X 射線結晶結構解析決定之 6RL#9 抗體之 Fab 片段之重鏈 CDR3 之結構。

圖 15 顯示使用 Biacore 之抗人類 IL-6 抗體於 Ca^{2+} 1.2 mM 及 Ca^{2+} 3 μM 對於人類 IL-6 之交互作用之傳感圖。

圖 16 顯示含人類 Vk5-2 序列之抗體、與含人類 Vk5-2 序列中之糖鏈加成序列經改變之 h Vk5-2_L65 序列之抗體之離子交換層析圖。實線代表含人類 Vk5-2 序列之抗體(重鏈：CIM_H、序列編號：48 及輕鏈：hVk5-2、序列編號：41 與序

列編號：28 之融合分子)之層析圖、虛線代表具 hVk5-2_L65 序列之抗體(重鏈：CIM_H(序列編號：48)、輕鏈：hVk5-2_L65(序列編號 47))之層析圖。

圖 17 顯示含 LfVk1_Ca 序列之抗體(重鏈：GC_H、序列編號：102 及輕鏈：LfVk1_Ca、序列編號：61)、與含 LfVk1_Ca 序列中之 Asp(D)殘基改變為 Ala(A)殘基之序列之抗體於 5°C 保存後(實線)或 50°C 保存後(虛線)之離子交換層析圖。各以 5°C 保存後之離子交換層析圖中最高的峰部當做主要峰部，以主要峰部將 y 軸常態化。

圖 18 顯示含 LfVk1_Ca 序列之抗體(重鏈：GC_H、序列編號：102 及輕鏈：LfVk1_Ca、序列編號：61)、與含 LfVk1_Ca 序列中之 30 位(Kabat 編號法)之 Asp(D)殘基改變為 Ser(S)殘基之 LfVk1_Ca6 序列(重鏈：GC_H、序列編號：102 及輕鏈：LfVk1_Ca6、序列編號：75)之抗體於 5°C 保存後(實線)或 50°C 保存後(虛線)之離子交換層析圖。各以 5°C 保存後之離子交換層析圖中最高的峰部當做主要峰部，以主要峰部將 y 軸常態化。

圖 19 顯示使用 Biacore 之抗人類 CD4 抗體於 Ca^{2+} 1.2 mM 及 Ca^{2+} 3 μM 對於可溶型人類 CD4 之交互作用之傳感圖。

圖 20 顯示抗人類 CD4 抗體之正常小鼠血漿中抗體濃度變化。

圖 21 顯示可溶型人類 CD4 單獨投予群、TNX355-IgG1 抗體投予群、Q425 抗體投予群及 Q425L9 抗體投予群於正常小鼠血漿中之可溶型人類 CD4 之濃度變化。

圖 22 顯示使用 Biacore 之抗人類 IgA 抗體於 Ca^{2+} 1.2 mM

及 Ca^{2+} 3 μM 對於人類 IgA 之交互作用之傳感圖。

圖 23 顯示 GA1-IgG1 抗體投予群、GA2-IgG1 抗體投予群、GA3-IgG1 及 GA2-N434W 抗體投予群之正常小鼠血漿中抗體濃度變化。

圖 24 顯示人類 IgA 單獨投予群、GA1-IgG1 抗體投予群、GA2-IgG1 抗體投予群、GA3-IgG1 抗體投予群及 GA2-N434W 抗體投予群於正常小鼠血漿中人類 IgA 之濃度變化。

圖 25 顯示 GA1-IgG1 抗體投予群、GA2-IgG1 抗體投予群、GA3-IgG1 抗體投予群及 GA2-N434W 抗體投予群於正常小鼠血漿中之非結合型人類 IgA 之濃度變化。

圖 26 顯示對於多元體抗原形成大型免疫複合體之通常抗體，抗體每 1 分子使抗原消失之效率之例。

圖 27 顯示包含對於多元體抗原形成大型免疫複合體之天然 IgG1 之恆定區之 pH/Ca 依存性抗體，抗體每 1 分子使抗原消失之效率之例。

圖 28 顯示認識單體抗原存在之 2 個以上之抗原決定基並對於形成大型免疫複合體為適當的多專一性 pH/Ca 依存性抗體，抗體每 1 分子使抗原消失之效率之例。

圖 29 顯示使用 ELISA 法之抗人類 Glypican3 抗體於 Ca^{2+} 1.2 mM 及 Ca^{2+} 3 μM 對於重組人類 Glypican3 之交互作用。

圖 30 顯示使用 ELISA 法之抗人類 IgE 抗體於 Ca^{2+} 2mM 及 Ca^{2+} 3 μM 對於重組人類 IgE 之交互作用。

圖 31 顯示人類 FcRn 基因轉殖小鼠中，抗體之血漿中濃度

變化。

圖 32 顯示人類 FcRn 基因轉殖小鼠中，可溶型人類 IL-6 受體之血漿中濃度變化。

圖 33 顯示正常小鼠中，抗體之血漿中濃度變化。

圖 34 顯示正常小鼠中，可溶型人類 IL-6 受體之血漿中濃度變化。

圖 35 顯示正常小鼠中，非結合型(unbound)可溶型人類 IL-6 受體之血漿中濃度變化。

圖 36 顯示人類 FcRn 基因轉殖小鼠中，血漿中可溶型人類 IL-6 受體濃度變化。

圖 37 顯示以低用量 (0.01 mg/kg) 或 1 mg/kg 投予 Fv4-IgG1-F14 後，血漿中可溶型人類 IL-6 受體濃度變化。

圖 38 顯示以低用量 (0.01 mg/kg) 或 1 mg/kg 投予 Fv4-IgG1-F14 後，血漿中抗體濃度變化。

圖 39 顯示對於血漿中可溶型人類 IL-6 受體濃度維持穩定狀態之正常小鼠，投予抗人類 IL-6 受體抗體後之血漿中可溶型人類 IL-6 受體濃度變化。

圖 40 顯示對於人類 FcRn 基因轉殖小鼠(系統 276)，同時投予 hsIL-6R 及抗人類 IL-6 受體抗體後之血漿中抗體濃度變化。

圖 41 顯示對於人類 FcRn 基因轉殖小鼠(系統 276)，同時投予 hsIL-6R 及抗人類 IL-6 受體抗體後之血漿中可溶型人類 IL-6 受體濃度變化。

圖 42 顯示於 pH7.0 對於人類 FcRn 之 Fc 變異體之結合親

和性、與對於人類 FcRn 基因轉殖小鼠(系統 276)同時投予 hsIL-6R 及抗人類 IL-6 受體抗體 1 日後之血漿中 hsIL-6R 濃度之關係。

圖 43 顯示 pH7.0 對於人類 FcRn 之 Fc 變異體之結合親和性、與對於人類 FcRn 基因轉殖小鼠(系統 276)同時投予 hsIL-6R 及抗人類 IL-6 受體抗體 1 日後之血漿中抗體濃度之關係。

圖 44 顯示對於人類 FcRn 基因轉殖小鼠(系統 276)同時投予 hsIL-6R 及抗人類 IL-6 受體抗體後之抗原/抗體莫耳比(C 值)之變化。

圖 45 顯示 pH7.0 對於人類 FcRn 之 Fc 變異體之結合親和性、與對於人類 FcRn 基因轉殖小鼠(系統 276)同時投予 hsIL-6R 及抗人類 IL-6 受體抗體 1 日後之抗原/抗體莫耳比(C 值)之間的關係。

圖 46 顯示對於血漿中 hsIL-6R 濃度維持穩定狀態之人類 FcRn 基因轉殖小鼠(系統 276)(穩定狀態注入模型)以低用量(0.01 或 0.2 mg/kg)或 1 mg/kg 投予 Fv4-IgG1-F14 後，血漿中 hsIL-6R 濃度變化。

圖 47 顯示對於人類 FcRn 基因轉殖小鼠(系統 276 及 32)，同時投予 hsIL-6R 及抗人類 IL-6 受體抗體後，於人類 FcRn 基因轉殖小鼠系統 276 及系統 32 之血漿中 hsIL-6R 濃度變化。

圖 48 顯示對於人類 FcRn 基因轉殖小鼠(系統 276 及系統 32)同時投予 hsIL-6R 及抗人類 IL-6 受體抗體後，於人類 FcRn 基因轉殖小鼠系統 276 及系統 32 之血漿中抗體濃度變化。

圖 49 顯示對於血漿中 hsIL-6R 濃度維持穩定狀態之人類

FcRn 基因轉殖小鼠(系統 32)(穩定狀態注入模型)投予抗人類 IL-6 受體抗體後，血漿中 hsIL-6R 濃度變化。

圖 50 顯示對於血漿中 hsIL-6R 濃度維持穩定狀態之人類 FcRn 基因轉殖小鼠(系統 32)(穩定狀態注入模型)投予抗人類 IL-6 受體抗體後之血漿中抗體濃度變化。

圖 51 顯示對於血漿中 hsIL-6R 濃度維持穩定狀態之人類 FcRn 基因轉殖小鼠(系統 32)(穩定狀態注入模型)投予抗人類 IL-6 受體抗體後，抗原/抗體莫耳比(C 值)之變化。

圖 52 顯示 pH7.0 對於人類 FcRn 之 Fc 變異體之結合親和性、與對於血漿中 hsIL-6R 濃度維持穩定狀態之人類 FcRn 基因轉殖小鼠(系統 32)(穩定狀態注入模型)投予抗人類 IL-6 受體抗體 1 日後之抗原/抗體莫耳比(C 值)之間的關係。

圖 53 顯示對於血漿中 hsIL-6R 濃度維持穩定狀態之人類 FcRn 基因轉殖小鼠(系統 32)(穩定狀態注入模型)，投予具 F11、F39、F48、及 F264 之 Fc 變異體之抗人類 IL-6 受體抗體後，血漿中抗體濃度變化。

圖 54 顯示對於血漿中 hsIL-6R 濃度維持穩定狀態之人類 FcRn 基因轉殖小鼠(系統 32)(穩定狀態注入模型)，投予具 F11、F39、F48、及 F264 之 Fc 變異體之抗人類 IL-6 受體抗體後，血漿中 hsIL-6R 濃度變化。

圖 55 顯示對於血漿中 hsIL-6R 濃度維持穩定狀態之人類 FcRn 基因轉殖小鼠(系統 32)(穩定狀態注入模型)，投予具 F157、F196、及 F262 之 Fc 變異體之抗人類 IL-6 受體抗體後，血漿中抗體濃度變化。

圖 56 顯示對於血漿中 hsIL-6R 濃度維持穩定狀態之人類 FcRn 基因轉殖小鼠(系統 32)(穩定狀態注入模型)，投予具 F157、F196、及 F262 之 Fc 變異體之抗人類 IL-6 受體抗體後，血漿中 hsIL-6R 濃度變化。

【實施方式】

【實施發明之形態】

【0017】 本發明提供促進利用抗原結合分子使抗原攝入細胞內之方法、增加 1 分子之抗原結合分子對於抗原之結合次數之方法、促進利用抗原結合分子之投予而減少血漿中之抗原濃度之方法、及改善抗原結合分子之血漿中滯留性之方法。具體而言，提供藉由使用抗原結合分子之低鈣濃度條件下之抗原結合活性(本發明有時記載為「結合能力」)低於高鈣濃度條件下之抗原結合活性的抗原結合分子，而促進抗原結合分子所為之使抗原攝入細胞內之方法、增加 1 分子之抗原結合分子對於抗原之結合次數之方法、促進抗原結合分子之投予所致血漿中之抗原濃度之減少之方法、及改善抗原結合分子之血漿中滯留性之方法。

【0018】 胺基酸

本說明書中，例如 Ala/A、Leu/L、Arg/R、Lys/K、Asn/N、Met/M、Asp/D、Phe/F、Cys/C、Pro/P、Gln/Q、Ser/S、Glu/E、Thr/T、Gly/G、Trp/W、His/H、Tyr/Y、Ile/I、Val/V 所表示，胺基酸以單字母碼或 3 字母碼或其兩者表示記載。

【0019】 抗原

本說明書中，「抗原」只要含有抗原結合域所結合之抗原

決定基即可，其構造不限於特定構造。就其他含意而言，抗原也可為無機物也可為有機物，對於投予本發明之活體可為外源性或內在性者。依照本發明之方法，藥物動態經改善之抗原結合分子含有的抗原結合域所結合之抗原，較佳為例如：受體蛋白質(膜結合型受體、可溶型受體)或細胞表面標記等膜抗原、細胞激素等可溶型抗原、含有僅存在於外源性生物之抗原決定基的抗原等。抗原例如下列分子；17-IA、4-1 BB、4Dc、6-酮基-PGF1a、8-異-PGF2a、8-側氧基-dG、A1 腺苷受體、A33、ACE、ACE-2、活化素(activin)、活化素 A、活化素 AB、活化素 B、活化素 C、活化素 RIA、活化素 RIA ALK-2、活化素 RIB ALK-4、活化素 RIIA、活化素 RIIB、ADAM、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17/TACE、ADAM8、ADAM9、ADAMTS、ADAMTS4、ADAMTS5、Addressin(Addressins)、Adiponectin、ADP-ribosyl cyclase-1、aFGF、AGE、ALCAM、ALK、ALK-1、ALK-7、Allergen、 α 1-antichymotrypsin、 α 1-antitrypsin、 α -synuclein、 α -V/ β -1 拮抗劑、aminin(aminin)、amylin、類澱粉 β 、類澱粉免疫球蛋白重鏈可變區、類澱粉免疫球蛋白輕鏈可變區、雄激素(androgen)、ANG、血管收縮素原(angiotensinogen)、血管生成素(Angiopoietin)配體-2、抗 Id、antithrombin III、碳疽、APAF-1、APE、APJ、APO A1、APO 血清類澱粉 A、APO-SAA、APP、APRIL、AR、ARC、ART、Artemin(Artemin)、ASPARTIC、心房性鈉利尿因子、心房性鈉利尿胜肽、心房性鈉利尿胜肽 A、心房性鈉利尿胜肽 B、心房性鈉利尿胜肽 C、 α v/ β 3 integrin、Ax1、B7-1、B7-2、B7-H、BACE、

BACE-1、炭疽桿菌(*Bacillus anthracis*)防禦抗原、Bad、BAFF、
 BAFF-R、Bag-1、BAK、Bax、BCA-1、BCAM、Bcl、BCMA、
 BDNF、b-ECGF、 β -2-微球蛋白、 β 內醯胺分解酶、bFGF、BID、
 Bik、BIM、BLC、BL-CAM、BLK、B淋巴球刺激因子(BIyS)、
 BMP、BMP-2 (BMP-2a)、BMP-3 (Osteogenin (Osteogenin))、
 BMP-4 (BMP-2b)、BMP-5、BMP-6 (Vgr-1)、BMP-7 (OP-1)、
 BMP-8 (BMP-8a)、BMPR、BMPR-IA (ALK-3)、BMPR-IB
 (ALK-6)、BMPR-II (BRK-3)、BMP、BOK、Bombesin、骨來源
 神經營養因子(Bone-derived neurotrophic factor)、牛成長荷爾
 蒙、BPDE、BPDE-DNA、BRK-2、BTC、B淋巴球細胞黏著分
 子、C10、C1 抑制因子、C1q、C3、C3a、C4、C5、C5a(補體
 5a)、CA125、CAD-8、Cadherin-3、calcitonin、cAMP、碳酸脫
 水酵素 -IX、癌胎兒抗原(CEA)、癌關連抗原
 (carcinoma-associated antigen)、cardiotrophin-1、CathepsinA、
 CathepsinB、CathepsinC/DPPI、CathepsinD、CathepsinE、
 CathepsinH、CathepsinL、CathepsinO、CathepsinS、CathepsinV、
 CathepsinX/Z/P、CBL、CCI、CCK2、CCL、CCL1/I-309、
 CCL11/eotaxin、CCL12/MCP-5、CCL13/MCP-4、CCL14/HCC-1、
 CCL15/HCC-2、CCL16/HCC-4、CCL17/TARC、CCL18/PARC、
 CCL19/ELC、CCL2/MCP-1、CCL20/MIP-3- α 、CCL21/SLC、
 CCL22/MDC、CCL23/MPIF-1、CCL24/eotaxin-2、
 CCL25/TECK、CCL26/eotaxin-3、CCL27/CTACK、
 CCL28/MEC、CCL3/MIP-1- α 、CCL3L1/LD-78- β 、
 CCL4/MIP-1- β 、CCL5/RANTES、CCL6/C10、CCL7/MCP-3、

CCL8/MCP-2、CCL9/10/MIP-1- γ 、CCR、CCR1、CCR10、CCR2、
 CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CD1、
 CD10、CD105、CD11a、CD11b、CD11c、CD123、CD13、CD137、
 CD138、CD14、CD140a、CD146、CD147、CD148、CD15、CD152、
 CD16、CD164、CD18、CD19、CD2、CD20、CD21、CD22、
 CD23、CD25、CD26、CD27L、CD28、CD29、CD3、CD30、
 CD30L、CD32、CD33 (p67 蛋白質)、CD34、CD37、CD38、
 CD3E、CD4、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD49a、
 CD49b、CD5、CD51、CD52、CD54、CD55、CD56、CD6、CD61、
 CD64、CD66e、CD7、CD70、CD74、CD8、CD80 (B7-1)、CD89、
 CD95、CD105、CD158a、CEA、CEACAM5、CFTR、cGMP、
 CGRP 受體、CINC、CKb8-1、Claudin18、CLC、肉毒桿菌
 (*Clostridium botulinum*) 毒素、*Clostridium difficile*
 (*Clostridium difficile*) 毒素、*Clostridium perfringens*
 (*Clostridium perfringens*) 毒素、c-Met、CMV、CMV UL、CNTF、
 CNTN-1、補體因子 3 (C3)、補體因子 D、皮質類固醇結合球
 蛋白、群落刺激因子-1 受體、COX、C-Ret、CRG-2、CRTH2、
 CT-1、CTACK、CTGF、CTLA-4、CX3CL1/fractalkine、CX3CR1、
 CXCL、CXCL1/Gro- α 、CXCL10、CXCL11/I-TAC、
 CXCL12/SDF-1- α/β 、CXCL13/BCA-1、CXCL14/BRAK、CXCL15/
 Lungkine (Lungkine)、CXCL16、CXCL16、CXCL2/Gro- β
 CXCL3/Gro- γ 、CXCL3、CXCL4/PF4、CXCL5/ENA-78、
 CXCL6/GCP-2、CXCL7/NAP-2、CXCL8/IL-8、CXCL9/Mig、
 CXCL10/IP-10、CXCR、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、

CXCR5、CXCR6、cystatinC、cytokeratin 腫瘤關連抗原、DAN、DCC、DcR3、DC-SIGN、崩壞促進因子、Delta 狀蛋白質 (Delta-like protein)配體 4、des(1-3)-IGF-1 (腦 IGF-1)、Dhh、DHICA 氧化酶、Dickkopf-1、Digoxin、二肽基肽解酶 IV、DK1、DNAM-1、Dnase、Dpp、DPPIV/CD26、Dtk、ECAD、EDA、EDA-A1、EDA-A2、EDAR、EGF、EGFR (ErbB-1)、含有 EGF 狀域之蛋白質 7(EGF like domain containing protein 7)、elastase、elastin、EMA、EMMPRIN、ENA、ENA-78、Endosialin (Endosialin)、endothelin 受體、內毒素、enkephalinase、eNOS、Eot、eotaxin、eotaxin-2、eotaxini (eotaxini)、EpCAM、Ephrin B2/EphB4、Epha2 酪胺酸激酶受體、上皮增殖因子受體 (EGFR)、ErbB2 受體、ErbB3 酪胺酸激酶受體、ERCC、erythropoietin (EPO)、erythropoietin 受體、E-selectin、ET-1、Exodus (Exodus)-2、RSV 之 F 蛋白質、F10、F11、F12、F13、F5、F9、第 Ia 因子、第 IX 因子、第 Xa 因子、第 VII 因子、第 VIII 因子、第 VIIIc 因子、Fas、Fc α R、Fc epsilon RI、Fc γ IIb、Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIIa、Fc γ RIIIb、FcRn、FEN-1、ferritin、FGF、FGF-19、FGF-2、FGF-2 受體、FGF-3、FGF-8、酸性 FGF(FGF-acidic)、鹼性 FGF(FGF-basic)、FGFR、FGFR-3、fibrin、纖維母細胞活化蛋白質(FAP)、纖維母細胞增殖因子、纖維母細胞增殖因子-10、fibronectin、FL、FLIP、Flt-3、FLT3 配體、葉酸受體、卵泡刺激荷爾蒙(FSH)、fractalkine(CX3C)、游離型重鏈、游離型輕鏈、FZD1、FZD10、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、G250、Gas 6、GCP-2、

GCSF、G-CSF、G-CSF 受體、GD2、GD3、GDF、GDF-1、GDF-15 (MIC-1)、GDF-3 (Vgr-2)、GDF-5 (BMP-14/CDMP-1)、GDF-6 (BMP-13/CDMP-2)、GDF-7 (BMP-12/CDMP-3)、GDF-8 (myostatin)、GDF-9、GDNF、gelsolin、GFAP、GF-CSF、GFR- α 1、GFR- α 2、GFR- α 3、GF- β 1、gH 外被糖蛋白質、GITR、升糖素、升糖素受體、升糖素狀胜肽 1 受體、Glut 4、谷胺酸羧基肽解酶 II、糖蛋白質荷爾蒙受體、糖蛋白質 11b/111a (GP 11b/111a)、Glypican-3、GM-CSF、GM-CSF 受體、gp130、gp140、gp72、顆粒球-CSF (G-CSF)、GRO/MGSA、成長荷爾蒙釋放 γ 因子、GRO- β 、GRO- γ 、pylori 菌 (*H. pylori*)、半抗原 (NP-cap 或 NIP-cap)、HB-EGF、HCC、HCC 1、HCMV gB 外被糖蛋白質、HCMV UL、造血增殖因子 (Hemopoietic growth factor) (HGF)、Hep B gp120、heparanase、肝素輔因子 II、肝細胞增殖因子 (hepatic growth factor)、*Bacillus anthracis* 防禦抗原、C 型肝炎病毒 E2 糖蛋白質、E 型肝炎、*hepcidin*、Her1、Her2/neu (ErbB-2)、Her3 (ErbB-3)、Her4 (ErbB-4)、單純皰疹病毒 (HSV) gB 糖蛋白質、HGF、HGFA、高分子量黑色素瘤關連抗原 (High molecular weight melanoma-associated antigen) (HMW-MAA)、GP120 等 HIV 外被蛋白質、HIV MIB gp 120 V3 環圈、HLA、HLA-DR、HM1.24、HMFG PEM、HMGB-1、HRG、Hrk、HSP47、Hsp90、HSV gD 糖蛋白質、人類心肌肌凝蛋白、人類細胞巨病毒 (HCMV)、人類成長荷爾蒙 (hGH)、人類血清白蛋白、人類組織型纖維蛋白溶酶原活化因子 (t-PA)、Huntingtin、HVEM、IAP、ICAM、ICAM-1、ICAM-3、ICE、ICOS、IFN- α 、IFN- β 、

IFN- γ 、IgA、IgA 受體、IgE、IGF、IGF 結合蛋白質、IGF-1、IGF-1 R、IGF-2、IGFBP、IGFR、IL、IL-1、IL-10、IL-10 受體、IL-11、IL-11 受體、IL-12、IL-12 受體、IL-13、IL-13 受體、IL-15、IL-15 受體、IL-16、IL-16 受體、IL-17、IL-17 受體、IL-18 (IGIF)、IL-18 受體、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1 受體、IL-2、IL-2 受體、IL-20、IL-20 受體、IL-21、IL-21 受體、IL-23、IL-23 受體、IL-2 受體、IL-3、IL-3 受體、IL-31、IL-31 受體、IL-3 受體、IL-4、IL-4 受體、IL-5、IL-5 受體、IL-6、IL-6 受體、IL-7、IL-7 受體、IL-8、IL-8 受體、IL-9、IL-9 受體、免疫球蛋白免疫複合體、免疫球蛋白、INF- α 、INF- α 受體、INF- β 、INF- β 受體、INF- γ 、INF- γ 受體、I 型 IFN、I 型 IFN 受體、influenza、inhibin、inhibin α 、inhibin β 、iNOS、胰島素、胰島素 A 鏈、胰島素 B 鏈、胰島素狀增殖因子 1、胰島素狀增殖因子 2、胰島素狀增殖因子結合蛋白質、integrin、integrin α 2、integrin α 3、integrin α 4、integrin α 4/ β 1、integrin α -V/ β -3、integrin α -V/ β -6、integrin α 4/ β 7、integrin α 5/ β 1、integrin α 5/ β 3、integrin α 5/ β 6、integrin α - δ (α V)、integrin α - θ 、integrin β 1、integrin β 2、integrin β 3(GPIIb-IIIa)、IP-10、I-TAC、JE、kallikrein、kallikrein11、kallikrein12、kallikrein14、kallikrein15、kallikrein2、kallikrein5、kallikrein6、kallikreinL1、kallikreinL2、kallikreinL3、kallikreinL4、kallistatin、KC、KDR、角質化細胞增殖因子(KGF)、角質化細胞增殖因子-2(KGF-2)、KGF、殺手免疫球蛋白狀受體、kit 配體 (KL)、Kit 酪胺酸激酶、laminin5、LAMP、LAPP (amelin、

胰島類澱粉多胜肽)、LAP (TGF-1)、潛伏期關連胜肽、潛在型 TGF-1、潛在型 TGF-1 bp1、LBP、LDGF、LDL、LDL 受體、LECT2、lefty、leptin、黃體形成荷爾蒙 (leutinizing hormone)(LH)、Lewis-Y 抗原、Lewis-Y 關連抗原、LFA-1、LFA-3、LFA-3 受體、Lfo、LIF、LIGHT、脂蛋白、LIX、LKN、Lptn、L-selectin、LT-a、LT-b、LTB4、LTBP-1、肺界面活性劑、黃體形成荷爾蒙、lymphotactin、lympotoxin β 受體、Lysosphingolipid 脂質受體、Mac-1、巨噬體-CSF (M-CSF)、MAdCAM、MAG、MAP2、MARC、maspin、MCAM、MCK-2、MCP、MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-I (MCAF)、M-CSF、MDC、MDC (67 a.a.)、MDC (69 a.a.)、megsin (megsin)、Mer、MET 酪胺酸激酶受體家族、金屬蛋白酶、膜糖蛋白質 OX2、mesothelin、MGDF 受體、MGMT、MHC (HLA-DR)、微生物蛋白質 (microbial protein)、MIF、MIG、MIP、MIP-1 α 、MIP-1 β 、MIP-3 α 、MIP-3 β 、MIP-4、MK、MMAC1、MMP、MMP-1、MMP-10、MMP-11、MMP-12、MMP-13、MMP-14、MMP-15、MMP-2、MMP-24、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、單核球吸引蛋白質 (monocyte attractant protein)、單核球群落抑制因子 (monocyte colony inhibitory factor)、小鼠促性腺激素關連 (gonadotropin-associated) 胜肽、MPIF、Mpo、MSK、MSP、MUC-16、MUC18、mutin(Mud)、Muller 管抑制因子、Mug、MuSK、髓磷脂關連糖蛋白質、骨髓前驅細胞抑制因子-1 (MPIF-I)、NAIP、Nanobody (Nanobody)、NAP、NAP-2、NCA 90、NCAD、N-Cadherin、NCAM、neprilysin、神經細胞黏著

分子、neroserin (neroserin)、神經成長因子(NGF)、neurotrophin-3、neurotrophin-4、neurotrophin-6、neuropilin1、neurturin、NGF- β 、NGFR、NKG20、N-甲硫胺醯基人類成長荷爾蒙、nNOS、NO、Nogo-A、Nogo 受體、C 型肝炎病毒來源之非構造蛋白質 3 型 (NS3)、NOS、Npn、NRG-3、NT、NT-3、NT-4、NTN、OB、OGG1、oncostatinM、OP-2、OPG、OPN、OSM、OSM 受體、骨誘導因子 (osteoinductive factor)、Osteopontin、OX40L、OX40R、氧化型 LDL、p150、p95、PADPr、副甲狀腺荷爾蒙、PARC、PARP、PBR、PBSF、PCAD、P-Cadherin、PCNA、PCSK9、PDGF、PDGF 受體、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、PDGF-D、PDK-1、PECAM、PEDF、PEM、PF-4、PGE、PGF、PGI2、PGJ2、PIGF、PIN、PLA2、胎盤增殖因子、胎盤鹼性磷解酶(PLAP)、胎盤 lactogen、纖維蛋白溶酶原活化因子抑制因子-1、血小板增殖因子(platelet-growth factor)、plgR、PLP、不同大小的聚甘醇鏈(poly glycol chain)(例如:PEG-20、PEG-30、PEG40)、PP14、prekallikrein、prion 蛋白質、procalcitonin、程式化細胞死蛋白質 1、胰島素前體、prolactin、蛋白質前體轉換酵素 PC9、prorelaxin (prorelaxin)、前列腺專一性膜抗原(PSMA)、proteinA、proteinC、proteinD、proteinS、proteinZ、PS、PSA、PSCA、PsmAr、PTEN、PTHrp、Ptk、PTN、P-selectin 糖蛋白質配體-1、R51、RAGE、RANK、RANKL、RANTES、relaxin、relaxinA 鏈、relaxinB 鏈、腎素(renin)、呼吸器多核體病毒(RSV) F、Ret、reticulon (reticulon)4、風濕因子、RLI P76、RPA2、RPK-1、RSK、RSV

Fgp、S100、RON-8、SCF/KL、SCGF、Sclerostin (Sclerostin)、
 SDF-1、SDF1 α 、SDF1 β 、SERINE (SERINE)、血清類澱粉 P、
 血清白蛋白、sFRP-3、Shh、志賀類毒素 II、SIGIRR、SK-1、
 SLAM、SLPI、SMAC、SMDF、SMOH、SOD、SPARC、神經
 胺醇磷酸受體 1、葡萄球菌之脂胞壁酸(lipoteichoic acid)、
 Stat、STEAP、STEAP-II、幹細胞因子(SCF)、鏈激酶、過氧化
 超氧化物歧化酶、syndecan-1、TACE、TACI、TAG-72 (腫瘤
 關連糖蛋白質-72)、TARC、TB、TCA-3、T 細胞受體 α/β 、TdT、
 TECK、TEM1、TEM5、TEM7、TEM8、Tenascm、TERT、睪
 丸 PLAP 狀鹼性磷解酶、TfR、TGF、TGF- α 、TGF- β 、TGF- β
 泛專一性(TGF- β Pan Specific)、TGF- β RII、TGF- β RIIb、TGF- β
 RIII、TGF- β R1 (ALK-5)、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4、
 TGF- β 5、TGF-I、凝血(thrombin)、血小板生成素
 (Thrombopoietin)(TPO)、胸腺間質性淋巴蛋白質(Thymic
 stromal lymphoprotein)受體、胸腺 Ck-1、甲狀腺刺激荷爾蒙
 (TSH)、甲狀腺素、甲狀腺素結合球蛋白、Tie、TIMP、TIQ、
 組織因子、組織因子蛋白酶抑制因子、組織因子蛋白質、
 TMEFF2、Tmpe、TMPRSS2、TNF 受體 I、TNF 受體 II、TNF- α 、
 TNF- β 、TNF- β 2、TNFc、TNF-RI、TNF-RII、TNFRSF10A (TRAIL
 R1 Apo-2/DR4)、TNFRSF10B (TRAIL R2
 DR5/KILLER/TRICK-2A/TRICK-B)、TNFRSF10C (TRAIL R3
 DcR1/LIT/TRID)、TNFRSF10D (TRAIL R4 DcR2/TRUNDD)、
 TNFRSF11A (RANK ODF R/TRANCE R)、TNFRSF11B (OPG
 OCIF/TR1)、TNFRSF12 (TWEAK R FN14)、TNFRSF12A、

TNFRSF13B (TACI)、TNFRSF13C (BAFF R)、TNFRSF14 (HVEM
 ATAR/HveA/LIGHT R/TR2)、TNFRSF16 (NGFR p75NTR)、
 TNFRSF17 (BCMA)、TNFRSF18 (GITR AITR)、TNFRSF19
 (TROY TAJ/TRADE)、TNFRSF19L (RELT)、TNFRSF1A (TNF R1
 CD120a/p55-60)、TNFRSF1B (TNF RII CD120b/p75-80)、
 TNFRSF21 (DR6)、TNFRSF22 (DcTRAIL R2 TNFRH2)、
 TNFRSF25 (DR3 Apo-3/LARD/TR-3/TRAMP/WSL-1)、
 TNFRSF26 (TNFRH3)、TNFRSF3 (LTbR TNF RIII/TNFC R)、
 TNFRSF4 (OX40 ACT35/TXGP1 R)、TNFRSF5 (CD40 p50)、
 TNFRSF6 (Fas Apo-1/APT1/CD95)、TNFRSF6B (DcR3
 M68/TR6)、TNFRSF7 (CD27)、TNFRSF8 (CD30)、TNFRSF9 (4-1
 BB CD137/ILA)、TNFRST23 (DcTRAIL R1 TNFRH1)、TNFSF10
 (TRAIL Apo-2 配體 /TL2)、TNFSF11 (TRANCE/RANK 配體
 ODF/OPG 配體)、TNFSF12 (TWEAK Apo-3 配體 /DR3 配體)、
 TNFSF13 (APRIL TALL2)、TNFSF13B (BAFF
 BLYS/TALL1/THANK/TNFSF20)、TNFSF14 (LIGHT HVEM 配
 體 /LTg)、TNFSF15 (TL1A/VEGI)、TNFSF18 (GITR 配體 AITR
 配 體 /TL6)、TNFSF1A (TNF-a Conectin
 (Conectin)/DIF/TNFSF2)、TNFSF1B (TNF-b LTa/TNFSF1)、
 TNFSF3 (LTb TNFC/p33)、TNFSF4 (OX40 配體 gp34/TXGP1)、
 TNFSF5 (CD40 配體 CD154/gp39/HIGM1/IMD3/TRAP)、TNFSF6
 (Fas 配體 Apo-1 配體 /APT1 配體)、TNFSF7 (CD27 配體
 CD70)、TNFSF8 (CD30 配體 CD153)、TNFSF9 (4-1 BB 配體
 CD137 配體)、TNF- α 、TNF- β 、TNIL-I、毒性代謝產物(toxic

metabolite)、TP-1、t-PA、Tpo、TRAIL、TRAIL R、TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRANCE、transferrin 受體、TGF- α 及 TGF- β 等轉形增殖因子(TGF)、穿膜型糖蛋白質 NMB、transcyletin、TRF、Trk、TROP-2、凝血細胞(thromboplast)糖蛋白質、TSG、TSLP、腫瘤壞死因子(TNF)、腫瘤關連抗原 CA 125、Lewis Y 關連糖を示す腫瘤關連抗原、TWEAK、TXB2、Ung、uPAR、uPAR-1、尿激酶、VAP-1、血管內皮增殖因子(VEGF)、vaspin (vaspin)、VCAM、VCAM-1、VECAD、VE-Cadherin、VE-Cadherin-2、VEGFR-1 (flt-1)、VEGFR-2、VEGF 受體 (VEGFR)、VEGFR-3 (flt-4)、VEGI、VIM、病毒抗原、維生素 B12 受體、hydronectin 受體、VLA、VLA-1、VLA-4、VNRintegrin、Von Willebrand 因子(vWF)、WIF-1、WNT1、WNT10A、WNT10B、WNT11、WNT16、WNT2、WNT2B/13、WNT3、WNT3A、WNT4、WNT5A、WNT5B、WNT6、WNT7A、WNT7B、WNT8A、WNT8B、WNT9A、WNT9B、XCL1、XCL2/SCM-1- β 、XCL1/lymponectin、XCR1、XEDAR、XIAP、XPD、HMGB1、IgA、A β 、CD81、CD97、CD98、DDR1、DKK1、EREG、Hsp90、IL-17/IL-17R、IL-20/IL-20R、氧化 LDL、PCSK9、prekallikrein、RON、TMEM16F、SOD1、Chromogranin A、Chromogranin B、tau、VAP1、高分子 kininogen、IL-31、IL-31R、Nav1.1、Nav1.2、Nav1.3、Nav1.4、Nav1.5、Nav1.6、Nav1.7、Nav1.8、Nav1.9、EPCR、C1、C1q、C1r、C1s、C2、C2a、C2b、C3、C3a、C3b、C4、C4a、C4b、C5、C5a、C5b、C6、C7、C8、C9、factor B、factor D、factor H、properdin、sclerostin、fibrinogen、fibrin、prothrombin、thrombin、組織因

子, factor V, factor Va, factor VII, factor VIIa, factor VIII, factor VIIIa, factor IX, factor IXa, factor X, factor Xa, factor XI, factor XIa, factor XII, factor XIIa, factor XIII, factor XIIIa, TFPI, antithrombin III, EPCR, thrombomodulin、TAPI, tPA, plasminogen, plasmin, PAI-1, PAI-2、GPC3、Syndecan-1、Syndecan-2、Syndecan-3、Syndecan-4、LPA、S1P 及荷爾蒙及成長因子用之受體當中, 在活體體液中不會留在細胞而以可溶型式存在之分子。

【0020】 意指抗原中存在之抗原決定部位之抗原決定基(epitope), 係本說明書揭示之抗原結合分子中之抗原結合域所結合之抗原上之部位。因此, 例如: 抗原決定基可由其構造定義。又, 該抗原決定基也可由認識該抗原決定基之抗原結合分子中之對於抗原之結合活性定義。抗原為胜肽或多胜肽時, 也可利用構成抗原決定基之胺基酸殘基指定抗原決定基。又, 抗原決定基為糖鏈時, 也可利用特定糖鏈構造來指定抗原決定基。

【0021】 直線狀抗原決定基, 係包含認識胺基酸一次序列的抗原決定基的抗原決定基。直線狀抗原決定基典型在固有序列中至少含有 3 個, 且最普通為至少 5 個, 例如約 8 至約 10 個, 6 至 20 個胺基酸。

【0022】 立體構造抗原決定基, 與直線狀抗原決定基相對照, 係指含有抗原決定基之胺基酸之一次序列並非所認識之抗原決定基之單一規定成分的抗原決定基(例如: 胺基酸之一次序列不一定由規定抗原決定基之抗體所認識之抗原決定基)。立

體構造抗原決定基，可能包含對於直線狀抗原決定基為更多之數之胺基酸。關於立體構造抗原決定基之認識，抗體認識胜肽或蛋白質之三維構造。例如：蛋白質分子折疊形成三維構造時，形成立體構造抗原決定基之某個胺基酸及/或多胜肽主鏈，可以並排，抗體可認識抗原決定基。決定抗原決定基之立體構造之方法，包含例如 X 射線結晶學、二維核磁共振分光學及部位專一性旋轉標誌及電磁場磁性共振分光學，但不限於該等。例如參考：Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology (1996)、第 66 卷、Morris(編)。

【0023】 結合活性

以下例示確認含有對抗 IL-6R 之抗原結合域的待驗抗原結合分子其對於抗原決定基之結合的確認方法，但是確認含有對抗 IL-6R 以外之抗原的抗原結合域之待驗抗原結合分子其對於抗原決定基之結合的確認方法，也可依照下列例示適當實施。

【0024】 例如：含有對抗 IL-6R 之抗原結合域的待驗抗原結合分子會認識 IL-6R 分子中存在之線狀抗原決定基之情事，例如可以如下方式確認。為了上述目的，合成由構成 IL-6R 之細胞外域之胺基酸序列構成的線狀胜肽。該胜肽可化學合成。或，利用 IL-6R 之 cDNA 中之編碼為相當於細胞外域之胺基酸序列之區域，以基因工程方法可獲得。其次，評價由構成細胞外域之胺基酸序列所構成的線狀胜肽與含有對於 IL-6R 之抗原結合域的待驗抗原結合分子間的結合活性。例如，利用以經固定化之線狀胜肽為抗原之 ELISA，可評價該抗原結合分子對於該胜肽之結合活性。或，依據 IL-6R 表現細胞中，該抗原結合

分子之結合時由於線狀胜肽所致抑制的水平，可以明確獲得對於線狀胜肽之結合活性。利用該等試驗，可以明確獲得該抗原結合分子對於線狀胜肽之結合活性。

【0025】 又，含有對抗 IL-6R 之抗原結合域的待驗抗原結合分子會認識立體構造抗原決定基之情事，可由以下方式確認。為了上述目的，製備表現 IL-6R 之細胞。含有對抗 IL-6R 之抗原結合域的待驗抗原結合分子接觸 IL-6R 表現細胞時，會強力結合於該細胞，另一方面，對於固定化有該抗原結合分子之由構成 IL-6R 之細胞外域的胺基酸序列而成的線狀胜肽，實質上不結合時等。在此，實質上不結合，係指對於人類 IL-6R 表現細胞之結合活性之 80%以下、通常 50%以下，較佳為 30%以下，尤佳為 15%以下之結合活性。

【0026】 包含對抗 IL-6R 之抗原結合域之待驗抗原結合分子其對於 IL-6R 表現細胞之結合活性之測定方法，例如：Antibodies A Laboratory Manual 記載之方法(Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) 359-420)。亦即，可利用以 IL-6R 表現細胞為抗原之 ELISA 或 FACS(fluorescence activated cell sorting)之原理評價。

【0027】 ELISA 格式中，包含對抗 IL-6R 之抗原結合域之待驗抗原結合分子其對於 IL-6R 表現細胞之結合活性，可利用比較酵素反應所生成之訊號水平而定量評價。亦即，在固定化有 IL-6R 表現細胞之 ELISA 板添加待驗抗原結合分子，利用認識待驗抗原結合分子之酵素標記檢測結合於抗體細胞之待驗抗原結合分子。或 FACS 中，製作待驗抗原結合分子之稀釋系

列，決定對於 IL-6R 表現細胞之抗體結合力價(titer)，藉此可比較待驗抗原結合分子對於 IL-6R 表現細胞之結合活性。

【0028】 待驗抗原結合分子對於在懸浮於緩衝液等之細胞表面上表現之抗原之結合，可利用流式細胞計數器檢測。流式細胞計數器已知例如如下裝置。

FACSCanto™ II

FACSAria™

FACSArray™

FACSVantage™ SE

FACSCalibur™ (均為 BD Biosciences 公司的商品名)

EPICS ALTRA HyPerSort

Cytomics FC 500

EPICS XL-MCL ADC EPICS XL ADC

Cell Lab Quanta / Cell Lab Quanta SC(均為 Beckman Coulter 公司之商品名)

【0029】 例如:包含對抗 IL-6R 之抗原結合域之待驗抗原結合分子其對於抗原之結合活性之理想測定方法，例如以下方法。首先，以認識與表現 IL-6R 之細胞反應之待驗抗原結合分子的經 FITC 標定的二次抗體染色。將待驗抗原結合分子以適當理想的緩衝液稀釋，可將該抗原結合分子製成所望濃度。例如可使用 10 μ g/ml 至 10 ng/ml 之間的任一濃度。其次，以 FACSCalibur(BD 公司)測定螢光強度及細胞數。抗體對於該細胞之結合量，反映於使用 CELL QUEST Software(BD 公司)解析所得之螢光強度，亦即幾何平均值(幾何平均)。亦即，藉由

獲得該幾何平均之值，可測定待驗抗原結合分子之結合量所代表之待驗抗原結合分子之結合活性。

【0030】 包含對抗 IL-6R 之抗原結合域之待驗抗原結合分子與某抗原結合分子共有抗原決定基之情事，可藉由兩者對於相同抗原決定基之彼此競爭而確認。抗原結合分子間之彼此競爭，可利用交叉阻斷試驗等檢測。例如彼此競爭 ELISA 試驗為較佳的交叉阻斷試驗。

【0031】 具體而言，交叉阻斷試驗中，塗覆在微滴定板之井上的 IL-6R 蛋白質，於候選的彼此競爭抗原結合分子存在下或非存在下，預備溫育後，添加待驗抗原結合分子。井中之 IL-6R 蛋白質所結合之待驗抗原結合分子之量，間接相關於成為彼此競爭之候選的彼此競爭抗原結合分子對於相同抗原決定基之結合之結合能力。亦即，彼此競爭抗原結合分子對於相同抗原決定基之親和性愈大，則對於塗覆有待驗抗原結合分子之 IL-6R 蛋白質之井的結合活性愈低。

【0032】 經由 IL-6R 蛋白質而結合於井之待驗抗原結合分子之量，可藉由預先標記抗原結合分子而輕易測定。例如，經生物素標記之抗原結合分子，可藉由抗生物素蛋白過氧化酶接合體及適當基質測定。利用過氧化酶等酵素標記之交叉阻斷試驗，尤其稱為彼此競爭 ELISA 試驗。抗原結合分子可以用能檢測或測定之其他標記物質予以標記。具體而言，放射標記或螢光標記等為公知。

【0033】 比起於不存在候選之彼此競爭抗原結合分子組合體下實施之對照試驗中獲得之結合活性，彼此競爭抗原結合分

子若能阻斷包含對抗 IL-6R 之抗原結合域之待驗抗原結合分子之結合至少 20%，較佳為至少 20-50%，更佳為至少 50%，則該待驗抗原結合分子係與彼此競爭抗原結合分子實質上結合於相同抗原決定基，或對於相同抗原決定基之結合為彼此競爭之抗原結合分子。

【0034】 包含對抗 IL-6R 之抗原結合域之待驗抗原結合分子所結合之抗原決定基在鑑定構造時，待驗抗原結合分子與對照抗原結合分子共有抗原決定基之情事，可藉由比較兩者之抗原結合分子對於構成該抗原決定基之胜肽導入有胺基酸變異而成之胜肽之結合活性而予以評價。

【0035】 如此測定結合活性之方法，例如可藉由比較前述 ELISA 格式中，待驗抗原結合分子及對照抗原結合分子對於導入有變異的線狀胜肽的結合活性而測定。就 ELISA 以外之方法而言，也可藉由將對於結合於管柱之該變異胜肽的結合活性，以使待驗抗原結合分子與對照抗原結合分子流下該管柱後溶出到溶出液中之抗原結合分子進行定量而測定。使變異胜肽例如與 GST 之融合胜肽吸附於管柱之方法為公知。

【0036】 又，當鑑定的抗原決定基為立體抗原決定基時，待驗抗原結合分子與對照抗原結合分子共有抗原決定基之情事，可藉由以下方法評價。首先，製備表現 IL-6R 之細胞以及表現對於抗原決定基導入有變異之 IL-6R 的細胞。對於該等細胞懸浮於 PBS 等適當緩衝液而成的細胞懸浮液添加待驗 IL-6R 與對照 IL-6R。其次，對於經適當緩衝液洗滌的細胞懸浮液，添加能夠認識待驗 IL-6R 與對照 IL-6R 的經 FITC 標記的抗

體。利用 FACSCalibur(BD 公司)測定標記抗體所染色之細胞之螢光強度及細胞數。將待驗 IL-6R 與對照 IL-6R 之濃度以適當緩衝液適當稀釋以製備為所望濃度後使用。例如可使用 $10\mu\text{g/ml}$ 至 10 ng/ml 之間的任一濃度。標記抗體對於該細胞之結合量，反映於使用 CELL QUEST Software(BD 公司)解析所獲得之螢光強度，亦即幾何平均值。亦即藉由獲得該幾何平均值，可以測定以標記抗體之結合量所代表之待驗 IL-6R 與對照 IL-6R 之結合活性。

【0037】 本方法中，例如「實質上不結合於變異 IL-6R 表現細胞」之情事，可藉由以下方法判斷。首先，將已對於表現變異 IL-6R 之細胞結合之待驗抗原結合分子與對照抗原結合分子以標記抗體染色。接著，檢測細胞之螢光強度。螢光檢測使用 FACSCalibur 當做流式細胞計數儀時，獲得之螢光強度可以使用 CELL QUEST Software 解析。從抗原結合分子存在下及非存在下之幾何平均值，將其比較值(Δ 幾何平均)依下列計算式計算，可以求得抗原結合分子之結合所致之螢光強度之增加比例。

【0038】

Δ 幾何平均值 = 幾何平均值 (抗原結合分子存在下) / 幾何平均值 (抗原結合分子非存在下)

【0039】 將由解析獲得之反映待驗抗原結合分子對於變異 IL-6R 表現細胞之結合量的幾何平均比較值(變異 IL-6R 分子 Δ 幾何平均值)，與反映待驗抗原結合分子對於 IL-6R 表現細胞之結合量的 Δ 幾何平均值比較值進行比較。於該情形，求取對

於變異 IL-6R 表現細胞及 IL-6R 表現細胞之 Δ 幾何平均比較值時使用之待驗抗原結合分子之濃度調整為彼此相同或實質上為相同濃度尤佳。可利用預先確認認識 IL-6R 中之抗原決定基的抗原結合分子當做對照抗原結合分子。

【0040】 待驗抗原結合分子對於變異 IL-6R 表現細胞之 Δ 幾何平均比較值，若比起待驗抗原結合分子對於 IL-6R 表現細胞之 Δ 幾何平均比較值之至少 80%、較佳為 50%、更佳為 30%、尤佳為 15%還小，則判定為「實質上不結合於變異 IL-6R 表現細胞」。求取幾何平均值(Geometric Mean)之計算式，記載於 CELL QUEST Software User's Guide(BD biosciences 公司)。若比較比較值而其實質上可視為相同之程度，則可評價待驗抗原結合分子與對照抗原結合分子之抗原決定基為相同。

【0041】 抗原結合域

本說明書中，「抗原結合域」只要能結合於目的之抗原則可使用任意構造之域。如此的域，例如：抗體之重鏈及輕鏈之可變區、存在於生體內之細胞膜蛋白質 Avimer 所含之約 35 個胺基酸之稱為 A 域之模組 (WO2004/044011、WO2005/040229)、包含於細胞膜表現之糖蛋白質 fibronectin 中之蛋白質所結合之域 10Fn3 域之 Adnectin(WO2002/032925)、以構成由 ProteinA 之 58 個胺基酸構成的 3 個螺旋束(bundle)的 IgG 結合域為支架(scaffold)的 Affibody(WO1995/001937)、具含 33 個胺基酸殘基之轉彎(turn)與 2 個反向並行之螺旋以及迴圈的次單元返覆層疊的構造的 ankyrin 返覆(ankyrin repeat: AR)之分子表面所露出之區

DARPin(Designed proteins)(WO2002/020565)、將嗜中性球明膠酶結合 lipocalin (neutrophil gelatinase-associated lipocalin(NGAL))等 lipocalin 分子中高度保守的 8 個反向並行的股中央方向扭曲成的活塞桶 (barrel) 構造的單側予以支撐的 4 個迴圈區 Anticalin 等 (WO2003/029462)、就八目鰻、沼田鰻等無顎類之獲得免疫系統而言不具免疫球蛋白之構造的可變性淋巴球受體 (variable lymphocyte receptor(VLR)) 之富含白胺酸殘基之返覆 (leucine-rich-repeat(LRR)) 模組返覆疊層而獲得之馬蹄形構造之內部之平行型片構造之中空區 (WO2008/016854) 為佳。本發明之抗原結合域之較佳例，例如含抗體之重鏈及輕鏈之可變區的抗原結合域。如此的抗原結合域，例如「scFv(single chain Fv)」、「單鏈抗體(single chain antibody)」、「Fv」、「scFv2(single chain Fv 2)」、「Fab」或「F(ab')₂」等為較佳。

【0042】 本發明之抗原結合分子中，抗原結合域可以結合於相同的抗原決定基。在此，相同之抗原決定基可存在於由例如：序列編號：15 記載之胺基酸序列構成的蛋白質中。又，可存在於由序列編號：15 記載之胺基酸序列之 20 號至 365 號之胺基酸構成的蛋白質中。或，本發明之抗原結合分子中，抗原結合域可以結合於彼此不同的抗原決定基。在此，不同的抗原決定基，可存在於由例如：序列編號：15 記載之胺基酸序列構成的蛋白質中。又，可存在於由序列編號：15 記載之胺基酸序列之 20 號至 365 號之胺基酸構成之蛋白質中。

【0043】 鈣結合模體

本發明之抗原結合分子中，抗原結合域包含鈣結合模體。鈣結合模體，只要是在低鈣濃度條件下的抗原結合活性低於在高鈣濃度條件下之抗原結合活性，則可包含於抗原結合域之任一位置。抗原結合域為抗體之可變區時，鈣結合模體也可包含於可變區之重鏈，也可包含於可變區之輕鏈。又，鈣結合模體也可包含於重鏈及輕鏈之兩者。非限定之另一態樣中，鈣結合模體也可包含於可變區之框架序列，也可包含於可變區之 CDR 序列。又，鈣結合模體也可包含於框架序列與 CDR 序列兩者。

【0044】 本發明之非限定之一態樣中，鈣結合模體包含視鈣離子濃度之條件而改變對抗抗原之抗原結合分子之結合活性之胺基酸殘基。該胺基酸殘基，例如理想者有具金屬螯合作用之胺基酸。具金屬螯合作用之胺基酸，例如絲胺酸(Ser(S))、蘇胺酸(Thr(T))、天冬醯胺酸(Asn(N))、麩醯胺酸(Gln(Q))、天冬胺酸(Asp(D))、麩胺酸(Glu(E))、組胺酸(His(H))及酪胺酸(Tyr(Y))等較佳。具有在低鈣濃度條件下之抗原結合活性低於在高鈣濃度條件下之抗原結合活性的性質的既有抗原結合域所存在之鈣結合模體，可適當當做本發明之鈣結合模體。如此的既有的抗原結合域之非限定例，例如：在低鈣濃度條件下之抗原結合活性低於在高鈣濃度條件下之抗原結合活性之抗體之可變區所含之鈣結合模體。如此的抗體之非限定例，例如含序列編號：1 及序列編號：2 之 IL-6 受體抗體及含序列編號：25 及序列編號：26 之 IL-6 抗體。又，已知具多數個鈣離子結合部位且據認為係從分子進化上共通之起源而來的

TroponinC、攜鈣素(Calmodulin)、Parvalbumin、肌凝蛋白輕鏈等，其結合模體也可當做本發明之鈣結合模體使用。

【0045】 本發明之抗原結合域為抗體之可變區時，鈣結合模體也可包含於可變區之重鏈，也可包含於可變區之輕鏈。又，鈣結合模體也可包含於重鏈及輕鏈之兩者。非限定之另一態樣中，鈣結合模體可包含於可變區之框架序列，也可包含於可變區之 CDR 序列。又，鈣結合模體，可包含於框架序列與 CDR 序列兩者。可設計重鏈或輕鏈之 CDR1、CDR2 及/或 CDR3，使得含有該等鈣結合模體。例如：本發明之非限定一態樣中，可設計以序列編號：41、序列編號：63、序列編號：64 表示之人類抗體之輕鏈可變區所含之鈣結合模體，使包含於本發明之抗原結合分子之輕鏈可變區。如此的鈣結合模體，例如以 Kabat 編號法表示之 30 位、31 位、32 位、50 位及/或 92 位中任一個以上之胺基酸為包含具金屬螯合作用之胺基酸的鈣結合模體。如此的鈣結合模體之非限定態樣，例如與從以序列編號：41、序列編號：63、序列編號：64 表示之人類抗體之輕鏈可變區之以 Kabat 編號法表示之 30 位、31 位、32 位、50 位及/或 92 位之 5 個胺基酸中選出的 1~4 個胺基酸為相同之胺基酸，係包含於對應之 Kabat 編號法之胺基酸部位的鈣結合模體。於此情形，輕鏈可變區之以 Kabat 編號法表示之 30 位、31 位、32 位、50 位及/或 92 位之 5 個胺基酸部位之中，與以序列編號：41、序列編號：63、序列編號：64 表示之人類抗體之輕鏈可變區中之對應的胺基酸部位所含之胺基酸為不相同之胺基酸胺基酸部位，宜為包含具金屬螯合作用之胺基酸。

又，例如：本發明之非限定之另一態樣中，可設計以序列編號：1 表示之重鏈可變區所包含之鈣結合模體，使其包含於本發明之抗原結合分子之重鏈可變區。如此的鈣結合模體，例如以 Kabat 編號法表示之 95 位、96 位及/或 100a 位之胺基酸為包含具金屬螯合作用之胺基酸的鈣結合模體。又，例如：本發明之非限定之另一態樣中，可設計以序列編號：25 表示之重鏈可變區所包含之鈣結合模體，使其包含於本發明之抗原結合分子之重鏈可變區。如此的鈣結合模體，例如以 Kabat 編號法表示之 95 位及/或 101 位之胺基酸為包含具金屬螯合作用之胺基酸的鈣結合模體。具該等金屬螯合作用之胺基酸，例如絲胺酸 (Ser(S))、蘇胺酸 (Thr(T))、天冬醯胺酸 (Asn(N))、麩醯胺酸 (Gln(Q))、天冬胺酸 (Asp(D))、麩胺酸 (Glu(E))、組胺酸 (His(H)) 及酪胺酸 (Tyr(Y)) 等。又，為了鈣離子之結合，也可涉及該等位置之胺基酸之主鏈之羰基。如後述實施例所記載，藉由將包含於鈣結合模體之胺基酸移植到所望的抗原結合域，令人意外地，可對於該抗原結合域賦予鈣離子結合活性。又，也可適當使用 Cadherin 域、Calmodulin 所包含之 EF 手、Protein kinase C 所包含之 C2 域、血液凝固蛋白質 Factor IX 所包含之 Gla 域、去唾液酸糖蛋白 (asialoglycoprotein) 受體或甘露糖結合受體所包含之 C 型凝集素、LDL 受體所包含之 A 域、Annexin、thrombospondin3 型域及 EGF 狀域也可理想地使用。

【0046】 專一性

專一性係指其中之一的分子對於其一或多數之結合對象的分子以外之分子未顯示任何顯著結合之狀態。又，抗原結合

域也可用在對於某抗原中所含之多數抗原決定基當中特定抗原決定基為專一性的情形。又，抗原結合域所結合之抗原決定基包含在多數不同抗原時，具該抗原結合域之多胜肽組合體可以與含該抗原決定基之各種抗原結合。

【0047】 抗體

本說明書中，抗體係指天然者或部分或完全合成所製造之免疫球蛋白。抗體可從其天然存在之血漿或血清等天然資源或產生抗體之融合瘤細胞之培養上清單離，或可使用基因重組等方法部分或完全合成。抗體例如免疫球蛋白之同種型(isotype)及此等同種型之次類(subclass)為較佳例。人類免疫球蛋白已知有 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgM9 種類型(同種型)。本發明之抗體在該等同種型之中，可含 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。

【0048】 製作具有所望結合活性之抗體之方法於該技術領域之人士為公知。以下列舉製作與 IL-6 結合之抗體(抗 IL-6R 抗體)之方法。與 IL-6R 以外之抗原結合的抗體也可依據下列例示適當製作。

【0049】 抗 IL-6R 抗體可使用公知方法以多株或單株抗體之形式取得。抗 IL-6R 抗體，宜製作哺乳動物來源的單株抗體。哺乳動物來源的單株抗體，包含由融合瘤產生者，及以基因工程的方法以含抗體基因之表現載體轉形而得之寄主細胞所產生者等。本發明之單株抗體包含「人類化抗體」或「嵌合抗體」。

【0050】 單株抗體產生融合瘤，可使用公知技術依例如以下方式製作。亦即，使用 IL-6R 蛋白質當做感作抗原，依通常

之免疫方法將哺乳動物免疫。將獲得之免疫細胞以通常的細胞融合法與公知之母細胞融合。其次依照通常之篩選法，篩選單株抗體產生細胞，可選擇產生抗 IL-6R 抗體之融合瘤。

【0051】 具體而言，單株抗體之製作係依例如以下所示方式實行。首先，藉由表現在序列編號：16 揭示其核苷酸序列之 IL-6R 基因，取得當做抗體取得之感作抗原使用的以序列編號：15 表示的 IL-6R 蛋白質。亦即，藉由將編碼為 IL-6R 之基因序列插入公知之表現載體，而將適當的寄主細胞轉形。從該寄主細胞中或培養上清中以公知方法精製所望之人類 IL-6R 蛋白質。為了從培養上清中取得可溶型之 IL-6R，例如可使 Mullberg 等人(J. Immunol. (1994) 152 (10), 4958-4968)記載之序列編號：15 表示之 IL-6R 多胜肽序列當中 1 至 357 號之胺基酸構成之蛋白質表現，以代替表現以序列編號：15 表示之 IL-6R 蛋白質。又，經精製的天然 IL-6R 蛋白質也同樣可當做感作抗原使用。

【0052】 對於哺乳動物免疫時使用之感作抗原，可使用該精製 IL-6R 蛋白質。IL-6R 之部分胜肽也可當做感作抗原使用。於此時，該部分胜肽可利用人類 IL-6R 之胺基酸序列以化學合成取得。又，也可將 IL-6R 基因之一部分納入表現載體使表現而取得。再者，使用蛋白質分解酵素將 IL-6R 蛋白質分解也可取得，但是當做部分胜肽使用之 IL-6R 胜肽之區域及大小不限於特別之態樣。較佳區域可從序列編號：15 之胺基酸序列當中相當於 20-357 胺基酸之胺基酸序列選擇任意序列。構成當做感作抗原之胜肽的胺基酸的數目至少為 5 以上，例如 6 以

上或 7 以上較佳。更具體而言，可將 8~50、較佳為 10~30 個殘基之胜肽當做感作抗原使用。

【0053】 又，將 IL-6R 蛋白質之所望之部分多胜肽或胜肽與不同的多胜肽融合成的融合蛋白質可利用為感作抗原。為了製造當做感作抗原使用之融合蛋白質，例如可適當利用抗體之 Fc 片段或胜肽標籤(tag)等。表現融合蛋白質之載體，可藉由將編碼為所望之二種或更多種多胜肽片段之基因於框架內(inframe)融合，並將該融合基因以前述方式插入表現載體而製作。融合蛋白質之製作方法記載於 Molecular Cloning 2nd ed. (Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58(1989) Cold Spring Harbor Lab. press)。可當做感作抗原使用之 IL-6R 之取得方法及使用其之免疫方法，在 WO2003/000883、WO2004/022754、WO2006/006693 等亦有具體記載。

【0054】 以該感作抗原免疫之哺乳動物不限於特定動物，宜考慮與細胞融合使用之母細胞之間的適合性選擇。一般的嚙齒類動物，例如小鼠、大鼠、倉鼠、或兔、猴等較佳。

【0055】 依公知方法將上述動物以感作抗原免疫。例如就一般方法而言，係藉由將感作抗原對於哺乳動物之腹腔內或皮下注射而投予以實施免疫。具體而言，將以 PBS(Phosphate-Buffered Saline)或生理食鹽水等以適當稀釋倍率稀釋過的感作抗原，視所望與通常的佐劑例如佛洛依德完全佐劑混合並乳化後，將該感作抗原對於哺乳動物每 4 至 21 日投予數次。又，感作抗原免疫時可以使用適當載體。尤其使用

小分子量之部分胜肽當做感作抗原時，有時以結合有白蛋白、血藍蛋白(keyhole lympet hemocyanin)等載體蛋白質的該感作抗原胜肽進行免疫為理想。

【0056】 又，產生所望抗體之融合瘤可使用 DNA 免疫並依以下方式製作。DNA 免疫，係指在免疫動物中投予以能表現編碼為抗原蛋白質之基因的態樣構建之載體 DNA 的該免疫動物中，藉由感作抗原在該免疫動物之活體內表現，能提供免疫刺激之免疫方法。比起對於免疫動物投予蛋白質抗原之一般免疫方法，DNA 免疫可期待如下的優越性。

- 可維持如 IL-6R 之膜蛋白質之構造而提供免疫刺激
- 無需精製免疫抗原

【0057】 為了以 DNA 免疫獲得本發明之單株抗體，首先將表現 IL-6R 蛋白質之 DNA 對於免疫動物投予。編碼為 IL-6R 之 DNA 可利用 PCR 等公知方法合成。將獲得之 DNA 插入適當表現載體並對於免疫動物投予。表現載體例如可以理想地利用 pcDNA3.1 等市售表現載體。將載體對於活體投予之方法，可使用一般使用之方法。例如，可藉由將吸附有表現載體之金粒子以基因槍導入免疫動物個體之細胞內而實施 DNA 免疫。再者，認識 IL-6R 之抗體之製作也可使用國際公開 WO2003/104453 記載之方法製作。

【0058】 以此方式將哺乳動物免疫，確認血清中與 IL-6R 結合之抗體力價上升後，從哺乳動物採取免疫細胞以供細胞融合。較佳之免疫細胞尤佳為使用脾細胞。

【0059】 與前述免疫細胞融合之細胞，可使用哺乳動物之

骨髓瘤細胞。骨髓瘤細胞宜具有為了篩選的適當選擇標記。選擇標記，係指能於特定培養條件下生存之(或無法生存)之形質。選擇標記中，次黃嘌呤-鳥嘌呤磷酸核糖轉移酶(hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase)缺損(以下簡稱為 HGPRT 缺損)、或胸腺嘧啶激酶缺損(以下簡稱為 TK 缺損)等為公知。具 HGPRT 或 TK 缺損之細胞，具有次黃嘌呤-胺基嘌呤-胸腺嘧啶感受性(以下簡稱為 HAT 感受性)。HAT 感受性之細胞在 HAT 選擇培養基中無法合成 DNA 會死滅，但若與正常細胞融合則會利用正常細胞之補救合成路徑(salvage pathway)繼續合成 DNA，故能在 HAT 選擇培養基中增殖。

【0060】 HGPRT 缺損或 TK 缺損之細胞，各可以含 6 硫鳥嘌呤(thioguanine)、8 氮雜鳥嘌呤 (以下簡稱為 8AG)、或 5'溴去氧尿嘧啶之培養基選擇。於 DNA 中納入該等嘧啶類似物之正常細胞會死滅。另一方面，未納入該等嘧啶類似物之該等酵素缺損之細胞，能在選擇培養基中生存。其他稱為 G418 耐受性之選擇標記，係利用新黴素耐受性基因提供對於 2-去氧鏈黴胺(streptomycin)系抗生物質(慶大黴素(gentamycin 類似體)之耐受性。對細胞融合為理想的各種骨髓瘤細胞為公知。

【0061】 如此的骨髓瘤細胞例如可理想地使用 P3(P3x63Ag8.653)(J. Immunol.(1979)123 (4), 1548-1550)、P3x63Ag8U.1(Current Topics in Microbiology and Immunology(1978)81, 1-7)、NS-1(C. Eur. J. Immunol.(1976)6 (7), 511-519)、MPC-11(Cell(1976)8 (3), 405-415)、SP2/0(Nature(1978)276 (5685), 269-270)、FO(J. Immunol.

Methods(1980)35 (1-2), 1-21) 、 S194/5.XX0.BU.1(J. Exp. Med.(1978)148 (1), 313-323) 、 R210(Nature(1979)277 (5692), 131-133)等。

【0062】基本上可依照公知方法例如 Keller 與 Milstein 等人的方法(Methods Enzymol.(1981)73, 3-46)等，實施前述免疫細胞與骨髓瘤細胞之細胞融合。

更具體而言，可於例如細胞融合促進劑存在下於通常的營養培養液中實施前述細胞融合。融合促進劑可使用例如聚乙二醇(PEG)、仙台病毒 (HVJ)等，為更提高融合效率，可視所望添加使用二甲基亞碲等輔助劑。

【0063】免疫細胞與骨髓瘤細胞之使用比例可任意設定。例如相對於骨髓瘤細胞將免疫細胞定為 1 至 10 倍較佳。前述細胞融合使用之培養液，例如適於前述骨髓瘤細胞株增殖之 RPMI1640 培養液、MEM 培養液、此外，可使用該種細胞培養使用之通常之培養液，再者，可理想地添加胎牛血清(FCS)等血清補液。

【0064】細胞融合係將前述免疫細胞與骨髓瘤細胞以既定量於前述培養液中充分混合，並且將預先加溫至約 37℃ 之 PEG 溶液(例如平均分子量 1000 至 6000 左右)以通常 30 至 60%(w/v)之濃度添加。藉由將混合液緩慢混合，會形成所望之融合細胞(融合瘤)。接著，逐次添加上述列舉之適當培養液，反複實施離心並去除上清之操作，可將對於融合瘤之生長不利的細胞融合劑等除去。

【0065】以如此方式獲得之融合瘤，可藉由於通常之選擇

培養液，例如 HAT 培養液(含次黃嘌呤、胺基嘌呤、胸腺嘧啶之培養液)培養而選擇。為了使所望之融合瘤以外之細胞(非融合細胞)死滅，可使繼續進行使用上述 HAT 培養液之培養足夠時間(通常該足夠時間為數日至數週)。其次，以通常之極限稀釋法，實施產生所望抗體之融合瘤之篩選及單一選殖。

【0066】 以如此方式獲得之融合瘤，可利用因應細胞融合使用之骨髓瘤具有之選擇標記的選擇培養液而選擇。例如具 HGPRT 或 TK 缺損之細胞，可藉由以 HAT 培養液(含次黃嘌呤、胺基嘌呤及胸腺嘧啶之培養液)培養而選擇。亦即，當使用 HAT 感受性骨髓瘤細胞於細胞融合時，可在 HAT 培養液中將成功與正常細胞細胞融合的細胞選擇性增殖。為了使所望融合瘤以外之細胞(非融合細胞)死滅，可以繼續使用上述 HAT 培養液之培養足夠時間。具體而言，一般可藉由數日至數週的培養而選擇所望之融合瘤。其次可利用通常之極限稀釋法，實施產生所望之抗體的融合瘤的篩選及單一選殖。

【0067】 所望之抗體之篩選及單一選殖，可依照基於公知抗原抗體反應之篩選方法而理想地實施。例如，結合於 IL-6R 之單株抗體可以結合於在細胞表面表現的 IL-6R。如此的單株抗體例如可藉由 FACS(fluorescence activated cell sorting)篩選。FACS 係將與螢光抗體接觸之細胞以雷射光解析，並測定各個細胞發出之螢光，而可測定抗體對於細胞表面之結合的系統。

【0068】 為了利用 FACS 篩選產生本發明之單株抗體的融合瘤，首先要製備表現 IL-6R 之細胞。用於篩選之較佳細胞為

使 IL-6R 強制表現之哺乳動物細胞。藉由以當做寄主細胞之未經轉形之哺乳動物細胞為對照，可以選擇性檢測抗體對於細胞表面之 IL-6R 的結合活性。亦即，藉由選擇產生未結合於寄主細胞而結合於 IL-6R 強制表現細胞的抗體的融合瘤，可以取得產生 IL-6R 單株抗體之融合瘤。

【0069】 或抗體對於經固定化之 IL-6R 表現細胞的結合活性可依據 ELISA 之原理評價。例如，將 IL-6R 表現細胞固定化在 ELISA 平板的井。使融合瘤之培養上清接觸井內之固定化細胞，以檢測結合於固定化細胞的抗體。單株抗體為小鼠來源時，與細胞結合之抗體可利用抗小鼠免疫球蛋白抗體檢測。該等篩選所選擇之產生具有對於抗原之結合能力的所望抗體的融合瘤，可利用極限稀釋法等選殖。

【0070】 以此方式製作之產生單株抗體之融合瘤可在通常之培養液中繼代培養。而且，該融合瘤可於液態氮中長期保存。

【0071】 將該融合瘤依照通常方法培養，可從其培養上清取得所望之單株抗體。或可將融合瘤對於與其具適合性之哺乳動物投予使增殖，並從其腹水獲取單株抗體。前者之方法對於獲得高純度抗體為適當。

【0072】 從該融合瘤等抗體產生細胞選殖的抗體基因所編碼之抗體也可適當利用。藉由將經選殖的抗體基因納入適當載體並導入寄主，可以表現該基因所編碼的抗體。抗體基因之單離與對於載體之導入、及用於將寄主細胞轉形之方法，例如已由 Vandamme 等人確立 (Eur.J. Biochem.(1990)192 (3), 767-775)。下列所述重組抗體之製造方法亦為公知。

【0073】 例如，可從產生抗 IL-6R 抗體之融合瘤細胞取得編碼為抗 IL-6R 抗體之可變區(V 區)之 cDNA。為此，通常首先從融合瘤萃取全體 RNA。用於從細胞萃取 mRNA 之方法，例如可利用如下方法。

— 胍 (guanidine) 超離心法 (Biochemistry (1979) 18 (24), 5294-5299)

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

【0074】 萃取到的 mRNA 可使用 mRNA Purification Kit (GE Health care bioscience 製)等精製。或如 QuickPrep mRNA Purification Kit (GE Health care bioscience 製)等，也有用於從細胞直接萃取全體 mRNA 之市售套組。使用如此的套組，可從融合瘤取得 mRNA。從獲得之 mRNA 使用反轉錄酵素可合成編碼為抗體 V 區之 cDNA。cDNA 可利用 AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit(生化學工業社製)等合成。又，為了 cDNA 之合成及放大，可適當利用 SMART RACE cDNA 放大套組(Clontech 製)及使用 PCR 之 5'-RACE 法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85 (23), 8998-9002、Nucleic Acids Res. (1989) 17 (8), 2919-2932)。又，在如此的 cDNA 合成之過程中，可在 cDNA 的兩末端導入後述適當的限制酶部位。

【0075】 從獲得之 PCR 產物精製目的之 cDNA 片段，其次與載體 DNA 連結。以如此方式製作重組載體，並導入大腸菌等，選擇群落(colony)後，從形成有該群落之大腸菌製備所望之重組載體。並且針對該重組載體是否具有目的 cDNA 之鹼基序列，可使用公知之方法例如二去氧核苷酸鏈終結法等確認。

【0076】 為了取得編碼為可變區之基因，利用使用可變區基因放大用引子之 5'-RACE 法係屬簡便。首先，以從融合瘤細胞萃取之 RNA 當做模板，合成 cDNA，獲得 5'-RACE cDNA 庫。5'-RACE cDNA 庫之合成可適當使用 SMART RACE cDNA 放大套組等市售套組。

【0077】 以獲得之 5'-RACE cDNA 庫為模板，以 PCR 法將抗體基因放大。依據公知之抗體基因序列可設計小鼠抗體基因放大用之引子。此等引子為依免疫球蛋白之次類而各不相同的鹼基序列。因此，次類理想為預先使用 Iso Strip 小鼠單株抗體同種型決定套組(Roche diagnostics)等市售套組決定。

【0078】 具體而言，當目的為取得例如編碼為小鼠 IgG 之基因時，可利用將編碼為當做重鏈之 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2a$ 、 $\gamma 2b$ 、 $\gamma 3$ 、當做輕鏈之 κ 鏈與 λ 鏈的基因放大的引子。為了放大 IgG 之可變區基因，一般係利用於 3'側之引子黏合有相當於接近可變區之恆定區之部分的引子。另一方面，5'側之引子係利用 5' RACE cDNA 庫製作套組所附帶的引子。

【0079】 利用如此放大之 PCR 產物，可再構成由重鏈與輕鏈之組合而成的免疫球蛋白。以再構成之免疫球蛋白對於 IL-6R 之結合活性當做指標，可以篩選所望之抗體。例如目的為取得對抗 IL-6R 之抗體時，抗體對於 IL-6R 之結合，更佳為專一性的。與 IL-6R 結合之抗體可藉由例如以下方式篩選；

(1)使從融合瘤獲得之含有由 cDNA 編碼之 V 區的抗體接觸 IL-6R 表現細胞之步驟、

(2)檢測 IL-6R 表現細胞與抗體之間的結合之步驟、及

(3)選擇與 IL-6R 表現細胞結合之抗體之步驟。

【0080】 檢測抗體與 IL-6R 表現細胞之間的結合的方法為公知。具體而言，可利用先前所述 FACS 等方法，檢測抗體與 IL-6R 表現細胞間之結合。為了評價抗體之結合活性，可適當利用 IL-6R 表現細胞之固定標本。

【0081】 以結合活性為指標之抗體之篩選方法，亦宜使用利用噬菌體載體之淘選法。從多株抗體表現細胞群，以重鏈與輕鏈之次類之庫的形式取得抗體基因時，利用噬菌體載體之篩選方法係屬有利。編碼為重鏈與輕鏈之可變區之基因，可藉由以適當連結子序列連結，而形成單鏈 Fv(scFv)。藉由將編碼為 scFv 之基因插入噬菌體載體，可取得於表面表現 scFv 之噬菌體。該噬菌體與所望抗原接觸後，藉由回收與抗原結合之噬菌體，可以回收編碼為具目的結合活性之 scFv 的 DNA。該操作可視需要反復實施，而將具所望之結合活性之 scFv 濃縮。

【0082】 獲得編碼為目的抗 IL-6R 抗體之 V 區的 cDNA 後，將該 cDNA 以認識插入於該 cDNA 之兩末端的限制酶部位之限制酶消化者。較佳之限制酶，係認識構成抗體基因之鹼基序列中出現頻度低之鹼基序列並消化。再者，為了將 1 副本的消化片段以正確方向插入載體，宜插入提供附著末端之限制酶。藉由將以上述方式經消化之編碼為抗 IL-6R 抗體之 V 區的 cDNA 插入適當表現載體，可以取得抗體表現載體。此時，若將編碼為抗體恆定區(C 區)之基因、與編碼為前述 V 區之基因於框架內融合，則可取得嵌合抗體。在此，嵌合抗體係指恆定區與可變區之來源不同者。因此，除了小鼠—人類等的異種嵌合抗

體，人類－人類同種嵌合抗體也包含在本發明之嵌合抗體。藉由預先在具恆定區之表現載體插入前述 V 區基因，可以構建嵌合抗體表現載體。具體而言，可於例如保持有編碼為所望之抗體恆定區(C 區)之 DNA 的表現載體之 5'側，適當配置消化前述 V 區基因之限制酶之限制酶認識序列。藉由將以相同組合之限制酶消化過的兩者於框架內融合，可以構建嵌合抗體表現載體。

【0083】 為了製造抗 IL-6R 單株抗體，可以將抗體基因於由表現控制區控制之下表現的方式納入表現載體。用於表現抗體之表現控制區，例如包含增強子或啟動子。又，也可在胺基末端附加適當的信號序列，以使表現的抗體分泌到細胞外。例如係使用具胺基酸序列 MGWSCIILFLVATATGVHS(序列編號：113)之胜肽當做信號序列，但是也可加成其他適當的信號序列。將表現的多胜肽在上述序列之羧基末端部分切斷，切斷的多胜肽可以成熟多胜肽之形式分泌到細胞外。其次，藉由以該表現載體將適當的寄主細胞轉形，可以取得表現編碼為抗 IL-6R 抗體之 DNA 的重組細胞。

【0084】 為了表現抗體基因，可將編碼為抗體重鏈(H 鏈)及輕鏈(L 鏈)之 DNA 納入分別的表現載體。藉由納入有 H 鏈與 L 鏈之載體，對於相同寄主細胞同時轉形(co-transfect)，可以表現具備 H 鏈與 L 鏈之抗體分子。或可將編碼為 H 鏈及 L 鏈之 DNA 納入單一的表現載體，而將寄主細胞轉形 (參照國際公開 WO 94/11523)。

【0085】 用以藉由將經單離之抗體基因導入適當寄主而製

作抗體之寄主細胞與表現載體的多數組合為公知。該等表現系均可應用於單離本發明之抗原結合域或 CD3 結合域。真核細胞當做寄主細胞時，可適當使用動物細胞、植物細胞、或真菌細胞。具體而言，動物細胞例如以下細胞。

(1)哺乳類細胞：CHO、COS、骨髓瘤、BHK(baby hamster kidney)、Hela、Vero 等

(2)兩生類細胞：非洲爪蟾卵母細胞等

(3)昆蟲細胞：sf9、sf21、Tn5 等

【0086】或植物細胞以煙草 (*Nicotiana tabacum*) 等煙草 (*Nicotiana*) 屬來源之細胞而得之抗體基因表現系為公知。植物細胞之轉形可以適當利用癒傷組織培養之細胞。

【0087】又，真菌細胞可以利用如下的細胞。

酵母：啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 等糖化酵母 (*Saccharomyces*) 屬、甲醇同化酵母 (*Pichia pastoris*) 等 *Pichia* 屬
絲狀菌：黑麴黴 (*Aspergillus niger*) 等麴菌 (*Aspergillus*) 屬

【0088】又，利用原核細胞之抗體基因之表現系亦為公知。例如使用細菌細胞時，可以適當利用大腸菌 (*E. coli*)、枯草菌等細菌細胞。於該等細胞中，以轉形導入含有目的抗體基因之表現載體。藉由將經轉形之細胞於體外培養，可從該轉形細胞之培養物獲取所望之抗體。

【0089】重組抗體之產生，除了上述寄主細胞，尚可利用基因轉殖動物。亦即，從導入有編碼為所望抗體之基因的動物，可獲取該抗體。例如，抗體基因藉由於框架內插入編碼為乳汁中固有產生之蛋白質的基因內部，可以構建融合基因。乳

汁中分泌之蛋白質，例如可利用羊 β 酪蛋白等。將含有插入有抗體基因之融合基因的 DNA 片段注入羊胚，並將該經注入之胚胎導入雌羊體內。從接受胚胎的羊產生之基因轉殖羊（或其子孫）所產之乳汁，可以取得所望之抗體與乳汁蛋白質之融合蛋白質。又，為了增加從基因轉殖羊產生之含所望之抗體之乳汁量，可對於基因轉殖羊投予荷爾蒙(Bio/Technology (1994), 12 (7), 699-702)。

【0090】 本說明書記載之多胜肽組合體對於人類投予時，該組合體中之抗原結合域，可適當採用以降低對於人類之異種抗原性等為目的經人為改變過的基因重組型抗體來源的抗原結合域。基因重組型抗體例如包含人類化(Humanized)抗體等。該等改變抗體可使用公知方法適當製造。

【0091】 本說明書記載之用於製作多胜肽組合體中的抗原結合域所使用之抗體之可變區，通常由插入在 4 個框架區(FR)的 3 個互補性決定區(complementarity-determining region ; CDR)構成。CDR 係實質上決定抗體之結合專一性之區域。CDR 之胺基酸序列富有多樣性。另一方面，構成 FR 之胺基酸序列，即使在具有不同之結合專一性的抗體之間也常會顯示高度同一性。所以，一般可利用 CDR 之移植而將某抗體之結合專一性移植到其他抗體。

【0092】 人類化抗體也稱為再構成(reshaped)人類抗體。具體而言，將人類以外之動物例如小鼠抗體之 CDR 移植到人類抗體而成之人類化抗體等為公知。為了獲得人類化抗體之一般基因重組方法亦為已知。具體而言，就將小鼠抗體之 CDR 移

植到人類 FR 的方法而言，例如 Overlap Extension PCR 為公知。於 Overlap Extension PCR，係對於用於合成人類抗體 FR 之引子中，附加編碼為待移植之小鼠抗體之 CDR 的鹼基序列。引子各準備 4 個 FR。一般將小鼠 CDR 移植到人類 FR 時，選擇與小鼠之 FR 具高同一性之人類 FR 時，對於維持 CDR 機能為有利。亦即，一般較佳為利用與相鄰於待移植之小鼠 CDR 的 FR 之胺基酸序列為高同一性之胺基酸序列構成之人類 FR。

【0093】 又，連結之鹼基序列可設計為彼此於框架內連接。藉由各引子，可個別合成人類 FR。其結果，可獲得於各 FR 附加有編碼為小鼠 CDR 之 DNA 的產物。各產物之編碼為小鼠 CDR 之鹼基序列，可設計成彼此重疊。接著，使以人類抗體基因為模板而合成之產物之重疊的 CDR 部分彼此黏合，進行互補鏈合成反應。利用該反應，人類 FR 經由小鼠 CDR 之序列而連結。

【0094】 最後，將連結有 3 個 CDR 與 4 個 FR 之 V 區基因，利用黏合在其 5'末端與 3'末端並附加有適當之限制酶認識序列的引子，將其全長放大。藉由將以上述方式獲得之 DNA 與編碼為人類抗體 C 區之 DNA 以於框架內融合之方式插入於表現載體中，藉此可製作人類型抗體表現用載體。將該重組載體導入寄主並樹立重組細胞後，培養該重組細胞，使編碼為該人類化抗體之 DNA 表現，藉此使該培養細胞之培養物中產生該人類化抗體（參照歐洲專利公開 EP 239400、國際公開 WO1996/002576）。

【0095】 以定性或定量測定以上述方式製作之人類化抗體

對於抗原之結合活性並進行評價，可以理想地選擇當經由 CDR 連結時該 CDR 會形成良好之抗原結合部位的人類抗體之 FR。視需要，可以將 FR 之胺基酸殘基取代，使再構成人類抗體之 CDR 能形成適當的抗原結合部位。例如，應用將小鼠 CDR 移植到人類 FR 時使用之 PCR 法，可對於 FR 導入胺基酸序列之變異。具體而言，可對於與 FR 黏合之引子導入部分的鹼基序列的變異。以如此的引子合成之 FR，導入有鹼基序列之變異。以上述方法測定並評價將胺基酸取代過的變異型抗體對於抗原之結合活性，可以選擇具所望性質之變異 FR 序列(Sato, K. et al., Cancer Res, 1993, 53, 851-856)。

【0096】 又，可以將具有人類抗體基因所有曲目的基因轉殖動物(參照國際公開 WO1993/012227、WO1992/003918、WO1994/002602、WO1994/025585、WO1996/034096、WO1996/033735)當做免疫動物，以 DNA 免疫取得所望之人類抗體。

【0097】 再者，使用人類抗體庫以淘選取得人類抗體之技術亦為已知。例如，將人類抗體之 V 區以單鏈抗體(scFv)之形式，以噬菌體呈現法使表現在噬菌體之表面。可以選擇表現與抗原結合之 scFv 的噬菌體。藉由解析選擇之噬菌體之基因，可以決定編碼為與抗原結合之人類抗體之 V 區的 DNA 序列。決定與抗原結合之 scFv 之 DNA 序列後，將該 V 區序列與所望之人類抗體 C 區之序列於框架內融合後插入適當表現載體，可以製作表現載體。將該表現載體導入上述列舉之適當表現細胞中，並使編碼為該人類抗體之基因表現，可取得該人類抗體。

該等方法已為公知(參照國際公開 WO1992/001047、WO1992/020791、WO1993/006213、WO1993/011236、WO1993/019172、WO1995/001438、WO1995/015388)。

【0098】 又，就取得抗體基因之而言，除上述以外，也可適當使用 Bernasconi 等人(Science (2002) 298, 2199-2202)或 WO2008/081008 記載之 B 細胞選殖(各抗體之編碼序列之鑑定及選殖、其單離、及各抗體(尤其 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4)製作用之表現載體構建之用途等)之方法。

【0099】 EU 編號法

依照本發明使用之方法，指定為抗體之 CDR 與 FR 之胺基酸位置係依照 Kabat 規定 (Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institute of Health, Bethesda, Md., 1987 年及 1991 年)。本說明書中，抗原結合分子為抗體或抗原結合片段時，可變區之胺基酸係依照 Kabat 編號法，恆定區之胺基酸係依照 Kabat 之胺基酸位置的 EU 編號法表示。

【0100】 抗原對於細胞內之攝入或對於細胞內之攝入之促進

本發明中，由抗原結合分子所為之「抗原對於細胞內之攝入」，係指抗原由於胞吞作用而被攝入細胞內。又，本發明中，「促進對於細胞內之攝入」，係指於血漿中，與抗原結合之抗原結合分子攝入細胞內之速度受促進、及/或經攝入的抗原再循環到血漿中之量減少。本發明中，對於細胞內之攝入速度之促進程度，當比較抗原結合分子在低鈣濃度條件下之抗原結合活性低於在高鈣濃度條件下之抗原結合活性之前之抗原結合

分子，對於細胞內之攝入速度受促進即可。因此，本發明中是否由抗原結合分子使抗原對於細胞內之攝入受促進，可以由是否抗原對於細胞內之攝入速度增大而判斷。抗原對於細胞內之攝入速度例如可對於含人類 FcRn 表現細胞之培養液添加抗原結合分子與抗原，經時測定抗原於培養液中濃度之減少、或經時測定人類 FcRn 表現細胞內攝入之抗原之量而計算。

【0101】 藉由本發明之抗原結合分子促進抗原攝入細胞內之攝入速度的方法，例如藉由投予抗原結合分子，能促進血漿中之抗原之消失速度。因此，是否由於抗原結合分子促進抗原對於細胞內之攝入，例如可藉由測定是否血漿中存在之抗原之消失速度受加速，或是否由於抗原結合分子之投予使血漿中之抗原濃度減低而能確認。亦即，也可藉由本發明之抗原結合分子之投予，而促進血漿中之抗原濃度減少。

【0102】 1 分子之抗原結合分子對於抗原之結合次數

又，本發明中，「1 分子之抗原結合分子對於抗原之結合次數」，係指 1 分子抗原結合分子分解至消失為止之期間能夠結合於抗原之次數。本發明中，「使 1 分子抗原結合分子對於抗原之結合次數增加」，係指以於血漿中，抗原與抗原結合分子結合，且結合有抗原之抗原結合分子攝入細胞內並在體內將抗原解離後，抗原結合分子回到血漿中當做 1 個循環時，1 分子抗原結合分子被分解而消失為止之期間能夠周轉的該循環數增加。本發明中，只要抗原結合分子在低鈣濃度條件下之抗原結合活性不低於在高鈣濃度條件下之抗原結合活性之抗原結合分子、或在低鈣濃度條件下之抗原結合活性低於在高鈣濃

度條件下之抗原結合活性之前之抗原結合分子比較，循環數有增加即可。因此，是否循環數增加，可藉由是否前述「對於細胞內之攝入有促進」，或是否後述「血漿中滯留性有改善」而判斷。

【0103】 血漿中滯留性之改善

本發明中，「血漿中滯留性之改善」，可代換為「藥物動態之提高」、「藥物動態之改善」、「優異之藥物動態」、「血漿中滯留性之提高」、「優異之血漿中滯留性」或「血漿中滯留性加長」，該等語句係以相同含意使用。

【0104】 本發明中，「血漿中滯留性改善」，包含從抗原結合分子對於人類、小鼠、大鼠、猴、兔、犬等動物投予之後到從血漿中消失為止(例如:於細胞內被分解等而成為抗原結合分子不能再回到血漿中之狀態為止)之時間不僅增長，且從投予抗原結合分子到其被分解並消失為止之期間於可結合到抗原之狀態(例如:抗原結合分子非結合於抗原之狀態)滯留於血漿中之時間增長。亦即包含非結合於抗原之抗原結合分子(抗原非結合型抗原結合分子)被分解而消失為止之時間增長。

【0105】 抗原結合分子即使存在於血漿中，若該抗原結合分子已經與抗原時，該抗原結合分子不能與新的抗原結合。所以，若抗原結合分子未與抗原結合之時間增長，能與新的抗原結合的時間會增長(能與新抗原結合之機會增加)，能減少在活體內抗原未與抗原結合分子結合之時間，可以增長抗原與抗原結合分子結合之時間。若能藉由抗原結合分子之投予使抗原從血漿中消失加速，則抗原非結合型抗原結合分子之血漿中濃度

增加，且抗原與抗原結合分子結合之時間加長。亦即，本發明中，「抗原結合分子於血漿中滯留性之改善」，係包含在低鈣濃度條件下之抗原結合活性不低於在高鈣濃度條件下之抗原結合活性之抗原非結合型抗原結合分子、或在低鈣濃度條件下之抗原結合活性低於在高鈣濃度條件下之抗原結合活性之前之抗原非結合型抗原結合分子比較，本發明之抗原非結合型抗原結合分子之任一藥物動態參數有所改善(血漿中半衰期增加、平均血漿中滯留時間增加、血漿中廓清降低任一者)、或抗原結合分子投予後，抗原與抗原結合分子結合之時間延長、或由於抗原結合分子使抗原從血漿中消失加速。

【0106】 藥物動態參數是否改善，可藉由測定抗原結合分子或抗原非結合型抗原結合分子之血漿中半衰期、平均血漿中滯留時間、血漿中廓清等任一參數(由藥理動力學演習理解(南山堂))以判斷。例如：將抗原結合分子對於小鼠、大鼠、猴、兔、犬、人類等投予時，測定抗原結合分子或抗原非結合型抗原結合分子之血漿中濃度並計算各參數，當血漿中半衰期增長或平均血漿中滯留時間增長時，則可稱抗原結合分子之血漿中滯留性有改善。該等參數可利用該技術領域之人士公知之方法測定，例如可使用藥物動態解析軟體 WinNonlin(Pharsight)依附帶的程序書解析 Noncompartmental 而適當評價。抗原非結合型抗原結合分子之血漿中濃度之測定，可以利用該技術領域之人士公知之方法實施，例如可使用 Clin Pharmacol. 2008 Apr;48(4):406-17 中的測定方法。

【0107】 本發明中，「血漿中滯留性改善」，也包含抗原

結合分子投予後，抗原與抗原結合分子結合之時間延長。抗原結合分子投予後，抗原與抗原結合分子結合之時間是否延長，可測定抗原結合分子非結合型抗原(游離型抗原)之血漿中濃度、或抗原結合分子非結合型抗原濃度(游離型抗原濃度)相對於總抗原濃度，由該濃度之比例開始上升為止之時間判斷。

【0108】 本發明中，「血漿中之抗原濃度」之測定，可使用該技術領域之人士公知的方法實施抗原結合分子非結合型抗原之血漿中濃度、或抗原結合分子非結合型抗原濃度相對於總抗原濃度之比例之測定，例如：可使用 Pharm Res. 2006 Jan;23(1):95-103 中的測定方法。

【0109】 又，抗原在活體內顯示某些機能時，抗原是否與中和抗原機能之抗原結合分子(拮抗物分子)結合，也可利用該抗原之機能是否受中和以評價。抗原之機能是否受中和，可藉由測定反映抗原機能之某些活體內之標記以評價。抗原是否與活化抗原機能之抗原結合分子(促效劑分子)結合，可藉由測定反映抗原機能之某些活體內之標記以評價。

【0110】 抗原結合分子非結合型抗原之血漿中濃度之測定、抗原結合分子非結合型抗原濃度對於總抗原濃度之比例之測定、活體內標記之測定等測定不特別限定，宜於抗原結合分子投予後經過固定時間後進行較佳。本發明中，「抗原結合分子投予後經過固定時間後」並不特別限定，可由該技術領域之人士依投予之抗原結合分子之性質等適時決定，例如抗原結合分子投予後經過 1 日後、抗原結合分子投予經過 3 日後、抗原結合分子投予經過 7 日後、抗原結合分子投予經過 14 日後、

抗原結合分子投予經過 28 日後等。

【0111】 本發明中，改善人類之血漿中滯留性較佳。難以測定於人類之血漿中滯留性時，也可基於小鼠(例如：正常小鼠、人類抗原表現基因轉殖小鼠、人類 FcRn 表現基因轉殖小鼠、等)或猴(例如：長尾獼猴(*Macaca fascicularis*)等)之血漿中滯留性，來預測於人類之血漿中滯留性。

【0112】 於細胞外與抗原結合分子結合之抗原於細胞內從抗原結合分子之解離

又，本發明也可當做促進於細胞外與抗原結合分子結合之抗原於細胞內從抗原結合分子解離之方法。本發明中，抗原從抗原結合分子解離之處只要是在細胞內的任一處均可，較佳為早期核內體內。本發明中，「於細胞外與抗原結合分子結合之抗原於細胞內從抗原結合分子之解離」，不需要是在細胞外與抗原結合分子結合之攝入細胞內之抗原全部在細胞內從抗原結合分子解離，只要在細胞內從抗原結合分子解離之抗原之比例，係抗原結合分子在低鈣濃度條件下之抗原結合活性不低於在高鈣濃度條件下之抗原結合活性之抗原結合分子、或在低鈣濃度條件下之抗原結合活性低於在高鈣濃度條件下之抗原結合活性之前之抗原結合分子比較，於細胞內從抗原結合分子解離之抗原之比例較高即可。又，促進於細胞外與抗原結合分子結合之抗原在細胞內從抗原結合分子解離之方法，也可稱為對於抗原結合分子賦予對於與抗原結合之抗原結合分子攝入細胞內、於細胞內抗原從抗原結合分子解離容易促進之性質之方法。

【0113】 將以結合於抗原之狀態攝入細胞內之抗原結合分子，以非結合抗原之狀態釋放到細胞外

又，本發明也可當做促進以結合於抗原之狀態攝入細胞內之抗原結合分子，以非結合於抗原之狀態釋放到細胞外之方法。本發明中，「以結合於抗原之狀態攝入細胞內之抗原結合分子，以非結合於抗原之狀態釋放到細胞外」，不需要為以結合於抗原之狀態攝入細胞內之抗原結合分子全部以非結合於抗原之狀態釋放到細胞外，只要比較以非結合於抗原之狀態釋放到細胞外之抗原結合分子之比例為，抗原結合分子在低鈣濃度條件下之抗原結合活性不低於高鈣濃度條件下之抗原結合活性之抗原結合分子、或在低鈣濃度條件下之抗原結合活性低於在高鈣濃度條件下之抗原結合活性之前，釋放到細胞外之抗原結合分子之比例增高即可。釋放到細胞外之抗原結合分子，宜維持抗原結合活性較佳。又，促進以結合於抗原之狀態攝入細胞內之抗原結合分子以未結合於抗原之狀態釋放到細胞外之方法，也可稱為對於抗原結合分子賦予容易促進使結合於抗原之抗原結合分子攝入細胞內，並促進抗原結合分子未與抗原之狀態釋放到細胞外之促進之性質的方法。

【0114】 鈣濃度之條件

本發明中，低鈣濃度條件下，通常意指離子化鈣濃度為 $0.1\mu\text{M}\sim 30\mu\text{M}$ 。較佳為 $0.5\mu\text{M}\sim 10\mu\text{M}$ ，尤佳為接近在活體內的早期核內體內中的離子化鈣濃度的 $1\mu\text{M}\sim 5\mu\text{M}$ 。又，本發明中，高鈣濃度條件下，通常意指離子化鈣濃度為 $100\mu\text{M}\sim 10\text{ mM}$ ，較佳為 $200\mu\text{M}\sim 5\text{ mM}$ ，尤佳為接近活體內之血漿中(血中)之離

子化鈣濃度之 0.5 mM~2.5 mM。

【0115】 因此本發明中，「抗原結合分子在低鈣濃度條件下之抗原結合活性低於高鈣濃度條件下之抗原結合活性」，係指抗原結合分子於離子化鈣濃度 $0.1\mu\text{M}\sim 30\mu\text{M}$ 之抗原結合活性，若於離子化鈣濃度 $100\mu\text{M}\sim 10\text{ mM}$ 之抗原結合活性。較佳為抗原結合分子在離子化鈣濃度 $0.5\mu\text{M}\sim 10\mu\text{M}$ 之抗原結合活性，若於在離子化鈣濃度 $200\mu\text{M}\sim 5\text{ mM}$ 之抗原結合活性，尤佳在為活體內之早期核內體內之離子化鈣濃度時的抗原結合活性，若於在活體內之血漿中之離子化鈣濃度時的抗原結合活性，具體而言，意指抗原結合分子在離子化鈣濃度 $1\mu\text{M}\sim 5\mu\text{M}$ 之抗原結合活性若於在離子化鈣濃度 0.5 mM~2.5 mM 之抗原結合活性。

【0116】 再者，本發明中，「抗原結合分子在低鈣濃度條件下之抗原結合活性低於高鈣濃度條件下之抗原結合活性」的表達方式，也可表達為抗原結合分子於高鈣濃度條件下之抗原結合活性高於在低鈣濃度條件下之抗原結合活性。又，「抗原結合分子在低鈣濃度條件下之抗原結合活性低於在高鈣濃度條件下之抗原結合活性」之表達方式中，也包含藉由改變抗原結合分子中之胺基酸序列，使抗原結合分子在低鈣濃度條件下之抗原結合活性低於在高鈣濃度條件下之抗原結合活性、或使抗原結合分子於高鈣濃度條件下之抗原結合活性高在低鈣濃度條件下之抗原結合活性之情形。亦即，本發明中，只要抗原結合分子在低鈣濃度條件下之抗原結合活性與於高鈣濃度條件下之抗原結合活性之比增大即可。例如：如後述，使 $KD(\text{Ca})$

3 μ M)/KD(Ca 2 mM)之值增大之態樣。為了使抗原結合分子在低鈣濃度條件下之抗原結合活性與於高鈣濃度條件下之抗原結合活性之比增大，例如可選擇在低鈣濃度條件下之抗原結合活性低者、或藉由改變抗原結合分子中之胺基酸序列，而降低在低鈣濃度條件下之抗原結合活性，也可選擇於高鈣濃度條件下之抗原結合活性高，或藉由改變抗原結合分子中之胺基酸序列，而提高於高鈣濃度條件下之抗原結合活性，或兩者均可。

【0117】 又，本發明中，有時會記載「在低鈣濃度條件下之抗原結合活性低於高鈣濃度條件下之抗原結合活性」為「低鈣濃度條件下之抗原結合能力若於高鈣濃度條件下之抗原結合能力」，又，有時會記載「使在低鈣濃度條件下之抗原結合活性低於在高鈣濃度條件下之抗原結合活性」為「使低鈣濃度條件下之抗原結合能力低於高鈣濃度條件下之抗原結合能力」。

【0118】 FcRn

與屬於免疫球蛋白超級家族之 Fc γ 受體不同，FcRn 尤其是人類 FcRn，在構造的上與主要組織不適合性複合體(MHC)第 I 類之多胜肽在構造的相類似，且與第 I 類之 MHC 分子有 22 至 29%之序列同一性 (Ghetie 等人，Immunol. Today (1997) 18 (12), 592-598)。FcRn，係由與可溶性 β 或輕鏈(β 2 微球蛋白)複合體化之穿膜 α 或重鏈構成的異二聚體的形式表現。如 MHC，FcRn 之 α 鏈係由 3 個細胞外域(α 1、 α 2、 α 3)構成，且短的細胞質域係將蛋白質留在細胞表面。 α 1 及 α 2 域會與抗體之 Fc 區域中之 FcRn 結合域交互作用(Raghavan 等人(Immunity

(1994) 1, 303-315)。

【0119】 FcRn 係於哺乳動物之母性胎盤或卵黃囊表現，其涉及 IgG 從母親移動到胎兒。此外，於表現 FcRn 之嚙齒類新生兒的小腸中，涉及母體 IgG 從攝取 FcRn 之初乳或乳橫切移動到刷子緣上皮。FcRn 有多數種類，在多數其他組織、及各種內皮細胞系表現。其在人類成人血管內皮、肌肉血管系、及肝臟洞狀毛細血管也有表現。FcRn 會與 IgG，並且再循環到血清，而據認為有維持 IgG 之血漿中濃度之作用。FcRn 對於 IgG 分子之結合，通常係嚴格依存於 pH，最適結合據認為是小於 7.0 之 pH 酸性域。

【0120】 以含序列編號：17 表示之信號序列之多胜肽當做前驅體之人類 FcRn，於活體內(序列編號：18 記載包含信號序列之其多胜肽)會與人類 $\beta 2$ -微球蛋白形成複合體。與 $\beta 2$ -微球蛋白形成複合體之可溶型人類 FcRn 可使用通常之重組表現方法製造。可以評價本發明之 FcRn 結合域對於與如此的與 $\beta 2$ -微球蛋白形成複合體之可溶型人類 FcRn 的結合活性。本發明中，未特別記載時，人類 FcRn 指能與本發明之 FcRn 結合域結合之形態者，例如人類 FcRn 與人類 $\beta 2$ -微球蛋白之複合體。

【0121】 FcRn 結合域

本發明之抗原結合分子，具有抗原結合域與人類 FcRn 結合域。人類 FcRn 結合域，只要是抗原結合分子在酸性 pH 及/或中性 pH 具有人類 FcRn 結合活性即不特別限定、又，也可為直接或間接對於人類 FcRn 具結合活性之域。如此的域，例如：直接對於人類 FcRn 具結合活性之 IgG 型免疫球蛋白之 Fc

區域、白蛋白、白蛋白 domain3、抗人類 FcRn 抗體、抗人類 FcRn 胜肽、抗人類 FcRn Scaffold 分子等、或間接對於人類 FcRn 具結合活性之與 IgG 或白蛋白結合之分子等。本發明中，宜具於 pH 酸性域及 pH 中性域具人類 FcRn 結合活性之域為較佳。該域只要是預先在 pH 酸性域及 pH 中性域具人類 FcRn 結合活性之域，即可直接使用。該域在 pH 酸性域及/或 pH 中性域沒有人類 FcRn 結合活性或弱時，可改變抗原結合分子中之胺基酸而獲得人類 FcRn 結合活性，但較佳為改變人類 FcRn 結合域中之胺基酸而獲得於 pH 酸性域及/或 pH 中性域之人類 FcRn 結合活性。又，也可預先在 pH 酸性域及/或 pH 中性域改變具人類 FcRn 結合活性之域中之胺基酸，而提高人類 FcRn 結合活性。人類 FcRn 結合域之胺基酸改變，可藉由比較胺基酸改變前與改變後之 pH 酸性域及/或 pH 中性域中的人類 FcRn 結合活性，而找出目的之改變。

【0122】 人類 FcRn 結合域，宜為直接與人類 FcRn 結合之區。人類 FcRn 結合區之較佳例，例如抗體之 Fc 區域。但是能與白蛋白或 IgG 等具有與人類 FcRn 之結合活性之多胜肽結合之區，也可經由白蛋白或 IgG 等而間接結合於人類 FcRn。所以，本發明之人類 FcRn 結合區，也可為與白蛋白或 IgG 具結合活性之多胜肽結合之區。尤其，人類 FcRn 結合域，較佳為於中性 pH 之人類 FcRn 結合活性較高者，可以預先選擇在中性 pH 之人類 FcRn 結合活性高之人類 FcRn 結合域，也可改變抗原結合分子中之胺基酸而賦予在中性 pH 之人類 FcRn 結合活性，或可提高於中性 pH 之人類 FcRn 結合活性。

【0123】 測定對於人類 FcRn 之結合活性時，pH 以外之條件可由該技術領域之人士適當選擇，無特別限定。可於例如：WO2009/125825 記載，於 MES 緩衝液、37℃ 之條件測定。又，抗原結合分子之人類 FcRn 結合活性之測定可依照該技術領域之人士公知之方法進行，例如可使用 Biacore(GE Healthcare)等測定。抗原結合分子與人類 FcRn 之結合活性之測定，可藉由對於固定化有抗原結合分子或人類 FcRn 之晶片，分別以人類 FcRn 或抗原結合分子當做分析物使其流過而評價。

【0124】 在此，酸性 pH 中，對於人類 FcRn 之結合活性，係指於 pH4.0~pH6.5 之人類 FcRn 結合活性。較佳為意指於 pH5.5~pH6.5 之人類 FcRn 結合活性，尤佳為接近於活體內之早期核內體內之 pH 的 pH5.8~pH6.0 的人類 FcRn 結合活性。又，於中性 pH 對於人類 FcRn 之結合活性，係指於 pH6.7~pH10.0 之人類 FcRn 結合活性。較佳為意指於 pH7.0~pH8.0 之人類 FcRn 結合活性，尤佳為意指於接近活體內之血漿中之 pH 之 pH7.4 的人類 FcRn 結合活性。

【0125】 改變抗原結合分子中之胺基酸而賦予於中性 pH 之人類 FcRn 結合活性、或提高於中性 pH 之人類 FcRn 結合活性時，例如使用 IgG 型免疫球蛋白之 Fc 區域當做人類 FcRn 結合域時，可藉由改變人類 FcRn 結合域之胺基酸，對於抗原結合分子賦予於中性 pH 之人類 FcRn 結合活性、或提高中性 pH 之人類 FcRn 結合活性。用於改變之較佳 IgG 型免疫球蛋白之 Fc 區域，例如人類天然型 IgG(IgG1,IgG2,IgG3,IgG4)之 Fc 區域。

對於其他胺基酸之改變，只要能賦予於中性 pH 之人類 FcRn 結合活性或提高人類 FcRn 結合活性，則可在任意位置改變胺基酸。抗原結合分子，當含有人類 IgG1 之 Fc 區域當做人類 FcRn 結合域時，宜包含使於中性 pH 對於人類 FcRn 之結合強於人類天然型 IgG1 之改變。可進行如此改變之胺基酸，例如：EU 編號法 221 號~225 號、227 號、228 號、230 號、232 號、233 號~241 號、243 號~252 號、254 號~260 號、262 號~272 號、274 號、276 號、278 號~289 號、291 號~312 號、315 號~320 號、324 號、325 號、327 號~339 號、341 號、343 號、345 號、360 號、362 號、370 號、375 號~378 號、380 號、382 號、385 號~387 號、389 號、396 號、414 號、416 號、423 號、424 號、426 號~438 號、440 號及 442 號之位置之胺基酸。更具體而言，例如表 1 記載之胺基酸改變。藉由使用該等改變，能對於 IgG 型免疫球蛋白之 Fc 區域賦予、或提高(加強)於中性 pH 對於人類 FcRn 之結合活性。又，能使於 pH 酸性域對於人類 FcRn 之結合活性比起人類天然型 IgG1 為強之改變，例如表 2 所示。該等改變之中，可以適當選擇於中性 pH 也能強化對於人類 FcRn 之結合之改變，並使用於本發明。

【0126】 FcRn 結合域之「胺基酸之改變」或「胺基酸改變」，係包含改變為與母 FcRn 結合域之胺基酸序列不同之胺基酸序列。只要母 FcRn 結合域之修飾改變體在 pH 中性域能與人類 FcRn 結合，則任一 FcRn 結合域均可當做母 FcRn 結合域。又，對於已施加改變之 FcRn 結合域當做母 FcRn 結合域再施加改變而得之 FcRn 結合域，也可理想地當做本發明之 FcRn 結合域。

母 FcRn 結合域，係指多胜肽本身、包含母 FcRn 結合域之組成物、或意指編碼為母 FcRn 結合域之聚核苷酸序列。母 FcRn 結合域，可包含於抗體之項概略說明過的重組產生之公知 Fc 區域。母 FcRn 結合域之起源不限定，但可從非人類動物之任意生物或人類取得。較佳之任意生物，例如小鼠、大鼠、天竺鼠、倉鼠、荒地鼠、貓、兔、犬、羊、綿羊、牛、馬、駱駝、及非人類靈長類選擇之生物。其他態樣中，母 FcRn 結合域也可從長尾獼猴、天竺鼠、紅毛猩猩、黑猩猩、或人類取得。較佳為母 FcRn 結合域，係從人類 IgG1 取得，但不限於 IgG 之特定類別。此係指可適當使用人類 IgG1、IgG2、IgG3、或 IgG4 之 Fc 區域當做母 FcRn 結合域。同樣地，本說明書中，意指可將來自於前述任意生物之 IgG 之任意類別或次類之 Fc 區域，較佳為當做母 FcRn 結合域。天然存在之 IgG 之變異體或經操作之型，例如公知文獻(Curr. Opin. Biotechnol. (2009) 20 (6), 685-91、Curr. Opin. Immunol. (2008) 20 (4), 460-470、Protein Eng. Des. Sel. (2010) 23 (4), 195-202、WO2009/086320、WO2008/092117、WO2007/041635、及 WO2006/105338)記載者，但不限定。

【0127】 改變例如包含一以上之變異，例如：取代為與母 FcRn 結合域之胺基酸為不同之胺基酸殘基之變異、或對於母 FcRn 結合域之胺基酸插入一個以上胺基酸殘基或由母 FcRn 結合域之胺基酸有一個以上之胺基酸之缺損等。較佳為改變後之 FcRn 結合域之胺基酸序列中，至少部分包含至少天然未產生之 FcRn 結合域之胺基酸序列。如此的變種必然與母 FcRn 結合

域有低於 100%之序列同一性或類似性。較佳實施形態中，變種與母 FcRn 結合域之胺基酸序列有約 75%~低於 100%之胺基酸序列同一性或類似性，更佳為約 80%~低於 100%，更佳為約 85%~低於 100%，又更佳為約 90%~低於 100%、最佳為約 95%~低於 100%之同一性或類似性之胺基酸序列。本發明之一非限定態樣中，母 FcRn 結合域及本發明之經改變之 FcRn 結合域之間，有至少 1 個胺基酸的差異。母 FcRn 結合域與改變 FcRn 結合域之胺基酸之不同，也可利用尤其以前述 EU 編號法指定之胺基酸殘基之位置之指定之胺基酸差異而理想地指定。

【0128】 又，於 pH 酸性域對於人類 FcRn 之結合能比起母人類 IgG 為強之改變，例如表 2。該等改變之中，可以適當選擇於 pH 中性域仍能強化對於人類 FcRn 之結合的改變，並使用在本發明。又，對於 Fv4-IgG1 於酸性條件下與人類 FcRn 之結合可以加強之改變之組合如表 6-1 及 6-2。尤佳之母人類 IgG 之 Fc 區域之改變胺基酸，例如 EU 編號法 237 號、238 號、239 號、248 號、250 號、252 號、254 號、255 號、256 號、257 號、258 號、265 號、270 號、286 號、289 號、297 號、298 號、303 號、305 號、307 號、308 號、309 號、311 號、312 號、314 號、315 號、317 號、325 號、332 號、334 號、360 號、376 號、380 號、382 號、384 號、385 號、386 號、387 號、389 號、424 號、428 號、433 號、434 號及 436 號之位置之胺基酸。

【0129】 尤佳之改變，例如：母 IgG 之 Fc 區域之 EU 編號法 237 號之 Gly 取代為 Met 之胺基酸取代、

- 238 號之 Pro 取代為 Ala 之胺基酸取代、
- 239 號之 Ser 取代為 Lys 之胺基酸取代、
- 248 號之 Lys 取代為 Ile 之胺基酸取代、
- 250 號之 Thr 取代為 Ala、Phe、Ile、Met、Gln、Ser、Val、
Trp、或 Tyr 之胺基酸取代、
- 252 號之 Met 取代為 Phe、Trp、或 Tyr 之胺基酸取代、
- 254 號之 Ser 取代為 Thr 之胺基酸取代、
- 255 號之 Arg 取代為 Glu 之胺基酸取代、
- 256 號之 Thr 取代為 Asp、Glu、或 Gln 之胺基酸取代、
- 257 號之 Pro 取代為 Ala、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、
Thr、或 Val 之胺基酸取代、
- 258 號之 Glu 取代為 His 之胺基酸取代、
- 265 號之 Asp 取代為 Ala 之胺基酸取代、
- 270 號之 Asp 取代為 Phe 之胺基酸取代、
- 286 號之 Asn 取代為 Ala 或 Glu 之胺基酸取代、
- 289 號之 Thr 取代為 His 之胺基酸取代、
- 297 號之 Asn 取代為 Ala 之胺基酸取代、
- 298 號之 Ser 取代為 Gly 之胺基酸取代、
- 303 號之 Val 取代為 Ala 之胺基酸取代、
- 305 號之 Val 取代為 Ala 之胺基酸取代、
- 307 號之 Thr 取代為 Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、
Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、Trp、或 Tyr 之
胺基酸取代、
- 308 號之 Val 取代為 Ala、Phe、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、

或 Thr 之胺基酸取代、

309 號之 Leu 或 Val 取代為 Ala、Asp、Glu、Pro、或 Arg 之胺基酸取代、

311 號之 Gln 取代為 Ala、His、或 Ile 之胺基酸取代、

312 號之 Asp 取代為 Ala 或 His 之胺基酸取代、

314 號之 Leu 取代為 Lys 或 Arg 之胺基酸取代、

315 號之 Asn 取代為 Ala 或 His 之胺基酸取代、

317 號之 Lys 取代為 Ala 之胺基酸取代、

325 號之 Asn 取代為 Gly 之胺基酸取代、

332 號之 Ile 取代為 Val 之胺基酸取代、

334 號之 Lys 取代為 Leu 之胺基酸取代、

360 號之 Lys 取代為 His 之胺基酸取代、

376 號之 Asp 取代為 Ala 之胺基酸取代、

380 號之 Glu 取代為 Ala 之胺基酸取代、

382 號之 Glu 取代為 Ala 之胺基酸取代、

384 號之 Asn 或 Ser 取代為 Ala 之胺基酸取代、

385 號之 Gly 取代為 Asp 或 His 之胺基酸取代、

386 號之 Gln 取代為 Pro 之胺基酸取代、

387 號之 Pro 取代為 Glu 之胺基酸取代、

389 號之 Asn 取代為 Ala 或 Ser 之胺基酸取代、

424 號之 Ser 取代為 Ala 之胺基酸取代、

428 號之 Met 取代為 Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、Trp、或 Tyr 之胺基酸取代、

433 號之 His 取代為 Lys 之胺基酸取代、

434 號之 Asn 取代為 Ala、Phe、His、Ser、Trp、或 Tyr 之胺基酸取代、及

436 號之 Tyr 或 Phe 取代為 His 之胺基酸取代。

【0130】 改變之胺基酸數目不特別限定，可僅改變 1 處胺基酸，也可改變 2 處以上之胺基酸。2 處以上之胺基酸之改變之組合，例如表 3 記載之組合。又，可以使於 pH 酸性域對於人類 FcRn 之結合比起母人類 IgG 為加強之改變之組合，如表 4-1~4-5。該等改變之中，可以適當選擇於 pH 中性域也能加強對於人類 FcRn 之結合的改變的組合，使用在本發明。再者，相對於 Fv4-IgG1，於中性條件下加強對於人類 FcRn 之結合的改變的組合，如表 5-1 及 5-2。

【0131】 藉由將選自於該等胺基酸中至少 1 個胺基酸取代為其他胺基酸，能提高於抗原結合分子之 pH 中性域之人類 FcRn 結合活性。

【0132】 【表 1】

位置	胺基酸改變
256	P
280	K
339	T
385	H
428	L
434	W, Y, F, A, H

【0133】 【表 2】

位置	胺基酸改變	位置	胺基酸改變
221	Y, K	299	W, F, H, Y
222	Y	300	K, A, G, V, M, Q, N, E
223	E, K	301	E
224	Y, E	302	I
225	E, K, W	303	Y, E, A
227	K, E, G	304	N, T
228	Y, K, G	305	A, H
230	E, G	306	Y
232	K	307	A, E, M, G, Q, H
233	R, S, M, T, W, Y, G	308	A, R, F, C, Y, W, N, H
234	H, R, E, I, V, F, D, Y, G	311	A, I, K, L, M, V, W, T, H
235	Y, V, N, S, T, Q, D	312	A, P, H
236	I, V, K, P, E, Q, H, W, Y, D, T, M, A, F, S, N, R	315	T, H
237	I, W, S, T, E, R, N, Q, K, H, D, P, L, M	316	K
238	A, L, D, S, T, H, W, V, I, G, M, F, E, K	317	A, P, H
239	M, R, T, G, V, E, D, L, A	318	N, T, R, L, Y
240	I, M, T	319	L, I, W, H, M, V, A
241	E, W, L	320	L, W, H, N
243	E, W	324	T, D
244	L	325	F, M, D
245	R	326	A
246	Y, H	327	D, K, M, Y, H, L
247	D	328	G, A, W, R, F
248	Y	329	K, R, W
249	P, Q, Y, H	330	G, W, V, P, H, F
250	I, E, Q	331	L, F, Y
251	T, D	332	F, H, K, L, M, R, S, W, T, Q, E, Y, D, N, V
252	Y, W, Q	333	L, F, M, A
254	H	334	A
255	E, Y, H	335	H, F, N, V, M, W, I, S, P, L
256	A	336	E, K
257	A, I, M, N, S, V, T, L, Y, C	337	A
258	D, Y, H, A	338	A
259	I, F, N	339	N, W
260	S, D, E, H, Y	341	P
262	L, E	343	E, H, K, Q, R, T, Y
263	I	360	H, A
264	F, A, I, T, N, S, D	362	A
265	R, P, G, A	375	R
266	I	376	A, G, I, M, P, T, V
267	K, E, A	377	K
268	E, M	378	Q, D, N, W
269	M, W, K, P, I, S, G, V, F, Y, A	380	A, N, S, T, Q, R, H
270	K, S, I, A	382	A, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y
271	A, V, S, Y, I, T	385	N, E
272	A, L, R, I, D, H, V, W, Y, P, T	386	H
274	M, F, G, E, I, T, N	387	H, Q
276	D, F, H, R, L, V, W, A	414	A
278	R, S, V, M, N, I, L, D	423	N
279	A, D, G, H, M, N, Q, R, S, T, W, Y, C, I	424	A
281	D, Y	426	H, L, V, R
282	G, K, E, Y	427	N
283	A, D, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, W, Y	428	F
284	T, L, Q, E	429	Q
285	N, Y, W, Q, K, E, D, Y	430	A, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, Y
286	F, L, Y, E, P, D, K, A	431	H, K
287	S, H	432	H
288	N, P, Y, H, D, I, V, C, E, G, L, Q, R	433	P
289	H	434	G, T, M, S,
291	Q, H	435	K
292	Y, E, D	436	I, L, T
293	V	437	H
294	I, K, G	438	K, L, T, W
295	V, T	440	K
296	E, I, L	442	K
298	F, E, T, H		

【0134】 【表 3】

胺基酸改變之組合
M252Y/S254T/T256E
M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F/Y436H
H433K/N434F/Y436H
T307A/E380A
T307A/E380A/N434H
T307A/E380A/N434A
N434H/N315H
N434H/T289H
N434H/T370A/E380A
T250Q/M428L
T250Q/N434A
M252W/N434A
M252Y/N434A
T256A/N434A
T256D/N434A
T256E/N434A
T256S/N434A
P257I/Q311I
T307A/N434A
T307E/N434A
T307Q/N434A
V308P/N434A
L309G/N434A
Q311H/N434A
Q311R/N434A
N315D/N434A
A378V/N434A
E380S/N434A
E382V/N434A
S424E/N434A
M428L/N434A
N434A/Y436I
T437Q/N434A
T437R/N434A

【0135】 【表 4-1】

胺基酸改變之組合
L234I/L235D
G236A/V308F/I332E
G236R/L328R
G236A/I332E/N434S
S239E/V264I/A330Y/I332E
S239E/V264I/I332E
S239E/V264I/S298A/A330Y/I332E
S239D/D265H/N297D/I332E
S239D/E272Y/I332E
S239D/E272S/I332E
S239D/E272I/I332E
S239D/N297D/I332E
S239D/K326T/I332E
S239Q/I332Q
S239Q/I332N
S239D/I332D
S239D/I332E
S239Q/I332E
S239E/I332E
F241W/F243W
F241Y/F243Y/V262T/V264T
F241W/F243W/V262A/V264A
F241L/V262I
F243L/V262I/V264W
F243L/K288D/R292P/Y300L/V305I/P396L/H435K
F243L/K288D/R292P/Y300L/H435K
F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L/H435K
P245G/V308F
T250I/V259I/V308F
T250I/V308F
T250I/V308F/N434S
T250Q/V308F/M428L
T250Q/M428L
L251I/N434S
L251N/N434S
L251F/N434S
L251V/N434S
L251M/N434S
T252L/T254S/T256F
M252Y/S254T/T256E/N434M
M252Y/S254T/T256E/M428L/N434S
M252Y/S254T/T256E
M252Y/S254T/T256E/V308F
M252Y/S254T/T256E/N434S
M252Y/S254T/T256E/N434A
M252Y/S254T/T256E/M428L
M252Y/S254T/T256E/T307Q
M252F/T256D
M252Y/T256Q
M252Y/P257L
M252Y/P257N
M252Y/V259I
M252Y/V279Q
M252Y/V308P/N434Y
M252Q/V308F
M252Y/V308F

【0136】 表 4-2 係接續表 4-1。

【表 4-2】

M252Q/V308F/N434S
M252Y/V308F/M428L
M252Y/V308F/N434M
M252Y/V308F/N434S
M252Y/Y319I
M252Q/M428L/N434S
M252Y/M428L
M252Y/N434M
M252Y/N434S
M252Y/N434A
M252Y/N434Y
S254T/V308F
R255H/N434A
R255Q/N434S
R255H/N434S
T256V/V308F
T256P/Q311I
T256P/I332E
T256P/I332F/S440Y
T256P/E430Q
T256P/N434H
T256E/N434Y
T256P/S440Y
P257Y/V279Q
P257L/V279E
P257N/V279Q
P257N/V279E
P257N/V279Y
P257L/V279Q
P257N/~281S
P257L/~281S
P257N/V284E
P257N/L306Y
P257L/V308Y
P257L/V308F
P257N/V308Y
P257I/Q311I/N434H
P257L/Q311V
P257L/G385N
P257L/M428L
P257I/E430Q
P257I/N434H
P257L/N434Y
E258H/N434A
E258H/N434H
V259I/T307Q/V308F
V259I/V308F
V259I/V308F/Y319L
V259I/V308F/Y319I
V259A/V308F
V259I/V308F/N434M
V259I/V308F/N434S
V259I/V308F/M428L/N434S
V259I/V308F/M428L
V259I/Y319I
V259I/Y319I/N434S
V259I/M428L
V259I/M428L/N434S
V259I/N434S

【0137】 表 4-3 係接續表 4-2。

【表 4-3】

V259L/N434Y
V264L/A330L/I332E
V264I/I332E
D265F/N297E/I332E
S267L/A327S
E272R/V279L
V279E/V284E
V279Q/L306Y
V279Y/V308F
V279Q/V308F
V279Q/G385H
^281S/V308Y
^281S/V308F
^281S/N434Y
E283F/V284E
V284E/V308F
V284E/G385H
K288A/N434A
K288D/H435K
K288V/H435D
T289H/N434A
T289H/N434H
L306I/V308F
T307P/V308F
T307Q/V308F/N434S
T307Q/V308F/Y319L
T307S/V308F
T307Q/V308F
T307A/E310A/N434A
T307Q/E380A/N434A
T307Q/M428L
T307Q/N434M
T307I/N434S
T307V/N434S
T307Q/N434S
T307Q/N434Y
V308T/L309P/Q311S
V308F/L309Y
V308F/Q311V
V308F/Y319F
V308F/Y319I/N434M
V308F/Y319I
V308F/Y319L
V308F/Y319I/M428L
V308F/Y319I/M428L/N434S
V308F/Y319L/N434S
V308F/I332E
V308F/G385H
V308F/M428L/N434M
V308F/M428L
V308F/M428L/N434S
V308P/N434Y
V308F/N434M
V308F/N434S
V308F/N434Y
Q311G/N434S
Q311D/N434S
Q311E/N434S
Q311N/N434S

【0138】 表 4-4 係接續表 4-3。

【表 4-4】

Q311Y/N434S
Q311F/N434S
Q311W/N434S
Q311A/N434S
Q311K/N434S
Q311T/N434S
Q311R/N434S
Q311L/N434S
Q311M/N434S
Q311V/N434S
Q311I/N434S
Q311A/N434Y
D312H/N434A
D312H/N434H
L314Q/N434S
L314V/N434S
L314M/N434S
L314F/N434S
L314I/N434S
N315H/N434A
N315H/N434H
Y319I/V308F
Y319I/M428L
Y319I/M428L/N434S
Y319I/N434M
Y319I/N434S
L328H/I332E
L328N/I332E
L328E/I332E
L328I/I332E
L328Q/I332E
L328D/I332E
L328R/M428L/N434S
A330L/I332E
A330Y/I332E
I332E/D376V
I332E/N434S
P343R/E345D
D376V/E430Q
D376V/E430R
D376V/N434H
E380A/N434A
G385R/Q386T/P387R/N389P
G385D/Q386P/N389S
N414F/Y416H
M428L/N434M
M428L/N434S
M428L/N434A
M428L/N434Y
I1429N/N434S
E430D/N434S
E430T/N434S
E430S/N434S
E430A/N434S
E430F/N434S
E430Q/N434S
E430L/N434S
E430I/N434S
A431T/N434S

【0139】 表 4-5 係接續表 4-4。

【表 4-5】

A431S/N434S
A431G/N434S
A431V/N434S
A431N/N434S
A431F/N434S
A431H/N434S
L432F/N434S
L432N/N434S
L432Q/N434S
L432H/N434S
L432G/N434S
L432I/N434S
L432V/N434S
L432A/N434S
H433K/N434F
H433L/N434S
H433M/N434S
H433A/N434S
H433V/N434S
H433K/N434S
H433S/N434S
H433P/N434S
N434S/M428L
N434S/Y436D
N434S/Y436Q
N434S/Y436M
N434S/Y436G
N434S/Y436E
N434S/Y436F
N434S/Y436T
N434S/Y436R
N434S/Y436S
N434S/Y436H
N434S/Y436K
N434S/Y436L
N434S/Y436V
N434S/Y436W
N434S/Y436I
N434S/T437I

【0140】 【表 5-1】

改變體名	KD (M)	胺基酸改變
IgG1	ND	無
IgG1-v1	3.2E-06	M252Y/S254T/T256E
IgG1-v2	8.1E-07	N434W
IgG1-F3	2.5E-06	N434Y
IgG1-F4	5.8E-06	N434S
IgG1-F5	6.8E-06	N434A
IgG1-F7	5.6E-06	M252Y
IgG1-F8	4.2E-06	M252W
IgG1-F9	1.4E-07	M252Y/S254T/T256E/N434Y
IgG1-F10	6.9E-08	M252Y/S254T/T256E/N434W
IgG1-F11	3.1E-07	M252Y/N434Y
IgG1-F12	1.7E-07	M252Y/N434W
IgG1-F13	3.2E-07	M252W/N434Y
IgG1-F14	1.8E-07	M252W/N434W
IgG1-F19	4.6E-07	P257L/N434Y
IgG1-F20	4.6E-07	V308F/N434Y
IgG1-F21	3.0E-08	M252Y/V308P/N434Y
IgG1-F22	2.0E-06	M428L/N434S
IgG1-F25	9.2E-09	M252Y/S254T/T256E/V308P/N434W
IgG1-F26	1.0E-06	I332V
IgG1-F27	7.4E-06	G237M
IgG1-F29	1.4E-06	I332V/N434Y
IgG1-F31	2.8E-06	G237M/V308F
IgG1-F32	8.0E-07	S254T/N434W
IgG1-F33	2.3E-06	S254T/N434Y
IgG1-F34	2.8E-07	T256E/N434W
IgG1-F35	8.4E-07	T256E/N434Y
IgG1-F36	3.6E-07	S254T/T256E/N434W
IgG1-F37	1.1E-06	S254T/T256E/N434Y
IgG1-F38	1.0E-07	M252Y/S254T/N434W
IgG1-F39	3.0E-07	M252Y/S254T/N434Y
IgG1-F40	8.2E-08	M252Y/T256E/N434W
IgG1-F41	1.5E-07	M252Y/T256E/N434Y
IgG1-F42	1.0E-06	M252Y/S254T/T256E/N434A
IgG1-F43	1.7E-06	M252Y/N434A
IgG1-F44	1.1E-06	M252W/N434A
IgG1-F47	2.4E-07	M252Y/T256Q/N434W
IgG1-F48	3.2E-07	M252Y/T256Q/N434Y
IgG1-F49	5.1E-07	M252F/T256D/N434W
IgG1-F50	1.2E-06	M252F/T256D/N434Y
IgG1-F51	8.1E-06	N434F/Y436H
IgG1-F52	3.1E-06	H433K/N434F/Y436H
IgG1-F53	1.0E-06	I332V/N434W
IgG1-F54	8.4E-08	V308P/N434W
IgG1-F56	9.4E-07	I332V/M428L/N434Y

【0141】 表 5-2 係接續表 5-1。

【表 5-2】

IgG1-F57	1.1E-05	G385D/Q386P/N389S
IgG1-F58	7.7E-07	G385D/Q386P/N389S/N434W
IgG1-F59	2.4E-06	G385D/Q386P/N389S/N434Y
IgG1-F60	1.1E-05	G385H
IgG1-F61	9.7E-07	G385H/N434W
IgG1-F62	1.9E-06	G385H/N434Y
IgG1-F63	2.5E-06	N434F
IgG1-F64	5.3E-06	N434H
IgG1-F65	2.9E-07	M252Y/S254T/T256E/N434F
IgG1-F66	4.3E-07	M252Y/S254T/T256E/N434H
IgG1-F67	6.3E-07	M252Y/N434F
IgG1-F68	9.3E-07	M252Y/N434H
IgG1-F69	5.1E-07	M428L/N434W
IgG1-F70	1.5E-06	M428L/N434Y
IgG1-F71	8.3E-08	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434W
IgG1-F72	2.0E-07	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434Y
IgG1-F73	1.7E-07	M252Y/M428L/N434W
IgG1-F74	4.6E-07	M252Y/M428L/N434Y
IgG1-F75	1.4E-06	M252Y/M428L/N434A
IgG1-F76	1.0E-06	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434A
IgG1-F77	9.9E-07	T256E/M428L/N434Y
IgG1-F78	7.8E-07	S254T/M428L/N434W
IgG1-F79	5.9E-06	S254T/T256E/N434A
IgG1-F80	2.7E-06	M252Y/T256Q/N434A
IgG1-F81	1.6E-06	M252Y/T256E/N434A
IgG1-F82	1.1E-06	T256Q/N434W
IgG1-F83	2.6E-06	T256Q/N434Y
IgG1-F84	2.8E-07	M252W/T256Q/N434W
IgG1-F85	5.5E-07	M252W/T256Q/N434Y
IgG1-F86	1.5E-06	S254T/T256Q/N434W
IgG1-F87	4.3E-06	S254T/T256Q/N434Y
IgG1-F88	1.9E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434W
IgG1-F89	3.6E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434Y
IgG1-F90	1.9E-08	M252Y/T256E/V308P/N434W
IgG1-F91	4.8E-08	M252Y/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F92	1.1E-08	M252Y/S254T/T256E/V308P/M428L/N434W
IgG1-F93	7.4E-07	M252W/M428L/N434W
IgG1-F94	3.7E-07	P257L/M428L/N434Y
IgG1-F95	2.6E-07	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434F
IgG1-F99	6.2E-07	M252Y/T256E/N434H

【0142】 【表 6-1】

變異體名	KD (M)	胺基酸改變
IgG1	ND	無
IgG1-v1	3.2E-06	M252Y/S254T/T256E
IgG1-v2	8.1E-07	N434W
IgG1-F3	2.5E-06	N434Y
IgG1-F4	5.8E-06	N434S
IgG1-F5	6.8E-06	N434A
IgG1-F7	5.6E-06	M252Y
IgG1-F8	4.2E-06	M252W
IgG1-F9	1.4E-07	M252Y/S254T/T256E/N434Y
IgG1-F10	6.9E-08	M252Y/S254T/T256E/N434W
IgG1-F11	3.1E-07	M252Y/N434Y
IgG1-F12	1.7E-07	M252Y/N434W
IgG1-F13	3.2E-07	M252W/N434Y
IgG1-F14	1.8E-07	M252W/N434W
IgG1-F19	4.6E-07	P257L/N434Y
IgG1-F20	4.6E-07	V308F/N434Y
IgG1-F21	3.0E-08	M252Y/V308P/N434Y
IgG1-F22	2.0E-06	M428L/N434S
IgG1-F25	9.2E-09	M252Y/S254T/T256E/V308P/N434W
IgG1-F26	1.0E-06	I332V
IgG1-F27	7.4E-06	G237M
IgG1-F29	1.4E-06	I332V/N434Y
IgG1-F31	2.8E-06	G237M/V308F
IgG1-F32	8.0E-07	S254T/N434W
IgG1-F33	2.3E-06	S254T/N434Y
IgG1-F34	2.8E-07	T256E/N434W
IgG1-F35	8.4E-07	T256E/N434Y
IgG1-F36	3.6E-07	S254T/T256E/N434W
IgG1-F37	1.1E-06	S254T/T256E/N434Y
IgG1-F38	1.0E-07	M252Y/S254T/N434W
IgG1-F39	3.0E-07	M252Y/S254T/N434Y
IgG1-F40	8.2E-08	M252Y/T256E/N434W
IgG1-F41	1.5E-07	M252Y/T256E/N434Y
IgG1-F42	1.0E-06	M252Y/S254T/T256E/N434A
IgG1-F43	1.7E-06	M252Y/N434A
IgG1-F44	1.1E-06	M252W/N434A
IgG1-F47	2.4E-07	M252Y/T256Q/N434W
IgG1-F48	3.2E-07	M252Y/T256Q/N434Y
IgG1-F49	5.1E-07	M252F/T256D/N434W
IgG1-F50	1.2E-06	M252F/T256D/N434Y
IgG1-F51	8.1E-06	N434F/Y436H
IgG1-F52	3.1E-06	H433K/N434F/Y436H
IgG1-F53	1.0E-06	I332V/N434W
IgG1-F54	8.4E-08	V308P/N434W
IgG1-F56	9.4E-07	I332V/M428L/N434Y
IgG1-F57	1.1E-05	G385D/Q386P/N389S
IgG1-F58	7.7E-07	G385D/Q386P/N389S/N434W
IgG1-F59	2.4E-06	G385D/Q386P/N389S/N434Y
IgG1-F60	1.1E-05	G385H
IgG1-F61	9.7E-07	G385H/N434W
IgG1-F62	1.9E-06	G385H/N434Y
IgG1-F63	2.5E-06	N434F
IgG1-F64	5.3E-06	N434H

【0143】 表 6-2 係接續表 6-1。

【表 6-2】

IgG1-F65	2.9E-07	M252Y/S254T/T256E/N434F
IgG1-F66	4.3E-07	M252Y/S254T/T256E/N434H
IgG1-F67	6.3E-07	M252Y/N434F
IgG1-F68	9.3E-07	M252Y/N434H
IgG1-F69	5.1E-07	M428L/N434W
IgG1-F70	1.5E-06	M428L/N434Y
IgG1-F71	8.3E-08	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434W
IgG1-F72	2.0E-07	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434Y
IgG1-F73	1.7E-07	M252Y/M428L/N434W
IgG1-F74	4.6E-07	M252Y/M428L/N434Y
IgG1-F75	1.4E-06	M252Y/M428L/N434A
IgG1-F76	1.0E-06	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434A
IgG1-F77	9.9E-07	T256E/M428L/N434Y
IgG1-F78	7.8E-07	S254T/M428L/N434W
IgG1-F79	5.9E-06	S254T/T256E/N434A
IgG1-F80	2.7E-06	M252Y/T256Q/N434A
IgG1-F81	1.6E-06	M252Y/T256E/N434A
IgG1-F82	1.1E-06	T256Q/N434W
IgG1-F83	2.6E-06	T256Q/N434Y
IgG1-F84	2.8E-07	M252W/T256Q/N434W
IgG1-F85	5.5E-07	M252W/T256Q/N434Y
IgG1-F86	1.5E-06	S254T/T256Q/N434W
IgG1-F87	4.3E-06	S254T/T256Q/N434Y
IgG1-F88	1.9E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434W
IgG1-F89	3.6E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434Y
IgG1-F90	1.9E-08	M252Y/T256E/V308P/N434W
IgG1-F91	4.8E-08	M252Y/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F92	1.1E-08	M252Y/S254T/T256E/V308P/M428L/N434W
IgG1-F93	7.4E-07	M252W/M428L/N434W
IgG1-F94	3.7E-07	P257L/M428L/N434Y
IgG1-F95	2.6E-07	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434F
IgG1-F99	6.2E-07	M252Y/T256E/N434H

【0144】 針對該等胺基酸改變，可使用公知技術適當實施，例如 Drug Metab Dispos. 2007 Jan;35(1):86-94、Int Immunol. 2006 Dec;18(12):1759-69、J Biol Chem. 2001 Mar 2;276(9):6591-604、J Biol Chem. 2007;282(3):1709-17、J Immunol. 2002;169(9):5171-80、J Immunol. 2009;182(12):7663-71、Molecular Cell, Vol. 7, 867-877, April, 2001、Nat Biotechnol. 1997 Jul;15(7):637-40、Nat Biotechnol. 2005 Oct;23(10):1283-8、Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Dec

5;103(49):18709-14 、 EP2154157 、 US20070141052 、 WO2000/042072 、 WO2002/060919 、 WO2006/020114 、 WO2006/031370 、 WO2010/033279 、 WO2006/053301 、 WO2009/086320 中，係進行人類天然型 IgG1 之 Fc 區域之改變。

【0145】 依照 The Journal of Immunology,2009 182: 7663-7671, pH 酸性域(pH6.0)之人類天然型 IgG1 之人類 FcRn 結合活性為 KD 1.7 μ M, 於 pH 中性域, 人類天然型 IgG1 幾乎無法檢測到人類 FcRn 結合活性。因此, 本發明之方法使用之抗原結合分子之較佳態樣, 例如在 pH 酸性域之人類 FcRn 結合活性為 KD 20 μ M 以下且於 pH 中性域之人類 FcRn 結合活性為人類天然型 IgG1 以上之抗原結合分子。更佳態樣為例如於 pH 酸性域之人類 FcRn 結合活性為 KD 2.0 μ M 以下且於 pH 中性域之人類 FcRn 結合活性為 KD 40 μ M 以下之抗原結合分子。更佳態樣例如於 pH 酸性域之人類 FcRn 結合活性為 KD 0.5 μ M 以下且於 pH 中性域之人類 FcRn 結合活性為 KD 15 μ M 以下之抗原結合分子。亦即, 宜使抗原結合分子於酸性 pH 條件下之抗原結合活性低於在中性 pH 條件下之抗原結合活性。又, 在此所示之 KD 值, 係以 The Journal of Immunology,2009 182: 7663-7671 記載之方法(將抗原結合分子固定於晶片, 而流過人類 FcRn 當做分析物)測定時之值。

【0146】 人類 FcRn 結合活性之值可使用 KD(解離定數), 但由於人類天然型 IgG1 於 pH 中性域(pH7.4)幾乎不認為有人類 FcRn 結合活性, 故計算 KD 有所困難。就判斷於 pH7.4 之人類 FcRn 結合活性是否高於人類天然型 IgG1 之方法而言, 例

如於 Biacore 以相同濃度流過分析物時之結合回應的大小判斷之方法。亦即，若於 pH7.4 對於固定化有抗原結合分子之晶片流過人類 FcRn 時之回應大過於 pH7.4 對於固定化有人類天然型 IgG1 之晶片流過人類 FcRn 時之回應，則可判斷該抗原結合分子於 pH7.4 之人類 FcRn 結合活性高於人類天然型 IgG1。

【0147】 pH7.0 也可當做 pH 中性域使用。中性 pH 藉由使用 pH7.0，可以促進人類 FcRn 與 FcRn 結合域之弱的交互作用。就測定條件使用之溫度而言，可於 10°C~50°C 之任意溫度評價結合親和性。較佳為為了決定人類 FcRn 結合域與人類 FcRn 之結合親和性，使用 15°C~40°C 之溫度。更佳為為了決定人類 FcRn 結合域與人類 FcRn 之間的結合親和性，同樣使用 20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、及 35°C 任一由 20°C 至 35°C 之任意溫度。實施例 5 記載之 25°C 的此溫度，係關於本發明之態樣之一例。於較佳態樣中，人類 FcRn 與 FcRn 結合域之交互作用，可如實施例 5 記載，於 pH7.0 及 25°C 測定。抗原結合分子對於人類 FcRn 之結合親和性，可如實施例 3 記載，以 Biacore 測定。

【0148】 更佳態樣中，本發明之抗原結合分子於 pH7.0 及 25°C，具有比起天然型人類 IgG 為高之人類 FcRn 結合活性。更佳態樣中，於 pH7.0 及 25°C 之人類 FcRn 結合活性，係比天然型人類 IgG 高 28 倍，或強 KD 3.2 μ M。更佳態樣中，於 pH7.0 及 25°C 之人類 FcRn 結合活性，比天然型人類 IgG 高 38 倍、或強 KD 2.3 μ M。

【0149】 天然型人類 IgG1、IgG2、IgG3、或 IgG4，較佳為

關於人類 FcRn 結合活性或活體內的結合活性，用於與抗原結合分子比較之參考天然型人類 IgG 用途的天然型人類 IgG。較佳為適當使用與目的之抗原結合分子含相同抗原結合域及就人類 FcRn 結合域含天然型人類 IgG Fc 區域之參照抗原結合分子。更佳為，天然型人類 IgG1，係用於在關於人類 FcRn 結合活性或活體內之結合活性，與抗原結合分子比較之參照天然型人類 IgG 用途中使用。

【0150】 更具體而言，本發明記載之對於血漿中之抗原消失活性有長期效果之抗原結合分子，係於 pH7.0 及 25°C 比起天然型人類 IgG1 有高 28 倍~440 倍之範圍之 FcRn 結合活性，或有 KD 為 3.0 μ M 至 0.2 μ M 之範圍之 FcRn 結合活性。為了評價本發明之抗原結合分子對於血漿中之抗原消失活性的長期效果，長期間之血漿中抗原濃度，可測定在抗原結合分子投予 2 日後、4 日後、7 日後、14 日後、28 日後、56 日後、或 84 日後，血漿中之總抗原濃度或游離抗原濃度及抗原/抗原結合分子莫耳比而決定。血漿中抗原濃度或抗原/抗原結合分子莫耳比減少是否係由於本發明記載之抗原結合分子而達成，可利用在先前記載之 1 或多數任意時點評價減少而決定。

【0151】 更具體而言，本發明記載之對於血漿中之抗原消失活性具短期效果之抗原結合分子，係於 pH7.0 及 25°C 具有比天然型人類 IgG 高 440 倍之人類 FcRn 結合活性、或 KD 強 0.2 μ M 之 FcRn 結合活性。為了評價本發明之抗原結合分子對於血漿中之抗原消失活性之短期效果，短期間之血漿中抗原濃度，可於抗原結合分子投予 15 分鐘後、1 小時後、2 小時後、

4 小時後、8 小時後、12 小時後、或 24 小時後，藉由測定血漿中之總抗原濃度或游離抗原濃度及抗原/抗原結合分子莫耳比而決定。

【0152】 本發明之方法，不拘於標的抗原種類，可適應於任意之抗原結合分子。

【0153】 例如：抗原結合分子係與膜抗原結合之抗體時，對於活體內投予之抗體係與抗原結合，之後抗體維持與抗原結合並與抗原一起利用內化(internalization)而攝入細胞內之核內體。之後，抗體維持與抗原結合的狀態移動到溶體，抗體與抗原一起由溶體分解。經由內化而從血漿中消失，稱為抗原依存性的消失，已有人報告許多抗體分子(Drug Discov Today. 2006 Jan;11(1-2):81-8)。1 分子之 IgG 抗體以 2 價結合於抗原時，1 分子之抗體係以結合於 2 分子之抗原的狀態內化，並且維持此狀態於溶體被分解。因此，為通常之抗體時，1 分子之 IgG 抗體無法結合於 3 分子以上之抗原。例如為具中和活性之 1 分子之 IgG 抗體時，無法中和 3 分子以上之抗原。

【0154】 IgG 分子之血漿中滯留性較長(消失慢)，係由於已知當做 IgG 分子之再利用(salvage)受體的人類 FcRn 的作用。利用胞飲作用攝入核內體之 IgG 分子，在核內體內之酸性條件下會與在核內體內表現的人類 FcRn 結合。無法結合於人類 FcRn 之 IgG 分子會前進到溶體，於此被分解，但與人類 FcRn 結合之 IgG 分子會移往細胞表面並於血漿中之中性條件下從人類 FcRn 解離，藉此再度回到血漿中。

【0155】 又，抗原結合分子為與可溶型抗原結合之抗體

時，對於活體內投予之抗體會與抗原結合，之後抗體維持與抗原結合的狀態被攝入細胞內。攝入細胞內之抗體中的多數會由 FcRn 而釋放到細胞外，但此時由於以維持結合於抗原之狀態釋放到細胞外，因此無法再度與抗原結合。因此，與和膜抗原結合之抗體同樣，為通常之抗體時，1 分子之 IgG 抗體無法與 3 分子以上之抗原結合。

【0156】 對於抗原會在血漿中之高鈣濃度條件下強力結合，且於核內體內之低鈣濃度條件下從抗原解離之鈣濃度依存性抗原結合抗體，能於核內體內從抗原解離。鈣濃度依存性抗原結合抗體，由於將抗原解離後，抗體會利用 FcRn 於血漿中再循環且能再度與抗原結合，因此 1 個抗體能與多數抗原返覆結合。又，與抗原結合分子結合之抗原藉由於核內體內解離，不會於血漿中再循環，因此能促進利用抗原結合分子所為之使抗原攝入細胞內，並且促進由於抗原結合分子之投予所為之抗原消失，能使血漿中之抗原濃度降低。

【0157】 抗原結合分子

本發明提供一種抗原結合分子，其包含：抗原結合域以及人類 FcRn 結合域，且在 2 個不同之鈣濃度條件下的抗原結合活性相異，抗原結合分子在低鈣濃度條件下之抗原結合活性低於在高鈣濃度條件下之抗原結合活性。

【0158】 本發明之抗原結合分子，只要是具有對於當做對象之抗原的專一性結合活性之抗原結合域即可，不特別限定。抗原結合域之較佳例，例如具抗體之抗原結合區之域。抗體之抗原結合區，例如 CDR 或可變區。抗體之抗原結合區為 CDR

時，也可含有全長抗體所包含之全部 6 個 CDR，也可含 1 個或 2 個以上之 CDR。就抗體之結合區而言含 CDR 時，所含之 CDR 可進行胺基酸之缺損、取代、加成及/或插入等，又也可為 CDR 之一部分。

【0159】 又，本發明之方法中當做對象之抗原結合分子，例如具拮抗物活性之抗原結合分子(拮抗物抗原結合分子)、具促效劑活性之抗原結合分子(促效劑抗原結合分子)、具細胞傷害活性之分子等，但較佳態樣，例如：拮抗物抗原結合分子，尤其認識受體或細胞激素等抗原之拮抗物抗原結合分子。

【0160】 本發明中，成為對象之抗原結合分子不特別限定，可為任意抗原結合分子。本發明使用之抗原結合分子，較佳為具抗原結合活性(抗原結合域)與人類 FcRn 結合域。本發明中，尤以含有與人類 FcRn 之結合域的抗原結合分子較佳。

【0161】 具有抗原結合域與人類 FcRn 結合域之抗原結合分子，例如抗體。本發明之抗體之較佳例，例如 IgG 抗體。抗體使用 IgG 抗體時，其種類不限定，可使用 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 等同功型(次類)之 IgG。又，本發明之抗原結合分子中可含抗體之恆定區，也可在恆定區部分導入胺基酸變異。導入之胺基酸變異，例如：對於 Fc γ 受體之結合增大或減低者 (Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Mar 14;103(11):4005-10.)等，但不限於該等。又，藉由適當選擇 IgG2 等適當恆定區，能使 pH 依存性結合變化。

【0162】 本發明當做對象之抗原結合分子為抗體時，抗體可為小鼠抗體、人類抗體、大鼠抗體、兔抗體、山羊抗體、駱

駝抗體等之類的動物來源之抗體。再者，例如嵌合抗體，其中人類化抗體等將胺基酸序列取代而得之改變抗體亦可。又，也可為二種專一性抗體、使各種分子結合成之抗體修飾物、含抗體片段之多胜肽等。

【0163】 「嵌合抗體」，係指組合不同動物來源的序列而製作之抗體。嵌合抗體之具體例，例如：由小鼠抗體之重鏈、輕鏈之可變(V)區與人類抗體之重鏈、輕鏈之固定(C)區構成的抗體。

【0164】 「人類化抗體」，也稱為再構成(reshaped)人類抗體，係將人類以外之哺乳動物來源之抗體，例如小鼠抗體之互補性決定區(CDR;complementarity determining region)移植到人類抗體之 CDR 者。用於鑑定 CDR 之方法為公知(Kabat et al., Sequence of Proteins of Immunological Interest (1987), National Institute of Health, Bethesda, Md.; Chothia et al., Nature (1989) 342: 877)。又，其一般的基因重組方法亦為公知(參照歐洲專利申請案公開編號 EP 125023 號公報、WO 96/02576 號公報)。

【0165】 雙專一性抗體，係指在同一抗體分子內具有認識不同抗原決定基之可變區的抗體。二種專一性抗體可為認識 2 種以上不同抗原之抗體，也可為認識同一抗原上之不同的 2 個以上之抗原決定基之抗體。

【0166】 又，含抗體片段之多胜肽，例如：Fab 片段、F(ab')₂ 片段、scFv(Nat Biotechnol. 2005 Sep;23(9):1126-36.)domain antibody(dAb)(WO2004/058821, WO2003/002609) 、

scFv-Fc(WO2005/037989)、dAb-Fc、Fc 融合蛋白質等。含 Fc 區域之分子可將 Fc 區域當做人類 FcRn 結合域使用。又，該等分子可以融合人類 FcRn 結合域。

【0167】再者，本發明能適用之抗原結合分子，也可為抗體狀分子。抗體狀分子(scaffold 分子、胜肽分子)，係指藉由與標靶分子結合而發揮機能之分子(Current Opinion in Biotechnology 2006, 17:653-658、Current Opinion in Biotechnology 2007, 18:1-10、Current Opinion in Structural Biology 1997, 7:463-469、Protein Science 2006, 15:14-27)，例如：DAR Pins(WO2002/020565)、Affibody(WO1995/001937)、Avimer(WO2004/044011, WO2005/040229)、Adnectin(WO2002/032925)等。即使是該等抗體狀分子，也能對於標的分子以鈣濃度依存性結合，促進由於抗原結合分子所致抗原攝入細胞內，促進由於抗原結合分子之投予所致血漿中之抗原濃度減少、並改善抗原結合分子之血漿中滯留性、增加 1 個抗原結合分子所致對於抗原之結合次數增加。

【0168】又，抗原結合分子，也可為與標的結合之受體蛋白質融合有人類 FcRn 結合域之蛋白質，例如：TNFR-Fc 融合蛋白質、IL1R-Fc 融合蛋白質、VEGFR-Fc 融合蛋白質、CTLA4-Fc 融合蛋白質等(Nat Med. 2003 Jan;9(1):47-52、BioDrugs. 2006;20(3):151-60.)。該等為受體人類 FcRn 結合域之融合蛋白質，也能對於標的分子以鈣濃度依存性結合，並且促進由於抗原結合分子所致抗原攝入細胞內，並促進由於抗原結合分子之投予所致血漿中之抗原濃度減少、並改善抗原結合分子之血漿

中滯留性、增加 1 個抗原結合分子對於抗原之結合次數。

【0169】 又，抗原結合分子也可為與標的結合具中和效果之人工配體蛋白質與人類 FcRn 結合域之融合蛋白質，例如：人工配體蛋白質，例如變異 IL-6(EMBO J. 1994 Dec 15;13(24):5863-70.)等。該等人工配體融合蛋白質也能對於標的分子以鈣濃度依存性的結合，並促進抗原結合分子所致抗原攝入細胞內、促進由於抗原結合分子之投予所致血漿中之抗原濃度減少、改善抗原結合分子之血漿中滯留性、增加 1 個抗原結合分子對於抗原之結合次數。

【0170】 再者，本發明之抗體也可有糖鏈改變。糖鏈經改變之抗體之例，例如：糖化經修飾之抗體(WO99/54342 等)、對於糖鏈加成的岩藻糖缺損之抗體(WO00/61739、WO02/31140、WO2006/067847、WO2006/067913 等)、具有有二等分 GlcNAc 之糖鏈的抗體(WO02/79255 等)等。

【0171】 測定對於抗原之結合活性時，離子化鈣濃度以外之條件，可由該技術領域之人士適當選擇，不特別限定。例如可於 HEPES 緩衝液、37℃ 之條件測定。例如可使用 Biacore(GE Healthcare)等測定。抗原結合分子與抗原之結合活性之測定，於抗原為可溶型抗原時，可藉由於固定化有抗原結合分子之晶片，使抗原當做分析物流過，而評價對於可溶型抗原之結合活性，抗原為膜型抗原時，可藉由於固定化有抗原之晶片，使抗原結合分子當做分析物而流過，以評價對於膜型抗原之結合活性。

【0172】 本發明之抗原結合分子中，只要在低鈣濃度條件

下之抗原結合活性弱於在高鈣濃度條件下之抗原結合活性，則在低鈣濃度條件下之抗原結合活性與於高鈣濃度條件下之抗原結合活性之比不特別限定，較佳為對於抗原在低鈣濃度條件下之 KD (Dissociation constant: 解離常數) 與高鈣濃度條件下之 KD 之比 $KD(Ca\ 3\mu M)/KD(Ca\ 2\ mM)$ 之值為 2 以上，更佳為 $KD(Ca\ 3\mu M)/KD(Ca\ 2\ mM)$ 之值為 10 以上，又更佳為 $KD(Ca\ 3\mu M)/KD(Ca\ 2\ mM)$ 之值為 40 以上。 $KD(Ca\ 3\mu M)/KD(Ca\ 2\ mM)$ 之值之上限不特別限定，只要是該技術領域之人士之技術能製作，可為 400、1000、10000 等各種值。

【0173】 就抗原結合活性之值而言，於抗原為可溶型抗原時，可使用 KD (解離常數)，抗原為膜型抗原時，可使用視 KD (Apparent dissociation constant: 視解離常數)。 KD (解離常數)、及、視 KD (視解離常數)，可利用該技術領域之人士公知之方法測定，例如可使用 Biacore(GE healthcare)、Scatchard 作圖法、流式細胞計數儀等。

【0174】 又，本發明之抗原結合分子中，代表在低鈣濃度條件下之抗原結合活性與於高鈣濃度條件下之抗原結合活性之比的另一指標，例如可使用解離速度常數 k_d (Dissociation rate constant: 解離速度常數)。代表結合活性之比之指標，使用 k_d (解離速度常數) 代替 KD (解離常數) 時，對於抗原在低鈣濃度條件下之 k_d (解離速度常數) 與高鈣濃度條件下之 k_d (解離速度常數) 之比 $k_d(\text{低鈣濃度條件下})/k_d(\text{高鈣濃度條件下})$ 之值，較佳為 2 以上，更佳為 5 以上，更佳為 10 以上，又更佳為 30 以上。 $k_d(\text{低鈣濃度條件下})/k_d(\text{高鈣濃度條件下})$ 之值之上限不特

別限定，只要該技術領域之人士之技術常識能製作，可為 50、100、200 等各種值。

【0175】 抗原結合活性之值，於抗原為可溶型抗原時，可使用 k_d (解離速度常數)，於抗原為膜型抗原時，可使用視 k_d (Apparent dissociation rate constant: 視解離速度常數)。 k_d (解離速度常數)、及視 k_d (視解離速度常數)，可以由該技術領域之人士公知之方法測定，例如可使用 Biacore(GE healthcare)、流式細胞計數儀等。

【0176】 又，本發明中，測定不同鈣濃度之抗原結合分子之抗原結合活性時，鈣濃度以外之條件宜為相同。

【0177】 為了獲得在低鈣濃度條件下之抗原結合活性低於在高鈣濃度條件下之抗原結合活性之抗原結合分子，使抗原結合分子在低鈣濃度條件下之抗原結合活性低於在高鈣濃度條件下之抗原結合活性(減弱)之方法(賦予鈣濃度依存性抗原結合活性之方法)，不特別限定。在低鈣濃度條件下之抗原結合活性低於高鈣濃度條件下之抗原結合活性(較弱)之抗原結合分子(顯示鈣濃度依存性結合之抗原結合分子)，例如可從藉由於體外(in vitro)呈現的抗體庫以如上述對於抗原之鈣濃度依存性結合為指標進行篩選，而直接取得。

【0178】 其他方法，例如有直接取得具有如此性質之抗原結合分子之方法。例如:將對於動物(小鼠、大鼠、倉鼠、兔、人類免疫球蛋白基因轉殖小鼠、人類免疫球蛋白基因轉殖大鼠、人類免疫球蛋白基因轉殖兔、羊駝、駱駝等)以抗原進行免疫而得之抗體，以對於抗原之鈣濃度依存性結合為指標進行

篩選，直接去得具目的性質之抗體亦可。又，也可對於抗原結合分子中之胺基酸序列導入無規變異，依照上述方法，測定於不同鈣濃度條件下之抗原結合分子之抗原結合活性，並與改變前之抗原結合分子比較，選擇在低鈣濃度條件下之抗原結合活性比起於高鈣濃度條件下之抗原結合活性為低者。

【0179】 依照上述方法等，使抗原結合分子在低鈣濃度條件下之抗原結合活性低於在高鈣濃度條件下之抗原結合活性(減弱)($KD(\text{低鈣濃度條件下})/KD(\text{高鈣濃度條件下})$ 之值增大)時，不特別限定，較佳為與以 $KD(\text{低鈣濃度條件下})/KD(\text{高鈣濃度條件下})$ 之值比起原本之抗體，通常 2 倍以上，較佳為 5 倍以上，更佳為 10 倍以上者。

【0180】 再者，本發明之賦予鈣濃度依存性抗原結合活性之方法，可藉由使用於中性 pH 具人類 FcRn 結合活性之抗原結合分子、或於中性 pH 賦予人類 FcRn 結合活性或提高之方法予以組合，而能增強促進抗原攝入細胞內之機能、增加 1 分子之抗原結合分子對於抗原之結合次數之機能、促進由於抗原結合分子之投予所致血漿中之抗原濃度減少之機能、或改善抗原結合分子之血漿中滯留性之機能。賦予或提高於中性 pH 之人類 FcRn 結合活性之方法，例如：改變上述人類 FcRn 結合域之胺基酸之方法。在此，「中性 pH 之人類 FcRn 結合活性」，係指於 pH6.7~pH10.0 對於人類 FcRn 之結合活性，較佳之人類 FcRn 結合活性，例如 pH7.0~pH8.0 之間之人類 FcRn 結合活性，更佳之人類 FcRn 結合活性，例如於 pH7.4 之人類 FcRn 結合活性。

【0181】 又，本發明之賦予鈣濃度依存性抗原結合活性之方法，可藉由組合使用在具 pH 依存性抗原結合活性之抗原結合分子、或促進 pH 依存性抗原結合活性之方法，而增強促進抗原攝入細胞內之機能、增加 1 分子之抗原結合分子對於抗原之結合次數之機能、促進由於抗原結合分子之投予減少血漿中之抗原濃度之機能、或改善抗原結合分子之血漿中滯留性之機能。賦予 pH 依存性抗原結合活性之方法，例如：WO2009/125825 記載之方法。

【0182】 具體而言，例如可以組合對於本發明之鈣濃度依存性抗原結合分子，使抗原結合分子於酸性 pH 之抗原結合活性低於中性 pH 之抗原結合活性(減弱)之方法。在此，「酸性 pH 中之抗原結合活性低於中性 pH 之抗原結合活性(減弱)」，係指抗原結合分子於 pH4.0~pH6.5 之抗原結合活性弱於 pH6.7~pH10.0 之抗原結合活性。較佳為抗原結合分子於 pH5.5~pH6.5 之抗原結合活性弱於 pH7.0~pH8.0 之抗原結合活性，尤佳為抗原結合分子於 pH5.8 之抗原結合活性弱於在 pH7.4 之抗原結合活性。本發明中，酸性 pH 通常為 pH4.0~pH6.5，較佳為 pH5.5~pH6.5，尤佳為 pH5.8。又、本發明中，中性 pH 通常為 pH6.7~pH10.0，較佳為 pH7.0~pH8.0，尤佳為 pH7.4。

【0183】 又，抗原結合分子之「於酸性 pH 之抗原結合活性低於中性 pH 之抗原結合活性」，也可表達為抗原結合分子於中性之抗原結合活性高於酸性之 pH 中的抗原結合活性。亦即，本發明中，抗原結合分子於酸性 pH 之抗原結合活性與中

性 pH 之抗原結合活性之差可增大即可(例如如後述， $KD(pH5.8)/KD(pH7.4)$ 之值增大即可)。為了使抗原結合分子於酸性 pH 之抗原結合活性與中性 pH 之抗原結合活性之差加大，例如可減低於酸性 pH 之抗原結合活性，也可增大於中性 pH 之抗原結合活性，或兩者。

【0184】 本發明中，酸性 pH 之抗原結合活性只要弱於中性 pH 之抗原結合活性，則酸性 pH 之抗原結合活性與中性 pH 之抗原結合活性之差不特別限定，較佳為對於抗原於 pH5.8 之 KD 與於 pH7.4 之 KD(Dissociation constant: 解離常數)之比 $KD(pH5.8)/KD(pH7.4)$ 之值為 2 以上，更佳為 $KD(pH5.8)/KD(pH7.4)$ 之值為 10 以上，又更佳為 $KD(pH5.8)/KD(pH7.4)$ 之值為 40 以上。 $KD(pH5.8)/KD(pH7.4)$ 之值之上限不特別限定，只要該技術領域之人士之技術能製作，可為 400、1000、10000 等各種值。

【0185】 又，代表酸性 pH 之抗原結合活性與中性 pH 之抗原結合活性之差之其他指標，例如也可使用解離速度常數 k_d (Dissociation rate constant: 解離速度常數)。代表結合活性之差之指標，當使用 k_d (解離速度常數)代替 KD(解離常數)時，對於抗原於 pH5.8 之 k_d (解離速度常數)與於 pH7.4 之 k_d (解離速度常數)之比 $k_d(pH5.8)/k_d(pH7.4)$ 之值，較佳為 2 以上，更佳為 5 以上，又更佳為 10 以上，再更佳為 30 以上。 $k_d(pH5.8)/k_d(pH7.4)$ 之值之上限不特別限定，只要該技術領域之人士之技術常識能製作，可為 50、100、200 等任意值。

【0186】 賦予 pH 依存性抗原結合活性之方法不特別限定，

例如將抗原結合分子中至少 1 個胺基酸取代為組胺酸、或在抗原結合分子中插入至少 1 個組胺酸，而使 pH5.8 之抗原結合活性弱於 pH7.4 之抗原結合活性之方法。藉由將抗體中之胺基酸以組胺酸取代，能對於抗體賦予 pH 依存性之抗原結合活性，係為已知 (FEBS Letter, 309(1), 85-88, (1992))。本發明中，對於抗原結合分子導入(進行)組胺酸變異(取代)或插入之位置不特別限定，只要與變異或插入前相比較，於 pH5.8 之抗原結合活性弱於 pH7.4 之抗原結合活性 ($KD(pH5.8)/KD(pH7.4)$ 之值增大)即可，可在任意部位。例如：抗原結合分子為抗體時，例如抗體之可變區等。導入(進行)組胺酸變異或插入之數目可由該技術領域之人士適當決定，可僅將 1 處以組胺酸取代，或僅於 1 處插入組胺酸，也可將 2 處以上之多數處以組胺酸取代，或於 2 處以上之多數處插入組胺酸。又，也可同時導入組胺酸變異以外之變異(變異為組胺酸以外之胺基酸)。再者，也可同時進行組胺酸變異與組胺酸插入。取代為組胺酸或組胺酸之插入可利用該技術領域之人士公知之丙胺酸掃描之丙胺酸取代為組胺酸之組胺酸掃描等方法無規進行，也可於無規導入有組胺酸變異或插入之抗原結合分子庫中，選擇比起變異前之 $KD(pH5.8)/KD(pH7.4)$ 之值增大之抗原結合分子。

【0187】 對於抗原結合分子，將至少 1 個胺基酸取代為組胺酸、或於抗原結合分子胺基酸插入至少 1 個組胺酸時，不特別限定，但以組胺酸取代或插入後之抗原結合分子於 pH7.4 之抗原結合活性與組胺酸取代或插入前之抗原結合分子於 pH7.4 之抗原結合活性為同等較佳。在此，組胺酸取代或插入後之抗

原結合分子於 pH7.4 之抗原結合活性，與組胺酸取代或插入前之抗原結合分子於 pH7.4 之抗原結合活性為同等，係指組胺酸取代或插入後之抗原結合分子，維持組胺酸取代或插入前之抗原結合分子所具有之抗原結合活性之 10%以上，較佳為 50%以上，更佳為 80%以上，更佳為 90%以上。由於組胺酸取代或插入造成抗原結合分子之抗原結合活性減低時，可藉由抗原結合分子中之 1 或多數胺基酸之取代、缺損、加成及/或插入等，使得抗原結合活性與組胺酸取代或插入前之抗原結合活性為同等。本發明中也包含如此的組胺酸取代或插入後藉由進行 1 或多數胺基酸之取代、缺損、加成及/或插入使得結合活性成為同等之抗原結合分子。

【0188】 又，使抗原結合分子於 pH5.8 之抗原結合活性弱於 pH7.4 之抗原結合活性之其他方法，例如將抗原結合分子中之胺基酸取代為非天然型胺基酸之方法、或於抗原結合分子中之胺基酸插入非天然型胺基酸之方法。非天然胺基酸已知能夠人為控制 pKa(Angew. Chem. Int. Ed. 2005, 44, 34、Chem Soc Rev. 2004 Sep 10;33(7):422-30.、Amino Acids. 1999;16(3-4):345-79.)。因此本發明中，可將非天然型胺基酸代替上述組胺酸。又，上述組胺酸取代及/或插入，與非天然型胺基酸之取代及/或插入，也可同時進行。本發明使用之非天然型胺基酸，可為任意非天然型胺基酸，可使用對於該技術領域之人士為公知之非天然型胺基酸等。

【0189】 再者，抗原結合分子包含抗體恆定區時，使抗原結合分子於 pH5.8 之抗原結合活性弱於 pH7.4 之抗原結合活性

之另一方法，例如改變抗原結合分子所包含之抗體恆定區之方法。如此的抗體恆定區之改變之具體例，例如 WO2009/125825 記載之取代恆定區之方法。

【0190】 又，抗體恆定區之改變方法，例如：探討多數恆定區之同功型(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)，並選擇 pH5.8 之抗原結合活性降低之(pH5.8 之解離速度加快)之同功型之方法。再者，藉由對於野生型同功型之胺基酸序列(野生型 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 胺基酸序列)導入胺基酸取代，使 pH5.8 之抗原結合活性降低(pH5.8 之解離速度加快)之方法。由於同功型(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)，使抗體恆定區之鉸鏈區之序列大幅不同，鉸鏈區之胺基酸序列之不同會大大地影響抗原結合活性，因此依抗原或抗原決定基之種類選擇適當的同功型，可選擇於 pH5.8 之抗原結合活性降低(pH5.8 之解離速度加速)的同功型。又，鉸鏈區之胺基酸序列之差異會大大地影響抗原結合活性，因此野生型同功型之胺基酸序列之胺基酸取代處據認為以鉸鏈區為理想。

【0191】 依照上述方法等，當抗原結合物質於 pH5.8 之抗原結合活性弱於 pH7.4 之抗原結合活性($KD(pH5.8)/KD(pH7.4)$ 之值增大)時，不特別限定，但 $KD(pH5.8)/KD(pH7.4)$ 之值比起原本的抗體，通常為 2 倍以上，較佳為 5 倍以上，更佳為 10 倍以上較佳。

【0192】 抗原結合分子

再者，本發明提供一種抗原結合分子，其於 2 種不同的鈣濃度條件下的抗原結合活性不同，在低鈣濃度條件下之抗原結

合活性低於高鈣濃度條件下之抗原結合活性。本發明較佳為提供一種抗原結合分子，其於離子化鈣濃度 $0.1\mu\text{M}\sim 30\mu\text{M}$ 之低鈣濃度條件下之抗原結合活性，低於離子化鈣濃度 $100\mu\text{M}\sim 10\text{ mM}$ 之高鈣濃度條件下之抗原結合活性。更具體而言，於活體內之早期核內體內之離子化鈣濃度(低鈣濃度，例如 $1\mu\text{M}\sim 5\mu\text{M}$)的抗原結合活性低於活體內之血漿中之離子化鈣濃度(高鈣濃度，例如 $0.5\text{ mM}\sim 2.5\text{ mM}$)之抗原結合活性的抗原結合分子。

【0193】 本發明之在低鈣濃度條件下之抗原結合活性低於在高鈣濃度條件下之抗原結合活性的抗原結合分子，只要是在低鈣濃度條件下之抗原結合活性低於高鈣濃度條件下之抗原結合活性即可，其結合活性之差不限定，只要在低鈣濃度條件下之抗原結合活性稍低即可。

【0194】 本發明之在低鈣濃度條件下之抗原結合活性低於在高鈣濃度條件下之抗原結合活性之抗原結合分子之較佳態樣，係在低鈣濃度條件下之 KD 與高鈣濃度條件下之 KD 之比 $KD(\text{低 Ca})/KD(\text{高 Ca})$ 之值為 2 以上，更佳為 $KD(\text{低 Ca})/KD(\text{高 Ca})$ 之值為 10 以上，更佳為 $KD(\text{低 Ca})/KD(\text{高 Ca})$ 之值為 40 以上。 $KD(\text{低 Ca})/KD(\text{高 Ca})$ 之值之上限不特別限定，只要是該技術領域之人士之技術能製作，可為 400、1000、10000 等任意值。

【0195】 再者，本發明之在低鈣濃度條件下之抗原結合活性低於在高鈣濃度條件下之抗原結合活性之抗原結合分子之其他較佳態樣，係對於抗原在低鈣濃度條件下之 k_d 與在高鈣濃度條件下之 k_d 之比 $k_d(\text{低 Ca})/k_d(\text{高 Ca})$ 之值為 2 以上，更佳

為 $k_d(\text{低 Ca})/k_d(\text{高 Ca})$ 之值為 5 以上，更佳為 $k_d(\text{低 Ca})/k_d(\text{高 Ca})$ 之值為 10 以上，更佳為 $k_d(\text{低 Ca})/k_d(\text{高 Ca})$ 之值為 30 以上。 $k_d(\text{低 Ca})/k_d(\text{高 Ca})$ 之值之上限不特別限定，只要是該技術領域之人士之技術能製作即可，可為 50、100、200 等任意值。

【0196】 本發明之抗原結合分子，可更具有於上述中性 pH 條件下之人類 FcRn 結合活性。藉由組合該中性 pH 條件下之人類 FcRn 結合活性、與鈣濃度依存性抗原結合活性，可增強促進抗原攝入細胞內之機能、增加 1 分子之抗原結合分子對於抗原之結合次數之機能、促進由於抗原結合分子之投予所致血漿中之抗原濃度減少之機能、或改善抗原結合分子之血漿中滯留性之機能。

【0197】 又，本發明之抗原結合分子，也可更具有上述 pH 依存性抗原結合活性，亦即於酸性 pH 條件下之抗原結合活性低於中性 pH 條件下之抗原結合活性之抗原結合活性。藉由組合該 pH 依存性抗原結合活性、與鈣濃度依存性抗原結合活性，能增加促進抗原攝入細胞內之機能、促進 1 分子之抗原結合分子結合於抗原之結合次數之機能、促進抗原結合分子之投予所致血漿中之抗原濃度減少之機能、或改善抗原結合分子之血漿中滯留性之機能。

【0198】 又，本發明之抗原結合分子只要在低鈣濃度條件下之抗原結合活性低於在高鈣濃度條件下之抗原結合活性即可，可具有其他任何性質，例如促效劑抗原結合分子或拮抗物抗原結合分子等。本發明之較佳抗原結合分子，例如拮抗物抗原結合分子。拮抗物抗原結合分子通常為抑制配體(促效劑)與

受體之結合，並且抑制經由受體之對於細胞內之信號傳遞之抗原結合分子。

【0199】 又，已賦予 pH 依存性抗原結合活性之抗原結合分子，可以有至少 1 個胺基酸以組胺酸取代，或插入有至少 1 個組胺酸。

【0200】 又，本發明之抗原結合分子所結合之抗原不特別限定，可結合於任意抗原。例如：受體蛋白質(膜結合型受體、可溶型受體)或細胞表面標記等膜抗原、細胞激素等可溶型抗原等。其他抗原之具體例如上述。

【0201】 篩選方法

本發明供篩選抗原結合分子在低鈣濃度條件下之抗原結合活性低於在高鈣濃度條件下之抗原結合活性之抗原結合分子之方法。又，提供一種抗原結合分子之篩選方法，該抗原結合分子係具有從以下選出的至少 1 種機能：

- (i)促進抗原攝入細胞內之機能、
- (ii)對於抗原結合 2 次以上之機能、
- (iii)促進血漿中之抗原濃度減少之機能，及
- (iv)優異之血漿中滯留性機能。

【0202】 具體而言，本發明提供一種抗原結合分子之篩選方法，其係包含以下步驟(a)~(c)；

(a) 獲得低鈣濃度條件下之抗原結合分子之抗原結合活性、

(b) 獲得高鈣濃度條件下之抗原結合分子之抗原結合活性、

(c) 選擇在低鈣濃度條件下之抗原結合活性低於在高鈣濃度條件下之抗原結合活性之抗原結合分子。

【0203】再者，本發明提供一種抗原結合分子之篩選方法，係包含以下步驟(a)~(c)；

(a) 於高鈣濃度條件下使抗原結合分子或抗原結合分子庫接觸抗原、

(b) 將於前述步驟(a)與抗原結合之抗原結合分子置在低鈣濃度條件下、

(c) 取得於前述步驟(b)解離之抗原結合分子。

【0204】再者，本發明提供一種抗原結合分子之篩選方法，係包含以下步驟(a)~(d)；

(a) 在低鈣濃度條件下使抗原結合分子或抗原結合分子庫接觸抗原、

(b) 選擇於前述步驟(a)未結合於抗原之抗原結合分子、

(c) 使前述步驟(b)選擇之抗原結合分子於高鈣濃度條件下與抗原結合、

(d) 取得於前述步驟(c)與抗原結合之抗原結合分子。

【0205】再者，本發明提供一種抗原結合分子之篩選方法，係包含以下步驟(a)~(c)；

(a) 使固定有抗原之管柱，於高鈣濃度條件下接觸抗原結合分子或抗原結合分子庫、

(b) 使於前述步驟(a)與管柱結合之抗原結合分子在低鈣濃度條件下從管柱溶出、

(c) 取得前述步驟(b)溶出之抗原結合分子。

【0206】 又，本發明提供一種抗原結合分子之篩選方法，係包含以下步驟(a)~(d)；

(a) 在低鈣濃度條件下使抗原結合分子或抗原結合分子庫通過固定有抗原之管柱、

(b) 將於前述步驟(a)未結合於管柱而溶出之抗原結合分子回收、

(c) 使於前述步驟(b)回收之抗原結合分子於高鈣濃度條件下與抗原結合、

(d) 取得於前述步驟(c)與抗原結合之抗原結合分子。

【0207】 再者，本發明提供一種抗原結合分子之篩選方法，係包含以下步驟(a)~(d)；

(a) 於高鈣濃度條件下使抗原結合分子或抗原結合分子庫接觸抗原、

(b) 取得於前述步驟(a)與抗原結合之抗原結合分子、

(c) 將前述步驟(b)取得之抗原結合分子置在低鈣濃度條件下、

(d) 取得前述步驟(c)之抗原結合活性弱於前述步驟(b)中抗原結合活性之抗原結合分子。

【0208】 又，該等步驟可以返覆 2 次以上。因此，本發明提供如上述篩選方法，更包含返覆(a)~(c)或(a)~(d)之步驟 2 次以上之步驟。(a)~(c)或(a)~(d)之步驟返覆的次數不特別限定，通常為 10 次以內。

【0209】 本發明之篩選方法中，低鈣濃度條件下之抗原結合分子之抗原結合活性，只要是離子化鈣濃度為 $0.1\mu\text{M}\sim 30\mu\text{M}$

之間之抗原結合活性即可，不特別限定、較佳之離子化鈣濃度，例如 $0.5\mu\text{M}\sim 10\mu\text{M}$ 之間之抗原結合活性。更佳之離子化鈣濃度，例如活體內之早期核內體內之離子化鈣濃度，具體而言例如 $1\mu\text{M}\sim 5\mu\text{M}$ 之抗原結合活性。又，於高鈣濃度條件下之抗原結合分子之抗原結合活性，只要是離子化鈣濃度為 $100\mu\text{M}\sim 10\text{ mM}$ 之間之抗原結合活性即不特別限定，較佳之離子化鈣濃度，例如 $200\mu\text{M}\sim 5\text{ mM}$ 之間之抗原結合活性。更佳之離子化鈣濃度，例如於活體內之血漿中之離子化鈣濃度，具體而言，例如 $0.5\text{ mM}\sim 2.5\text{ mM}$ 之抗原結合活性。

【0210】 抗原結合分子之抗原結合活性，可依照該技術領域之人士所公知之方法測定，針對離子化鈣濃度以外之條件，可由該技術領域之人士適當決定。抗原結合分子之抗原結合活性，可就 KD (Dissociation constant: 解離常數)、視 KD (Apparent dissociation constant: 視解離常數)、解離速度 k_d (Dissociation rate: 解離速度常數)、或視 k_d (Apparent dissociation: 視解離速度常數)等評價。該等可由該技術領域之人士公知之方法測定，例如可使用 Biacore (GE healthcare)、Scatchard 作圖法、FACS 等。

【0211】 本發明中，選擇於高鈣濃度條件下之抗原結合活性高在低鈣濃度條件下之抗原結合活性之抗原結合分子之步驟，與選擇在低鈣濃度條件下之抗原結合活性低於在高鈣濃度條件下之抗原結合活性之抗原結合分子之步驟為相同含意。

【0212】 只要於高鈣濃度條件下之抗原結合活性高於在低鈣濃度條件下之抗原結合活性，則於高鈣濃度條件下之抗原結

合活性與在低鈣濃度條件下之抗原結合活性之差不特別限定，較佳為於高鈣濃度條件下之抗原結合活性為在低鈣濃度條件下之抗原結合活性之 2 倍以上，更佳為 10 倍以上，又更佳為 40 倍以上。

【0213】 依照本發明之篩選方法篩選之抗原結合分子可為任意抗原結合分子，例如可篩選上述抗原結合分子。例如：可篩選具天然序列之抗原結合分子，也可篩選胺基酸序列經取代之抗原結合分子。

【0214】 本發明之篩選方法所篩選之抗原結合分子可以任意方法製備，例如：可使用預先已存在的抗體、預先已存在之庫(噬菌體庫等)、對於動物免疫獲得之融合瘤或從免疫動物之 B 細胞製作之抗體或庫、對於該等抗體或庫導入可螯合鈣之胺基酸(例如天冬胺酸或麩胺酸)或導入有非天然胺基酸變異之抗體或庫(可螯合鈣之胺基酸(例如天冬胺酸或麩胺酸)或提高非天然胺基酸之含有率之庫或於特定處有可螯合鈣之胺基酸(例如天冬胺酸或麩胺酸)或導入有非天然胺基酸變異之庫等)等。

【0215】 依照本發明之篩選方法，可獲得當對於人類、小鼠、猴等動物投予時，具有選自於以下當中至少 1 種機能的抗原結合分子：

- (i)促進抗原攝入細胞內之機能、
- (ii)對於抗原結合 2 次以上之機能、
- (iii)促進血漿中之抗原濃度減少之機能、及
- (iv)優異之血漿中滯留性機能。

因此本發明之篩選方法，可當做能篩選具有該等機能中至

少 1 種機能之抗原結合分子的篩選方法。

【0216】 又，依照本發明之篩選方法獲得之該等抗原結合分子，可以減少對患者之投予量或投予頻度，結果能減少總投予量，所以可認為當做醫藥品特別優異。因此，本發明之篩選方法可當做篩選用於當做醫藥組成物之抗原結合分子之篩選方法。

【0217】 抗原結合分子之製造方法

本發明提供製造抗原結合分子在低鈣濃度條件下之抗原結合活性低於在高鈣濃度條件下之抗原結合活性之抗原結合分子之製造方法。又本發明提供一種抗原結合分子之製造方法，該抗原結合分子具有選自於以下之至少 1 種機能：

- (i)促進抗原攝入細胞內之機能、
- (ii)對於抗原結合 2 次以上之機能、
- (iii)促進血漿中之抗原濃度減少之機能、及、
- (iv)優異之血漿中滯留性機能。

【0218】 具體而言，本發明提供一種抗原結合分子之製造方法，係包含以下步驟(a)~(e)；

- (a) 獲得在低鈣濃度條件下之抗原結合分子之抗原結合活性、
- (b) 獲得於高鈣濃度條件下之抗原結合分子之抗原結合活性、
- (c) 選擇在低鈣濃度條件下之抗原結合活性低於在高鈣濃度條件下之抗原結合活性之抗原結合分子、
- (d) 取得編碼為前述步驟(c)選擇之抗原結合分子之基因、

(e) 使用前述步驟(d)獲得之基因產生抗原結合分子。

【0219】 又，本發明提供一種抗原結合分子之製造方法，係包含以下步驟(a)~(e)：

(a) 於高鈣濃度條件下使抗原結合分子或抗原結合分子庫接觸抗原、

(b) 將前述步驟(a)與抗原結合之抗原結合分子置在低鈣濃度條件下、

(c) 取得於前述步驟(b)解離之抗原結合分子、

(d) 獲得編碼為前述步驟(c)取得之抗原結合分子之基因、

(e) 使用前述步驟(d)獲得之基因產生抗原結合分子。

又，(a)~(d)之步驟也可返覆 2 次以上。因此，本發明提供如上述方法，更包含返覆(a)~(d)之步驟 2 次以上之步驟。(a)~(d)之步驟之返覆次數不特別限定，通常為 10 次以內。

【0220】 又，本發明提供一種抗原結合分子之製造方法，係包含以下步驟(a)~(f)：

(a) 在低鈣濃度條件下使抗原結合分子或抗原結合分子庫與抗原接觸、

(b) 選擇於前述步驟(a)未與抗原結合之抗原結合分子、

(c) 使於前述步驟(b)選擇之抗原結合分子於高鈣濃度條件下與抗原接觸、

(d) 取得於前述步驟(c)與抗原結合之抗原結合分子、

(e) 獲得編碼為前述步驟(d)取得之抗原結合分子之基因、

(f) 使用前述步驟(e)獲得之基因產生抗原結合分子。

又，(a)~(e)之步驟也可返覆 2 次以上。因此，本發明提供

如上述方法，更包含返覆(a)~(e)之步驟 2 次以上之步驟。(a)~(e)之步驟的返覆次數不特別限定，通常為 10 次以內。

【0221】 再者，本發明提供一種抗原結合分子之製造方法，係包含以下步驟(a)~(e)；

(a) 於高鈣濃度條件下使抗原結合分子或抗原結合分子庫接觸固定有抗原之管柱、

(b) 使於前述步驟(a)與管柱結合之抗原結合分子在低鈣濃度條件下從管柱溶出、

(c) 取得於前述步驟(b)溶出之抗原結合分子、

(d) 獲得編碼為前述步驟(c)取得之抗原結合分子之基因、

(e) 使用前述步驟(d)獲得之基因產生抗原結合分子。

又，(a)~(d)之步驟也可返覆 2 次以上。因此，本發明提供如上述方法，更包含返覆(a)~(d)之步驟 2 次以上之步驟。(a)~(d)之步驟的返覆次數不特別限定，通常為 10 次以內。

【0222】 又，本發明提供一種抗原結合分子之製造方法，係包含以下步驟(a)~(f)；

(a) 在低鈣濃度條件下使抗原結合分子或抗原結合分子庫通過固定有抗原之管柱、

(b) 將於前述步驟(a)未與管柱結合而溶出之抗原結合分子回收、

(c) 使於前述步驟(b)回收之抗原結合分子於高鈣濃度條件下與抗原結合、

(d) 取得於前述步驟(c)與抗原結合之抗原結合分子、

(e) 獲得編碼為前述步驟(d)取得之抗原結合分子的基因、

(f) 使用前述步驟(e)獲得之基因產生抗原結合分子。

又，(a)~(e)之步驟也可返覆 2 次以上。因此，本發明提供如上述方法，更包含返覆(a)~(e)之步驟 2 次以上之步驟。(a)~(e)之步驟的返覆次數不特別限定，通常為 10 次以內。

【0223】 又，本發明提供一種抗原結合分子之製造方法，係包含以下步驟(a)~(f)；

(a) 於高鈣濃度條件下使抗原結合分子或抗原結合分子庫接觸抗原、

(b) 取得於前述步驟(a)與抗原結合之抗原結合分子、

(c) 將前述步驟(b)取得之抗原結合分子置在低鈣濃度條件下、

(d) 取得前述步驟(c)中抗原結合活性弱於前述步驟(b)中抗原結合活性的抗原結合分子、

(e) 獲得編碼為前述步驟(d)取得之抗原結合分子之基因、

(f) 使用前述步驟(e)獲得之基因產生抗原結合分子。

又，(a)~(e)之步驟也可返覆 2 次以上。因此，本發明提供如上述方法，更包含返覆(a)~(e)之步驟 2 次以上之步驟。(a)~(e)之步驟的返覆次數不特別限定，通常為 10 次以內。

【0224】 本發明之製造方法使用之抗原結合分子可以任意方法製備，例如：可使用預先已存在的抗體、預先已存在之庫(噬菌體庫等)、對於動物免疫獲得之融合瘤或從免疫動物之 B 細胞製作之抗體或庫、對於該等抗體或庫導入可螯合鈣之胺基酸(例如天冬胺酸或麩胺酸)或導入有非天然胺基酸變異之抗體或庫(可螯合鈣之胺基酸(例如天冬胺酸或麩胺酸)或提高非天然

胺基酸之含有率之庫或於特定處有可螯合鈣之胺基酸(例如天冬胺酸或麩胺酸)或導入有非天然胺基酸變異之庫等)等。

【0225】 上述製造方法中，在低鈣濃度條件下之抗原結合分子之抗原結合活性，只要離子化鈣濃度為 $0.1\mu\text{M}\sim 30\mu\text{M}$ 之間之抗原結合活性即不特別限定，較佳之離子化鈣濃度，例如 $0.5\mu\text{M}\sim 10\mu\text{M}$ 之間之抗原結合活性。更佳之離子化鈣濃度，更佳之離子化鈣濃度，例如活體內之早期核內體內之離子化鈣濃度，具體而言例如 $1\mu\text{M}\sim 5\mu\text{M}$ 之抗原結合活性。又，於高鈣濃度條件下之抗原結合分子之抗原結合活性，只要是離子化鈣濃度為 $100\mu\text{M}\sim 10\text{ mM}$ 之間之抗原結合活性即不特別限定，較佳之離子化鈣濃度，例如 $200\mu\text{M}\sim 5\text{ mM}$ 之間之抗原結合活性。更佳之離子化鈣濃度，例如於活體內之血漿中之離子化鈣濃度，具體而言，例如 $0.5\text{ mM}\sim 2.5\text{ mM}$ 之抗原結合活性。

【0226】 抗原結合分子之抗原結合活性，可依照該技術領域之人士所公知之方法測定，針對離子化鈣濃度以外之條件，可由該技術領域之人士適當決定。

【0227】 選擇於高鈣濃度條件下之抗原結合活性高在低鈣濃度條件下之抗原結合活性之抗原結合分子之步驟，與選擇在低鈣濃度條件下之抗原結合活性低於在高鈣濃度條件下之抗原結合活性之抗原結合分子之步驟為相同含意。

【0228】 只要於高鈣濃度條件下之抗原結合活性高於在低鈣濃度條件下之抗原結合活性，則於高鈣濃度條件下之抗原結合活性與在低鈣濃度條件下之抗原結合活性之差特別限定，較佳為於高鈣濃度條件下之抗原結合活性為在低鈣濃度條

件下之抗原結合活性之 2 倍以上，更佳為 10 倍以上，又更佳為 40 倍以上。

【0229】 依照本發明之篩選方法篩選之抗原結合分子可為任意抗原結合分子，例如可篩選上述抗原結合分子。例如：可篩選具天然序列之抗原結合分子，也可篩選胺基酸序列經取代之抗原結合分子。

上述製造方法中，抗原與抗原結合分子之結合可在任意狀態進行，不特別限定。例如：可藉由使經固定化之抗原結合分子接觸抗原，而使抗原結合分子與抗原結合，也可藉由使經固定化之抗原與抗原結合分子接觸，而使抗原結合分子與抗原結合。又，也可藉由在溶液中使抗原結合分子與抗原接觸，而使抗原結合分子與抗原結合。

【0230】 又，本發明之製造方法也可使用在上述中性 pH 具有人類 FcRn 結合活性之抗原結合分子，也可組合賦予或提高於中性 pH 之人類 FcRn 結合活性之方法。本發明之製造方法，組合用於賦予或提高於中性 pH 之人類 FcRn 結合活性之方法時，可包含改變抗原結合分子中之胺基酸，並賦予或提高於中性 pH 條件下之人類 FcRn 結合活性之步驟。又，於中性 pH 具人類 FcRn 結合活性之抗原結合分子之人類 FcRn 結合域，例如於上述中性 pH 具人類 FcRn 結合活性之人類 FcRn 結合域為較佳例。因此，本發明之製造方法中，也可包含預先選擇在中性 pH 之人類 FcRn 結合活性高之具人類 FcRn 結合域之抗原結合分子，及/或改變抗原結合分子中之胺基酸並賦予或提高於中性 pH 之人類 FcRn 結合活性之步驟。

【0231】 再者，本發明之製造方法也可使用在上述具 pH 依存性抗原結合活性之抗原結合分子，也可與賦予 pH 依存性抗原結合活性之方法(WO 2009/125825)組合。本發明之製造方法中組合賦予 pH 依存性抗原結合活性之方法時，可以更包含：預先選擇於酸性 pH 條件下之抗原結合活性低於中性 pH 條件下之抗原結合活性的抗原結合分子、及/或改變抗原結合分子中之胺基酸，並使於酸性 pH 條件下之抗原結合活性低於中性 pH 條件下之抗原結合活性之步驟。

【0232】 又，具 pH 依存性抗原結合活性之抗原結合分子，較佳例為：抗原結合分子之至少 1 個胺基酸以組胺酸取代或至少有 1 個組胺酸插入之抗原結合分子。因此本發明之製造方法中，也可更包含：就抗原結合分子而言，使用至少 1 個胺基酸以組胺酸取代或至少有 1 個組胺酸插入之抗原結合分子，或將抗原結合分子之至少 1 個胺基酸取代為組胺酸或至少插入 1 個組胺酸之步驟。

【0233】 又，本發明之製造方法，也可使用非天然胺基酸代替組胺酸。因此，可將上述組胺酸取代為非天然胺基酸而理解本發明。

【0234】 依照本發明之製造方法，可製造對於人類、小鼠、猴等動物投予時，具有從以下選出之至少 1 種機能的抗原結合分子：

- (i)促進抗原攝入細胞內之機能、
- (ii)對於抗原結合 2 次以上之機能、
- (iii)促進血漿中之抗原濃度減少之機能、及

(iv)優異之血漿中滯留性機能。

因此本發明之製造方法可利用為當做獲得具有該等機能中至少其中之一之機能的抗原結合分子之製造方法。

【0235】 又，該等抗原結合分子可減少對患者之投予量或投予頻度，結果為可減少總投予量，故可認為當做醫藥品特別優異。因此本發明之製造方法可利用為當做製造當做醫藥組成物之抗原結合分子之製造方法。

【0236】 本發明之製造方法中獲得之基因，通常係載持(插入)適當載體，並導入寄主細胞。該載體只要能穩定保持插入之核酸即可，無特別限制，例如寄主若使用大腸菌，則選殖用載體以 pBluescript 載體(Stratagene 公司製)等為較佳，但可使用市售的各種載體。本發明之抗原結合分子於生產之目的使用載體時，尤以表現載體為有用。表現載體只要是在試管內、大腸菌內、培養細胞內、生物個體內表現抗原結合分子之載體即可，無特別限制，例如若於試管內表現，以 pBEST 載體較佳(PROMEGA 公司製)、若於大腸菌表現，為 pET 載體較佳(Invitrogen 公司製)，若於培養細胞表現，以 pME18S-FL3 載體較佳(GenBank Accession No. AB009864)，若於生物個體表現，以 pME18S 載體(Mol Cell Biol. 8:466-472(1988))等較佳。本發明之 DNA 插入載體時，可依常法，例如利用限制酶部位之接合酶反應進行(Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4-11.11)。

【0237】 上述寄主細胞不特別限制，可因應目的使用各種

寄主細胞。用於使抗原結合分子表現之細胞，例如：細菌細胞(例：鏈球菌、葡萄球菌、大腸菌、鏈黴菌、枯草菌)、真菌細胞(例：酵母、麴菌)、昆蟲細胞(例：Drosophila S2、spodoptera SF9)、動物細胞(例：CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293、Bowes 黑色素瘤細胞)及植物細胞。對於寄主細胞導入載體，例如可使用磷酸鈣沉澱法、電氣脈衝穿孔法(Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9.1-9.9)、脂轉染法、顯微注射法等公知之方法進行。

【0238】 寄主細胞之培養可依照公知之方法進行。例如：動物細胞為寄主時，培養液例如可使用 DMEM、MEM、RPMI1640、IMDM。此時，可併用 FBS、胎牛血清(FCS)等血清補液，也可於無血清培養進行細胞培養。培養時之 pH，定為約 6~8 為較佳。培養通常於約 30~40℃ 進行約 15~200 小時，並視需要施行培養基之更換、通氣、攪拌。

【0239】 為了使寄主細胞表現之抗原結合分子分泌到小胞體之內腔、細胞周邊腔、或細胞外之環境，可以在目的多胜肽納入適當的分泌信號。該等信號對於目的之抗原結合分子可為內因性也可為異種信號。

【0240】 另一方面，於體內(in vivo)產生多胜肽之系，例如：使用動物之產生系或使用植物之產生系。對於該等動物或植物導入目的聚核苷酸，並使在動物或植物之體內產生多胜肽並回收。本發明中，「寄主」包含該等動物、植物。

【0241】 使用動物時，有使用哺乳類動物、昆蟲之產生系。

哺乳類動物可使用山羊、豬、綿羊、小鼠、牛等 (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications (1993))。又，使用哺乳類動物時，可使用基因轉殖動物。

【0242】 例如可製備編碼為本發明之抗原結合分子之聚核苷酸，與編碼為如山羊 β 酪蛋白之類在乳汁中固有產生之多肽的基因的融合基因。其次，將含該融合基因的聚核苷酸片段注入山羊胚，並將該胚胎移植到雌山羊。從接受胚胎的山羊產生之基因轉殖山羊(或其子孫)所產之乳汁，可以取得所望之抗原結合分子。又，為了增加從基因轉殖山羊產生之含所望之抗原結合分子之乳汁量，可對於基因轉殖山羊投予適當的荷爾蒙 (Ebert et al., Bio/Technology (1994) 12: 699-702)。

【0243】 又，本發明之使抗原結合分子產生之昆蟲，例如可使用蠶。使用蠶時，藉由將插入有編碼為目的抗原結合分子之聚核苷酸的桿狀病毒感染蠶，可從該蠶之體液獲得目的之抗原結合分子。

【0244】 再者，植物使用在產生本發明之抗原結合分子時，例如可使用煙草。使用煙草時，例如將編碼為目的抗原結合分子之聚核苷酸插入於植物表現用載體例如 pMON 530，將該載體導入如農桿菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 之細菌。使該細菌桿染煙草，例如 *Nicotiana tabacum*，可從該煙草葉獲得所望之抗原結合分子 (Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24: 131-8)。又，將同樣的細菌感染浮萍 (*Lemna minor*)，並選殖化後，可從浮萍的細胞獲得所望之抗原結合分子 (Cox KM et al. Nat. Biotechnol. 2006 Dec;24(12):1591-1597)。

【0245】 如此獲得之抗原結合分子，可從寄主細胞內或細胞外(培養基、乳汁等)單離，並精製為實質上為純且均勻的抗原結合分子。抗原結合分子之分離、精製，只要是通常之多胜肽之精製使用的分離、精製方法即可，無任何限定。例如可適當選擇層析管柱、過濾、超過濾、鹽析、溶劑沉澱、溶劑萃取、蒸餾、免疫沈降、SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳、等電點電泳法、透析、再結晶等，並組合而將抗原結合分子分離、精製。

【0246】 層析，例如親和性層析、離子交換層析、疏水性層析、凝膠過濾、逆相層析、吸附層析等 (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al.(1996) Cold Spring Harbor Laboratory Press)。該等層析，如液相層析可使用例如 HPLC、FPLC 等液相層析進行。親和性層析使用之管柱，例如 PROTEIN A 管柱、PROTEIN G 管柱。例如:使用 PROTEIN A 之管柱，如 Hyper D, POROS, Sepharose F. F. (Pharmacia 製)等。

【0247】 視需要，在抗原結合分子精製前或精製後使適當的蛋白質修飾酵素作用，藉此可任意施加修飾，或部分除去胜肽。蛋白質修飾酵素，例如:胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、離胺醯基內切胜肽酶、PROTEIN 激酶、糖苷酶等。

【0248】 醫藥組成物

又，本發明係關於包含本發明之抗原結合分子、由本發明之篩選方法單離之抗原結合分子、或依照本發明之製造方法製造之抗原結合分子的醫藥組成物。本發明之抗原結合分子、由本發明之篩選方法單離之抗原結合分子、或依照本發明之製造

方法製造之抗原結合分子，為具有選自於以下當中至少 1 種機能的抗原結合分子，能期待抗原結合分子之投予頻度減，故當做醫藥組成物為有用：

(i)促進抗原攝入細胞內之機能、

(ii)對於抗原結合 2 次以上之機能、

(iii)促進血漿中之抗原濃度減少之機能、及

(iv)優異之血漿中滯留性機能。又，本發明之醫藥組成物可包含藥學上可容許之載體。

【0249】 本發明中，醫藥組成物，係指通常、疾患之治療或預防、或檢查・診斷用的藥劑。

【0250】 本發明之醫藥組成物，能以該技術領域之人士公知之方法製劑化。例如：能以與水或其他藥學上可容許之液體的無菌性溶液、或懸浮液劑之注射劑之形式以非經口的使用。例如：藥理學上可容許之載體或介質，具體而言，可考慮適當組合滅菌水或生理食鹽水、植物油、乳化劑、懸浮劑、界面活性劑、安定劑、香味劑、賦形劑、運載劑、防腐劑、黏結劑等，以一般認可的製藥實務要求的單位用量形態混合而製劑化。該等製劑中的有效分量，可設定為可獲得指示範圍之適當容量。

用於注射之無菌組成物，可使用如注射用蒸餾水之運載劑而依通常之製劑實務配方。

【0251】 注射用之水溶液，例如生理食鹽水、葡萄糖或含其他輔助藥(例如 D-山梨醇、D-甘露糖、D-甘露醇、氯化鈉)之等張液。也可併用適當的溶解輔助劑，例如醇(乙醇等)、多

元醇(丙二醇、聚乙二醇等)、非離子性界面活性劑(聚山梨糖醇酸酯 80(TM)、HCO-50 等)。

【0252】 油性液，例如麻油、黃豆油，溶解輔助劑可併用苯甲酸苄酯及/或苯甲醇。又，也可摻合緩衝劑(例如：磷酸鹽緩衝液及乙酸鈉緩衝液)、止痛劑(例如：鹽酸普羅卡因)、安定劑(例如：苯甲醇及酚)、抗氧化劑。製備的注射液通常充填在適當的安瓿。

【0253】 本發明之醫藥組成物較佳為以非經口投予。例如可製成注射劑型、經鼻投予劑型、經肺投予劑型、經皮投予型之組成物。例如可利用靜脈內注射、肌肉內注射、腹腔內注射、皮下注射等對於全身或局部投予。

【0254】 投予方法可視患者之年齡、症狀適當選擇。含抗原結合分子之醫藥組成物之投予量，例如可設定為每次體重 1 kg 為 0.0001 mg 至 1000 mg 之範圍。或，可定為例如每位患者為 0.001~100000 mg 之投予量，但本發明不一定限於該等數值。投予量及投予方法，視患者之體重、年齡、症狀等而變動，但如為該技術領域之人士，可考慮該等條件，設定適當的投予量及投予方法。

【0255】 又，本發明之醫藥組成物，可為用於促進抗原攝入細胞內、或促進血漿中之抗原濃度減少之醫藥組成物。

【0256】 又，本發明，係關於藉由投予本發明之抗原結合分子、或依照本發明之製造方法所製造之抗原結合分子，促進由於抗原結合分子使抗原攝入細胞內之方法、或促進血漿中之抗原濃度之減少之方法。投予可於體內(in vivo)或體外(in vitro)

任一者進行。投予對象，例如非人類動物(小鼠、猴等)、或人類等。

【0257】 又，本發明係關於藉由使用本發明之抗原結合分子、或依照本發明之製造方法所製造之抗原結合分子，使 1 分子之抗原結合分子對於抗原之結合次數增加之方法、或改善抗原結合分子之血漿中滯留性之方法。

【0258】 又，本發明記載之胺基酸序列所包含之胺基酸，有時會受到轉譯後修飾(例如:N 末端之麩醯胺酸由於焦麩胺醯基化而修飾為焦麩胺酸為該技術領域之人士熟知之修飾)，但如此的胺基酸為轉譯後修飾時，當然也包含在本發明記載之胺基酸序列。

【0259】 又，本發明提供至少包含本發明之抗原結合分子之用於本發明之方法之套組。該套組，除此以外，也可預先包裝藥學上可容許之載體、介質、記載使用方法之指示書等。

【0260】 又，本發明係關於含有本發明之抗原結合分子或依照本發明之製造方法所製造之抗原結合分子當做有效成分之利用抗原結合分子使抗原攝入細胞內之攝入促進劑、血漿中之抗原濃度之減少促進劑、使 1 分子之抗原結合分子對於抗原之結合次數增加劑、或抗原結合分子之血漿中滯留性改善劑。

【0261】 又，本發明係關於本發明之抗原結合分子或依照本發明之製造方法所製造之抗原結合分子之用途，係使用在利用抗原結合分子使抗原攝入細胞內之攝入促進劑、血漿中之抗原濃度之減少促進劑、使 1 分子之抗原結合分子對於抗原之結合次數增加劑、或抗原結合分子之血漿中滯留性改善劑之製

造。

【0262】 又，本發明係關於本發明之抗原結合分子或依照本發明之製造方法所製造之抗原結合分子，其係使用在促進利用抗原結合分子使抗原攝入細胞內之方法、促進血漿中之抗原濃度減少之方法、增加 1 分子之抗原結合分子對於抗原之結合次數之方法、或改善抗原結合分子之血漿中滯留性之方法。

【0263】 又，本說明書引用之所有先前技術文獻，係納入本說明書當做參照。

【實施例】

【0264】 以下以實施例更具體說明本發明，但本發明不限於該等實施例。

[實施例 1]鈣依存性的抗原結合抗體之抗原消失加速效果之概念

(1-1)pH 依存性的結合抗體之利用抗原結合抗體之抗原消失加速效果

WO 2009/125825 記載之 H54/L28-IgG1 為人類化抗 IL-6 受體抗體，Fv4-IgG1 為對於 H54/L28-IgG1 賦予對於可溶型人類 IL-6 受體以 pH 依存性結合之特性(中性條件下結合，且於酸性條件下解離)的人類化抗 IL-6 受體抗體。WO 2009/125825 記載之小鼠之體內試驗中，與投予 H54/L28-IgG1 與抗原可溶型人類 IL-6 受體之混合物之群比較，投予 Fv4-IgG1 與抗原可溶型人類 IL-6 受體之混合物之群中，顯示可溶型人類 IL-6 受體之消失能大幅加速。

【0265】 通常之與可溶型人類 IL-6 受體結合之抗體所結合

之可溶型人類 IL-6 受體，會與抗體一起由 FcRn 而於血漿中再循環，相對於此，以 pH 依存性的與可溶型人類 IL-6 受體結合之抗體，會於核內體內之酸性條件下將與抗體結合之可溶型人類 IL-6 受體解離。解離的可溶型人類 IL-6 受體會由溶體分解，故可大幅加速可溶型人類 IL-6 受體之消失，再者，以 pH 依存性的與可溶型人類 IL-6 受體結合之抗體會由於 FcRn 而於血漿中再循環，再循環的抗體能再度與可溶型人類 IL-6 受體結合，藉由反復此現象，1 個抗體分子能多次反復結合於可溶型人類 IL-6 受體（圖 1）。

【0266】 又，如 WO 2009/125825 記載，通常之人類化抗 IL-6 受體抗體，與膜型人類 IL-6 受體結合後，會以人類化抗 IL-6 受體抗體與膜型人類 IL-6 受體之複合體之狀態，被內化，之後溶體於分解。相對於此，以 pH 依存性的結合的人類化抗 IL-6 受體抗體，於與膜型人類 IL-6 受體結合並內化後，會於核內體內之酸性條件下從膜型人類 IL-6 受體解離，藉此於血漿中再循環。如此再循環之抗體能再度與膜型人類 IL-6 受體結合，藉由如此返覆，1 個抗體分子能返覆多次與膜型人類 IL-6 受體結合（圖 2）。

【0267】 (1-2)血漿中及核內體中之 pH 及鈣濃度

於圖 1 及圖 2 所示之 pH 依存性的結合抗體的作用中，利用血漿中與核內體內之環境不同，亦即 pH 之差異（血漿中：pH7.4、核內體內：pH6.0），使血漿中與抗原強力結合，並於核內體內從抗原解離係屬重要。為了使血漿中與核內體內之 pH 依存性的結合抗體對於抗原之結合能力有如此差異，血漿

中與核內體內之環境差異的大小係屬重要。pH 之不同，亦即氫離子濃度之不同。亦即，pH7.4 之血漿中之氫離子濃度為約 40 nM，pH6.0 之核內體內之氫離子濃度為約 1000 nM，血漿中與核內體內，因子(氫離子)之濃度約有約 25 倍的差別。

【0268】 為了使圖 1 及圖 2 所示作用更容易達成，或為了增強其作用，據認為利用血漿中與核內體內之氫離子濃度之不同，使用依存於濃度之不同大的因子的抗體即可。探索血漿中與核內體內的濃度不同大之因子，結果發現：鈣。血漿中之離子化鈣濃度為約 1.1-1.3 mM，核內體內之離子化鈣濃度為約 3 μ M，血漿中與核內體內的因子(鈣)之濃度有約 400 倍的差異，其差比起氫離子濃度差(25 倍)為大。亦即，藉由使用於高鈣濃度條件下(1.1-1.3 mM)會與抗原結合，且在低鈣濃度條件下(3 μ M)會從抗原解離之離子化鈣濃度依存性的結合抗體，據認為可更容易達成圖 1 及圖 2 所示之作用，或能增強其作用。

【0269】 又，WO 2009/125825 中，係藉由導入組胺酸，係作在 pH7.4 與 pH6.0 之性質改變的 pH 依存性的結合抗體。組胺酸於血漿中之中性條件下為中性電荷，但於核內體內之酸性條件下具正電荷。利用該組胺酸之電荷變化，可以對於抗體與抗原之交互作用賦予 pH 依存性。另一方面，如圖 3 所示，使用組胺酸時，為了於血漿中與抗原結合並於核內體內從抗原解離，抗體之組胺酸殘基必需與抗原之正電荷之胺基酸或成為氫鍵之捐出者的胺基酸交互作用，故用於發揮目的作用之 pH 依存性的結合抗體所結合之抗原側之抗原決定基，必需為正電荷之胺基酸或能成為氫鍵之捐出者的胺基酸。

【0270】 另一方面，如圖 4 所示，由於考慮鈣依存性的結合抗體會介由鈣離子而與抗原結合，故抗原側之抗原決定基為可螯合鈣離子之負電荷之胺基酸或能成為氫鍵接受者的之胺基酸，因此可以導向由導入組胺酸所製作之 pH 依存性的結合體無法導向的抗原決定基。再者，如圖 5 所示，藉由使用同時具鈣依存性與 pH 依存性之抗體，據認為可導向具有廣泛性質之抗原決定基。

【0271】 [實施例 2]使用噬菌體呈現技術從人類抗體庫取得 Ca 依存性的結合抗體

(2-1)未改變(naïve)人類抗體噬菌體呈現庫之製作

以從人類 PBMC 製作之 polyA RNA 或市售人類 polyA RNA 等當做模板，參考(Methods Mol Biol. 2002;178:87-100.)，構建提示由人類抗體序列構成之 Fab 域之多數人類抗體噬菌體呈現庫。

【0272】 (2-2)利用珠粒淘選由庫取得 Ca 依存性的結合抗體片段

從構建之人類抗體噬菌體呈現庫之最初之選拔，係僅濃縮具備對於抗原之結合能力之抗體片段、或以 Ca 依存性的結合能力為指標濃縮。濃縮成具備 Ca 依存性的結合能力之抗體片段時，係於 Ca 離子存在下使抗原結合後，利用 EDTA 將 Ca 離子螯合，以溶出噬菌體。抗原使用經生物素標記之人類 IL-6 受體。

【0273】 由保持以上述方式構建之噬菌體呈現用 phagemid 之大腸菌產生噬菌體，將獲得之培養液以 2.5 M NaCl/10%PEG

沉澱後以 TBS 稀釋，製成噬菌體庫液。對於噬菌體庫液添加 BSA, CaCl_2 ，製成使終濃度 4% BSA，離子化鈣濃度 1.2 mM。淘選係參考一般方法，即使用固定化於磁性珠粒之抗原之淘選方法 (J Immunol Methods. 2008 Mar 20;332(1-2):2-9.、J Immunol Methods. 2001 Jan 1;247(1-2):191-203.、Biotechnol Prog. 2002 Mar-Apr;18(2):212-20.、Mol Cell Proteomics. 2003 Feb;2(2):61-9.)。磁性珠粒使用 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) 或 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)。

【0274】 具體而言，於製備之噬菌體庫液添加 250 pmol 生物素標記抗原，於室溫使與抗原接觸 60 分鐘。添加經 BSA 阻斷的磁性珠粒，於室溫結合 15 分鐘。將珠粒以 1 mL 的 1.2 mM CaCl_2 /TBS(含 1.2 mM CaCl_2 TBS)洗滌 1 次。之後，於濃縮具備結合能力之抗體片段時，以一般方法進行溶出，於濃縮具備 Ca 依存性的結合能力的抗體片段時，於 2 mM EDTA/TBS(含 2%EDTA 之 TBS)將珠粒懸浮，並回收噬菌體。於回收之噬菌體溶液中，添加處在對數增殖期(OD600 0.4-0.5)之大腸菌株 TG1 10 mL，於 37°C、1 hr，利用緩慢攪拌培養使感染。將經感染之大腸菌塗覆在 225 mm x 225 mm 之平板。再度從該大腸菌開始培養，並培養噬菌體。

【0275】 第 2 次以後的淘選，係以 Ca 依存性的結合能力為指標進行濃縮。具體而言，於製備的噬菌體庫液添加 40 pmol 之生物素標記抗原，於室溫使與抗原接觸 60 分鐘。添加以 BSA 阻斷的磁性珠粒，於室溫使結合 15 分鐘。將珠粒以 1 mL 的

1.2 mM CaCl_2 /TBST(含 1.2 mM CaCl_2 , 0.1% Tween-20 之 TBS) 與 1.2 mM CaCl_2 /TBS 各洗滌 1 次。之後，添加 0.1 mL 之 2 mM EDTA/TBS(含 2%EDTA 之 TBS)，將珠粒於室溫懸浮，並立即使用磁座分離珠粒，回收噬菌體溶液。將回收之噬菌體溶液，添加到處於對數增殖期(OD600 0.4-0.5) 之大腸菌株 TG1 10 mL，於 37°C、1 hr,緩慢攪拌培養以使感染。將經感染之大腸菌塗覆在 225 mm x 225 mm 之平板。再度從該大腸菌開始培養，與上述同樣進行噬菌體之培養，反複 2 次淘選。

【0276】 (2-3)利用噬菌體 ELISA 之評價

從依上述方法獲得之大腸菌單一菌落，參考(Methods Mol Biol. 2002;178:133-145.)回收含噬菌體之培養上清。

對於含噬菌體之培養上清添加 BSA、 CaCl_2 ，使終濃度為 4%BSA、鈣離子濃度 1.2 mM，以供 ELISA。將 StreptaWell 96 微滴定平板(Roche)以含生物素標記抗原之 PBS 100 μL 塗覆一晚。以 PBST(含 0.1%Tween20 之 PBS)洗滌，去除抗原後，以 4% BSA-TBS 250 μL 阻斷 1 小時以上。去除 4% BSA-TBS，於其中添加製備的培養上清，於 37°C 靜置 1 小時，使噬菌體呈現抗體結合。以 1.2 mM CaCl_2 /TBST (含 1.2 mM CaCl_2 , 0.1% Tween20 之 TBS)洗滌後，添加 1.2 mM CaCl_2 /TBS 或 1 mM EDTA/TBS，於 37°C 靜置 30 分鐘並溫育。以 1.2 mM CaCl_2 /TBST 洗滌後，以 4% BSA、離子化鈣濃度 1.2 mM 之 TBS 稀釋成的 HRP 結合抗 M13 抗體(Amersham Pharmacia Biotech)溫育 1 小時。以 1.2 mM CaCl_2 /TBST 洗滌後，以 TMB single solution(ZYMED)檢測，並藉由硫酸之添加使反應停止後，測

定 450 nm 之吸光度。對於判斷有 Ca 依存性的結合能力的抗體片段，使用專一性引子進行鹼基序列解析。

【0277】 (2-4)抗體之表現與精製

利用噬菌體 ELISA，針對判斷有 Ca 依存性的結合能力的選殖體，進行對於動物細胞表現用質體的導入。抗體之表現係使用以下方法進行。將人類胎腎細胞來源的 FreeStyle 293-F 株(Invitrogen)懸浮於 FreeStyle 293 Expression Medium 培養基(Invitrogen)，以 1.33×10^6 個 /mL 的細胞密度在 6 井盤的各井各接種 3 mL，以脂轉染法將製備的質體導入細胞。於 CO₂ 培養箱 (37 度、8%CO₂, 90 rpm)培養 4 日，從獲得之培養上清，使用 rProtein A Sepharose™ Fast Flow(Amersham Biosciences)，以該技術領域之人士公知之方法精製抗體。精製抗體濃度，使用分光光度計測定於 280 nm 之吸光度。從獲得之值，以 PACE 法使用計算之吸光係數，計算抗體濃度(Protein Science 1995 ; 4 : 2411-2423)。

【0278】 [實施例 3]取得之抗體對於人類 IL-6 受體之 Ca 依存性的結合能力之評價

將實施例 2 取得之抗體 6RL#9-IgG1(重鏈序列編號：1、輕鏈序列編號：2)、6RK#12-IgG1(重鏈序列編號：66、輕鏈序列編號：67)及、FH4-IgG1(重鏈序列編號：3、輕鏈序列編號：4)，使用 Biacore T100(GE Healthcare)，評價於 pH7.4 之人類介白素 6 受體 (hIL6R) 結合活性。運行緩衝液，使用含 3 μM 或 2 mM CaCl₂ 之 0.05% Surfactant P20, 10 mmol/l ACES 150 mmol/l NaCl(pH7.4 或 pH6.0)測定。

【0279】 於 Sensor chip CM4(GE Healthcare)上，以胺基偶聯法將重組型 PROTEIN A(Thermo Scientific)適量固定化後，使抗體結合。注入適當濃度的 hIL-6R 當作分析物，使與感應晶片上之抗體交互作用。之後，注入 10 mmol/L Glycine-HCl (pH1.5)，使感應晶片再生。測定於 37 °C 進行。測定之結果，獲得之傳感圖如圖 6。從該等結果，可知：6RL#9-IgG1、6RK#12-IgG1 及 FH4-IgG1 抗體均為，於 Ca^{2+} 濃度為 3 μM 之條件下比起在 Ca^{2+} 濃度為 2 mM 之條件下時，對於 hIL6R 之結合較弱。

【0280】 該等抗體之中，就具 Ca 依存性之抗體而言，使用 6RL#9-IgG1(重鏈序列編號：1、輕鏈序列編號：2)、及、FH4-IgG1(重鏈序列編號：3、輕鏈序列編號：4)進一步進行反應速度論解析。就不具 Ca 依存性之抗體而言，使用 WO 2009/125825 記載之 H54/L28-IgG1(重鏈序列編號：5、輕鏈序列編號：6)。就高鈣離子濃度而言，使用 2 mM，低鈣離子濃度之條件使用 3 μM 。抗原使用人類 IL-6 受體(IL-6R)。於 Sensor chip CM4 (GE Healthcare)上以胺偶聯法適量固定 protein A (Invitrogen)，並於其中捕集目的之抗體。運行緩衝液使用 10 mmol/L ACES、150 mmol/L NaCl、0.05% (w/v) Tween20、2 mmol/L CaCl_2 、pH7.4 或 10 mmol/L ACES、150 mmol/L NaCl、0.05% (w/v) Tween20、3 $\mu\text{mol/L}$ CaCl_2 、pH7.42 種類。測定均於 37°C 實施，IL-6R 之稀釋也使用分別的緩衝液。

【0281】 關於 H54L28-IgG1，將 IL-6R 稀釋液與空白運行緩衝液以流速 20 $\mu\text{L/min}$ 注射 3 分鐘，使捕捉於感應晶片上之抗

體與 IL-6R 交互作用。之後，以流速 20 μ L/min 流過 10 分鐘運行緩衝液，觀察 IL-6R 之解離後，將 10 mmol/L Glycine-HCl, pH1.5 以流速 30 μ L/min 注射 30 秒，將感應晶片再生。從測定獲得之傳感圖，計算動力學參數結合速度常數 k_a (1/Ms)、及解離速度常數 k_d (1/s)，基於該值計算各抗體對於人類 IL-6 受體之解離常數 K_D (M)。各參數之計算係使用 Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare)。

【0282】 關於 FH4-IgG1、6RL#9-IgG1，係使 IL-6R 稀釋液與空白運行緩衝液以流速 5 μ L/min 注射 15 分鐘，使捕捉於感應晶片上之抗體與 IL-6R 交互作用。之後，將 10 mmol/L Glycine-HCl, pH1.5 以流速 30 μ L/min 注射 30 秒，將感應晶片再生。對於測定獲得之傳感圖使用 steady state affinity model 計算解離常數 K_D (M)。各參數之計算使用 Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare)。

【0283】 依該方法求出之於 2 mM CaCl_2 存在下之各抗體與 IL-6R 間的解離常數 K_D ，如表 7。於 H54/L28-IgG1 未觀察到由於 Ca 濃度之差異所致對於 IL-6R 之結合之差異，但是於 FH4-IgG1、6RL#9-IgG1，觀察到於低濃度 Ca 條件下的結合顯著減弱 (圖 7、8、9)。

【0284】 【表 7】

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

【0285】 針對 H54/L28-IgG1，可與於 2 mM Ca 濃度存在下為同樣方法，計算 Ca 濃度為 3 μ M 之條件下之 K_D 。針對 FH4-IgG1、6RL#9-IgG1，於 Ca 濃度為 3 μ M 時，幾乎未觀察到

對於 IL-6R 之結合，因此，難以利用上述方法計算 K_D ，但藉由使用下式 1，能預測 K_D (Biacore T100 Software Handbook, BR-1006-48, AE 01/2007)。

【0286】 [式 1]

$$R_{eq} = C \cdot R_{max} / (K_D + C) + RI$$

【0287】 上述式 1 中之各項目含意如下；

R_{eq} (RU): 穩定狀態結合水平 (Steady state binding levels)

R_{max} (RU): 分析物之表面結合能力 (Analyte binding capacity of the surface)

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

C (M): 分析物濃度 (Analyte concentration)

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

【0288】 使用該式 1，概算 Ca 濃度為 3 $\mu\text{mol/L}$ 時預測之各抗體與 IL-6R 之解離常數 K_D ，結果如表 8。

【0289】 【表 8】

	H54L28-IgG1	FH4-IgG1	6RL#9-IgG1
R_{eq} (RU)		5	10
R_{max} (RU)		39	72
RI (RU)		0	0
C (M)		5E-06	5E-06
K_D (M)	2.2E-9	3.4E-05	3.1E-05

【0290】 上述表 8 中， R_{eq} 、 R_{max} 、RI、C 係基於測定結果而假定之值。

【0291】 由該結果，可預測：FH4-IgG1、6RL#9-IgG1，藉由從 2 mM CaCl_2 改為 3 μM CaCl_2 ，對於 IL-6R 之 K_D 各升高約 60

倍、約 120 倍(60 倍、120 倍以上的親和性會減低)。表 9 整理 H54/L28-IgG1、FH4-IgG1、6RL#9-IgG1 之 3 抗體於 2 mM CaCl_2 存在下及 3 μM CaCl_2 存在下之 K_D 值、及、 K_D 值之 Ca 依存性。

【0292】 【表 9】

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

【0293】 [實施例 4]對於取得之抗體之鈣離子結合評價

其次，為了評價鈣離子對於抗體之結合，利用差示掃描型熱量測定(DSC)評價熱變性中間溫度(T_m 值) (MicroCal VP-Capillary DSC、MicroCal 製)。熱變性中間溫度(T_m 值)係安定性之指標，若鈣離子結合而蛋白質安定化，則熱變性中間溫度(T_m 值)比起鈣離子未結合時會增高(J Bio Chem. 2008 Sep 12 ; Vol.283 ; No. 37:pp 25140 - 25149)之性質，評價鈣離子對於抗體之結合。將經精製之抗體對於 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 , pH7.4、或 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 3 μM CaCl_2 , pH7.4 之溶液進行透析(EasySEP, TOMY)。將蛋白質溶液以透析用溶液製備成 0.1 mg/mL，於 20℃ 至 115℃ 之 240℃/hr 之升溫速度測定 DSC。依據獲得之 DSC 之變性曲線，計算各抗體之 Fab 域之熱變性中間溫度(T_m 值)，如表 10。

【0294】 【表 10】

可變區序列	鈣離子濃度		$\Delta T_m[^\circ\text{C}]$
	3 μM	2mM	2mM - 3 μM
H54/L28	92.87	92.87	0.00
FH4	74.71	78.97	4.26
6RL#9	77.77	78.98	1.21

【0295】 由表 10 之結果，顯示鈣依存性結合能力之 FH4 及 6RL#9 會由於鈣離子濃度而使 Fab 之 T_m 值變動，未顯示鈣依存性結合能力之 H54/L28 的 T_m 值不會變動。以 FH4 及 6RL#9 所示之 Fab 之 T_m 值之變動，顯示該等抗體有鈣離子結合，且 Fab 部分安定化。由此顯示，FH4 及 6RL#9 有鈣離子結合，另一方面，H54/L28 無鈣離子結合。

【0296】 [實施例 5]使用正常小鼠之 Ca 依存性結合抗體對於抗原於血漿中滯留性之影響評價

(5-1)使用正常小鼠之體內(in vivo)試驗

對於正常小鼠(C57BL/6J mouse、Charles River Japan)單獨投予 hsIL-6R(可溶型人類 IL-6 受體：於參考例 1 製作)或同時投予 hsIL-6R 及抗人類 IL-6 受體抗體後，評價 hsIL-6R 及抗人類 IL-6 受體抗體之體內動態。將 hsIL-6R 溶液($5\mu\text{g/mL}$)、或 hsIL-6R 與抗人類 IL-6 受體抗體之混合溶液對於尾靜脈以 10 mL/kg 單次投予。抗人類 IL-6 受體抗體，使用上述 H54/L28-IgG1、6RL#9-IgG1、FH4-IgG1。

【0297】 混合溶液中之 hsIL-6R 濃度均為 $5\mu\text{g/mL}$ ，但是抗人類 IL-6 受體抗體濃度依每種抗體不同，H54/L28-IgG1 為 0.1 mg/mL 、6RL#9-IgG1 及 FH4-IgG1 為 10 mg/mL ，此時由於相對於 hsIL-6R，抗人類 IL-6 受體抗體有足夠量過剩存在，因此可認為 hsIL-6R 大部分與抗體結合。投予後 15 分鐘、7 小時、1 日、2 日、4 日、7 日、14 日、21 日、28 日進行採血。將採取的血液立即於 4°C 、 $12,000\text{ rpm}$ 進行 15 分鐘離心分離，並獲得血漿。經分離之血漿，直到實施測定為止，保存在設定為 -20

℃ 以下之冷凍庫。

【0298】 (5-2)利用 ELISA 法測定正常小鼠血漿中之抗人類 IL-6 受體抗體濃度

小鼠血漿中之抗人類 IL-6 受體抗體濃度，係以 ELISA 法測定。首先，將 Anti-Human IgG(γ -chain specific) F(ab')₂ Fragment of Antibody (SIGMA) 分注到 Nunc-Immuno Plate, MaxiSoup (Nalge nunc International)，於 4℃ 靜置 1 晚，製作 Anti-Human IgG 固相化板。製備血漿中濃度為 0.64、0.32、0.16、0.08、0.04、0.02、0.01 μ g/mL 之檢量線試樣與稀釋 100 倍以上之小鼠血漿測定試樣，分注到 Anti-Human IgG 固相化板，於 25℃ 進行 1 小時溫育。之後使 Biotinylated Anti-human IL-6 R Antibody(R&D) 於 25℃ 反應 1 小時，再使 Streptavidin-PolyHRP80 (Stereospecific Detection Technologies)於 25℃ 反應 0.5 小時，以 TMB One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories)當做基質進行發色反應，以 1N-Sulfuric acid(Showa Chemical)停止反應後，以微平板讀取儀測定 450 nm 之吸光度。小鼠血漿中濃度係由檢量線之吸光度使用解析軟體 SOFTmax PRO(Molecular Devices)計算。以該方法測定之靜脈內投予後之正常小鼠中之 H54/L28-IgG1、6RL#9-IgG1、FH4-IgG1 在血漿中抗體濃度變動，如圖 10。

【0299】 (5-3)利用電化學發光法測定血漿中 hsIL-6R 濃度

小鼠之血漿中 hsIL-6R 濃度，係以電化學發光法測定。製備調整為 2000、1000、500、250、125、62.5、31.25 pg/mL 之

hsIL-6R 檢量線試樣及稀釋 50 倍以上之小鼠血漿測定試樣，混合以 SULFO-TAG NHS Ester(Meso Scale Discovery)釐化 51 Monoclonal Anti-human IL-6R Antibody(R&D)及 Biotinylated Anti-human IL-6 R Antibody (R&D)及 tocilizumab (重鏈序列編號：13、輕鏈序列編號：14)溶液混合，於 4℃ 使反應 1 晚。此時於 Assay buffer 中含有 10 mM EDTA，使樣本中之游離 Ca 濃度降低，目的為使樣本中幾乎所有的 hsIL-6R 從 6RL#9-IgG1 或 FH4-IgG1 解離，且與添加之 tocilizumab 成為結合狀態。之後，分注如 MA400 PR Streptavidin Plate(Meso Scale Discovery)。再於 25℃ 使反應 1 小時並洗滌後，分注 Read Buffer T($\times 4$)(Meso Scale Discovery)，立即以 SECTOR PR 400 reader(Meso Scale Discovery)進行測定。hsIL-6R 濃度係由檢量線之回應，使用解析軟體 SOFTmax PRO(Molecular Devices)計算。以該方法測定之靜脈內投予後之正常小鼠於血漿中之 hsIL-6R 濃度變動如圖 11。

【0300】 結果，hsIL-6R 單獨顯示非常快消失，相對於此，同時投予 hsIL-6R 與無 Ca 依存性結合之通常之抗體 H54/L28-IgG1 時，hsIL-6R 之消失會大幅延遲。相對於此，同時投予 hsIL-6R 以及具有 100 倍以上之 Ca 依存性結合之 6RL#9-IgG1 或 FH4-IgG1 時，hsIL-6R 之消失會大幅加速。比起同時投予 H54/L28-IgG1 之情形，同時投予 6RL#9-IgG1 及 FH4-IgG1 時，Day1 之血漿中之 hsIL-6R 濃度能分別減低 39 倍及 2 倍。藉此，確認鈣依存性結合抗體可加速抗原從血漿中消失。

【0301】 [實施例 6]探討 Ca 依存性抗原結合抗體之抗原消失加速效果之提高 (製作抗體)

(6-1)關於 IgG 抗體對 FcRn 之結合

IgG 抗體藉由與 FcRn 結合，會具有長的血漿中滯留性。IgG 與 FcRn 之結合，僅於酸性條件下(pH6.0)會發生，於中性條件下(pH7.4)幾乎未認為有結合。IgG 抗體會非專一性地攝入，但於核內體內之酸性條件下會與核內體內之 FcRn 結合，藉此回到細胞表面上，於血漿中之中性條件下會從 FcRn 解離。若對於 IgG 之 Fc 區域導入變異，並且喪失於酸性條件下對於 FcRn 之結合，則由於不會核內體內再循環於血漿中，故抗體之血漿中滯留性會顯著減損。

【0302】 改善 IgG 抗體之血漿中滯留性之方法，有人報告於酸性條件下提高對於 FcRn 之結合之方法。藉由對於 IgG 抗體之 Fc 區域導入胺基酸取代，並提高於酸性條件下對於 FcRn 之結合，從核內體內再循環到血漿中之效率會提高，其結果，血漿中滯留性會改善。導入胺基酸取代時重要者，係不提高於中性條件下對於 FcRn 之結合。若於中性條件下結合於 FcRn，則即使於核內體內之酸性條件下藉由與 FcRn 結合而回到細胞表面上，於中性條件下之血漿中若 IgG 抗體不會從 FcRn 解離，IgG 抗體不會再循環到血漿中，故反而會減損血漿中滯留性。

【0303】 例如:J Immunol. 2002;169(9):5171-80.記載，藉由將對於 IgG1 導入胺基酸取代，而於中性條件下(pH7.4)認為對於小鼠 FcRn 有結合之抗體對於小鼠投予時，據報告抗體之血漿中滯留性會惡化。又，如 J Immunol. 2009;182(12):7663-71.

或 J Biol Chem. 2007 Jan 19;282(3):1709-17.或 J Immunol. 2002 Nov 1;169(9):5171-80.記載，藉由對於 IgG1 導入胺基酸取代，會提高於酸性條件下(pH6.0)之人類 FcRn 之結合，但若同時將於中性條件下(pH7.4)對於人類 FcRn 認為有結合之抗體對於長尾獼猴時，抗體之血漿中滯留性不會改善，不認為血漿中滯留性有變化。所以，於提高抗體機能之抗體工程技術中，僅專注在不使於中性條件下(pH7.4)對於人類 FcRn 之結合增加，而藉由使酸性條件下之對於人類 FcRn 之結合增加，以改善抗體之血漿中滯留性，至今為止尚無人報告：於 IgG 抗體之 Fc 區域導入胺基酸取代，並增加中性條件下(pH7.4)對於人類 FcRn 之結合之優點。

【0304】 與 Ca 依存性抗原結合之抗體，由於具有使可溶型之抗原之消失加速，使 1 個抗體分子返覆多次與可溶型之抗原結合之效果，故極有用。使該抗原消失加速效果更為提高之方法，有人驗證使中性條件下(pH7.4)對於 FcRn 之結合增強之方法。

【0305】 (6-2)中性條件下具有對於 FcRn 之結合的 Ca 依存性的人類 IL-6 受體結合抗體之製備

對於具鈣依存性的抗原結合能力之 FH4-IgG1 與 6RL#9-IgG1、及當做對照之不具鈣依存性的抗原結合能力的 H54/L28-IgG1，導入於中性條件下(pH7.4)使對於 FcRn 之結合增加之胺基酸變異。胺基酸變異之導入係利用使用 PCR 之該技術領域之人士公知之方法進行。具體而言，製作相對於 IgG1 之重鏈恆定區、相對於 IgG1 之重鏈恆定區，將 EU 編號法 434

號由 Asn 取代成 Trp 之 FH4-N434W(重鏈序列編號：7、輕鏈序列編號：8)與 6RL#9-N434W(重鏈序列編號：9、輕鏈序列編號：10)與 H54/L28-N434W(重鏈序列編號：11、輕鏈序列編號：12)。導入胺基酸取代之方法，係使用 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit(Stratagene)，以附屬說明書記載之方法製作變異體，並將獲得之質體片段插入動物細胞表現載體，製作成目的之表現載體。抗體之表現、精製、濃度測定，係以實施例 2 記載之方法實施。

【0306】 [實施例 7]使用正常小鼠評價 Ca 依存性結合抗體之消失加速效果

(7-1)使用正常小鼠之體內試驗

對於正常小鼠(C57BL/6J mouse、Charles River Japan)單獨投予 hsIL-6R(可溶型人類 IL-6 受體：參考例 1 製作)或將 hsIL-6R 及抗人類 IL-6 受體抗體同時投予後，評價 hsIL-6R 及抗人類 IL-6 受體抗體之體內動態。將 hsIL-6R 溶液(5 μ g/mL)、或 hsIL-6R 與抗人類 IL-6 受體抗體之混合溶液對於尾靜脈以 10 mL/kg 單次投予。抗人類 IL-6 受體抗體，使用上述 H54/L28-N434W、6RL#9-N434W、FH4-N434W。

【0307】 混合溶液中之 hsIL-6R 濃度均為 5 μ g/mL，但抗人類 IL-6 受體抗體濃度依各抗體而不同，H54/L28-N434W 為 0.042 mg/mL、6RL#9-N434W 為 0.55 mg/mL、FH4-N434W 為 1 mg/mL。此時由於對於 hsIL-6R，抗人類 IL-6 受體抗體以足量過剩存在，因此可認為 hsIL-6R 大部分與抗體結合。投予後 15 分鐘、7 小時、1 日、2 日、4 日、7 日、14 日、21 日、28 日

進行採血。將採取之血液立即於 4℃、12,000 rpm 進行 15 分鐘離心分離，獲得血漿。將分離之血漿在實施測定為止，保存於設定在 -20℃ 以下之冷凍庫。

【0308】 (7-2)利用 ELISA 法測定正常小鼠血漿中之抗人類 IL-6 受體抗體濃度

小鼠血漿中之抗人類 IL-6 受體抗體濃度，係以與實施例 6 同樣之 ELISA 法測定。該方法測定之靜脈內投予後之正常小鼠中，H54/L28-N434W、6RL#9-N434W、FH4-N434W 之血漿中抗體濃度變動如圖 12。

【0309】 (7-3)利用電化學發光法測定血漿中 hsIL-6R 濃度

小鼠之血漿中 hsIL-6R 濃度，以電化學發光法測定。製備調整為 2000、1000、500、250、125、62.5、31.25 pg/mL 之 hsIL-6R 檢量線試樣及稀釋 50 倍以上之小鼠血漿測定試樣，並以 SULFO-TAG NHS Ester(Meso Scale Discovery)釐化之 Monoclonal Anti-human IL-6R Antibody(R&D)及 Biotinylated Anti-human IL-6 R Antibody (R&D)混合，並於 4℃ 使反應 1 晚。此時之 Assay buffer 中含有 10 mM EDTA，並使樣本中之游離 Ca 濃度降低而使樣本中幾乎全部的 hsIL-6R 從 6RL#9-N434W 或 FH4-N434W 解離，目的為使成為以游離體的形式存在之狀態。之後，分注於 MA400 PR Streptavidin Plate(Meso Scale Discovery)。再於 25℃ 反應 1 小時並洗滌後，分注 Read Buffer T(×4)(Meso Scale Discovery)，立即以 SECTOR PR 400 reader(Meso Scale Discovery)測定。hsIL-6R 濃度，係由檢量線之回應使用解析軟體 SOFTmax

PRO(Molecular Devices)計算。該方法測定之靜脈內投予後之正常小鼠於血漿中之 hsIL-6R 濃度變動如圖 13。

【0310】 結果，於 pH7.4 對於 FcRn 之結合增強，但是當同時投予 hsIL-6R 與無 Ca 依存性結合之通常之抗體 H54/L28-N434W 時，比起單獨投予 hsIL-6R 時，hsIL-6R 之消失大幅減慢。相對於此，同時投予 hsIL-6R 與具 100 倍以上之 Ca 依存性結合且於 pH7.4 對於 FcRn 之結合增強之抗體 6RL#9-N434W 或 FH4-N434W 時，比起單獨投予 hsIL-6R 時，hsIL-6R 之消失加速。比起單獨投予 hsIL-6R 時，同時投予 6RL#9-N434W 及 FH4-N434W 時，Day1 之血漿中之 hsIL-6R 濃度各減低 3 倍及 8 倍。藉此，可確認對於鈣依存性結合抗體，藉由使於 pH7.4 對於 FcRn 之結合能力增強，可以更加速抗原從血漿中消失。

【0311】 將 hsIL-6R 與無 Ca 依存性結合之通常之抗體 H54/L28-IgG1 比較，具有與 hsIL-6R 及 100 倍以上之 Ca 依存性結合之抗體 6RL#9-IgG1 或 FH4-IgG1，確認有使 hsIL-6R 之消失增大之效果，具有與 hsIL-6R 與 100 倍以上之 Ca 依存性結合，且於 pH7.4 對於 FcRn 之結合增強之抗體 6RL#9-N434W 或 FH4-N434W，確認 hsIL-6R 之消失比起 hsIL-6R 單獨時能加速。該等數據，與如圖 1 所示，與 pH 依存性的抗原結合之抗體同樣，啟示與 Ca 依存性的抗原結合之抗體在核內體內會將抗原解離。如實施例 1 所示，與 pH 依存性的抗原結合之抗體受限於能當做標的之抗原決定基(圖 3)，但藉由使用與本探討發現的 Ca 依存性的抗原結合之抗體(圖 4、5)，能更加廣以將

核內體依存性的抗原解離之抗體為標的之抗原決定基。

【0312】 [實施例 8]利用 X 射線結晶結構解析鑑定 6RL#9 抗體之鈣離子結合部位

(8-1)X 射線結晶結構解析

如實施例 4 所示，6RL#9 抗體與鈣離子結合，係由熱變性溫度 T_m 值之測定所啟示。但是由於無法預測 6RL#9 抗體之哪個部位與鈣離子結合，因此，藉由使用 X 射線結晶結構解析之方法，指定鈣離子所交互作用之 6RL#9 抗體之序列中之殘基。

【0313】 (8-2)6RL#9 抗體之表現及精製

將為了 X 射線結晶結構解析使用而使表現之 6RL#9 抗體予以精製。具體而言，將各能表現 6RL#9 抗體之重鏈(序列編號：1)與輕鏈(序列編號：2)之方式製備之動物表現用質體，暫時導入動物細胞。對於懸浮於 FreeStyle 293 Expression Medium 培養基(Invitrogen)，使得最終細胞密度成為 1×10^6 細胞/mL 之 800 mL 之人類胎兒腎細胞來源 FreeStyle 293-F 株(Invitrogen)，導入以脂轉染法製備的質體。將導入有質體之細胞，於 CO_2 培養箱($37^\circ C$ 、 $8\%CO_2$ 、90 rpm)中培養 5 日。依照使用 rProtein A SepharoseTM Fast Flow(Amersham Biosciences)之該技術領域之人士公知之方法，從如上述獲得之培養上清精製抗體。使用分光光度計測定精製之抗體溶液於 280 nm 之吸光度。使用依 PACE 法計算之吸光係數，由測定值計算抗體濃度(Protein Science (1995) 4, 2411-2423)。

【0314】 (8-3)從 6RL#9 抗體精製 Fab 片段

使用分子量區分尺寸 10000MWCO 之超過濾膜時，將

6RL#9 抗體濃縮至 21 mg/mL。使用 L-Cystein 4 mM、EDTA 5 mM、20 mM 磷酸鈉緩衝液(pH 6.5)，至備以 5 mg/mL 稀釋而得之 2.5 mL 之該抗體之試樣。添加 0.125 mg 之 Papain(Roche Applied Science)，並將經攪拌之該試樣於 35°C 鏡置 2 小時。靜置後，溶解蛋白酶抑制劑蛋白酶抑制劑迷你長尾獼猴，再將溶有無 EDTA(Roche Applied Science)1 錠之 10 mL 之 25 mM MES 緩衝液(pH6)添加到該試樣，於冰中靜置，藉此，以 Papain 停止蛋白酶反應。其次，將該試樣添加到於下流游隨機連結之 1 mL 尺寸之 ProteinA 載體管柱 HiTrap MabSelect Sure(GE Healthcare)之 25 mM MES 緩衝液 pH6，經平衡化之 1 mL 尺寸之陽離子交換管柱 HiTrap SP HP(GE Healthcare)。同緩衝液中之 NaCl 濃度藉由直接上升到 300 mM 並進行溶出可獲得 6RL#9 抗體之 Fab 片段之精製區分。其次，將獲得之精製區分以 5000MWCO 超過濾膜濃縮為約 0.8 mL。於以含 50 mM NaCl 之 100 mM HEPES 緩衝液(pH 8)平衡化之凝膠過濾管柱 Superdex 200 10/300 GL(GE Healthcare)中，添加濃縮液。結晶化用之精製 6RL#9 抗體之 Fab 片段使用同緩衝液從管柱溶出。又，上述所有的管柱操作係於 6 至 7.5°C 之低溫下實施。

【0315】 (8-4)6RL#9 抗體之 Fab 片段於 Ca 存在下之結晶化

預先以一般的條件設定獲得 6RL#9 Fab 片段之種結晶。其次，使用以使成為 5 mM 之方式添加有 CaCl₂ 之精製 6RL#9 抗體之 Fab 片段，使用 5000MWCO 之超過濾膜濃縮為 12 mg/mL。其次，利用 hanging-drop 蒸氣擴散法，實施如前述方式濃縮之

試樣之結晶化。貯存溶液，使用含 20-29% PEG4000 之 100 mM HEPES 緩衝液(pH7.5)。在蓋玻片上對於 0.8 μ l 之貯存溶液及 0.8 μ l 之前述濃縮試樣之混合液，添加含 29% PEG4000 及 5 mM CaCl₂ 之於 100 mM HEPES 緩衝液(pH7.5)中破碎之前述種結晶稀釋成 100-10000 倍之稀釋系列之溶液 0.2 μ l，藉此製備結晶化滴劑。將該結晶化滴劑於 20℃ 靜置 2 日至 3 日，測定藉此獲得之薄板狀結晶之 X 射線繞射數據。

【0316】 (8-5)6RL#9 抗體之 Fab 片段於 Ca 非存在下之結晶化

精製 6RL#9 抗體之 Fab 片段使用 5000MWCO 之超過濾膜，濃縮為 15 mg/ml。其次，利用 hanging-drop 蒸氣擴散法，實施以前述方式濃縮之試樣之結晶化。貯存溶液使用含 18-25% 之 PEG4000 之 100 mM HEPES 緩衝液(pH7.5)。在蓋玻片上對於 0.8 μ l 之貯存溶液及 0.8 μ l 之前述濃縮試樣之混合液，添加以含 25% PEG4000 之 100 mM HEPES 緩衝液(pH7.5)中破碎之 Ca 存在下獲得之 6RL#9 抗體之 Fab 片段之結晶稀釋為 100-10000 倍而得之稀釋系列之溶液 0.2 μ l，製備結晶化滴劑。將該結晶化滴劑於 20℃ 靜置 2 日至 3 日，測定藉此獲得之薄板狀之結晶之 X 射線繞射數據。

【0317】 (8-6)6RL#9 抗體之 Fab 片段於 Ca 存在下之結晶 X 射線繞射數據之測定

將浸於含 35% PEG4000 及 5 mM CaCl₂ 之 100mM HEPES 緩衝液(pH7.5)之溶液而得之 6RL#9 抗體之 Fab 片段於 Ca 存在下獲得之單結晶，使用微小的附尼龍環的銷，將各外液鏟出，

而使該單結晶於液態氮中凍結。使用高能量加速器研究機構之放射光設施 Photon Factory 之束線 BL-17A，測定前述冷凍結晶之 X 射線繞射數據。又，測定中藉由一直於 -178°C 之氮氣流中放置冷凍結晶，維持冷凍狀態。使用束線具備並安裝的 CCD 偵測器 Quantum315r(ADSC)，使結晶每次旋轉 1° ，收集總共 180 張繞射影像。晶格常數之決定、對於繞射斑點賦予指數、及繞射數據之處理，係以程式 Xia2(CCP4 Software Suite)、XDS Package(Walfgang Kabsch)及 Scala(CCP4 Software Suite)進行。最終，獲得解析能力至多 2.2 埃之繞射強度數據。本結晶，屬於空間群 P212121，晶格常數 $a = 45.47$ 埃、 $b = 79.86$ 埃、 $c = 116.25$ 埃、 $\alpha = 90^{\circ}$ 、 $\beta = 90^{\circ}$ 、 $\gamma = 90^{\circ}$ 。

【0318】 (8-7)6RL#9 抗體之 Fab 片段於 Ca 非存在下之結晶之 X 射線繞射數據之測定

將浸於含 35% PEG4000 之 100 mM HEPES 緩衝液(pH7.5)之溶液的 6RL#9 抗體之 Fab 片段於 Ca 非存在下獲得之單結晶之一，藉由使用附微小的尼龍環的的銷，將外液鑷出，使該單結晶於液態氮中冷凍。使用高能量加速器研究機構之放射光設施 Photon Factory 之束線 BL-5A，測定前述冷凍結晶之 X 射線繞射數據。又，測定中一直將冷凍結晶放置在 -178°C 之氮氣流中，藉此維持冷凍狀態。使用束線具備並安裝的 CCD 偵測器 Quantum210r(ADSC)，使結晶每次旋轉 1° ，收集總共 180 張繞射影像。晶格常數之決定、對於繞射斑點賦予指數、及繞射數據之處理，係以程式 Xia2(CCP4 Software Suite)、XDS Package(Walfgang Kabsch)及 Scala(CCP4 Software Suite)進

行。最終，獲得解析能力至多 2.3 埃之繞射強度數據。本結晶，屬於空間群 P212121，晶格常數 $a = 45.40$ 埃、 $b = 79.63$ 埃、 $c = 116.07$ 埃、 $\alpha = 90^\circ$ 、 $\beta = 90^\circ$ 、 $\gamma = 90^\circ$ ，與 Ca 存在下之結晶為同型。

【0319】 (8-8)6RL#9 抗體之 Fab 片段於 Ca 存在下之結晶之結構解析

利用使用程式 Phaser(CCP4 Software Suite)之分子取代法，決定 6RL#9 抗體之 Fab 片段於 Ca 存在下之結晶之結構。從獲得之結晶格子之大小以及 6RL#9 抗體之 Fab 片段之分子量，預測非對稱單元中之分子數為一個。依據一次序列上之相同性，將從 PDB code: 1ZA6 之結構座標取出之 A 鏈 112-220 號及 B 鏈 116-218 號之胺基酸殘基部分當做 CL 及 CH1 區之探索用模型分子。其次，將從 PDB code: 1ZA6 之結構座標取出之 B 鏈 1-115 號之胺基酸殘基部分，當做 VH 區之探索用模型分子。最後，將從 PDB code 2A9M 之結構座標取出之輕鏈 3-147 號之胺基酸殘基，當做 VL 區之探索用模型分子。依照該順序，從旋轉函數及並進函數決定各探索用模型分子於結晶格子內之走向與位置，而獲得 6RL#9 抗體之 Fab 片段之起始結構模型。對於該起始結構模型，進行使 VH、VL、CH1、CL 之各域移動的剛體精密化，對於 25-3.0 埃之反射數據，結晶學的可靠度因子 R 值為 46.9%、Free R 值為 48.6%。又，一面參考利用使用程式 Refmac5(CCP4 Software Suite)之結構精密化、與由實驗決定之結構因子 F_o 與從模型計算之結構因子 F_c 及使用位相計算之以 $2F_o - F_c$ 、 $F_o - F_c$ 當做係數之電子密度輿圖，一面反

複進行於程式 Coot(Paul Emsley)上進行模型修正，藉此進行模型之精密化。最後，依據以 $2F_o-F_c$ 、 F_o-F_c 當做係數之電子密度輿圖，將 Ca 離子及水分子納入模型，以使用程式 Refmac5(CCP4 Software Suite)進行精密化。藉由使用解析能力為 25-2.2 埃之 21020 個反射數據，最終，對於 3440 個原子之模型，結晶學的可靠度因子 R 值為 20.0%、Free R 值為 27.9%。

【0320】 (8-9)6RL#9 抗體之 Fab 片段於 Ca 非存在下之結晶之 X 射線繞射數據之測定

6RL#9 抗體之 Fab 片段於 Ca 非存在下之結晶之結構，係使用同型 Ca 存在下結晶之結構決定。從 6RL#9 抗體之 Fab 片段於 Ca 存在下之結晶之結構座標，窺視水分子與 Ca 離子分子，進行使 V_H 、 V_L 、 $CH1$ 、 CL 之各域移動之剛體精密化。對於 25-3.0 埃之反射數據，結晶學的可靠度因子 R 值為 30.3%、Free R 值為 31.7%。再者，一面參考利用使用程式 Refmac5(CCP4 Software Suite)之結構精密化、與由實驗決定之結構因子 F_o 與從模型計算之結構因子 F_c 及使用位相計算之以 $2F_o-F_c$ 、 F_o-F_c 當做係數之電子密度輿圖，一面反複進行於程式 Coot(Paul Emsley)上進行模型修正，藉此進行模型之精密化。最後，依據以 $2F_o-F_c$ 、 F_o-F_c 當做係數之電子密度輿圖，將水分子納入模型，以使用程式 Refmac5(CCP4 Software Suite)進行精密化。藉由使用解析能力為 25-2.3 埃之 18357 個反射數據，最終，對於 3351 個原子之模型，結晶學的可靠度因子 R 值為 20.9%、Free R 值為 27.7%。

【0321】 (8-10)6RL#9 抗體之 Fab 片段於 Ca 存在或非存在

下之結晶之 X 射線繞射數據之比較

若比較 6RL#9 抗體之 Fab 片段於 Ca 存在下之結晶及 Ca 非存在下之結晶之結構，可觀察到重鏈 CDR3 有重大變化。圖 14 顯示由 X 射線結晶結構解析決定之 6RL#9 抗體之 Fab 片段之重鏈 CDR3 之結構。具體而言，於 Ca 存在下之 6RL#9 抗體之 Fab 片段之結晶中，重鏈 CDR3 環圈部分之中心部分存在有鈣離子。鈣離子，據認為會與重鏈 CDR3 之 95 位、96 位及 100a 位(Kabat 編號法)交互作用。Ca 存在下時，與抗原之結合會由於重要重鏈 CDR3 環圈與鈣結合而安定化，據認為成為對與抗原之結合最適之結構。抗體之重鏈 CDR3 有鈣結合之例，至今為止無人報告，抗體之重鏈 CDR3 有鈣結合之結構為新穎結構。重鏈 CDR3 與抗原之結合已知為最重要，本實施例發現的鈣離子對於重鏈 CDR3 之結構維持為必要之模體，據認為鈣離子對於與抗原結合具有重要作用。亦即，具有本模體之抗體據認為對於鈣離子依存性的抗原有結合之可能性極高，例如若能製作具本模體之合成庫，則據認為可從如此的庫有效率的取得鈣依存性結合抗體。

【0322】 [實施例 9]使用噬菌體呈現技術從人類抗體庫取得 Ca 依存性的與 IL-6 結合之抗體

(9-1)未經改變的(naïve)人類抗體噬菌體呈現庫之製作

依照從人類 PBMC 製作之多 A RNA，或以市售之人類多 A RNA 等為模板之該技術領域之人士公知之方法，構建呈現彼此不同的人類抗體序列之 Fab 域的多數噬菌體構成的人類抗體噬菌體呈現庫。

【0323】 (9-2)利用珠粒淘選從庫取得 Ca 依存性的與抗原結合之抗體片段

從構建之未經改變的人類抗體噬菌體呈現庫最初之選拔，係藉由濃縮成僅具對於抗原(IL-6)之結合能力之抗體片段而實施。抗原使用經生物素標記之 IL-6。

【0324】 從保持有經構建之噬菌體呈現用噬粒(phagemid)之大腸菌生產噬菌體。藉由對於進行噬菌體之大腸菌之培養液添加 2.5 M NaCl/10%PEG，使沉澱的噬菌體的集團以 TBS 稀釋，藉此獲得噬菌體庫液。其次，對於噬菌體庫液添加 BSA 及 CaCl_2 ，使終濃度成為 4%BSA 及 1.2mM 鈣離子濃度。淘選方法，係參照一般方法即使用固定化於磁性珠粒之抗原的淘選方法(J. Immunol. Methods. (2008) 332 (1-2), 2-9、J. Immunol. Methods. (2001) 247 (1-2), 191-203、Biotechnol. Prog. (2002) 18 (2) 212-20、Mol. Cell Proteomics (2003) 2 (2), 61-9)。磁性珠粒可使用 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated)或 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)。

【0325】 具體而言，於製備的噬菌體庫液添加 250 pmol 之生物素標記抗原，藉此使該噬菌體庫液於室溫接觸抗原 60 分鐘。添加以 BSA 阻斷的磁性珠粒，將抗原與噬菌體之複合體於室溫結合於磁性珠粒 15 分鐘。將珠粒以 1.2 mM CaCl_2 /TBST(含 1.2 mM CaCl_2 之 TBST)洗滌 3 次後，以 1 mL 之 1.2 mM CaCl_2 /TBS(含 1.2 mM CaCl_2 之 TBS)再洗滌 2 次。之後，將添加有 0.5 mL 之 1 mg/mL 之胰蛋白酶之珠粒於室溫懸

浮 15 分鐘後，立即使用磁座分離珠粒，將噬菌體溶液回收。將回收的噬菌體溶液，添加到處於對數增殖期(OD600 為 0.4-0.5)之 10 mL 之大腸菌株 TG1。於 37°C 緩慢攪拌，培養上述大腸菌 1 小時，藉此使噬菌體感染大腸菌。將經感染之大腸菌，接種到 225 mm x 225 mm 的平板。其次，從經接種之大腸菌之培養液回收噬菌體，以製備噬菌體庫液。

【0326】 第 2 次後之淘選，係以 Ca 依存性結合能力為指標，實施噬菌體之濃縮。具體而言，係於製備的噬菌體庫液添加 40 pmol 之生物素標記抗原，藉此使噬菌體庫於室溫與抗原接觸 60 分鐘。添加經 BSA 阻斷的磁性珠粒，使抗原與噬菌體之複合體於室溫結合於磁性珠粒 15 分鐘。珠粒以 1 mL 之 1.2 mM CaCl₂/TBST 與 1.2 mM CaCl₂/TBS 洗滌。之後，將添加有 0.1 mL 之 2 mM EDTA/TBS 的珠粒於室溫懸浮後，立即使用磁座分離珠粒，並回收噬菌體溶液。於回收之噬菌體溶液添加 100 mg/mL 之胰蛋白酶 5 μL，藉此切斷未呈現 Fab 之噬菌體之 pIII 蛋白質(幫助者(helper)噬菌體來源之 pIII 蛋白質)，使未呈現 Fab 之噬菌體失去對於大腸菌之感染能力。將從經胰蛋白酶處理之噬菌體溶液回收之噬菌體，添加到處於對數增殖期(OD600 為 0.4-0.7)之 10 mL 之大腸菌株 TG1。於 37°C 緩慢攪拌進行 1 小時上述大腸菌之攪拌培養，使噬菌體感染大腸菌。將感染的大腸菌接種在 225 mm x 225 mm 之平板。其次，從接種的大腸菌的培養液回收噬菌體，藉此回收噬菌體庫液。以 Ca 依存性結合能力為指標之淘選，返覆 3 次。

【0327】 (9-3)利用噬菌體 ELISA 所為之評價

從依照上述方法獲得之大腸菌之單一菌落，參考常法 (Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145) 回收含噬菌體之培養上清。將添加有 BSA 及 CaCl_2 使終濃度為 4%BSA 及 1.2 mM 鈣離子濃度之含噬菌體之培養上清，以下列步驟供 ELISA。將 StreptaWell 96 微滴定平板 (Roche) 以含生物素標記抗原之 100 μL 之 PBS 塗覆一晚。將該板之各井以 PBST 洗滌，以去除抗原後，將該井以 250 μL 之 4%BSA-TBS 阻斷 1 小時以上。將已去除 4%BSA-TBS 之各井中添加有製備之培養上清的該板，於 37°C 靜置 1 小時，藉此使呈現噬菌體之抗體結合於各井存在之抗原。於以 1.2 mM CaCl_2 /TBST 洗滌之各井中，添加 1.2 mM CaCl_2 /TBS 或 1 mM EDTA/TBS，將該板於 37°C 靜置 30 分鐘並溫育。以 1.2 mM CaCl_2 /TBST 洗滌後，將以設為終濃度 4%BSA 及 1.2 mM 離子化鈣濃度之 TBS 稀釋過的 HRP 結合抗 M13 抗體 (Amersham Pharmacia Biotech) 添加到各井之板溫育 1 小時。以 1.2 mM CaCl_2 /TBST 洗滌後，使添加有 TMB single 溶液 (ZYMED) 之各井中之溶液之發色反應藉由添加硫酸而停止後，從 450 nm 之吸光度測定該發色。

【0328】 使用經單離之 96 選殖體進行噬菌體 ELISA，獲得對於 IL-6 具有 Ca 依存性結合能力之 6KC4-1#85 抗體、6LC4-1#15 抗體及 6LC4-2#16 抗體。由上述噬菌體 ELISA 之結果，進行判斷為具有對於 Ca 依存性抗原之結合能力的抗體片段為模板，而以專一性引子放大之基因之鹼基序列解析。6KC4-1#85 抗體之重鏈可變區之序列記載於序列編號：25，及輕鏈可變區之序列記載於序列編號：26。將編碼為 6KC4-1#85

抗體之重鏈可變區(序列編號：25)之聚核苷酸，以 PCR 法與編碼為 IgG1 來源序列之聚核苷酸(序列編號：65)連結成之 DNA 片段，納入動物細胞表現用載體，構建表現序列編號：27 表示之重鏈之載體。將編碼為 6KC4-1#85 抗體之輕鏈可變區(序列編號：26)之聚核苷酸、以 PCR 法與編碼為天然型 Kappa 鏈之恆定區(序列編號：28)之聚核苷酸連結成之序列編號：29 表示之序列之 DNA 片段，納入動物細胞表現用載體。以同樣方法，將 6LC4-1#15 抗體(重鏈序列編號 68、輕鏈序列編號 69)及 6LC4-2#16 抗體(重鏈序列編號 70、輕鏈序列編號 71)納入細胞表現用載體。製作之改變體之序列，經該技術領域之人士公知之方法確認。

【0329】 (9-4)抗體之表現與精製

噬菌體 ELISA 之結果，將判斷為具有對於 Ca 依存性抗原之結合能力之選殖體，導入動物細胞表現用質體。抗體之表現係使用以下方法實施。將人類胎兒腎細胞來源 FreeStyle 293-F 株(Invitrogen)懸浮於 FreeStyle 293 Expression Medium 培養基(Invitrogen)，以 1.33×10^6 細胞/mL 之細胞密度對於 6 井板之各井各接種 3 mL。製備之質體，以脂轉染法導入細胞。於 CO₂ 培養箱(37 度、8%CO₂、90 rpm)中培養 4 日。使用 rProtein A Sepharose™ Fast Flow(Amersham Biosciences)，以該技術領域之人士公知之方法，從上述獲得之培養上清精製抗體。使用分光光度計測定經精製之抗體溶液於 280 nm 之吸光度。藉由使用 PACE 法計算之吸光係數，從得到之測定值計算抗體濃度(Protein Science (1995) 4, 2411-2423)。

【0330】 (9-5)鈣依存性的抗 IL6 抗體之結合評價

將取得之抗體使用 Biacore T100(GE Healthcare)，評價於 pH7.4 相關於人類介白素 6 (hIL6) 結合活性(解離常數 K_D (M))。運行緩衝液係使用含 $3\mu\text{M}$ 或 1.2mM CaCl_2 之 0.05% Tween20, 10 mmol/l ACES, 150 mmol/l NaCl(pH7.4)測定。

【0331】 於 Sensor chip CM5(GE Healthcare)上以胺基偶聯法適量固定化重組型 PROTEIN A/G(Thermo Scientific)後，使抗體結合。注射當做分析物之適當濃度之 hIL6(人類介白素 6、鎌倉 Technoscience)，使與感應晶片上之抗體交互作用。之後，注射 10 mmol/L Glycine-HCl (pH1.5)，使感應晶片再生。測定於 37°C 進行。測定之結果，獲得之傳感圖如圖 15。從該等結果，可知：6LC4-1#15-IgG1 及 6LC4-2#16-IgG1、6KC4-1#85-IgG1 抗體於 Ca^{2+} 濃度為 $3\mu\text{M}$ 之條件下，比起於 Ca^{2+} 濃度為 1.2mM 之條件下，對於 hIL6 之結合較弱。上述結果不僅是鈣依存性抗原結合之性質為實施例 3 所示之 IL-6R，在 IL-6 也有顯示，故顯示對於其他抗原也能適用。

【0332】 [實施例 10]6KC4-1#85 抗體之鈣離子結合評價

(10-1)6KC4-1#85 抗體之鈣離子結合評價

評價從人類抗體庫取得之鈣依存性的抗原結合抗體 6KC4-1#85 抗體是否會與鈣結合。以離子化鈣濃度不同之條件，依實施例 4 記載之方法評價所測定之 T_m 值是否有變動。

【0333】 6KC4-1#85 抗體之 Fab 域之 T_m 值如表 11。如表 11，6KC4-1#85 抗體之 Fab 域之 T_m 值會由於鈣離子之濃度而變動，所以可知：6KC4-1#85 抗體會與鈣結合。

【0334】 【表 11】

抗體	鈣離子濃度		$\Delta T_m(^{\circ}\text{C})$
	3 μM	2 mM	2 mM-3 μM
6KC4-1#85	71.49	75.39	3.9

【0335】 (10-2)6KC4-1#85 抗體之鈣離子結合部位之鑑定

實施例 10 之(10-1)顯示 6KC4-1#85 抗體會與鈣離子結合，但是 6KC4-1#85 不具有如後述 hVk5-2 序列之鈣結合模體。所以，為了鑑定鈣離子是否與 6KC4-1#85 抗體之哪一個殘基有鈣離子結合，製作 6KC4-1#85 抗體之 CDR 所存在之 Asp(D)殘基取代為與鈣離子之結合或螯合無關的 Ala(A)殘基之改變重鏈(6_H1-11(序列編號：30)、6_H1-12(序列編號：31)、6_H1-13(序列編號：32)、6_H1-14(序列編號：33)、6_H1-15(序列編號：34))及改變輕鏈(6_L1-5(序列編號：35)及 6_L1-6(序列編號：36))。從導入有含改變抗體基因之表現載體的動物細胞的培養液，依實施例 2 記載之方法精製改變抗體。經精製之改變抗體之鈣結合，依實施例 4 記載之方法測定。測定結果如表 12。

【0336】 【表 12】

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

【0337】 如表 12 所示，藉由將 6KC4-1#85 抗體之重鏈 CDR3 之 95 位或 101 位 (Kabat 編號法) 取代為 Ala 殘基，6KC4-1#85 抗體會失去鈣結合能力，因此可認為該殘基對於與鈣之結合為重要。從 6KC4-1#85 抗體之改變抗體之鈣結合性可知，6KC4-1#85 抗體之重鏈 CDR3 之環圈基部附近存在之鈣結合模體，也可利用為本發明之抗原結合分子所包含之抗原結合域之鈣結合模體。本模體，係與實施例 8 發現之模體同樣之重鏈 CDR3 之鈣結合模體，因此，若同樣能製作例如具本模體之合成庫時，則據認為可從如此之庫有效率地取得鈣依存性結合抗體。

【0338】 [實施例 11]與鈣離子結合之人類生殖細胞系列序列之探索

(11-1)人類生殖細胞系列序列之取得

至今為止無人報告以含人類生殖細胞系列序列之抗體與鈣離子結合之情事。所以，為了判定含人類生殖細胞系列序列之抗體是否會與鈣離子結合，選殖包含以從 Human Fetal Spleen Poly RNA(Clontech)製備之 cDNA 當做模板之人類生殖細胞系列序列的抗體之生殖細胞系列的序列。將經選殖之 DNA 片段插入動物細胞表現載體。將獲得之表現載體之鹼基序列依該技術領域之人士公知之方法決定，其序列編號如表 13。編碼為序列編號：37(Vk1)、序列編號：38(Vk2)、序列編號：39(Vk3)、序列編號：40(Vk4)及序列編號：41(Vk5) 5' 聚核苷酸，與利用 PCR 法編碼為天然型 Kappa 鏈之恆定區(序列編號：28)之聚核苷酸連結成的 DNA 片段，納入動物細胞表現用載體。又，序列編號：42(Vk1)、序列編號：43(Vk2)、序列編號：44(Vk3)、序列編號：45(Vk4)及編碼為序列編號：46(Vk5)之聚核苷酸，與編碼為利用 PCR 法而 IgG1 之 C 末端 2 個胺基酸缺損之多肽(序列編號：65)之聚核苷酸連結之 DNA 片段，納入動物細胞表現用載體。製作之改變體之序列經以該技術領域之人士公知之方法確認。

【0339】 【表 13】

輕鏈生殖細胞系列序列	重鏈可變區序列編號	輕鏈可變區序列編號
Vk1	42	37
Vk2	43	38
Vk3	44	39
Vk4	45	40
Vk5	46	41

【0340】 (11-2)抗體之表現與精製

將插入有取得之 5 種人類生殖細胞系列序列的 DNA 片段的動物細胞表現載體導入動物細胞。抗體之表現係以以下方法進行。將人類胎兒腎細胞來源 FreeStyle 293-F 株(Invitrogen)懸浮於 FreeStyle 293 Expression Medium 培養基(Invitrogen)，以 1.33×10^6 細胞/mL 之細胞密度對於 6 井板之各井接種 3 mL。製備之質體以脂轉染法導入細胞。於 CO₂ 培養箱(37 度、8%CO₂、90 rpm)中進行 4 日培養。使用 rProtein A Sepharose™ Fast Flow(Amersham Biosciences)並使用該技術領域之人士公知之方法，從上述獲得之培養上清精製抗體。使用分光光度計精製之抗體溶液測定於 280 nm 之吸光度。使用依 PACE 法計算之吸光係數，可從獲得之測定值計算抗體濃度(Protein Science (1995) 4, 2411-2423)。

【0341】 (11-3)含人類生殖細胞系列序列之抗體之鈣離子結合活性之評價

評價經精製之抗體之鈣離子結合活性。將經精製之抗體提供給以 20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、2 mM CaCl₂(pH7.4)或 20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl, 3μM CaCl₂(pH7.4)之溶液為外液之透析(EasySEP、TOMY)處理。使用供透析之溶液及製備為 0.1 mg/mL 之抗體溶液當做待驗物質，從 20℃ 至 115℃ 以 240℃/hr 之升溫速度進行 DSC 測定。依據獲得之 DSC 之變性曲線計算之各抗體之 Fab 域之熱變性中間溫度(T_m 值)，如表 14。

【0342】 【表 14】

輕鏈生殖細胞系列 序列	鈣離子濃度		ΔT_m (°C)
	3 μ M	2 mM	2 mM-3 μ M
Vk1	80.32	80.78	0.46
Vk2	80.67	80.61	-0.06
Vk3	81.64	81.36	-0.28
Vk4	70.74	70.74	0
Vk5	71.52	74.17	2.65

【0343】 其結果，含 hVk1、hVk2、hVk3、hVk4 序列之抗體之 Fab 域之 T_m 值，不依存於含該 Fab 域之溶液中之鈣離子濃度，不變動。另一方面，含 hVk5 序列之抗體之 Fab 域之 T_m 值，會由於含該 Fab 域之抗體溶液中之鈣離子濃度而變動，因此顯示 hVk5 序列會與鈣離子結合。

【0344】 [實施例 12]人類 Vk5(hVk5)序列之評價

(12-1)hVk5 序列

Kabat 資料庫中，hVk5 序列僅有 hVk5-2 序列登載。以下將 hVk5 與 hVk5-2 以相同含意處理。

【0345】 (12-2)糖鏈非加成型 hVk5-2 序列之構建、表現及精製

hVk5-2 序列在 20 位(Kabat 編號法)之胺基酸具有加成 N 型糖鏈之序列。對於蛋白質加成之糖鏈由於存在異質性，故由物質均勻性之觀點，以不加成糖鏈為理想。而，製作 20 位(Kabat 編號法)之 Asn(N)殘基取代為 Thr(T)殘基之改變體 hVk5-2_L65(序列編號：47)。胺基酸之取代，係使用 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit(Stratagene)之該技術領域之人士公知之方法進行。將編碼為改變體 hVk5-2_L65 之 DNA 納入動

物表現用載體。納入有製作之改變體 hVk5-2_L65 之 DNA 的動物表現用載體，與納入有表現當做重鏈之 CIM_H(序列編號：48)的動物表現用載體，以實施例 2 記載之方法一起導入到動物細胞中。於導入之動物細胞中表現之含 hVk5-2_L65 及 CIM_H 之抗體，以實施例 2 記載之方法精製。

【0346】 (12-3)含糖鏈非加成型 hVk5-2 序列之抗體之物性評價

經取得之含改變序列 hVk5-2_L65 之抗體，是否比起為供改變之基礎的 hVk5-2 序列之抗體，其異質性有所減少之情事，係使用離子交換層析分析。離子交換層析之方法如表 15 所示。分析結果如圖 16 所示，顯示糖鏈加成部位經改變之 hVk5-2_L65，比起原本的 hVk5-2 序列，異質性有所減少。

【0347】 【表 15】

	鈣離子濃度
管柱	TOSOH TSKgel DEAE-NPR
移動相	A; 10 mM Tris-HCl, 3 μ M CaCl ₂ (pH8.0)
	B; 10 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 3 μ M CaCl ₂ (pH8.0)
梯度時程	%B = 0 - (5min) - 0 - 2%/1min
管柱溫度	40°C
檢測	280 nm
注入量	100 μ L (5 μ g)

【0348】 其次，將含有異質性減少之 hVk5-2_L65 序列的抗體是否會與鈣離子結合之情事，使用實施例 4 記載之方法評價。其結果，如表 16 所示，含有糖鏈加成部位經改變之 hVk5-2_L65 之抗體之 Fab 域之 T_m 值，也會由於抗體溶液中之鈣離子濃度之變化而變動。亦即，顯示含糖鏈加成部位經改變

之 hVk5-2_L65 之抗體之 Fab 域，會有鈣離子結合。

【0349】 【表 16】

輕鏈	糖鏈加成序列	鈣離子濃度		$\Delta T_m(^{\circ}\text{C})$
		3 μM	2 mM	2 mM-3 μM
hVk5-2	有	71.52	74.17	2.65
hVk5-2_L65	無	71.51	73.66	2.15

【0350】 [實施例 13]對於含 hVk5-2 序列之 CDR 序列之抗體分子之鈣離子結合活性之評價

(13-1)含 hVk5-2 序列之 CDR 序列之改變抗體之製作、表現及精製

hVk5-2_L65 序列，係存在於人類 Vk5-2 序列之框架的糖鏈加成部位之胺基酸受改變之序列。於實施例 12 顯示即使改變糖鏈加成部位，鈣離子仍會結合，但是一般而言，框架序列為生殖細胞系列之序列從免疫原性之觀點為理想。所以，探討是否可能將抗體之框架序列取代為未加成糖鏈之生殖細胞系列序列之框架序列而維持對於該抗體之鈣離子之結合活性。

【0351】 將編碼為經化學合成之 hVk5-2 序列之框架序列改變為 hVk1、hVk2、hVk3 及 hVk4 序列之序列(各為 CaVk1(序列編號：49)、CaVk2(序列編號：50)、CaVk3(序列編號：51)、CaVk4(序列編號：52)的聚核苷酸，以 PCR 法與編碼為天然型 Kappa 鏈之恆定區(序列編號：28)之聚核苷酸連結成的 DNA 片段，納入動物細胞表現用載體。經製作之改變體之序列以該技術領域之人士公知之方法確認。以上述方式製作之各質體，與納入有編碼為 CIM_H(序列編號：48)之聚核苷酸之質體，一起以實施例 2 記載之方法導入動物細胞。從以上述方式導入之動

物細胞之培養液，精製表現之所望之抗體分子。

【0352】 (13-2)含 hVk5-2 序列之 CDR 序列之改變抗體之鈣離子結合活性之評價

以實施例 4 記載之方法評價鈣離子是否會結合於含 hVk5-2 序列以外之生殖細胞系列序列(hVk1、hVk2、hVk3、hVk4)之框架序列及 hVK5-2 序列之 CDR 序列的改變抗體。評價結果如表 17。各改變抗體之 Fab 域之 T_m 值，顯示會由於抗體溶液中之鈣離子濃度變化而變動。是以，顯示含 hVk5-2 序列之框架序列以外的框架序列的抗體也會與鈣離子結合。亦即，顯示 hVk5-2 序列之 CDR 序列所具有之模體對於與鈣離子之結合係屬重要，確認框架序列可為任意框架。

【0353】 【表 17】

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

【0354】 再者，可知：改變為含有 hVk5-2 序列以外之生殖細胞系列序列(hVk1、hVk2、hVk3、hVk4)之框架序列及 hVK5-2 序列之 CDR 序列的各抗體之 Fab 域之熱安定性之指標熱變性溫度(T_m 值)，比以含有當做供改變之基礎的 hVk5-2 序列的抗體之 Fab 域之 T_m 值為增加。從該結果，發現：含 hVk1、hVk2、hVk3、hVk4 之框架序列及 hVk5-2 序列之 CDR 序列的抗體，

具有與鈣離子結合之性質，此外，於熱安定性之觀點也為優異之分子。

【0355】 [實施例 14]人類生殖細胞系列 hVk5-2 序列存在之鈣離子結合部位之鑑定

(14-1)hVk5-2 序列之 CDR 序列中之變異部位之設計

如實施例 13 記載，含 hVk5-2 序列之 CDR 部分導入於其他生殖細胞系列之框架序列之輕鏈之抗體也會顯示與鈣離子結合。由此結果，啟示 hVk5-2 存在之鈣離子結合部位在 CDR 之中存在。與鈣離子結合，亦即螯合鈣離子之胺基酸，例如負電荷之胺基酸或能成為氫鍵之接受者之胺基酸。所以，評價含有 hVk5-2 序列之 CDR 序列中存在之 Asp(D)殘基或 Glu(E)殘基取代為 Ala(A)殘基之變異 hVk5-2 序列的抗體是否會與鈣離子結合。

【0356】 (14-2)hVk5-2 序列之 Ala 取代體之製作及抗體之表現及精製

製作含有 hVk5-2 序列之 CDR 序列中存在之 Asp 及 / 或 Glu 殘基改變為 Ala 殘基之輕鏈的抗體分子。如實施例 12 記載，由於未加成糖鏈之改變體 hVk5-2_L65 維持與鈣離子結合，故由鈣離子結合性之觀點，可認為與 hVk5-2 序列為同等。本實施例中，以 hVk5-2_L65 為模板序列，進行胺基酸取代。製作之改變體如表 18。胺基酸之取代使用 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit(Stratagene)、PCR 或 In fusion Advantage PCR cloning kit(TAKARA)等該技術領域之人士公知之方法進行，構建胺基酸經取代之改變輕鏈之表現載體。

【0357】 【表 18】

輕鏈改變體名	改變部位 (Kabat 編號法)	序列編號
hVk5-2_L65	野生型	4 7
hVk5-2_L66	30	5 3
hVk5-2_L67	31	5 4
hVk5-2_L68	32	5 5
hVk5-2_L69	50	5 6
hVk5-2_L70	30, 32	5 7
hVk5-2_L71	30, 50	5 8
hVk5-2_L72	30, 32, 50	5 9
hVk5-2_L73	92	6 0

【0358】 獲得之表現載體之鹼基序列以該技術領域之人士公知之方法決定。將製作之改變輕鏈之表現載體與重鏈 CIM_H(序列編號：48)之表現載體，一起暫時性導入人類胎兒腎癌細胞來源 HEK293H 株(Invitrogen)、或 FreeStyle293 細胞(Invitrogen)，以使抗體表現。從獲得之培養上清，使用 rProtein A Sepharose™ Fast Flow(GE Healthcare)，以該技術領域之人士公知之方法精製抗體。經精製之抗體溶液於 280 nm 之吸光度，使用分光光度計測定。藉由使用 PACE 法計算之吸光係數，從獲得之測定值計算抗體濃度 (Protein Science (1995) 4, 2411-2423)。

【0359】 (14-3)含 hVk5-2 序列之 Ala 取代體的抗體之鈣離子結合活性評價

判定獲得之精製抗體是否會與鈣離子結合。具體而言，將經精製之抗體供以 20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、2 mM CaCl₂(pH7.5)或 20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl(pH7.5)之溶液

(表 19 表示記載鈣離子濃度 $0\mu\text{M}$) 為外液之透析(EasySEP、TOMY)處理。使用透析用之溶液並以製備為 0.1 mg/mL 之抗體溶液當做待驗物質，於 20°C 至 115°C 以 240°C/hr 之升溫速度進行 DSC 測定。依據獲得之 DSC 之變性曲線計算之各抗體之 Fab 域之熱變性中間溫度(T_m 值)，如表 19。表中存在有藉由將 hVk5-2 序列之 CDR 序列中存在之 Asp 或 Glu 殘基取代為與鈣離子之結合或螯合無關的 Ala 殘基，由於抗體溶液之鈣離子濃度之變化其 Fab 域之 T_m 值不會變動之抗體。顯示由於 Ala 取代而 T_m 值不變動之取代部位(32 位及 92 位(Kabat 編號法))，對於鈣離子與抗體之結合特別重要。

【0360】 【表 19】

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

【0361】 [實施例 15] 含具鈣離子結合模體之 hVk1 序列之抗體之鈣離子結合活性之評價

(15-1) 具鈣離子結合模體之 hVk1 序列之製作及抗體之表現及精製

從實施例 14 記載之 Ala 取代體之鈣之結合活性之結果，

顯示 hVk5-2 序列之 CDR 序列之中，Asp 或 Glu 殘基對於鈣結合為重要。所以，評價是否僅將 30 位、31 位、32 位、50 位及 92 位(Kabat 編號法)之殘基導入其他生殖細胞系列之可變區序列，仍能與鈣離子結合。具體而言，製作人類生殖細胞系序列 hVk1 序列之 30 位、31 位、32 位、50 位及 92 位(Kabat 編號法)之殘基取代為 hVk5-2 序列之 30 位、31 位、32 位、50 位及 92 位(Kabat 編號法)之殘基之改變體 LfVk1_Ca(序列編號：61)。亦即，判定是否含有僅導入有 hVk5-2 序列中之該等 5 殘基的 hVk1 序列的抗體能與鈣結合。改變體之製作與實施例 2 同樣進行。將獲得之輕鏈改變體 LfVk1_Ca 與含輕鏈 hVk1 序列之 LfVk1(序列編號：62)，與重鏈 CIM_H(序列編號：48)一起表現。抗體之表現及精製與實施例 14 以同樣方法實施。

【0362】 (15-2)含具鈣離子結合模體之人類 hVk1 序列之抗體之鈣離子結合活性之評價

以實施例 4 記載之方法判定如上述獲得之精製抗體是否會與鈣離子結合。其結果如表 20。含有具 hVk1 序列之 LfVk1 的抗體之 Fab 域之 T_m 值不會隨抗體溶液中之鈣濃度變化而變動，另一方面，含有 LfVk1_Ca 之抗體序列之 T_m 值會隨抗體溶液中之鈣濃度之變化而變化 1℃ 以上，因此，顯示含 LfVk1_Ca 之抗體會與鈣結合。由上述結果，鈣離子之結合，完全不需要 hVk5-2 之 CDR 序列，僅在構建 LfVk1_Ca 序列時導入之殘基也就足夠。

【0363】 【表 20】

輕鏈改變體	鈣離子濃度		$\Delta T_m(^{\circ}\text{C})$
	3 μM	2 mM	2 mM-3 μM
LfVk1	83.18	83.81	0.63
LfVk1_Ca	79.83	82.24	2.41

【0364】 (15-3)分解抑制型 LfVk1__Ca 序列之構建、表現及精製

製作實施例 15 之(15-2)中的人類生殖細胞系序列 hVk1 序列之 30 位、31 位、32 位、50 位及 92 位(Kabat 編號法)之殘基改為 hVk5-2 序列之 30 位、31 位、32 位、50 位及 92 位(Kabat 編號法)之殘基的改變體 LfVk1__Ca(序列編號：61)，顯示鈣離子結合。而，據認為含 LfVk1__Ca 序列之 Ca 依存性抗體(Ca 結合抗體)，但由於新穎序列 LfVk1__Ca 序列當做醫藥品之保存安定性不明，故其當做醫藥品之可應用性不明。而，利用 LfVk1__Ca 之熱加速試驗評價安定性。將 L 鏈具有 LfVk1__Ca 之抗體於 20 mM Histidine-HCl、150 mM NaCl、pH6.0 之溶液於 4 $^{\circ}\text{C}$ 之條件透析一晚。將經透析之抗體製備成 0.5 mg/mL，於 5 $^{\circ}\text{C}$ 或 50 $^{\circ}\text{C}$ 保存 3 日。將保存後之各抗體以實施例 12 記載之方法進行離子交換層析。其結果，如圖 17 所示，確認 LfVk1__Ca 於 50 $^{\circ}\text{C}$ 保存 3 日時會顯著分解。LfVk1__Ca 序列，據報告於 30 位、31 位及 32 位(Kabat 編號法)存在 Asp 且於酸性條件下會分解之 Asp-Asp 序列於 CDR1 序列中存在(J. Pharm. Biomed. Anal. (2008) 47(1), 23-30)，故據認為 30 位、31 位及 32 位(Kabat 編號法)為可分解處。為了避免 LfVk1__Ca 之分解，製作可能分解之 3 處 Asp(D)殘基取代為 Ala(A)殘基之改變體 LfVk1_Ca1(序列編號：72)、LfVk1_Ca2(序列編號：73)

及 LfVk1_Ca3(序列編號:74)。胺基酸之取代係使用 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit(Stratagene)之該技術領域之人士公知之方法進行。將編碼為改變體之 DNA 納入動物表現用載體。製作之納入有改變體之 DNA 的動物表現用載體，與納入使表現為重鏈之 GC H(序列編號:102)的動物表現用載體，以實施例 14 記載之方法一起導入動物細胞中。將導入之動物細胞中表現之抗體，以實施例 14 記載之方法精製。

【0365】 (15-4)含分解抑制型 LfVk1_Ca 序列之抗體之安定性評價

利用熱加速後之各抗體之異質性之比較以評價於實施例 15 之 (15-3)取得之抗體是否比起含成為供改變之基礎之 LfVk1_Ca 序列之抗體在 pH6.0 溶液中之分解受抑制。與上述同樣，將抗體於 5℃ 或 50℃ 保存 3 日。保存後之各抗體以實施例 12 記載之方法進行離子交換層析。分析之結果，如圖 17 所示，30 號(Kabat 編號法)部位經改變之 LfVk1_Ca1，比起原本的 LfVk1_Ca 序列的異質性少，由於熱加速所致分解顯示顯著受抑制。亦即，顯示 LfVk1_Ca 序列中之 30 位存在之 Asp(D)殘基分解，並且顯示 Asp 殘基之分解能藉由胺基酸改變避免。

【0366】 (15-5)輕鏈 30 位 Asp 殘基分解抑制型 LfVk1_Ca 序列之製作及抗體之表現及精製

從實施例 15 之 (15-4)記載之 Ala 取代體之分解抑制之結果，顯示 LfVk1_Ca 序列之 CDR 序列之中之 30 位(Kabat 編號法)之 Asp(D)殘基於酸性條件分解，且藉由將 30 位(Kabat 編號法)取代為其他胺基酸((15-4)中係取代為 Ala(A)殘基)，能抑制

分解。而，對於 30 位(Kabat 編號法)之殘基取代為能螯合鈣離子之殘基之一個 Ser(S)殘基而成序列(稱為 LfVk1_Ca6。序列編號：75)，是否能於維持鈣結合能力之下使分解受抑制進行評價。改變體之製作與實施例 14 同樣進行。將獲得之輕鏈改變體 LfVk1_Ca6 及輕鏈 LfVk1_Ca 序列與重鏈 GC_H(序列編號：102)一起表現。抗體之表現及精製，係與實施例 14 以同樣方法實施。

【0367】 (15-6)輕鏈 30 位 Asp 殘基分解抑制型 LfVk1_Ca 序列之評價

如以上述方法獲得之精製抗體之酸性條件下之保存安定性，以實施例 15 之(15-4)記載之方法判定。其結果如圖 18 所示，含 LfVk1_Ca6 序列之抗體，顯示比起含原本的 LfVk1_Ca 序列之抗體其分解受抑制。

【0368】 再者，以實施例 15 記載之方法判定含 LfVk1_Ca 序列之抗體及含 LfVk1_Ca6 序列之抗體是否會與鈣離子結合。其結果如表 21。含 LfVk1_Ca 序列之抗體及含分解抑制型 LfVk1_Ca6 序列之抗體之 Fab 域之 T_m 值，各隨抗體溶液中之鈣濃度之變化而變化 1℃ 以上。

【0369】 【表 21】

輕鏈改變體	鈣離子濃度		ΔT _m (°C) 2 mM-3 μM
	3 μM	2 mM	
LfVk1_Ca	78.45	80.06	1.61
LfVk1_Ca6	78.44	79.74	1.30

【0370】 由以上之結果，若考慮安定性，顯示 30 位為能與 Asp 以外之鈣離子交互作用之胺基酸(Asn、Glu、Gln、Ser、Thr、His、Tyr 等)，且 31 位、32 位、50 位及 92 位(Kabat 編號法)

之序列之全部或一部分為 hVk5-2 之胺基酸、或能與鈣交互作用之胺基酸(Asp、Asn、Glu、Gln、Ser、Thr、His、Tyr 等)，顯示對於抗體之鈣離子之結合為重要。例如據認為若能製作具有如此的模體之合成庫，則能從如此的庫有效率的取得鈣依存性結合抗體。

【0371】 [實施例 16]利用 NMR 評價具含鈣離子結合模體之人類 hVk1 序列之抗體之鈣離子結合活性

(16-1)抗體之表現與精製

將用於 NMR 測定而使表現之含 LfVk1_Ca 之抗體與含 LfVk1 之抗體精製。具體而言，將含 LfVk1_Ca 之抗體以各能使表現重鏈(序列編號：13)與輕鏈(序列編號：61)的方式製備之動物表現用質體對於動物細胞暫時性導入。又，將含 LfVk1 之抗體以各能使表現重鏈(序列編號：13)與輕鏈(序列編號：62)之方式製備之動物表現用質體暫時性導入動物細胞。於以最終細胞密度成為 1×10^6 細胞/mL 之方式懸浮於 FreeStyle 293 Expression Medium 培養基(Invitrogen)之 100 mL 之人類胎兒腎細胞來源 FreeStyle 293-F 株(Invitrogen)之細胞懸浮液中，添加標記胺基酸。具體而言，添加針對 Asp/Glu/Gln/Asn 標記體，將 L-Aspartic acid- $^{13}\text{C}_4, ^{15}\text{N}$ (10 mg)、L-Glutamic acid- $^{13}\text{C}_5, ^{15}\text{N}$ (2.5 mg)、L-Glutamine- $^{13}\text{C}_5, ^{15}\text{N}_2$ (60 mg)、L-Asparagine- $^{13}\text{C}_4, ^{15}\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2.5 mg)、 β -chloro-L-alanine(6 mg)懸浮於 10 mL 之水而成的溶液以 $0.22\mu\text{m}$ 濾膜過濾之液體。針對 Leu 標記體，添加將 L-Leucine- ^{15}N (30 mg)、 β -chloro-L-alanine(6 mg)懸浮於 10 mL 之水而成的溶液以

0.22 μ m 濾膜過濾之液體。將以脂轉染法製備之質體導入細胞。導入有質體之細胞於 CO₂ 培養箱(37°C、8%CO₂、90 rpm)中培養 5 日依照使用 rProtein A Sepharose™ Fast Flow(Amersham Biosciences)之該技術領域之人士公知之方法，從如上述方法獲得之培養上清精製抗體。使用分光光度計測定經精製之抗體溶液於 280 nm 之吸光度。使用利用 PACE 法計算之吸光係數，從測定值計算抗體濃度(Protein Science (1995) 4, 2411-2423)。

【0372】 (16-2)Fab 片段之製備

使用分子量區分尺寸 30,000MWCO 之超過濾膜，將各種抗體濃縮至 8.2-11.8 mg/mL。使用 L-Cystein 1 mM、EDTA 2 mM、50 mM 乙酸/125 mMTris 緩衝液(pH 6.8)，製備稀釋成 8 mg/mL 之該抗體之試樣。將對於各抗體添加 1/240 量之 Papain(Roche Applied Science)並經攪拌之該試樣，於 37°C 靜置 1 小時。靜置後，添加到於各下游以連續連結大小 1 mL 之 ProteinA 載體管柱 HiTrap MabSelect Sure(GE Healthcare)而成之經以 50 mM 乙酸 /125 mMTris 緩衝液 (pH 6.8) 平衡化之結合有 Gly-Gly-Tyr-Arg(Sigma) 胜肽之大小 1 mL 之 HiTrap NHS-activated HP(GE Healthcare)。藉由以上游的 Gly-Gly-Tyr-Arg 胜肽去除活化 Papain，並以下游的 ProteinA 載體管柱去除 Fc 片段及未消化抗體，獲得 Fab 片段之精製區分。為了防止 Fab 區分所包含之不活性 Papain 活化，於 Fab 區分添加半胱胺酸蛋白酶抑制劑 E64(Sigma)10 μ M。又，上述所有的管柱操作係於 20 至 25°C 之室溫下實施。

【0373】 (16-3)LfVk1_Ca 抗體及 LfVk1 抗體之 Fab 片段之

NMR 試樣製備

將抗體溶液使用 MWCO 5000 之超過濾器 Vivaspin(Sartorius)離心至 0.5 mL 以濃縮。其次，於上述超過濾器設置透析過濾杯，對於 NMR 用緩衝液：5 mM d-BisTris, 20 mM NaCl, 0.001 % (w/v) NaN₃, 5 % (v/v) ²H₂O, pH 7.0(使用 NaOH、HCl 調整 pH)進行緩衝液取代(於透析過濾杯補充上述緩衝液 5 mL 並離心濃縮至 0.5 mL 之操作返覆 3 次)，最後濃縮至 0.25 mL。最後，以 NMR 緩衝液清洗超過濾器，與濃縮液合併，抗體溶液針對 LfVkl_Ca 抗體調成 420 μ L、針對 LfVkl 抗體調成 270 μ L。於此階段再度確認 pH，並且視需要以 NaOH、HCl 調整為 pH 7.0。使用 UV 測定器 Nanodrop(Thermo Fisher Scientific)，測定於 280 nm 之吸光度，並且以 280 nm 之莫耳吸光係數定為 70000 M⁻¹ · cm⁻¹，定量 Fab 片段。Leu 標記 LfVkl_Ca 抗體、Leu 標記 LfVkl 抗體成為 0.12 mM、Asp、Glu、Asn、Gln 標記 LfVkl_Ca 抗體、Asp、Glu、Asn、Gln 標記 LfVkl 抗體成為 0.24 mM。該等試樣之中，針對 LfVkl_Ca 抗體，使用移液管充填於直徑 5 mm 之 NMR 試管(shigemi)，針對 LfVkl 抗體，充填於直徑 5 mm 之水溶液用對稱形微型試管(shigemi)。於 LfVkl_Ca 抗體之 Ca²⁺滴定實驗，於抗體溶液中，添加 CaCl₂ 溶液，使對於抗體依序為 Ca²⁺為 1、2、5、10、20 莫耳等量。於添加使用之 CaCl₂ 溶液中，準備溶於 NMR 緩衝液之 10、20、50、100 mM CaCl₂ 溶液。利用針筒部分為比現有製品更為延長之特別訂製的微型針筒(ITO)，將 CaCl₂ 溶液之必要量直接添加到充填於 NMR 試管之抗體溶液並且使添加容

量成為 3-10 μ L 之範圍，將試管以 Vortex 混合器攪拌後，以手動離心器(Shimadzu)離心分離。

【0374】 (16-4)用於觀測 LfVk1_Ca 抗體及 LfVk1_Ca 抗體之 Fab 片段之醯胺基信號之 NMR 測定

NMR 測定使用設置有 TCI CryoProbe 之 NMR 分光器 DRX750(Bruker Biospin)。設定溫度定為 307K(GasFlow 535 L/h)。用於觀測醯胺基信號之 NMR 測定，使用 ^1H - ^{15}N HSQC。測定法， ^{15}N 展開期，使用 α 碳與羰基碳之同時 ^{13}C 去偶聯、及溶劑水信號消去用之伴隨 3-9-19pulse train 之 ^1H - ^{15}N FHSQC，且用於控制其之脈衝程式，使用由製造商(Bruker Biospin)準備當做標準者。NMR 之測定條件如下。光譜寬:12019Hz (f2), 1976 Hz (f1)、數據點數: 2048 (f2), 128 (f1)。數據處理，使用 Topspin 3.0(Bruker Biospin)。數據處理條件如下。將 f2、f1 同時乘以當做窗函數之 shifted Sine (QSINE)，並且進行填零(zero filling)使成為 2 倍之數據點數後，進行傅利葉變換。使用 NMR 解析軟體 Sparky(UCSF)計算信號之化學偏移。

【0375】 (16-5)主鏈醯胺基之 NMR 信號之指派(assignment)

至今為止，tocilizumab(重鏈序列編號:13、輕鏈序列編號:14)之 Fab 片段之主鏈醯胺基之 NMR 信號中，有 80%指派 (數據未公開)。LfVk1_Ca 抗體之 Fab 片段之胺基酸序列，除了與輕鏈 CDR1、CDR2、CDR3 的一部分、及輕鏈 73、83 號之胺基酸殘基以外，tocilizumab 與 Fab 片段之胺基酸序列相同。針對兩抗體的胺基酸序列相同之部分，其 NMR 信號具有相同或

接近的化學偏移，可移動 tocilizumab 之指派資訊。針對 Leu 標記試樣，輕鏈 11、(33)、(46)、(47)、(54)、(78)、125、135、136、154、175、179、181、201、重鏈 18、46、64、71、81、83、114、144、147、165、176、181、184、195 可行指派。上述未附括弧的編號與 tocilizumab 為相同的化學偏移，為能行指派之殘基編號，有附括弧之編號與 tocilizumab 具有相近的化學偏移，其他沒有具相近化學偏移之信號，故為能指派之殘基編號。另一方面，針對 Asp、Glu、Asn、Gln 標記試樣，比較 LfVkl_Ca 抗體與 LfVkl 抗體之光譜，於 LfVkl_Ca 新觀測到 4 個信號。此可分類為該兩抗體間在 Asp、Glu、Asn、Gln 殘基中，當做 Ca^{2+} 結合模體導入之序列之不同輕鏈 Asp30、31、32、92、Glu50 之 5 個殘基當中任 4 個殘基來源者。

【0376】 (16-6) Ca^{2+} 之 LfVkl_Ca 抗體上之結合部位之鑑定

將 LfVkl_Ca 抗體之 Fab 片段之 Ca^{2+} 未添加狀態、與添加 20 莫耳等量之 ^1H - ^{15}N HSQC 光譜比較，並抽取有化學偏移變化之信號。其結果，從 Leu 標記試樣可知：輕鏈 Leu33 涉及結合，其他 Leu 殘基不涉及結合。又，從 Asp、Glu、Asn、Gln 標記試樣可知：輕鏈 Asp30、31、32、92、Glu50 之 5 個殘基中的任 4 個殘基涉及結合，其他 Asp、Glu、Asn、Gln 殘基當中除 1 個殘基以外的全部殘基不涉及結合。由以上，鑑定當做 Ca^{2+} 結合模體導入之胺基酸序列之中，至少輕鏈 CDR1、以及輕鏈 CDR2、CDR3 兩者或任一之胺基酸涉及 Ca^{2+} 結合。此與實施例 15 確認之 30 位、31 位、32 位、50 位及 92 位(Kabat 編號法)當中的 4 個為 hVk5-2 序列之胺基酸對於鈣離子結合為

重要之結果為一致。

【0377】 (16-7) 滴定實驗之 Ca^{2+} 解離常數之計算

對於 Ca^{2+} 濃度為 LfVk1_Ca 抗體之 Fab 片段，利用 0、1、2、5、10、20 莫耳等量時之 ^1H - ^{15}N HSQC 光譜。以鑑定為結合部位之輕鏈 Leu33 之信號之 ^1H 或 ^{15}N 化學偏移為縱軸，以上述 Ca^{2+} 之莫耳等量為橫軸作圖，使用製圖軟體 Gnuplot，進行以下式 2 所示函數之適擬。

【0378】 [式 2]

$$f(x) = s \times [1 - 0.5/a \times \{(a \times x + a + Kd) - ((a \times x + a + Kd)^2 - 4 \times x \times a^2)^{0.5}\}] \\ + t \times [0.5/a \times \{(a \times x + a + Kd) - ((a \times x + a + Kd)^2 - 4 \times x \times a^2)^{0.5}\}]$$

【0379】 式 2 表示之函數中，s、t 各代表 Ca^{2+} 非結合時之化學偏移 [ppm]、 Ca^{2+} 飽和結合時之推定化學偏移 [ppm]、a 代表抗體 Fab 片段濃度 [M]、Kd 代表解離常數、x 代表對於抗體 Fab 片段添加之 Ca^{2+} 之莫耳等量。適擬時，以 s, t, Kd 當做適擬參數。其結果，從 ^1H 化學偏移估計 $Kd = 7.1 \times 10^{-5} [\text{M}]$ 、從 ^{15}N 化學偏移估計 $Kd = 5.9 \times 10^{-5} [\text{M}]$ 。

【0380】 [實施例 17] hVk5-2 變異體序列之鈣結合評價

獲得 Vk5-2(序列編號：41)以外，分類為 Vk5-2 之 Vk5-2 變異體 1(序列編號：63)及 Vk5-2 變異體 2(序列編號：64)。針對該等變異體也進行鈣結合評價。將 Vk5-2、Vk5-2 變異體 1 及 Vk5-2 變異體 2 之 DNA 片段分別納入動物細胞用表現載體。獲得之表現載體之鹼基序列以該技術領域之人士公知之方法決定。各納入有 Vk5-2、Vk5-2 變異體 1 及 Vk5-2 變異體 2 之 DNA 片段的動物細胞用表現載體，與納入有表現當做重鏈

之 CIM_H(序列編號：48)的動物表現用載體，一起以實施例 13 記載之方法導入動物細胞中，並且精製抗體。評價經精製之抗體之鈣離子結合活性。將經精製之抗體提供給以 20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、2 mM CaCl₂(pH7.5)或 20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl(pH7.5)之溶液(表 22 表示記載鈣離子濃度 0mM)當做外液之透析(EasySEP、TOMY)處理。使用透析使用之溶液及製備為 0.1 mg/mL 之抗體溶液當做待驗物質，於 20℃ 至 115℃ 以 240℃ /hr 之升溫速度進行 DSC 測定。依據獲得之 DSC 之變性曲線計算之各抗體之 Fab 域之熱變性中間溫度(T_m 值)，如表 22。

【0381】 【表 22】

輕鏈	鈣離子濃度		ΔT _m (°C) 2 mM-0mM
	0 mM	2 mM	
Vk5-2	71.65	74.38	2.73
Vk5-2 變異體 1	65.75	72.24	6.49
Vk5-2 變異體 2	66.46	72.24	5.78

【0382】 其結果，含 Vk5-2、Vk5-2 變異體 1 及 Vk5-2 變異體 2 之序列的抗體之 Fab 域之 T_m 值，會隨含該 Fab 域之抗體溶液中之鈣離子濃度而變動，由此顯示含分類為 Vk5-2 之序列的抗體會與鈣離子結合。

【0383】 [實施例 18]鈣依存性的與人類 CD4 之抗體

(18-1)可溶型人類 CD4 之製備

可溶型人類 CD4 以如下方式製備。將編碼為膜貫通區缺損之人類 CD4 之胺基酸序列加成有 Myc 標嵌的序列(序列編號：76)的 DNA 序列納入動物細胞表現用載體。製作之重組人類 CD4 之序列以該技術領域之人士公知之方法確認。

【0384】 (18-2)與可溶型人類 CD4 結合之抗體之表現與精製

TNX355-IgG1(重鏈序列編號：77、輕鏈序列編號：78)及 Q425(重鏈序列編號：79、輕鏈序列編號：80)，為抗人類 CD4 抗體。再者，Q425L9(重鏈序列編號：81、輕鏈序列編號：82)為 Q425 之 L 鏈改變體。將編碼為 TNX355-IgG1(重鏈序列編號：77、輕鏈序列編號：78)、Q425(重鏈序列編號：79、輕鏈序列編號：80)及 Q425L9(重鏈序列編號：81、輕鏈序列編號：82)之胺基酸之 DNA 序列，導入動物細胞表現用質體。抗體之表現係使用以下方法進行。將人類胎兒腎細胞來源 FreeStyle 293-F 株(Invitrogen)懸浮於 FreeStyle 293 Expression Medium 培養基(Invitrogen)，以 1.33×10^6 細胞/mL 之細胞密度對於 6 井板之各井各接種 3 mL。製備之質體以脂轉染法導入細胞。於 CO₂ 培養箱(37°C、8%CO₂、90 rpm)中培養 4 日。使用 rProtein A Sepharose™ Fast Flow(Amersham Biosciences)，以該技術領域之人士公知之方法，從上述獲得之培養上清精製抗體。使用分光光度計測定經精製之抗體溶液於 280 nm 之吸光度。藉由使用由 PACE 法計算之吸光係數，從獲得之測定值計算抗體濃度(Protein Science (1995) 4, 2411-2423)。

【0385】 (18-3)取得之抗體對於人類 CD4 之鈣依存性結合能力評價

取得之抗體對於可溶型人類 CD4 之鈣依存性結合能力，使用 Biacore T100 (GE Healthcare)評價。高鈣離子濃度使用 1.2 mM，低鈣離子濃度之條件使用 3μM。抗原使用可溶型人類

CD4(於 18-1 製備)。於 Sensor chip CM4(GE Healthcare)上以胺偶聯法將 protein G(Invitrogen)適量固定化，並使其捕捉目的之抗體。運行緩衝液使用含 1.2 mmol/L CaCl_2 或 3 $\mu\text{mol/L}$ CaCl_2 之 10 mmol/L ACES、150 mmol/L NaCl、0.05% (w/v) Tween20、1.2 mmol/L CaCl_2 、pH7.4 或 pH6.0。測定均於 37°C 實施，人類 CD4 之稀釋也使用各自的緩衝液。抗體之傳感圖如圖 19。如圖 19，TNX355-IgG1 抗體由於即使運行緩衝液之條件變化時傳感圖之形狀也不變化，因此確認 TNX355-IgG1 為對於人類 CD4 不顯示鈣依存性的結合活性的通常之抗體。另一方面，Q425 抗體及 Q425L9 抗體均於鈣離子濃度為 3 μM (低鈣離子濃度)時之抗原結合量比起鈣離子濃度為 1.2 mM(高鈣離子濃度)時之抗原結合量少，顯示 Ca 依存性結合能力。尤其，Q425L9 抗體若於鈣離子濃度為 3 μM 時，當以 200 nM 之分析物(可溶性人類 CD4)測定時完全未觀測到結合相。亦即，確認 Q425 抗體及 Q425L9 抗體對於人類 CD4 顯示鈣依存性的結合活性的鈣依存性結合。

【0386】 [實施例 19]使用正常小鼠評價 Ca 依存性結合抗體對於抗原之血漿中滯留性之影響

(19-1)使用正常小鼠之體內試驗

實施例 18 製備之 Q425 及 Q425L9，係以鈣依存性的與可溶型人類 CD4 結合之抗體。但是至今為止，雖已如實施例 5 及實施例 6 所示，由 IL6R 明白具有將以鈣依存性的與抗原結合之性質的抗體與抗原同時投予時，比以將無鈣依存性的與抗原結合之性質的抗體與抗原同時投予時，會有加速抗原消失之

性質，但是其他抗原是否也具有使抗原之消失加速之性質尚為不明。

【0387】 所以評價對於正常小鼠(C57BL/6J mouse、Charles River Japan)將可溶型人類 CD4(實施例 18 中製備)單獨投予或將可溶型人類 CD4 及抗人類 CD4 抗體同時投予後之可溶型人類 CD4 及抗人類 CD4 抗體之體內動態。將可溶型人類 CD4 溶液(50 μ g/mL)、或可溶型人類 CD4 及抗人類 CD4 抗體之混合溶液對於尾靜脈以 10 mL/kg 單次投予。抗人類 CD4 抗體使用上述 TNX355-IgG1、Q425-IgG1、Q425L9-IgG1。

【0388】 混合溶液中之可溶型人類 CD4 濃度均為 50 μ g/mL，但抗人類 CD4 抗體濃度依抗體而不同，TNX355-IgG1 為 0.264 mg/mL、Q425-IgG1 為 0.197 mg/mL、及 Q425L9-IgG1 為 2.594 mg/mL，此時由於抗人類 CD4 抗體對於可溶型人類 CD4 存在充分過剩量，故可認為可溶型人類 CD4 大部分與抗體結合。投予後，可溶型人類 CD4 單獨投予之群於 2 分鐘、5 分鐘、15 分鐘、30 分鐘、1 小時、2 小時採血。同時投予可溶型人類 CD4 及無鈣依存性的抗原結合能力的 TNX355-IgG1 的群，於投予後 5 分鐘、2 小時、7 小時、1 日、3 日、7 日、14 日、28 日採血。同時投予具可溶型人類 CD4 及鈣依存性的抗原結合能力的 Q425-IgG1 及 Q425L9-IgG1 之群，於投予後 5 分鐘、30 分鐘、2 小時、7 小時、1 日、3 日、8 日、14 日、28 日採血。將採取之血液立即於 4℃ 以 12,000 rpm 進行 15 分鐘離心分離，獲得血漿。分離之血漿直到實施測定為止，保存於設定在 -20℃ 以下之冷凍庫。

【0389】 (19-2)利用 ELISA 法測定正常小鼠血漿中之抗人類 CD4 抗體濃度

小鼠血漿中之抗人類 CD4 抗體濃度以 ELISA 法測定。首先，將 Anti-Human IgG(γ -chain specific) F(ab')₂ Fragment of Antibody (SIGMA) 分注於 Nunc-Immuno Plate, MaxiSoup (Nalge nunc International)，於 4℃ 靜置 1 晚，製作 Anti-Human IgG 固相化板。製備血漿中濃度為 0.64、0.32、0.16、0.08、0.04、0.02、0.01 μ g/mL 之檢量線試樣及稀釋 100 倍以上之小鼠血漿測定試樣，分注到 Anti-Human IgG 固相化板，於 25℃ 進行 1 小時溫育。之後，使 Biotinylated Anti-human IL-6 R Antibody(R&D) 於 25℃ 反應 1 小時，再使 Streptavidin-PolyHRP80(Stereospecific Detection Technologies) 於 25℃ 反應 0.5 小時，以 TMB One Component HRP Microwell Substrate(BioFX Laboratories)當做基質進行發色反應，以 1N-Sulfuric acid(Showa Chemical)停止反應後，以微平板讀取儀測定 450 nm 之吸光度。小鼠血漿中濃度，由檢量線之吸光度使用解析軟體 SOFTmax PRO(Molecular Devices)計算。

【0390】 以該方法測定之靜脈內投予後之正常小鼠中，TNX355-IgG1、Q425-IgG1 及 Q425L9-IgG1 之血漿中抗體濃度變化如圖 20。

【0391】 (19-3)以電化學發光法測定血漿中可溶型人類 CD4 濃度

小鼠之血漿中可溶型人類 CD4 濃度以 ELISA 法測定。

【0392】 針對 sCD4 單獨投予之群，Q425、Q425_L9 同時投

予之群，將 TNX 分注於 Nunc-Immuno Plate, MaxiSoup(Nalge nunc International)，於 4℃ 靜置 1 晚，製作 TNX 固相化板。以含 10mM EDTA 之緩衝液製備血漿中濃度為 10、5、2.5、1.25、0.625、0.3125、0.156 $\mu\text{g/mL}$ 之檢量線試樣及稀釋 100 倍以上之小鼠血漿測定試樣，分注到 TNX 固相化板，並於 25℃ 進行 3 小時溫育。之後使 Anti-c-myc-HRP(Miltenyi Biotech)於 25℃ 反應 1 小時，以 TMB One Component HRP Microwell Substrate(BioFX Laboratories)當做基質進行發色反應，以 1N-硫酸(Showa Chemical)停止反應後，以微平板讀取儀測定 450 nm 之吸光度。小鼠血漿中濃度，使用檢量線之吸光度使用解析軟體 SOFTmax PRO(Molecular Devices)計算。

【0393】 針對與 TNX 同時投予之群，將 Q425 分注到 Nunc-Immuno Plate, MaxiSoup (Nalge nunc International)，於 4℃ 靜置 1 晚，製作 Q425 固相化板。以含 2mM Ca^{2+} 之緩衝液製備血漿中濃度為 20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.3125 $\mu\text{g/mL}$ 之檢量線試樣及稀釋 100 倍以上之小鼠血漿測定試樣，分注到 TNX 固相化板，並於 25℃ 進行 3 小時溫育。之後將 Anti-c-myc-HRP (Miltenyi Biotech)於 25℃ 反應 1 小時，使用 TMB One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories)當做基質進行發色反應，以 1N-硫酸(Showa Chemical)停止反應後，以微平板讀取儀測定 450 nm 之吸光度。小鼠血漿中濃度，從檢量線之吸光度使用解析軟體 SOFTmax PRO(Molecular Devices)計算。

【0394】 該方法測定之靜脈內投予後之正常小鼠中之血漿

中可溶型人類 CD4 濃度變化如圖 21。

【0395】 結果，可溶型人類 CD4 單獨顯示非常快消失，相對於此，同時投予可溶型人類 CD4 與無 Ca 依存性結合之通常之抗體 TNX355-IgG1 時，可溶型人類 CD4 之消失大幅減慢。相對於此，同時投予可溶型人類 CD4 與具 Ca 依存性結合之 Q425-IgG1 或 Q425L9-IgG1 時，可溶型人類 CD4 之消失大幅加速。比起同時投予 TNX355-IgG1 之情形，同時投予 Q425-IgG1 或 Q425L9-IgG1 時可促進可溶型人類 CD4 消失。藉此，不僅於 IL-6R 確認鈣依存性結合抗體可達成抗原從血漿中消失，於人類 CD4 也確認。

【0396】 [實施例 20]鈣依存性的與人類 IgA 結合之抗體
(20-1)人類 IgA(hIgA)之製備

為抗原之人類 IgA 之重組人類 IgA(以下 hIgA)依如下方式製備。使含 H(WT)-IgA1(序列編號：83)與 L(WT)(序列編號：14)之 hIgA 表現，並依該技術領域之人士公知之方法使用離子交換層析及凝膠過濾層析精製。

【0397】 (20-2)與人類 IgA 結合之抗體之表現與精製

GA1-IgG1(重鏈序列編號：84、輕鏈序列編號：85)、GA2-IgG1(重鏈序列編號：86、輕鏈序列編號：87)、GA3-IgG1(重鏈序列編號：88、輕鏈序列編號：89)及 GA4-IgG1(重鏈序列編號：90、輕鏈序列編號：91)，係與人類 IgA 結合之抗體。再者，與實施例 6 及實施例 7 同樣，為了使抗原(hIgA)從血漿中之消失更為增大，為了增強小鼠 FcRn 對於 GA2-IgG1 於 pH7.4 之結合，製作導入有 N434W 之胺基酸取代之 GA2-N434W(重

鏈序列編號：92、輕鏈序列編號：87)。將編碼為 GA1-IgG1(重鏈序列編號：84、輕鏈序列編號：85)、GA2-IgG1(重鏈序列編號：86、輕鏈序列編號：87)、GA3-IgG1(重鏈序列編號：88、輕鏈序列編號：89)、GA4-IgG1(重鏈序列編號：90、輕鏈序列編號：91)及 GA2-N434W(重鏈序列編號：92、輕鏈序列編號：87)之 DNA 序列以該技術領域之人士公知之方法納入動物表現用質體。抗體之表現使用以下方法進行。將人類胎兒腎細胞來源 FreeStyle 293-F 株 (Invitrogen) 懸浮於 FreeStyle 293 Expression Medium 培養基 (Invitrogen)，以 1.33×10^6 個 /mL 之細胞密度對於 6 井盤的各井各接種 3 mL，將以脂轉染法製備之質體導入細胞。於 CO₂ 培養箱 (37°C、8%CO₂，90 rpm) 培養 4 日，從獲得之培養上清使用 rProtein A Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences) 以該技術領域之人士公知之方法精製抗體。精製抗體濃度，使用分光光度計測定於 280 nm 之吸光度。從獲得之值使用依 PACE 法計算之吸光係數，計算抗體濃度 (Protein Science 1995 ; 4 : 2411-2423)。

【0398】 (20-3) 取得之抗體對於人類 IgA 之 Ca 依存性結合能力評價

取得之抗體使用 Biacore T200 (GE Healthcare) 關於人類 IgA 結合活性 (解離常數 K_D (M)) 進行評價。運行緩衝液使用含 3 μ M 或 1.2 mM CaCl₂ 之 0.05% tween20, 20 mmol/l ACES, 150 mmol/l NaCl (pH7.4 及 pH5.8)、含 0.1 μ M 或 10 mM CaCl₂ 之 0.05% tween20, 20 mmol/l ACES, 150 mmol/l NaCl、pH8.0 進行測定。

【0399】 於 Sensor chip CM5(GE Healthcare)上以胺基偶聯法將重組型 PROTEIN A/G(Thermo Scientific)適量固定化後，使抗體結合。注入當做分析物之適當濃度的 hIgA(記載於(20-1))，使與感應晶片上之抗體交互作用。之後，注入 10 mmol/L Glycine-HCl, pH1.5，使感應晶片再生。測定於 37℃ 進行。測定結果使用 Biacore T200 Evaluation Software(GE Healthcare)，利用曲線適擬之解析及平衡值解析，計算解離常數 K_D (M)。其結果如表 23。又，獲得之傳感圖如圖 22。可知:GA2-IgG1、GA3-IgG1、GA4-IgG1 於 Ca^{2+} 濃度為 1.2 mM 時與人類 IgA 強力結合，但於 Ca^{2+} 濃度為 3 μ M 時與人類 IgA 為弱結合。

【0400】 【表 23】

抗體名	條件	適擬(fit)	ka	kd	KD
GA1-IgG1	pH8.0, 10 mM Ca	1:1binding model	1.10E+06	2.40E-01	2.20E-07
	pH8.0, 0.1 μ M Ca	1:1binding model	1.20E+06	1.20E-01	1.00E-07
	pH7.4, 1.2 mM Ca	1:1binding model	5.70E+05	8.40E-02	1.50E-07
	pH7.4, 3 μ M Ca	1:1binding model	6.40E+05	1.20E-01	1.90E-07
	pH5.8, 1.2 mM Ca	1:1binding model	6.80E+05	9.90E-02	1.40E-07
	pH5.8, 3 μ M Ca	1:1binding model	7.10E+05	1.10E-01	1.50E-07
GA2-IgG1	pH7.4, 1.2 mM Ca	1:1binding model	4.00E+05	1.60E-02	3.90E-08
	pH7.4, 3 μ M Ca	Steady State Affinity	-	-	6.70E-06
	pH5.8, 1.2 mM Ca	Steady State Affinity	-	-	4.00E-06
	pH5.8, 3 μ M Ca	Steady State Affinity	-	-	5.00E-06
GA3-IgG1	pH7.4, 1.2 mM Ca	1:1binding model	4.30E+05	3.30E-02	7.90E-08
	pH7.4, 3 μ M Ca	Steady State Affinity	-	-	-
	pH5.8, 1.2 mM Ca	1:1binding model	4.40E+05	3.50E-02	8.10E-08
	pH5.8, 3 μ M Ca	Steady State Affinity	-	-	1.10E-06
GA4-IgG1	pH7.4, 1.2 mM Ca	Steady State Affinity	-	-	4.20E-07
	pH7.4, 3 μ M Ca	Steady State Affinity	-	-	8.90E-07
	pH5.8, 1.2 mM Ca	Steady State Affinity	-	-	1.10E-06
	pH5.8, 3 μ M Ca	Steady State Affinity	-	-	1.50E-06

【0401】 [實施例 21]使用正常小鼠評價 Ca 依存性人類 IgA 結合抗體對於抗原之血漿中滯留性之影響

(21-1)使用正常小鼠之體內試驗

評價對於正常小鼠(C57BL/6J mouse、Charles River Japan)將人類 IgA(人類 IgA：實施例 20 製作)單獨投予或將人類 IgA 及抗人類 IgA 抗體同時投予後之人類 IgA 及抗人類 IgA 抗體之體內動態。將人類 IgA 溶液(80 μ g/mL)、或人類 IgA 及抗人類 IgA 抗體之混合溶液對於尾靜脈以 10 mL/kg 單次投予。抗人類 IgA 抗體，使用上述 GA1-IgG1、GA2-IgG1、GA3-IgG1 及 GA2-N434W。

【0402】 混合溶液中之人類 IgA 濃度均為 80 μ g/mL，但抗人類 IgA 抗體濃度因應各抗體對於 hIgA 之親和性而依抗體不同，GA1-IgG1 為 100 mg/mL、GA2-IgG1 為 28.9 mg/mL、GA3-IgG1 為 53.8 mg/mL、GA2-N434W 為 1 mg/mL。此時，由於對於人類 IgA 之抗人類 IgA 抗體係有足量過剩，故可認為人類 IgA 大部分與抗體結合。投予後 5 分鐘、7 小時、1 日、2 日、3 日、7 日進行採血。將採取之血液立即於 4℃ 以 12,000 rpm 進行 15 分鐘離心分離，獲得血漿。分離之血漿直到實施測定為止，保存在設定為 -20℃ 以下之冷凍庫。

【0403】 (21-2)利用 ELISA 法測定正常小鼠血漿中之抗人類 IgA 抗體濃度

小鼠血漿中之抗人類 IgA 抗體濃度以 ELISA 法測定。首先，將 Anti-Human IgG(γ -chain specific) F(ab')₂ Fragment of Antibody (SIGMA) 分注於 Nunc-Immuno Plate, MaxiSoup(Nalge nunc International)，於 4℃ 靜置 1 晚，製作 Anti-Human IgG 固相化板。製備血漿中濃度為 0.5、0.25、

0.125、0.0625、0.03125、0.01563、0.07813 $\mu\text{g/mL}$ 之檢量線試樣及稀釋 100 倍以上之小鼠血漿測定試樣，分注到 Anti-Human IgG 固相化板，於 25 $^{\circ}\text{C}$ 溫育 1 小時。之後，使 Goat Anti-Human IgG (γ chain specific) Biotin (BIOT) Conjugate(Southern Biotechnology Associates Inc.)於 25 $^{\circ}\text{C}$ 反應 1 小時，再將 Streptavidin-PolyHRP80(Stereospecific Detection Technologies)於 25 $^{\circ}\text{C}$ 反應 1 小時，使用 TMB One Component HRP Microwell Substrate(BioFX Laboratories)為基質進行發色反應，以 1N-硫酸(Showa Chemical)使反應停止後，以微平板讀取儀測定 450 nm 之吸光度。小鼠血漿中濃度，係從檢量線之吸光度使用解析軟體 SOFTmax PRO(Molecular Devices)計算。該方法測定之靜脈內投予後之正常小鼠中的 GA1-IgG1、GA2-IgG1、GA3-IgG1 及 GA2-N434W 之血漿中抗體濃度變化如圖 23。

【0404】 (21-3)利用 ELISA 法測定血漿中人類 IgA 濃度

小鼠之血漿中人類 IgA 濃度，以 ELISA 法測定。首先，將 Goat anti-Human IgA Antibody(BETHYL)分注於 Nunc-Immuno Plate, MaxiSoup(Nalge nunc International)，於 4 $^{\circ}\text{C}$ 靜置 1 晚，製作 Anti-Human IgA 固相化板。製備血漿中濃度為 0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125、0.00625 $\mu\text{g/mL}$ 之人類 IgA 檢量線試樣及稀釋 100 倍以上之小鼠血漿測定試樣，於該等檢量線試樣及血漿測定試樣 100 μL 添加 500 ng/mL 之 hsIL-6R200 μL ，於室溫靜置 1 小時。之後分注於 Anti-Human IgA 固相化板，再於室溫靜置 1 小時。之後，使 Biotinylated Anti-human IL-6 R Antibody(R&D)於室溫反應 1 小時，再使

Streptavidin-PolyHRP80(Stereospecific Detection Technologies) 於室溫反應 1 小時，以 TMB One Component HRP Microwell Substrate(BioFX Laboratories)為基質進行發色反應，以 1N-硫酸(Showa Chemical)使反應停止後，以微平板讀取儀測定 450 nm 之吸光度。小鼠血漿中濃度，係從檢量線之吸光度使用解析軟體 SOFTmax PRO(Molecular Devices)計算。該方法測定之靜脈內投予後之正常小鼠中之血漿中人類 IgA 濃度變化如圖 24。

【0405】 結果，相對於人類 IgA 單獨之消失，同時投予人類 IgA 與 Ca 依存性結合弱(依存性程度小)之抗體 GA1-IgG1 時，人類 IgA 之消失慢。相對於此，同時投予人類 IgA 與有 100 倍以上之 Ca 依存性結合之 GA2-IgG1 時，人類 IgA 之消失大幅加速。從圖 23 所示之血漿中抗體濃度、圖 24 所示之血漿中人類 IgA 濃度及表 23 所示之各抗體之 KD 值，求出血漿中存在之非結合型之人類 IgA 濃度。其結果如圖 25。如圖 25，與 GA1-IgG1 投予群之非結合型之抗原(人類 IgA)之濃度比較，GA2-IgG1 或 GA3-IgG1 投予群之非結合型之抗原(人類 IgA)之濃度低，因此顯示藉由鈣依存性結合抗體加速抗原之消失，能降低非結合型之抗原(人類 IgA)。再者，於 pH7.4 之 FcRn 結合經增強之 GA2-N434W，其抗原之消失比 GA2-IgG1 快，投予 7 小時後成為檢測極限以下。

【0406】 從以上確認：鈣依存性結合抗體比起 pH 或沒有鈣依存性的結合之通常之抗體，可加速抗原從血漿中消失，該現象不僅於實施例 5 所示之人類 IL6R 或實施例 19 所示之人類

CD4，在人類 IgA 也會發生。又，與實施例 6 及實施例 7 之人類 IL6R 同樣，也確認藉由增加對於鈣依存性結合抗體在 pH7.4 之 FcRn 結合，在人類 IgA 也能加速抗原之消失。

【0407】如參考實施例 31，以 pH 依存性的與人類 IL-6 受體結合之 Fv4-IgG1，比起以非 pH 依存性的與人類 IL-6 受體結合之 H54/L28-IgG1，人類 IL-6 受體之消失能加速，但是，人類 IL-6 受體單獨無法加速消失。為了加速人類 IL-6 受體單獨之消失，必需使用使中性區之對於 FcRn 之結合增強之 Fv4-IgG1-v1 或 Fv4-IgG1-v2。

【0408】另一方面，令人意外地發現，Ca 依存性的與人類 IgA 結合之 GA2-IgG1，儘管含有於中性區對於 FcRn 之結合未增強之天然型 IgG1 之恆定區，但是人類 IgA 之消失比起人類 IgA 單獨加速。如此的現象，於 GA2-IgG1 發生的理由，據認為是由於以下機制。

【0409】為人類 IL-6 受體之單體抗原時，對於 2 價之抗體有 2 個抗原結合，且會形成由抗原抗體 3 分子構成的抗原抗體複合體。另一方面，人類 IgA 為二聚體抗原，抗體也是 2 價，故兩者之抗原抗體複合體據認為會形成抗原抗體 4 分子以上構成的抗原抗體複合體(免疫複合體)。

【0410】對於多元體抗原之天然 IgG1 型通常抗體形成大型的免疫複合體時，該免疫複合體可對於 FcγR、FcRn、補體受體等介由多價之 Fc 區域以 avidity 結合，因此，相對於納入表現該等受體之細胞，不具 pH/Ca 依存性之對抗單體抗原之通常抗體，由於對於天然 IgG1 型的受體的親和性不足，納入細胞

之效率低。原本 FcRn 的作用為將納入細胞內之抗體從核內體再循環到血漿中，但對於如此之對於 FcRn 能以多價結合之大型免疫複合體，已知會介由 FcRn 而從核內體移到溶體並被分解。亦即，如圖 26，形成對於多元體抗原之大型免疫複合體之通常抗體，其可加速抗原之消失，但是由於在核內體內，抗原不會從抗體解離，而會與抗原同時使抗體也消失，故抗體 1 分子之使抗原消失之效率差。亦即，不具 pH/Ca 依存性之對於單體抗原的通常抗體雖能加速抗原之消失，但其效率據認為係差的。

【0411】 相對於此，包含對抗多元體抗原之天然型 IgG1 之恆定區之 pH/Ca 依存性抗體形成大型免疫複合體時，如圖 27，該免疫複合體會對於 FcγR、FcRn、補體受體等經由多價之 Fc 區域以 avidity 結合，並納入表現該等受體之細胞。之後，於核內體內抗原從 pH/Ca 依存性抗體解離，藉此解除免疫複合體之形成。抗原由於不能與 FcRn 結合，故相對於移到溶體並被分解，由於抗體不會形成免疫複合體，故據認為能以 FcRn 再循環於血漿中。

【0412】 亦即，含對抗多元體抗原之天然 IgG1 型之恆定區的 pH/Ca 依存性抗體若形成大型免疫複合體，並以 avidity 與 FcγR、FcRn、補體受體等結合，據認為能僅選擇性地大幅加速抗原之消失。如此的現象，據認為在對抗人類 IgA 之 GA2-IgG1 也會發生。據認為當做不使用參考實施例 31 所示之對於天然型 IgG1 以胺基酸取代增加中性區之 FcRn 之結合之方法，而大幅加速多元體抗原之消失之方法有用。

【0413】 為了發揮如此的作用，據認為抗原抗體必需形成大型免疫複合體，且 IgG1 也要以 avidity 與 FcγR/FcRn 強力結合。抗原若為二量體以上之抗原，則若能篩選形成大型免疫複合體，且以 avidity 與上述受體結合之 pH/Ca 依存性抗體，能不進行胺基酸取代而使用天然型 IgG1 之恆定區，有效率的加速抗原之消失。又，一般而言為了使抗原與抗體形成大型免疫複合體，據認為抗原必需為多元體抗原(例如 IgA, IgE 等免疫球蛋白或 TNF, CD154 等 TNF 超級家族)，但據認為即使是單體抗原，但使用認識該單體抗原存在之 2 個以上之抗原決定基之適當的 2 種以上之 pH/Ca 依存性抗體之混合物，也能形成大型免疫複合體。又，使用認識單體抗原存在之 2 個以上之抗原決定基之適當的多專一性 pH/Ca 依存性抗體(例如：圖 28 所示之含認識抗原決定基 A 之右臂與認識抗原決定基 B 之左臂之天然型 IgG 之恆定區的雙專一性抗體)，據認為也能形成大型免疫複合體。亦即，即使對於單體抗原，若能篩選適當 pH/Ca 依存性抗體，則藉由使用含天然型 IgG1 之恆定區之抗體之混合物或多專一性天然型 IgG1 之恆定區之抗體，可不使用其之胺基酸經取代之變異型 IgG1 而可有效率加速抗原之消失。

【0414】 [實施例 22]鈣依存性的與人類 Glypican3 結合之抗體

(22-1)人類 Glypican3(GPC3)之製備

當做抗原之重組人類 Glypican3(以下 GPC3)，以下列方式製備。培養將不含人類 Glypican3 之膜貫通區之胺基酸序列連結 6 個殘基之組胺酸的序列(序列編號：93)穩定導入表現之質

體的 CHO 細胞，並回收培養上清。將獲得之培養上清進行離子交換層析精製後，進行使用 His 標籤之親和性精製及凝膠過濾層析精製，獲得 GPC3。

【0415】 (22-2)與人類 GPC3 結合之抗體之表現與精製

將抗人類 Glypican3 抗體、CSCM-01_005(重鏈序列：94、輕鏈序列：95)、CSCM-01_009(重鏈序列：96、輕鏈序列：97)、CSCM-01_015(重鏈序列：98、輕鏈序列：99)、CSCM-01_023(重鏈序列：100、輕鏈序列：101)及 GC-IgG1(重鏈序列：102、輕鏈序列：103)各插入動物表現用質體。抗體之表現使用以下方法進行。將人類胎兒腎細胞來源 FreeStyle 293-F 株(Invitrogen)懸浮於 FreeStyle 293 Expression Medium 培養基(Invitrogen)，以 1.33×10^6 個 /mL 之細胞密度對於 6 井盤的各井各接種 3 mL，以脂轉染法將製備之質體導入細胞。以 CO₂ 培養箱(37℃、8%CO₂，90 rpm)培養 4 日，從獲得之培養上清使用 rProtein A Sepharose™ Fast Flow(Amersham Biosciences)，以該技術領域之人士公知之方法精製抗體。精製抗體濃度，使用分光光度計測定於 280 nm 之吸光度。從獲得之值，使用依 PACE 法計算之吸光係數計算抗體濃度 (Protein Science 1995 ; 4 : 2411-2423)。又，針對 GC-IgG1 抗體，從穩定表現 GC-IgG1 抗體之 CHO 細胞培養上清，以同樣方法精製抗體並計算濃度。

【0416】 (22-3)取得之抗體對於人類 GPC3 之 Ca 依存性結合能力評價

取得之抗體以下列步驟供 ELISA。將 StreptaWell 96 微滴定板(Roche)以含生物素標記抗原之 100μLPBS 塗覆一晚。將該

板之各井以 ACES buffer(10 mM ACES, 150 mM NaCl, 100 mM CaCl₂, 0.05% Tween20, pH7.4)洗滌，以去除抗原後，將該井以含 2%BSA 之 ACES Buffer 250 μ L 阻斷 1 小時以上。於去除含 2%BSA 之 ACES Buffer 之各井，添加預先從 10 μ g/mL 各稀釋 4 倍之精製 IgG 各 100 μ L，將該板靜置 1 小時，藉此使 IgG 與各井存在之抗原結合。以 ACES Buffer 洗滌過之各井中，添加「10 mM ACES, 150 mM NaCl, 1.2 mM CaCl₂, pH7.4」、「10 mM ACES, 150 mM NaCl, 3 μ M CaCl₂, pH7.4」、「10 mM ACES, 150 mM NaCl, 1.2 mM CaCl₂, pH5.8」或「10 mM ACES, 150 mM NaCl, 3 μ M CaCl₂, pH5.8」，將該板於 37 $^{\circ}$ C 靜置 30 分鐘並溫育。以 ACES Buffer 洗滌後，以含 2%BSA 之 ACES Buffer 稀釋過之 HRP 結合抗人類 IgG 抗體(BIOSOURCE)對於各井添加，將板溫育 1 小時。以 ACES Buffer 洗滌後，添加有 TMB single 溶液(ZYMED)之各井中之溶液之發色反應藉由硫酸之添加使停止後，測定於 450 nm 之吸光度之發色。

【0417】 測定之結果如圖 29。GC-IgG1 中，無論鈣離子之濃度，吸光度為相同，相對於此，CSCM-01_005、CSCM-01_009、CSCM-01_015 及 CSCM-01_023 中，比起 1.2 mM 鈣離子濃度(高鈣離子濃度)之吸光度，3 μ M 鈣離子濃度(低鈣離子濃度)之吸光度顯著較低。由該結果可知：CSCM-01_005、CSCM-01_009、CSCM-01_015 及 CSCM-01_023 具有隨鈣離子濃度而與抗原之結合會變化之性質，顯示對於人類 Glypican3 也可取得鈣依存性抗體。該等鈣依存性的抗人類 Glypican3 抗體，比起通常之抗人類 Glypican3 抗體，與上述實施例之人類

IL-6R、人類 CD4、人類 IgA 同樣，據認為可加速人類 Glypican3 之消失。再者，對於該等鈣依存性抗人類抗 Glypican3 抗體，藉由增加於 pH7.4 對於 FcRn 之結合，據認為可進一步加速人類 Glypican3 之消失。

【0418】 [實施例 23]鈣依存性的與 IgE 結合之抗體

(23-1)生物素化人類 IgE 之製備

抗原人類 IgE 以下列方式製備。製作插入有編碼為 IgE-H(序列編號：104、C 末端連結有生物素加成序列)及 L(WT)(序列編號：14)之 DNA 序列的動物細胞表現載體，並且使用該表現載體及 FreeStyle293(Invitrogen)在培養上清中使 C 末端結合有生物素加成序列之全長之人類 IgE 蛋白質表現。從獲得之培養上清，進行離子交換層析、使用抗生物素之親和性精製及凝膠過濾層析精製，獲得生物素化人類 IgE。

【0419】 (23-2)與人類 IgE 結合之抗體之表現與精製

GEB0100(重鏈序列編號：105、輕鏈序列編號：106)、GEB0220(重鏈序列編號：107、輕鏈序列編號：108)、GEB0230(重鏈序列編號：109、輕鏈序列編號：110)及 Xolair(重鏈序列編號：111、輕鏈序列編號：112)，為與人類 IgE 結合之抗體。將 GEB0100(重鏈序列編號：105、輕鏈序列編號：106)、GEB0220(重鏈序列編號：107、輕鏈序列編號：108)、GEB0230(重鏈序列編號：109、輕鏈序列編號：110)及 Xolair(一般名 Omalizumab)(重鏈序列編號：111、輕鏈序列編號：112)以該技術領域之人士公知的方法納入各動物表現用質體。抗體之表現以下列方法進行。對於人類胎兒腎細胞來源 FreeStyle

293-F 株(Invitrogen)，以脂轉染法將製備之質體導入細胞。於 CO₂ 培養箱(37℃、8%CO₂, 90 rpm)進行 4 至 7 日培養，從獲得之培養上清，使用 rProtein A Sepharose™ Fast Flow(Amersham Biosciences)，以該技術領域之人士公知之方法精製抗體。精製抗體濃度，係使用分光光度計測定於 280 nm 之吸光度。從獲得之值，使用依 PACE 法計算之吸光係數，計算抗體濃度(Protein Science 1995；4：2411-2423)。

【0420】 (23-3)取得之抗體對於人類 IgE 之 Ca 依存性結合能力之評價

取得之抗體對於人類 IgE 之 Ca 依存性結合能力之評價，使用 ELISA 法進行。具體而言，於 NUNCIMMUNO384 井板 MaxiSorp (Thermo fisher scientific 公司製 464718)添加 1μg/mL 之 Goat anti-rabbit IgG-Fc polyclonal antibody(Bethyl laboratory 公司製 A120-111A)或 1μg/mL 之 Goat anti-human IgG-Fc polyclonal antibody(ICN biomedical 公司製 55071) 40μL。於室溫進行 1 小時溫育後，除去溶液，添加稀釋為 20% 之 Blocking One 試藥(Nacalai tesque 公司製 03953-95) 50μL。於室溫進行 1 小時溫育後，去除溶液，添加以含 1.2 mM 氯化鈣之 Tris 緩衝溶液稀釋過的精製抗體 40μL。於 4℃ 進行一晚溫育後，以含 1.2 mM 氯化鈣與 0.05%(w/v)之 Tween-20 的 Tris 緩衝溶液 80μL 洗滌 3 次，添加以含 1.2 mM 氯化鈣之 Tris 緩衝溶液稀釋為 500ng/mL 之生物素化人類 IgE((23-1)製作) 40μL。於室溫進行 1 小時溫育後，以含 1.2 mM 氯化鈣與 0.05%(w/v)之 Tween-20 之 Tris 緩衝溶液 80μL 進行 3 次洗滌，

添加含 2 mM 氯化鈣之 ACES 緩衝溶液(pH7.4)或含 3 μ M 氯化鈣之 ACES 緩衝溶液(pH7.4) 80 μ L，立即去除溶液後，再添加含 2 mM 氯化鈣之 ACES 緩衝溶液(pH7.4)或含 3 μ M 氯化鈣之 ACES 緩衝溶液(pH7.4) 80 μ L。於 37 $^{\circ}$ C 進行 1 小時溫育後，以含 1.2 mM 氯化鈣與 0.05%(w/v)之 Tween-20 之 Tris 緩衝溶液 80 μ L 洗滌 3 次，添加以含 1.2 mM 氯化鈣之 Tris 緩衝溶液稀釋為 25 ng/mL 之 HRP 標記鏈抗生物素(Thermo fisher scientific 公司製 21132)40 μ L。於室溫進行 1 小時溫育後，以含 1.2 mM 氯化鈣與 0.05%(w/v)之 Tween-20 之 Tris 緩衝溶液 80 μ L 洗滌 3 次，添加發色基質(KPL 公司製 50-66-06: ABTS peroxidase substrate system 1 component)40 μ L。於室溫進行 15 分鐘或 30 分鐘溫育後，測定 405nm 之吸光度(Molecular devices 公司製 SpectraMax Plus384)。

【0421】 測定結果如圖 30。Xolair 中，不依存於鈣離子濃度，吸光度為相同，相對於此，於 GEB0100、GEB0220 及 GEB0230，比起於 2 mM 鈣離子濃度(高鈣離子濃度)之吸光度，於 3 μ M 鈣離子濃度(低鈣離子濃度)之吸光度顯著較低。由該結果顯示：GEB0100、GEB0220 及 GEB0230 具有隨鈣離子濃度，與抗原之結合變化之性質。上述現象顯示，對於人類 IgE 也可取得鈣依存性抗體。該等鈣依存性抗人類 IgE 抗體，比起 Xolair 等通常之抗人類 IgE 抗體，與上述實施例之人類 IL-6R、人類 CD4、人類 IgA 同樣，據認為可加速人類 IgE 之消失。再者，藉由對於該等鈣依存性抗人類 IgE 抗體，使於 pH7.4 對於 FcRn 之結合增強，據認為可更加速人類 IgE 之消失。

【0422】 [參考例 1]可溶型人類 IL-6 受體(hsIL-6R)之製備

抗原人類 IL-6 受體之重組人類 IL-6 受體，以下列方式製備。以該技術領域之人士公知之方法構建並培養穩定表現由 J. Immunol. 152, 4958-4968 (1994)報告之 N 末端側 1 號至 357 號之胺基酸序列構成的可溶型人類 IL-6 受體(以下稱為 hsIL-6R)之 CHO 穩定表現株，使 hsIL-6R 表現。從獲得之培養上清，以 Blue Sepharose 6 FF 管柱層析、凝膠過濾管柱層析 2 個步驟精製 hsIL-6R。於最終步驟，以溶出為主要峰部之區分當做最終精製品。

【0423】 [參考例 2]人類 FcRn 之製備

FcRn，為 FcRn 與 β 2-微球蛋白之複合體。依據公開之人類 FcRn 基因序列製備寡 DNA 引子 (J Exp Med. 1994 Dec 1; 180(6): 2377-81)。編碼為全體基因之 DNA 片段，使用製備之引子，並以人類 cDNA(Human Placenta Marathon-Ready cDNA, Clontech)為模板，以 PCR 製備。使用獲得之 DNA 片段當做模板，將編碼為含信號區(Met1~Leu290)之細胞外域的 DNA 片段以 PCR 放大，並插入哺乳動物細胞表現載體。同樣，依據公開的人類 β 2-微球蛋白基因序列(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (26): 16899-16903 (2002))製作寡 DNA 引子。編碼為全體基因之 DNA 片段，使用製備之引子，及以人類 cDNA(Human Placenta Marathon-Ready cDNA, Clontech)當做模板，以 PCR 製備。使用獲得之 DNA 片段當做模板，將編碼為含信號區(Met1~Met119)之蛋白質全體之 DNA 片段以 PCR 放大，並插入哺乳動物細胞表現載體。

【0424】 可溶型人類 FcRn 以下列步驟使表現。將為了表現人類 FcRn(序列編號：17)及 β 2-微球蛋白(序列編號：18)而構建之質體，利用使用 PEI(Polyscience)之脂轉染法，導入人類胎兒腎癌來源細胞株 HEK293H(Invitrogen)之細胞。回收獲得之培養上清，使用 IgG Sepharose 6 Fast Flow(Amersham Biosciences)精製後，以 HiTrap Q HP(GE Healthcare)(J Immunol. 2002 Nov 1; 169(9): 5171-80)將 FcRn 進一步精製。

【0425】 [參考例 3]pH 依存性的抗原結合抗體之抗原消失加速效果之提高探討(體內試驗)

(3-1)於中性條件下具對於 FcRn 之結合之 pH 依存性人類 IL-6 受體結合抗體之製備

對於含 VH3-IgG1(序列編號：19)與 VL3-CK(序列編號：20)之 Fv4-IgG1，導入於中性條件下(pH7.4)使對於 FcRn 之結合增加之變異。具體而言，製備對於 IgG1 之重鏈恆定區，EU 編號法之 252 號從 Met 取代為 Tyr、254 號從 Ser 取代為 Thr、256 號從 Thr 取代為 Glu 之 VH3-IgG1-v1(序列編號：21)、及對於 IgG1 之重鏈恆定區，EU 編號法之 434 號從 Asn 取代為 Trp 之 VH3-IgG1-v2(序列編號：22)。胺基酸取代之導入，係使用 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit(Stratagene)或 In-Fusion HD Cloning Kit(Clontech)，以附屬說明書記載之方法製作變異體，並將獲得之質體片段插入動物細胞表現載體，製作目的之 H 鏈表現載體及 L 鏈表現載體。獲得之表現載體之鹼基序列，以該技術領域之人士公知之方法決定。

【0426】 含 H54(序列編號：5)與 L28(序列編號：6)之

H54/L28-IgG1、含 VH3-IgG1(序列編號：19)與 VL3-CK(序列編號：20)之 Fv4-IgG1、含 VH3-IgG1-v1(序列編號：21)與 VL3-CK(序列編號：20)之 Fv4-IgG1-v1、及含 VH3-IgG1-v2(序列編號：22)與 VL3-CK(序列編號：20)之 Fv4-IgG1-v2 之表現及精製，依以下方法進行。依照製造商提供之實驗步驟記載，使 FreestyleHEK293 (Invitrogen)或 HEK293H 株 (Invitrogen)表現抗體。將人類胎兒腎癌細胞來源 HEK293H 株(Invitrogen)懸浮於含 10% 胎牛血清 (Invitrogen)之 DMEM 培養基 (Invitrogen)，並以 $5 \sim 6 \times 10^5$ 個 /mL 之細胞密度對於各黏著細胞用培養皿 (直徑 10 cm, CORNING)之各皿接種 10 mL，於 CO₂ 培養箱(37℃、5 % CO₂)內培養一日夜後，抽走培養基，添加 CHO-S-SFM-II(Invitrogen)培養基 6.9 mL。將製備之質體以脂轉染法導入細胞。回收獲得之培養上清後，離心分離(約 2000 g、5 分鐘、室溫)去除細胞，再通過 0.22 μ m 濾膜 MILLEX(註冊商標)-GV(Millipore)滅菌，獲得培養上清。獲得之培養上清使用 rProtein A Sepharose(商標) Fast Flow(Amersham Biosciences)，依該技術領域之人士公知之方法精製。精製抗體濃度，係使用分光光度計測定於 280 nm 之吸光度。從獲得之值，使用依 Protein Science 1995 ; 4 : 2411-2423 之方法計算之吸光係數，計算抗體濃度。依該技術領域之人士公知之方法使表現並精製。

【0427】 (3-2)使用人類 FcRn 基因轉殖小鼠及正常小鼠之體內試驗

對於人類 FcRn 基因轉殖小鼠(B6.mFcRn-/- .hFcRn Tg 系

統 276 +/+ 小鼠、Jackson Laboratories、Methods Mol Biol. 2010;602:93-104.)及正常小鼠(C57BL/6J 小鼠、Charles River Japan)單獨投予 hsIL-6R(可溶型人類 IL-6 受體：參考例 1 製備)，或同時投予 hsIL-6R 及抗人類 IL-6 受體抗體後，評價 hsIL-6R 及抗人類 IL-6 受體抗體之活體內之動態。將 hsIL-6R 溶液(5 μ g/mL)或 hsIL-6R 及抗人類 IL-6 受體抗體之混合溶液(各為 5 μ g/mL、0.1 mg/mL)對於尾靜脈 10 mL/kg 單次投予。此時，由於對於 hsIL-6R 存在充分量過剩的抗人類 IL-6 受體抗體，故可認為 hsIL-6R 幾乎全部與抗體。投予 15 分後、7 小時後、1 日後、2 日後、3 日後、4 日後、7 日後、14 日後、21 日後、28 日後採血。將採取之血液立即於 4℃ 以 15,000 rpm 進行 15 分鐘離心分離，獲得血漿。分離之血漿於實施測定為止，保存在設定為 -20℃ 以下之冷凍庫。抗人類 IL-6 受體抗體，於人類 FcRn 基因轉殖小鼠使用上述 H54/L28-IgG1、Fv4-IgG1、及、Fv4-IgG1-v2，於正常小鼠使用上述 H54/L28-IgG1、Fv4-IgG1、Fv4-IgG1-v1、及、Fv4-IgG1-v2。

【0428】 (3-3) 利用 ELISA 法測定血漿中抗人類 IL-6 受體抗體濃度

小鼠血漿中之抗人類 IL-6 受體抗體濃度，以 ELISA 法測定。首先將抗人類 IgG(γ 鏈特異的)F(ab')₂ 抗體片段(Sigma) 分注於 Nunc-ImmunoPlate, MaxiSorp (Nalge Nunc International)，於 4℃ 靜置一晚，製備抗人類 IgG 固相化板。製備血漿中濃度為 0.8、0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125 μ g/mL 之檢量線試樣及稀釋 100 倍以上之小鼠血漿測定試樣，對於該

等檢量線試樣及血漿測定試樣 100 μ L 添加 20 ng/mL 之 hsIL-6R 200 μ L，於室溫靜置 1 小時。之後，分注到抗人類 IgG 固相化板，於室溫靜置 1 小時。之後將生物素化抗人類 IL-6 R 抗體 (R&D) 於室溫反應 1 小時，再使 Streptavidin-PolyHRP80 (Stereospecific Detection Technologies) 於室溫反應 1 小時，以 TMB One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories) 當做基質進行發色反應，以 1N 硫酸 (Showa Chemical) 使反應停止後，以微平板讀取儀測定 450 nm 之吸光度。小鼠血漿中濃度，係從檢量線之吸光度，使用解析軟體 SOFTmax PRO (Molecular Devices) 計算。以該方法測定之靜脈內投予後之人類 FcRn 基因轉殖小鼠之血漿中抗體濃度變化如圖 31，於正常小鼠之血漿中抗體濃度變化如圖 33。

【0429】 (3-4) 利用電化學發光法測定血漿中 hsIL-6R 濃度

小鼠之血漿中 hsIL-6R 濃度，以電化學發光法測定。製備調整為 2000、1000、500、250、125、62.5、及 31.25 pg/mL 之濃度的 hsIL-6R 檢量線試樣及稀釋 50 倍以上之小鼠血漿測定試樣。將試樣與以 SULFO-TAG NHS Ester (Meso Scale Discovery) 釐化之單株抗人類 IL-6R 抗體 (R&D)、生物素化抗人類 IL-6 R 抗體 (R&D)、及 WT-IgG1 溶液混合，於 37 $^{\circ}$ C 使反應一晚。此時之抗人類 IL-6 受體抗體，為比起含 H(WT)(序列編號：13) 與 L(WT)(序列編號：14) 之 WT-IgG1 之終濃度過剩於試樣所包含之抗人類 IL-6 受體抗體濃度之 333 μ g/mL，目的為使試樣中幾乎所有 hsIL-6R 與 WT-IgG1 結合之狀態。之後，分注於 MA400 PR Streptavidin Plate (Meso Scale Discovery)。

再於室溫使反應 1 小時並洗滌後，分注 Read Buffer T($\times 4$)(Meso Scale Discovery)，立即以 SECTOR PR 400 reader(Meso Scale Discovery)測定。hsIL-6R 濃度，係從檢量線之回應使用解析軟體 SOFTmax PRO(Molecular Devices)計算。該方法測定之靜脈內投予後之人類 FcRn 基因轉殖小鼠於血漿中 hsIL-6R 濃度變化如圖 32，正常小鼠之血漿中 hsIL-6R 濃度變化如圖 34。

【0430】 (3-5)利用電化學發光法測定血漿中游離 hsIL-6R 濃度

為了評價可溶型人類 IL-6 受體在血漿中以哪個程度中和，以電化學發光法測定小鼠血漿中未被抗人類 IL-6 受體抗體結合(中和)之可溶型人類 IL-6 受體濃度(游離 hsIL-6R 濃度)。將調整為 10000、5000、2500、1250、625、312.5、或 156.25 pg/mL 之 hsIL-6R 檢量線試樣及小鼠之血漿試樣 12 μ L，添加到於 0.22 μ m 之濾杯 (Millipore)乾燥過的適量 rProtein A Sepharose Fast Flow (GE Healthcare)樹脂，以使血漿中存在之全部 IgG 型抗體(小鼠 IgG、抗人類 IL-6 受體抗體及抗人類 IL-6 受體抗體-可溶型人類 IL-6 受體複合體)吸附於 PROTEIN A。之後，以高速離心機離心下來，回收通過溶液。通過溶液中不含與 PROTEIN A 結合之抗人類 IL-6 受體抗體-可溶型人類 IL-6 受體複合體，故藉由測定通過溶液中之 hsIL-6R 濃度，可測定血漿中之游離 hsIL-6R 濃度。其次將通過溶液與以 SULFO-TAG NHS Ester(Meso Scale Discovery)釐化之單株抗人類 IL-6R 抗體(R&D)及生物素化抗人類 IL-6 R 抗體(R&D)混合，於室溫反應 1 小時。之後，分注於 MA400 PR Streptavidin Plate(Meso

Scale Discovery)。再於室溫進行 1 小時反應，並洗滌後，分注 Read Buffer T($\times 4$)(Meso Scale Discovery)，立即以 SECTOR PR 400 reader(Meso Scale Discovery)測定。hsIL-6R 濃度，係從檢量線之回應，使用解析軟體 SOFTmax PRO(Molecular Devices)計算。該方法測定之靜脈內投予後之正常小鼠血漿中之游離 hsIL-6R 濃度變化如圖 35。

【0431】 (3-6)pH 依存性的人類 IL-6 受體結合之效果

比較 H54/L28-IgG1 具有 pH 依存性人類 IL-6 受體結合之 Fv4-IgG1 之體內試驗之結果。如圖 31 及圖 33，兩者之抗體血漿中滯留性大約同等，但如圖 32 及圖 34，與具 pH 依存性人類 IL-6 受體結合之 Fv4-IgG1 同時之 hsIL-6R，比起與 H54/L28-IgG1 同時投予之 hsIL-6R，確認 hsIL-6R 之消失較快。該傾向於人類 FcRn 基因轉殖小鼠與正常小鼠兩者均確認，發現：藉由賦予 pH 依存性人類 IL-6 受體結合能力，在 4 日後之血漿中 hsIL-6R 濃度大約可減低約 17 倍及約 34 倍。

【0432】 (3-7)於中性條件下(pH7.4)對於 FcRn 結合之效果

據報告：天然型人類 IgG1 於中性條件下(pH7.4)與人類 FcRn 幾乎不結合(親和性極弱)。對於天然型人類 IgG1 藉由將 EU 編號法 434 號從 Asn 取代為 Trp，可增加於中性條件下(pH7.4)對於人類 FcRn 之結合 (J Immunol. 2009;182(12):7663-71.)。比較 Fv4-IgG1、及對於 Fv4-IgG1 導入有該胺基酸取代之 Fv4-IgG1-v2 於人類 FcRn 基因轉殖小鼠之體內試驗之結果。如圖 31，兩者之抗體血漿中滯留性大約同等，但如圖 32，與在中性條件下(pH7.4)對於人類 FcRn 之結合

增加之 Fv4-IgG1-v2 同時投予之 hsIL-6R，比起與 Fv4-IgG1 同時投予之 hsIL-6R，確認 hsIL-6R 之消失較快。發現：藉由賦予於中性條件下 (pH7.4) 對於人類 FcRn 之結合，4 日後之血漿中 hsIL-6R 濃度能減少約 4 倍。

【0433】 由人類 FcRn 與小鼠 FcRn 之同一性，據認為 EU 編號法 434 號從 Asn 取代為 Trp，也會使中性條件下 (pH7.4) 對於小鼠 FcRn 之結合增加。又，有人報告 EU 編號法 252 號從 Met 取代為 Tyr、254 號從 Ser 取代為 Thr、256 號從 Thr 取代為 Glu，能使中性條件下 (pH7.4) 對於小鼠 FcRn 之結合 (J Immunol. 2002;169(9):5171-80.)。比較 Fv4-IgG1、及對於 Fv4-IgG1 各導入有該等胺基酸取代之 Fv4-IgG1-v1 與 Fv4-IgG1-v2 在正常小鼠之體內試驗之結果。如圖 33，比起 Fv4-IgG1，於中性條件下 (pH7.4) 使對於小鼠 FcRn 之結合也增加之 Fv4-IgG1-v1 與 Fv4-IgG1-v2 之血漿中滯留性稍低 (1 日後之血漿中抗體濃度各為低約 1.5 倍及約 1.9 倍)。

【0434】 如圖 34，與中性條件下 (pH7.4) 之對於小鼠 FcRn 之結合增加之 Fv4-IgG1-v1 或 Fv4-IgG1-v2 同時投予之 hsIL-6R，比起與 Fv4-IgG1 同時之 hsIL-6R，確認 hsIL-6R 之消失顯著較快。發現藉由於中性條件下 (pH7.4) 賦予對於小鼠 FcRn 之結合，Fv4-IgG1-v1 與 Fv4-IgG1-v2 在 1 日後之血漿中 hsIL-6R 濃度各可減少約 32 倍及約 80 倍。發現藉由賦予於中性條件下 (pH7.4) 對於小鼠 FcRn 之結合，如上述，抗體之血漿中濃度稍低，但是血漿中 hsIL-6R 濃度減低效果顯示超出其許多的情形。又，比起 hsIL-6R 單獨之投予群，發現與 Fv4-IgG1-v1

或 Fv4-IgG1-v2 同時投予之 hsIL-6R，其 hsIL-6R 之消失較快。如圖 34，比起 hsIL-6R 單獨投予，與 Fv4-IgG1-v1 或 Fv4-IgG1-v2 同時投予 hsIL-6R 時，發現 1 日後之血漿中 hsIL-6R 濃度各可減低約 4 倍及約 11 倍。其亦即意指：藉由投予 pH 依存性的與可溶型 IL-6 受體結合，且賦予於中性條件下 (pH7.4) 對於小鼠 FcRn 之結合的抗體，能由抗體加速可溶型 IL-6 受體之消失。亦即，藉由對於活體投予如此的抗體，能減少活體內血漿中之抗原濃度。

【0435】如圖 35，H54/L28-IgG1 在投予 7 日後為止，檢測到游離 hsIL-6R 濃度，但 Fv4-IgG1 投予後 1 日以後未檢測到游離 hsIL-6R，Fv4-IgG1-v1 或 Fv4-IgG1-v2 於投予後 7 小時以後未檢測到游離 hsIL-6R。亦即，對於 hsIL-6R 具 pH 依存性結合之 Fv4-IgG1，比起 H54/L28-IgG1 顯示較低之游離 hsIL-6R 濃度，故藉由對於 hsIL-6R 賦予 pH 依存性結合，會發揮較高之 hsIL-6R 之中和效果，且相對於 Fv4-IgG1 使於 pH7.4 對於 FcRn 之結合增加之 Fv4-IgG1-v1 及 Fv4-IgG1-v2，顯示較低之游離 hsIL-6R 濃度，故藉由於 pH7.4 使對於 FcRn 之結合增加，可發揮更高 hsIL-6R 之中和效果。

【0436】如 H54/L28-IgG1 之通常之中和抗體，若投予抗體，會降低結合之抗原之廓清，使抗原在血漿中長期滯留。由於抗體投予使欲中和其作用之抗原之血漿中滯留性增長並不好。藉由對於抗原之結合賦予 pH 依存性(中性條件下結合、酸性條件下解離)，能使抗原之血漿中滯留性縮短。本次，藉由賦予於中性條件下 (pH7.4) 對人類 FcRn 之結合，能使抗原之血

漿中滯留性更短。再者，藉由投予 pH 依存性與抗原結合且賦予於中性條件下 (pH7.4) 對於 FcRn 之結合之抗體，顯示比起抗原單獨之廓清，能使廓清增大。至今為止，並不知道由於抗體投予，會比起抗原單獨之廓清使廓清增大之方法，本研究發現的方法，對於當做利用抗體投予使抗原從血漿中消失之極有用。又，本研究首次發現於中性條件下 (pH7.4) 使對 FcRn 之結合增加的好處。又，由於中性條件下 (pH7.4) 使對於 FcRn 之結合增加之具不同胺基酸取代之 Fv4-IgG1-v1 與 Fv4-IgG1-v2 兩者均認為有同樣效果，故不拘胺基酸取代之種類，只要為中性條件下 (pH7.4) 使對於人類 FcRn 之結合增加之胺基酸取代，均認為有加速抗原之消失之效果。亦即，藉由使用 J Biol Chem. 2007;282(3):1709-17 報告之 EU 編號法 257 號之 Pro 取代為 Ile 之胺基酸取代、EU 編號法 311 號之 Gln 取代為 Ile 之胺基酸取代、J Immunol. 2009;182(12):7663-71. 報告之 EU 編號法 434 號之 Asn 取代為 Ala、Tyr 或 Trp 之胺基酸取代、EU 編號法 252 號之 Met 取代為 Tyr 之胺基酸取代、EU 編號法 307 號之 Thr 取代為 Gln 之胺基酸取代、EU 編號法 308 號之 Val 取代為 Pro 之胺基酸取代、EU 編號法 250 號之 Thr 取代為 Gln 之胺基酸取代、EU 編號法 428 號之 Met 取代為 Leu 之胺基酸取代、EU 編號法 380 號之 Glu 取代為 Ala 之胺基酸取代、EU 編號法 378 號之 Ala 取代為 Val 之胺基酸取代、EU 編號法 436 號之 Tyr 取代為 Ile 之胺基酸取代、J Biol Chem. 2006 Aug 18;281(33):23514-24 報告之 EU 編號法 252 號之 Met 取代為 Tyr 之胺基酸取代、EU 編號法 254 號之 Ser 取代為 Thr 之胺基酸

取代、EU 編號法 256 號之 Thr 取代為 Glu 之胺基酸取代、Nat Biotechnol. 2005 Oct;23(10):1283-8.報告之 433 號之 His 取代為 Lys 之胺基酸取代、434 號之 Asn 取代為 Phe 之胺基酸取代、436 號之 Tyr 取代為 His 之胺基酸取代等、及該等胺基酸取代之組合，據認為可製作藉由投予使抗原從血漿中消失之抗體分子。

【0437】 [參考例 4]對於人類 FcRn 之結合活性之評價

當做評價使用 Biacore 之抗體與 FcRn 之交互作用的測定系，據報告有在 J Immunol. 2009;182(12):7663-71.記載之感應晶片固定化有抗體並以人類 FcRn 為分析物之系。為此目的，依參考例 2 記載製備人類 FcRn。使用該系，評價 Fv4-IgG1、Fv4-IgG1-v1 及 Fv4-IgG1-v2 於 pH6.0 及 pH7.4 對於人類 FcRn 之結合活性(解離常數 KD)。待驗物質抗體直接固定化在 Series S 感應晶片 CM5 並供試驗。抗體固定化於感應晶片，係使用 50 mmol/L 磷酸鈉/150 mmol/L NaCl, 0.05% (v/v%) Surfactant P20 pH6.0 當做運行緩衝液，使用胺偶聯套組依製造商的指引，以固定化量 500RU 為目標實施。

【0438】 運行緩衝液使用 50 mmol/L 磷酸鈉/150 mmol/L NaCl, 0.05% Surfactant P20 pH6.0、或 50 mmol/L 磷酸鈉/150 mmol/L NaCl, 0.05% Surfactant P20 pH7.4，使用製作之感應晶片實施測定。測定均於 25℃ 進行。將人類 FcRn 稀釋液以運行緩衝液(當做參照溶液)以流速 5 μ L/min 注射 10 分鐘，使感應晶片上之抗體與人類 FcRn 交互作用。之後以流速 5 μ L/min 流過 1 分鐘運行緩衝液，觀察 FcRn 解離後，將 20 mmol/L

Tris-HCl/150 mmol/L NaCl, pH8.1 以流速 30 μ L/min 注射 15 秒，並返覆 2 次，使感應晶片再生。

【0439】測定結果之解析以 Biacore T100 Evaluation Software(Ver. 2.0.1)進行。由至少 6 個不同濃度之 FcRn 之測定結果，以穩定狀態親和性法(steady-state affinity method)解析並計算解離常數(KD)。Fv4-IgG1、Fv4-IgG1-v1 及 Fv4-IgG1-v2 於 pH6.0 及 pH7.4 對於人類 FcRn 之結合活性(解離常數 KD)之結果，如下表 24。

【0440】 【表 24】

	KD (μ M)	
	pH6.0	pH7.4
Fv4-IgG1	1.99	NA
Fv4-IgG1-v1	0.32	36.55
Fv4-IgG1-v2	0.11	11.03

【0441】Fv4-IgG1 於 pH7.4 對於人類 FcRn 之結合非常弱，無法計算 KD 值(NA)。相對於此，Fv4-IgG1-v1 與 Fv4-IgG1-v2 在 pH7.4 對於人類 FcRn 認為有結合，KD 值各計算為 36.55 μ M 與 11.03 μ M。又，pH6.0 對於人類 FcRn 之 KD 值各計算為 1.99 μ M 與 0.32 μ M 與 0.11 μ M。如圖 31，人類 FcRn 基因轉殖小鼠中，與 Fv4-IgG1 相比較，藉由為 Fv4-IgG1-v2，hsIL-6R 之消失會加速，故可認為藉由改變人類 IgG1，使最低在 pH7.4 對於人類 FcRn 之結合強於 11.03 μ M，能加速抗原之消失。又，如 J Immunol. 2002;169(9):5171-80.所示，人類 IgG1 對於小鼠 FcRn 比起對於人類 FcRn 以強約 10 倍結合，因此，於 Fv4-IgG1-v1 與 Fv4-IgG1-v2，預測 pH7.4 對於小鼠 FcRn 之結合會比起對於

人類 FcR 之結合強約 10 倍。圖 34 所示正常小鼠中，Fv4-IgG1-v1 與 Fv4-IgG1-v2 之 hsIL-6R 之消失加速，比起圖 32 所示之人類 FcRn 基因轉殖小鼠中之 Fv4-IgG1-v2 之 hsIL-6R 之消失加速大，因此據認為，因應 pH7.4 對於 FcRn 之結合強度，hsIL-6R 之消失加速會增大。

【0442】 [參考例 5]中性條件下對於人類 FcRn 之結合經增強之 pH 依存性人類 IL-6 受體結合抗體之製備

(5-1)Fv4-IgG1 之重鏈恆定區改變體之製作

為使人類 FcRn 基因轉殖小鼠中，pH 依存性人類 IL-6 受體結合抗體之抗原消失效果更增大，對於 Fv4-IgG1 導入於中性條件下為使對於人類 FcRn 之結合增強之各種改變。具體而言，藉由將表 25-1 及 25-2 記載之胺基酸改變對於 Fv4-IgG1 之重鏈恆定區導入，製作各種變異體（變異處之胺基酸編號依 EU 編號法）。又，胺基酸取代之導入，依參考例 3 記載之該技術領域之人士公知之方法實施。

【0443】 【表 25-1】

變異體名	KD (M)	胺基酸改變
IgG1	ND	無
IgG1-v1	3.2E-06	M252Y/S254T/T256E
IgG1-v2	8.1E-07	N434W
IgG1-F3	2.5E-06	N434Y
IgG1-F4	5.8E-06	N434S
IgG1-F5	6.8E-06	N434A
IgG1-F7	5.6E-06	M252Y
IgG1-F8	4.2E-06	M252W
IgG1-F9	1.4E-07	M252Y/S254T/T256E/N434Y
IgG1-F10	6.9E-08	M252Y/S254T/T256E/N434W
IgG1-F11	3.1E-07	M252Y/N434Y
IgG1-F12	1.7E-07	M252Y/N434W
IgG1-F13	3.2E-07	M252W/N434Y
IgG1-F14	1.8E-07	M252W/N434W
IgG1-F19	4.6E-07	P257L/N434Y
IgG1-F20	4.6E-07	V308F/N434Y
IgG1-F21	3.0E-08	M252Y/V308P/N434Y
IgG1-F22	2.0E-06	M428L/N434S
IgG1-F25	9.2E-09	M252Y/S254T/T256E/V308P/N434W
IgG1-F26	1.0E-06	I332V
IgG1-F27	7.4E-06	G237M
IgG1-F29	1.4E-06	I332V/N434Y
IgG1-F31	2.8E-06	G237M/V308F
IgG1-F32	8.0E-07	S254T/N434W
IgG1-F33	2.3E-06	S254T/N434Y
IgG1-F34	2.8E-07	T256E/N434W
IgG1-F35	8.4E-07	T256E/N434Y
IgG1-F36	3.6E-07	S254T/T256E/N434W
IgG1-F37	1.1E-06	S254T/T256E/N434Y
IgG1-F38	1.0E-07	M252Y/S254T/N434W
IgG1-F39	3.0E-07	M252Y/S254T/N434Y
IgG1-F40	8.2E-08	M252Y/T256E/N434W
IgG1-F41	1.5E-07	M252Y/T256E/N434Y
IgG1-F42	1.0E-06	M252Y/S254T/T256E/N434A
IgG1-F43	1.7E-06	M252Y/N434A
IgG1-F44	1.1E-06	M252W/N434A
IgG1-F47	2.4E-07	M252Y/T256Q/N434W
IgG1-F48	3.2E-07	M252Y/T256Q/N434Y
IgG1-F49	5.1E-07	M252F/T256D/N434W
IgG1-F50	1.2E-06	M252F/T256D/N434Y
IgG1-F51	8.1E-06	N434F/Y436H
IgG1-F52	3.1E-06	H433K/N434F/Y436H
IgG1-F53	1.0E-06	I332V/N434W
IgG1-F54	8.4E-08	V308P/N434W
IgG1-F56	9.4E-07	I332V/M428L/N434Y
IgG1-F57	1.1E-05	G385D/Q386P/N389S
IgG1-F58	7.7E-07	G385D/Q386P/N389S/N434W
IgG1-F59	2.4E-06	G385D/Q386P/N389S/N434Y
IgG1-F60	1.1E-05	G385H
IgG1-F61	9.7E-07	G385H/N434W
IgG1-F62	1.9E-06	G385H/N434Y
IgG1-F63	2.5E-06	N434F
IgG1-F64	5.3E-06	N434H

【0444】 表 25-2 係接續於表 25-1

【表 25-2】

IgG1-F65	2.9E-07	M252Y/S254T/T256E/N434F
IgG1-F66	4.3E-07	M252Y/S254T/T256E/N434H
IgG1-F67	6.3E-07	M252Y/N434F
IgG1-F68	9.3E-07	M252Y/N434H
IgG1-F69	5.1E-07	M428L/N434W
IgG1-F70	1.5E-06	M428L/N434Y
IgG1-F71	8.3E-08	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434W
IgG1-F72	2.0E-07	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434Y
IgG1-F73	1.7E-07	M252Y/M428L/N434W
IgG1-F74	4.6E-07	M252Y/M428L/N434Y
IgG1-F75	1.4E-06	M252Y/M428L/N434A
IgG1-F76	1.0E-06	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434A
IgG1-F77	9.9E-07	T256E/M428L/N434Y
IgG1-F78	7.8E-07	S254T/M428L/N434W
IgG1-F79	5.9E-06	S254T/T256E/N434A
IgG1-F80	2.7E-06	M252Y/T256Q/N434A
IgG1-F81	1.6E-06	M252Y/T256E/N434A
IgG1-F82	1.1E-06	T256Q/N434W
IgG1-F83	2.6E-06	T256Q/N434Y
IgG1-F84	2.8E-07	M252W/T256Q/N434W
IgG1-F85	5.5E-07	M252W/T256Q/N434Y
IgG1-F86	1.5E-06	S254T/T256Q/N434W
IgG1-F87	4.3E-06	S254T/T256Q/N434Y
IgG1-F88	1.9E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434W
IgG1-F89	3.6E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434Y
IgG1-F90	1.9E-08	M252Y/T256E/V308P/N434W
IgG1-F91	4.8E-08	M252Y/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F92	1.1E-08	M252Y/S254T/T256E/V308P/M428L/N434W
IgG1-F93	7.4E-07	M252W/M428L/N434W
IgG1-F94	3.7E-07	P257L/M428L/N434Y
IgG1-F95	2.6E-07	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434F
IgG1-F99	6.2E-07	M252Y/T256E/N434H

【0445】 製備之含重鏈與 L(WT)(序列編號：14)之變異體，依參考例 3 記載之該技術領域之人士公知之方法使表現並精製。

【0446】 (5-2)對於人類 FcRn 之結合評價

使用 Biacore T100 (GE Healthcare)，進行人類 FcRn 與抗體之速度論解析。為該目的，依參考例 2 記載製備人類 FcRn。在感應晶片 CM4 (GE Healthcare) 上以胺偶聯法將 PROTEIN L (ACTIGEN)適量固定化，使其捕捉目的之抗體。其次，注射 FcRn

稀釋液與運行緩衝液(當做參照溶液)，使捕捉於感應晶片上之抗體與人類 FcRn 交互作用。運行緩衝液使用 50 mmol/L 磷酸鈉、150 mmol/L NaCl、0.05% (w/v) Tween20、pH7.0，FcRn 之稀釋也使用各自的緩衝液。晶片再生使用 10 mmol/L 甘胺酸-HCl, pH1.5。測定均於 25℃ 實施。從測定獲得之傳感圖，計訴動力學參數結合速度常數 k_a (1/Ms)、及解離速度常數 k_d (1/s)，依該值計算各抗體對於人類 FcRn 之 K_D (M)。各參數之計算使用 Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare)。

【0447】 依 Biacore 評價於中性條件下 (pH7.0) 對於人類 FcRn 之結合之結果，如表 6-1 及 6-2。在此，天然型 IgG1 結合非常弱，不能計算 K_D ，在表 6-1 表示記載為 ND。

【0448】 [參考例 6] 中性條件下對於人類 FcRn 之結合經增強之 pH 依存性人類 IL-6 受體結合抗體之體內試驗

使用參考例 4 製備之賦予於中性條件下對於人類 FcRn 之結合能力之重鏈，製作中性條件下具有對於人類 FcRn 之結合能力之 pH 依存性人類 IL-6 受體結合抗體，並驗證於活體內之抗原消失效果。具體而言，依參考例 3 記載之該技術領域之人士公知之方法以下抗體表現並精製：

含 VH3-IgG1 與 VL3-CK 之 Fv4-IgG1、

含 VH3-IgG1-v2 與 VL3-CK 之 Fv4-IgG1-v2、

含 VH3-IgG1-F14 與 VL3-CK 之 Fv4-IgG1-F14、

含 VH3-IgG1-F20 與 VL3-CK 之 Fv4-IgG1-F20、

含 VH3-IgG1-F21 與 VL3-CK 之 Fv4-IgG1-F21、

含 VH3-IgG1-F25 與 VL3-CK 之 Fv4-IgG1-F25、
 含 VH3-IgG1-F29 與 VL3-CK 之 Fv4-IgG1-F29、
 含 VH3-IgG1-F35 與 VL3-CK 之 Fv4-IgG1-F35、
 含 VH3-IgG1-F48 與 VL3-CK 之 Fv4-IgG1-F48、
 含 VH3-IgG1-F93 與 VL3-CK 之 Fv4-IgG1-F93、
 含 VH3-IgG1-F94 與 VL3-CK 之 Fv4-IgG1-F94。

【0449】 針對製備之 pH 依存性的人類 IL-6 受體結合抗體，與參考例 3 之方法同樣實施使用人類 FcRn 基因轉殖小鼠 (B6.mFcRn-/-hFcRn Tg 系統 276 +/+ 小鼠、Jackson Laboratories、Methods Mol Biol. 2010;602:93-104.)之體內試驗。

【0450】 獲得之靜脈內投予後之人類 FcRn 基因轉殖小鼠中，血漿中可溶型人類 IL-6 受體濃度變化如圖 36。試驗結果顯示：於中性條件下對於人類 FcRn 之結合經增強之 pH 依存性的人類 IL-6 受體結合抗體，均為與中性條件下幾乎不具對於人類 FcRn 之結合能力之 Fv4-IgG1 比較時，血漿中可溶型人類 IL-6 受體濃度變為較低。其中，列舉效果特別顯著之例，與 Fv4-IgG1-F14 同時之可溶型人類 IL-6 受體之 1 日後之血漿中濃度，比起與 Fv4-IgG1 同時，約低 54 倍。又，與 Fv4-IgG1-F21 同時投予之可溶型人類 IL-6 受體之 7 小時後之血漿中濃度，比起與 Fv4-IgG1 同時投予時，約低 24 倍。又，與 Fv4-IgG1-F25 同時投予之可溶型人類 IL-6 受體之 7 小時後之血漿中濃度，為檢測極限(1.56 ng/mL)以下，比起與 Fv4-IgG1 同時投予時，據認為抗原濃度可顯著低 200 倍以上。由該等顯示：為了增強

抗原消失效果，對於 pH 依存性的抗原結合抗體使在中性條件下對於人類 FcRn 之結合增強非常有效。又，用於增強抗原消失效果導入之於中性條件下使對於人類 FcRn 之結合增強之胺基酸改變之種類，包含表 6-1、表 6-2 記載之改變，不特別限定，據認為導入任意改變，均能使活體內之抗原消失效果增強。

【0451】再者，與 Fv4-IgG1-F14、Fv4-IgG1-F21、Fv4-IgG1-F25、Fv4-IgG1-F48 之 4 種 pH 依存性的人類 IL-6 受體結合抗體同時投予之可溶型人類 IL-6 受體，比起可溶型人類 IL-6 受體之單獨投予群，顯示較低的血漿中濃度變化。如此的 pH 依存性的人類 IL-6 受體結合抗體對於處於血漿中之可溶型人類 IL-6 受體濃度為固定濃度之狀態(穩定狀態)的活體內投予，可以使血漿中之可溶型人類 IL-6 受體濃度為穩定狀態之血漿中濃度維持在更低。亦即，藉由將如此的抗體對於活體內投予，能減低活體內血漿中之抗原濃度。

【0452】[參考例 7]低用量(0.01 mg/kg)之 Fv4-IgG1-F14 之有效性之驗證

使用參考例 6 製備之 Fv4-IgG1-F14，與參考例 6 之方法同樣進行低用量(0.01 mg/kg)之體內試驗，與參考例 6 獲得之 Fv4-IgG1 及 Fv4-IgG1-F14 投予 1 mg/kg 時之結果比較(結果如圖 37 及 38)。

【0453】其結果，Fv4-IgG1-F14 之 0.01 mg/kg 投予群之血漿中抗體濃度，比起 1 mg/kg 投予群，低約 100 倍(圖 38)，儘管如此，血漿中可溶型人類 IL-6 受體濃度變化大約同等(圖 37)。又，Fv4-IgG1-F14 之 0.01 mg/kg 投予群 7 小時後之血漿

中可溶型人類 IL-6 受體濃度，比起 Fv4-IgG1 之 1 mg/kg 投予群，顯示約低 3 倍。再者，Fv4-IgG1-F14 在任一用量之投予群，均比可溶型人類 IL-6 受體單獨投予群，顯示更低之血漿中可溶型人類 IL-6 受體濃度變化（圖 37）。

【0454】 由此可顯示：對於 Fv4-IgG1 使於中性條件下對於人類 FcRn 之結合增強之 Fv4-IgG1-F14，即使是 Fv4-IgG1 之 100 分之 1 之投予量，也能有效使血漿中可溶型人類 IL-6 受體濃度降低。亦即，藉由對於 pH 依存性的抗原結合抗體，使中性條件下對於 FcRn 之結合能力增強，據認為能以較低投予量仍可有效使抗原消失。

【0455】 [參考例 8]利用使用正常小鼠之穩定狀態模型之體內試驗

(8-1)於中性條件下對於小鼠 FcRn 之結合評價

針對參考例 5 製備之

含 VH3-IgG1(序列編號：19)與 L(WT)(序列編號：14)之 VH3/L(WT)-IgG1、

含 VH3-IgG1-v2(序列編號：22) 與 L(WT)(序列編號：14)之 VH3/L(WT)-IgG1-v2、

含 VH3-IgG1-F20(序列編號：23) 與 L(WT)(序列編號：14)之 VH3/L(WT)-IgG1-F20、

依以下方法評價中性條件下(pH7.4)對於小鼠 FcRn 之結合評價。

【0456】 使用 Biacore T100 (GE Healthcare)，解析小鼠 FcRn 與抗體之速度論。在感應晶片 CM4 (GE Healthcare) 上以胺偶

聯法將 PROTEIN L (ACTIGEN) 適量固定化，使其捕捉目的之抗體。其次，注射 FcRn 稀釋液與運行緩衝液(當做參照溶液)，使捕捉於感應晶片上之抗體與小鼠 FcRn 交互作用。運行緩衝液使用 50 mmol/L 磷酸鈉、150 mmol/L NaCl、0.05% (w/v) Tween20、pH7.4，FcRn 之稀釋也使用各自的緩衝液。晶片再生使用 10 mmol/L 甘胺酸-HCl, pH1.5。測定均於 25 °C 實施。從測定獲得之傳感圖，計算動力學參數結合速度常數 k_a (1/Ms)、及解離速度常數 k_d (1/s)，依該值計算各抗體對於小鼠 FcRn 之 K_D (M)。各參數之計算使用 Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare)。

【0457】 結果如表 26(pH7.4 之小鼠 FcRn 親和性)。在此，恆定區為天然型 IgG1VH3/L(WT)-IgG1(表 26 之 IgG1)，對小鼠 FcRn 之結合非常弱，不能計算 K_D ，故表 26 中表示記載為 ND。測定結果，於中性條件下對於人類 FcRn 之結合經增強之該等改變體，對於小鼠 FcRn 也同樣，於中性條件下顯示結合增強。

【0458】 【表 26】

	K_D (M)
IgG1	ND
IgG1-v2	1.04E-06
IgG1-F20	1.17E-07

【0459】 (8-2)血漿中可溶型人類 IL-6 受體濃度為穩定狀態之正常小鼠之體內試驗

使用實施例 3 及參考例 5 製備之 H54/L28-IgG1、Fv4-IgG1、Fv4-IgG1-v2 及 Fv4-IgG1-F20，依下列方法進行體內試驗。

【0460】 於正常小鼠(C57BL/6J 小鼠、Charles River Japan)之背部皮下埋入充填有可溶型人類 IL-6 受體之注入泵浦(MINI-OSMOTIC PUMP MODEL2004、alzet)，藉此製作血漿中可溶型人類 IL-6 受體濃度維持穩定狀態之動物模型。對該動物模型，投予抗人類 IL-6 受體抗體，並評價投予後之可溶型人類 IL-6 受體於活體內之動態。為抑制產生對抗可溶型人類 IL-6 受體之中和抗體，將單株抗小鼠 CD4 抗體(R&D)對於尾靜脈以 20 mg/kg 單次投予。之後，將充填有 92.8 μ g/mL 可溶型人類 IL-6 受體之注入泵浦埋入小鼠背部皮下。注入泵浦埋入 3 日後，將抗人類 IL-6 受體抗體對於尾靜脈以 1 mg/kg 單次投予。投予抗人類 IL-6 受體抗體 15 分鐘後、7 小時後、1 日後、2 日後、3 日後、4 日後、7 日後、14 日後、21 日後、28 日後採血。將採取之血液立即於 4℃ 以 15,000 rpm 進行 15 分鐘離心分離，獲得血漿。將分離之血漿直到實施試驗為止保存在設定為 -20℃ 以下之冷凍庫。

【0461】 (8-3) 以 ELISA 法測定血漿中抗人類 IL-6 受體抗體濃度

與參考例 3 以同樣方法實施。

【0462】 (8-4)以電化學發光法測定血漿中 hsIL-6R 濃度

與實施例 5 以同樣方法實施。

如圖 39，對於血漿中可溶型人類 IL-6 受體濃度維持約 40 ng/mL 之穩定狀態的正常小鼠(hsIL-6R 群)，若投予可溶型人類 IL-6 受體之中和抗體 H54/L28-IgG1，則血漿中可溶型人類 IL-6 受體濃度會升高到 650 ng/mL(投予前之 15 倍)。另一方面，於

對於 H54/L28-IgG1 賦予 pH 依存性的抗原結合能力之 Fv4-IgG1 之投予群，維持血漿中可溶型人類 IL-6 受體濃度為約 70 ng/mL。由此顯示：由於通常之中和抗體 H54/L28-IgG1 之投予引起的血漿中可溶型人類 IL-6 受體濃度的升高，會藉由賦予 pH 依存性結合能力，而能抑制在約 10 分之 1。

【0463】再者，投予對於 pH 依存性的人類 IL-6 受體結合抗體導入有於中性條件下對於 FcRn 之結合之改變的 Fv-IgG1-v2 及 Fv-IgG1-F20，顯示可維持血漿中可溶型人類 IL-6 受體濃度為穩定狀態之 10 分之 1 以下之狀態。在此，Fv-IgG1-v2 從投予起 14 日後，血漿中可溶型人類 IL-6 受體濃度為約 2 ng/mL，可降低為投予前之 20 分之 1。又，Fv-IgG1-F20，從投予起 7 小時後、1 日後、2 日後、4 日後之血漿中可溶型人類 IL-6 受體濃度，為檢測極限(1.56 ng/mL)以下，顯示可低至投予前之 25 分之 1 以下。

【0464】由以上顯示，藉由投予對於血漿中之抗原濃度維持穩定狀態之動物模型，同時具備 pH 依存性的抗原結合能力與於中性條件下對於 FcRn 之結合能力之抗體，能使血漿中之抗原之消失速度增加、血漿中抗原濃度顯著降低。

【0465】通常之抗體，如 H54/L28-IgG1，藉由對標的抗原結合，其作用僅能中和，且更壞的是會造成血漿中之抗原濃度上升。另一方面，同時具備 pH 依存性的抗原結合能力與於中性條件下對於 FcRn 之結合能力之抗體，不僅可中和標的抗原，且發現能使血漿中之標的抗原之濃度降低。藉由將抗原從血漿中除去，可期待中和以上之高度效果。又，對於僅中和不

夠的標的抗原，據認為可顯示效果。

【0466】 [參考例 9]對於增強抗原消失所必要之 pH 中性域之對於人類 FcRn 之結合親和性之閾值鑑定、及抗原消失與 pH 中性域對於人類 FcRn 之結合親和性之關係

(9-1)用於體內試驗之抗體製備

製備包含於 pH 中性域對於 FcRn 之結合經增加之 VH3-IgG1(序列編號：19)與 VL3-CK(序列編號：20)之 Fv4-IgG1 之 Fc 變異體。具體而言，製備 VH3-M73(序列編號：24)及 VH3-IgG1-v1(序列編號：21)。胺基酸取代之導入，依照參考例 3 記載之該技術領域之人士公知之方法實施。

【0467】 依參考例 3 記載之該技術領域之人士公知之方法表現並精製含 H54(序列編號：5)與 L28(序列編號：6)之 H54/L28-IgG1、含 VH3-IgG1(序列編號：19)與 VL3-CK(序列編號：20)之 Fv4-IgG1、含 VH3-M73(序列編號：24)與 VL3-CK(序列編號：20)之 Fv4-M73、含 VH3-IgG1-v1(序列編號：21)與 VL3-CK(序列編號：20)之 Fv4-IgG1-v1、及含 VH3-IgG1-v2(序列編號：22)與 VL3-CK(序列編號：20)之 Fv4-IgG1-v2。

【0468】 (9-2)pH 中性條件下對於人類 FcRn 之抗體之結合親和性之評價

依參考例 3 記載，製備含 VH3-IgG1(序列編號：19)與 L(WT)(序列編號：14)之 VH3/L(WT)-IgG1、含 VH3-M73(序列編號：24)與 L(WT)(序列編號：14)之 VH3/L(WT)-M73、含 VH3-IgG1-v1(序列編號：21)與 L(WT)(序列編號：14)之 VH3/L(WT)-IgG1-v1、及含 VH3-IgG1-v2(序列編號：22)與

L(WT)(序列編號：14)之 VH3/L(WT)-IgG1-v2，並評價於中性 pH(pH7.0)與人類 FcRn 之結合。

【0469】 VH3/L(WT)-IgG1-v1 及 VH3/L(WT)-IgG1-v2 對於人類 FcRn 之結合活性，使用參考例 5 記載之方法測定。由於 VH3/L(WT)-IgG1 及 VH3/L(WT)-M73 對人類 FcRn 之結合活性低，故以實施例 5 記載之方法無法測定對人類 FcRn 之結合活性，是以，該等抗體依以下記載之方法評價。抗體與人類 FcRn 結合之動態使用 Biacore T100(GE Healthcare)解析。在感應晶片 CM4(GE Healthcare)上以胺偶聯法將適量 PROTEIN L(ACTIGEN)固定化，使晶片捕捉目的之抗體。其次，將稀釋 FcRn 溶液與運行緩衝液(當做參照溶液)注入，使感應晶片上捕捉之抗體與人類 FcRn 交互作用。運行緩衝液使用 50 mmol/l 磷酸鈉、150 mmol/l NaCl、0.05% (w/v) Tween 20、pH7.0。FcRn 使用各緩衝液稀釋。晶片使用 10 mmol/l 甘胺酸-HCl(pH1.5)再生。測定於 25℃ 進行。

【0470】 各抗體之 KD(M)，使用同時使適擬於傳感圖之結合及解離相，且實行中之組的全部曲線一次適擬的 Biacore T100 Evaluation Software(GE Healthcare)，從傳感圖數據導出。將傳感圖適擬於 Biacore T100 Evaluation Software 提供之 1：1 結合模型「*Langmuir* 結合」模型。針對結合交互作用的數個，使用基於平衡之方法，對於分析物濃度之對數，將平衡結合回應 R_{eq} 作圖，由非線形回歸分析導入 KD。

針對中性條件下(pH7.0)之人類 FcRn 結合，由 Biacore 得到之結果如表 27。

【0471】 【表 27】

	KD(M)
IgG1	8.8E-05
M73	1.4E-05
IgG1-v1	3.2E-06
IgG1-v2	8.1E-07

【0472】 (9-3)使用人類 FcRn 基因轉殖小鼠系統 276 之同時投予模型之抗體之抗原消失效果之體內試驗

使用同時投予模型之抗體之體內試驗，依參考例 3 進行。該試驗使用之抗人類 IL-6 受體抗體，為先前記載之 H54/L28-IgG1、Fv4-IgG1、Fv4-M73、Fv4-IgG1-v1、及 Fv4-IgG1-v2。該試驗使用之小鼠為人類 FcRn 基因轉殖小鼠 (B6.mFcRn-/-hFcRn Tg 系統 276 +/+ 小鼠、Jackson Laboratories; Methods Mol Biol. (2010) 602: 93-104)。

如圖 40，H54/L28-IgG1、Fv4-IgG1、Fv4-M73、Fv4-IgG1-v1、及 Fv4-IgG1-v2 之藥物動態為同等，該等抗體於試驗期間維持類似之血漿中濃度。

【0473】血漿中 hsIL-6 濃度變化如圖 41。比起與 Fv4-IgG1 同時投予之 hsIL-6R，與 Fv4-IgG1-v2 同時之 hsIL-6R 顯示廓清增大，但與 Fv4-M73 及 Fv4-IgG1-v1 同時投予 hsIL-6R 顯示廓清降低。M73、v1 及 v2 所有 Fc 變異體，對於人類 FcRn 在 pH 中性條件下 (pH7.0) 之結合親和性增大，但顯示 hsIL-6R 廓清增大的只有 Fv4-IgG1-v2，Fv4-M73 及 Fv4-IgG1-v1 未顯示增大。此顯示：為了增大抗原廓清，與 pH7.0 對於人類 FcRn 之結合親和性為 KD 3.2 μ M 或比天然型人類 IgG1 (對人類 FcRn 之

結合親和性為 $KD\ 88\mu M$) 高 28 倍之 IgG1-v1 相比，pH7.0 對於人類 FcRn 之抗體之結合親和性至少要比其高高。

【0474】 圖 42 顯示 pH7.0 對於人類 FcRn 之 Fc 變異體之結合親和性、與同時投予 hsIL-6R 及 Fc 變異體 1 日後之血漿中 hsIL-6R 濃度之間的關係。係將本實施例及參考例 6 記載之 Fc 變異體 (Fv4-IgG1、Fv4-M73、Fv4-IgG1-v1、Fv4-IgG1-v2、Fv4-IgG1-F14、Fv4-IgG1-F20、Fv4-IgG1-F21、Fv4-IgG1-F25、Fv4-IgG1-F29、Fv4-IgG1-F35、Fv4-IgG1-F48、Fv4-IgG1-F93、及 Fv4-IgG1-F94) 作圖。若 pH7.0 對於人類 FcRn 之抗體之結合親和性增大，則反映抗原廓清之血漿中 hsIL-6R 濃度會先增加後急速降低。此顯示：與天然型人類 IgG1 比較，為使抗原廓清增大，需要使 pH7.0 對於人類 FcRn 之抗體之結合親和性，較佳為比 $KD\ 2.3\mu M$ (從圖 42 之曲線對應獲得之值) 強。抗體對人類 FcRn 之結合親和性為 $KD\ 88\mu M \sim KD\ 2.3\mu M$ 時，則抗原廓清降低 (較高之 hsIL-6R 濃度)。換言之，pH7.0 對於人類 FcRn 之抗體之結合親和性，為增強抗原之消失，較佳為必需比天然型人類 IgG1 高 38 倍，不然據認為抗原廓清會降低。

【0475】 圖 43 顯示 pH7.0 對於人類 FcRn 之 Fc 變異體之結合親和性、與同時投予 hsIL-6R 及 Fc 變異體 1 日後之血漿中抗體濃度之間的關係。係將本實施例及參考例 6 記載之 Fc 變異體 (Fv4-IgG1、Fv4-M73、Fv4-IgG1-v1、Fv4-IgG1-v2、Fv4-IgG1-F14、Fv4-IgG1-F20、Fv4-IgG1-F21、Fv4-IgG1-F25、Fv4-IgG1-F29、Fv4-IgG1-F35、Fv4-IgG1-F48、Fv4-IgG1-F93、及 Fv4-IgG1-F94) 作圖。若使 pH7.0 對於人類 FcRn 之抗體之結

合親和性增大，反映抗體之藥物動態(廓清)之血漿中抗體濃度會先維持，但之後急速降低。此顯示:為維持與天然型人類 IgG1(對於人類 FcRn 之結合親和性為 $KD\ 88\mu M$)類似之抗體之藥物動態，需要使 pH7.0 對於人類 FcRn 之抗體之親和性弱於 $KD\ 0.2\mu M$ (從圖 43 之曲線對應得到之值)。抗體對人類 FcRn 之結合親和性強於 $KD\ 0.2\mu M$ 時，抗體之廓清會增大(亦即，抗體急速從血漿消失)。換言之，pH7.0 對於人類 FcRn 之抗體之結合親和性，為了顯示與天然型人類 IgG1 類似之抗體藥物動態，比起天然型人類 IgG1，需要 440 倍以內之高度，不然，據認為抗體會從血漿急速消失。

【0476】 若考慮圖 42 及 43 兩者，為維持與天然型人類 IgG1 類似之抗體藥物動態且比起 IgG1 之抗原廓清增大 (亦即使血漿中抗原濃度減少)，pH7.0 對於人類 FcRn 之抗體之結合親和性必需為 $2.3\mu M$ 至 $0.2\mu M$ ，或換言之， pH7.0 對於人類 FcRn 之抗體之結合親和性必需比天然型人類 IgG1 為高 38 倍至 440 倍之範圍。與具長期間之抗體消失活性之 IgG1 類似之藥物動態之此種抗體，由於長期間作用性，據認為對於慢性疾患等需長投予間隔之抗體治療為有益。

【0477】 另一方面，藉由使 pH7.0 對於人類 FcRn 之抗體之結合親和性強於 $KD\ 0.2\mu M$ ，或換言之，使比起天然型人類 IgG1，於 pH7.0 抗體對於人類 FcRn 之結合親和性增大為高於 440 倍，抗體雖比天然型人類 IgG1 更快從血漿消失，但據認為抗原廓清於短期間也會相當增強。能誘導抗原濃度急速大量減少之如此的抗體，由於其即效性，據認為對於需要將疾病相

關抗原從血漿中除去之急性疾病等抗體治療為有益。

【0478】 就抗體 1 分子從血漿消失之抗原之量，為利用投予 pH7.0 對於人類 FcRn 之結合親和性增大之抗體 Fc 變異體評價抗原消失效率時之重要要因。為評價抗體 1 分子之抗原消失效率，於本實施例及參考例 6 記載之體內試驗之各時點實施以下計算。

A 值：各時點之抗原之莫耳濃度

B 值：各時點之抗體之莫耳濃度

C 值：每個抗體莫耳濃度之抗原莫耳濃度(抗原/抗體莫耳比)

$$C = A/B$$

【0479】 針對各抗體之 C 值(抗原/抗體莫耳比)之變化如圖 44。C 值較小時，抗體每 1 分子之抗原消失效率會較高，但 C 值更大時，抗體每 1 分子之抗原消失效率會較低。與 IgG1 相比較，若 C 值較小，顯示可藉由 Fc 變異體獲得較高抗原消失效率，但是若比 IgG1，C 值較大，顯示 Fc 變異體關於抗原消失效率具負面效果。Fv4-M73 及 Fv4-IgG1-v1 以外的所有 Fc 變異體，比起 Fv4-IgG1，顯示抗原消失效率增大。Fv4-M73 及 Fv4-IgG1-v1 顯示對抗原消失效率有負面影響，此與圖 42 一致。

【0480】 圖 45 顯示 pH7.0 對於人類 FcRn 之 Fc 變異體之結合親和性、與同時投予 hsIL-6R 及 Fc 變異體 1 日後之 C 值(抗原/抗體莫耳比)之間的關係。將本實施例及參考例 6 記載之 Fc 變異體 (Fv4-IgG1、Fv4-M73、Fv4-IgG1-v1、Fv4-IgG1-v2、

Fv4-IgG1-F14、Fv4-IgG1-F20、Fv4-IgG1-F21、Fv4-IgG1-F25、Fv4-IgG1-F29、Fv4-IgG1-F35、Fv4-IgG1-F48、Fv4-IgG1-F93、及 Fv4-IgG1-F94)作圖。其顯示與天然型人類 IgG1 比較為達成更高之抗原消失效率，必需使 pH7.0 對於人類 FcRn 之抗體之親和性強於 KD $3.0\mu\text{M}$ (從圖 45 之曲線對應到之值)。換言之，pH7.0 對於人類 FcRn 之抗體之結合親和性，為了使比起天然型人類 IgG1 達成較高抗原消失效率，必需比天然型人類 IgG1 至少高 29 倍。

【0481】 結論為，對於 FcRn 於 pH7.0 具 KD $3.0\mu\text{M}$ 至 $0.2\mu\text{M}$ 之結合親和性之抗體變異體之群、或換言之，對於 FcRn 於 pH7.0 比起天然型人類 IgG1 有高 29 倍至 440 倍之範圍之結合親和性之抗體變異體之群，具與 IgG1 類似之抗體藥物動態，但具增大之血漿中抗體消失能力。因此，如此的抗體比起 IgG1 顯示增大的抗原消失效率。藉由與 IgG1 類似之藥物動態，能使抗原長期間從血漿消失（長期間作用性之抗原消失），所以能以長投予間隔投予，此據認為對於慢性疾病相關之抗體治療物質有利。對於 FcRn 於 pH7.0 具強於 KD $0.2\mu\text{M}$ 之結合親和性之抗體變異體之群，或換言之對 FcRn 於 pH7.0 具比天然型人類 IgG1 高 440 倍之結合親和性之抗體變異體之群，具急速的抗體廓清(短期間之抗體消失)。此顯示:儘管如此，如此的抗體會由於暴露於抗原而急速廓清（即效性之抗原消失），故如此的抗體比 IgG1 顯示增大之抗原消失效率。如參考例 8，於正常小鼠之 Fv4-IgG1-F20，抗原從血漿之大幅消失會在非常短期間誘導，但抗原消失效果不持續。如此的概況，據認為對於

需要使疾病相關抗原於非常短期間迅速且大幅從血漿枯竭之急性疾病時，為有利。

【0482】 [參考例 10]使用人類 FcRn 基因轉殖小鼠系統 276 之穩定狀態注入模型之 Fv4-IgG1-F14 之體內試驗

使用人類 FcRn 基因轉殖小鼠系統 276 之下列穩定狀態注入模型進行 Fv4-IgG1-F14 之體內試驗。試驗群由對照群(無抗體)、以 1 mg/kg 用量之 Fv4-IgG1、及 1 mg/kg、0.2 mg/kg、及 0.01 mg/kg 之用量之 Fv4-IgG1-F14 構成。

【0483】 對於人類 FcRn 基因轉殖小鼠系統 276(B6.mFcRn-/-hFcRn Tg 系統 276 +/+小鼠(B6.mFcRn-/-hFCRN Tg276 B6.Cg-Fcgrt < tm1Dcr > Tg(FCGRT)276Dcr (Jackson #4919))、Jackson Laboratories; Methods Mol Biol. (2010) 602: 93-104)之背部皮下，埋入充填有可溶型人類 IL-6 受體之注入泵浦(MINI-OSMOTIC PUMP MODEL 2004; alzet)，藉此製作維持血漿中可溶型人類 IL-6 受體濃度為固定之模型動物。對於模型動物投予抗人類 IL-6 受體抗體，評價投予後之可溶型人類 IL-6 受體於活體內之動態。為抑制產生對抗可溶型人類 IL-6 受體之中和抗體，在埋入注入泵浦前，於將抗體對尾靜脈投予 14 日後，以 20 mg/kg 投予單株抗小鼠 CD4 抗體(R&D)。其次，將填充有 92.8 μ g/ml 之可溶型人類 IL-6 受體的注入泵浦埋入小鼠之背部皮下。埋入注入泵浦 3 日後，將抗人類 IL-6 受體抗體(H54/L28-IgG1 及 H54/L28-IgG1-F14)對於尾靜脈以 1 mg/kg 單次投予。投予抗人類 IL-6 受體抗體 15 分鐘後、7 小時後、1 日後、2 日後、3 日後、4 日後、7 日後、

14 日後、21 日後、及 28 日後採血。將採取之血液立即於 4℃ 以 15,000 rpm 進行 15 分鐘離心分離，獲得血漿。分離之血漿在實施測定為止前保存在設定為 -20℃ 以下之冷凍庫。

【0484】 小鼠血漿中之 hsIL-6R 濃度以電化學發光測定。製備調整為 2,000、1,000、500、250、125、62.5、及 31.25 pg/ml 之濃度之 hsIL-6R 檢量線試樣及稀釋 50 倍以上之小鼠血漿試樣。將試樣與經 SULFO-TAG NHS Ester(Meso Scale Discovery) 釐化之單株抗人類 IL-6R 抗體(R&D)、生物素化抗人類 IL-6R 抗體(R&D)、及 WT-IgG1 溶液混合，於 37℃ 反應一晚。就抗人類 IL-6 受體抗體而言，含 tocilizumab(重鏈序列編號：13、輕鏈序列編號：14)之 WT-IgG1 之終濃度比起試樣所包含之抗人類 IL-6 受體抗體濃度為過剩之 333 μg/ml，目的為使試樣中之幾乎全部 hsIL-6R 分子成為與 WT-IgG1 結合之狀態。之後，將試樣分注於 MA400 PR Streptavidin Plate(Meso Scale Discovery)，於室溫使反應 1 小時並洗滌。分注 Read Buffer T(×4)(Meso Scale Discovery)，立即以 Sector PR 400 Reader(Meso Scale Discovery)測定。hsIL-6R 濃度，係從檢量線之回應使用解析軟體 SOFTmax PRO(Molecular Devices)計算。

【0485】 圖 46 顯示抗體投予後之血漿中 hsIL-6R 濃度之時間曲線。比起未投予抗體之基線的 hsIL-6R 水平，由於投予 1 mg/kg Fv4-IgG1，血漿中 hsIL-6R 濃度增加數倍。另一方面，由於 1 mg/kg 之 Fv4-IgG1-F14 投予，比較 Fv4-IgG1 群及基線群時，血漿中濃度發生顯著減少。於第 2 日，未檢測到血漿中

hsIL-6R 濃度 (血漿中 hsIL-6R 濃度之定量極限於該測定系為 1.56 ng/mL)，持續到第 14 日。

【0486】 H54/L28-IgG1-F14，比起 H54/L28-IgG1，血漿中 hsIL-6R 濃度顯示減少，但減少程度小。減少之程度，當 Fv4 可變區具有對於 hsIL-6R 之 pH 依存性結合特性時，會相當大。此顯示：若使於 pH7.0 對於人類 FcRn 之結合親和性增大，對於使血漿中抗原濃度減少有效，但是若組合 pH 依存性的抗原結合及於 pH 中性域對於人類 FcRn 之結合親和性之增大，則抗原消失會顯著增大。

【0487】 使用較低用量之 Fv4-IgG1-F14 之試驗，即使是 1 mg/kg 之 1/1000.01 mg/kg，也能使血漿中抗原濃度比基線更減少，顯示分子使抗原從血漿枯竭之效率為顯著。

【0488】 [參考例 11]同時投予模型中，人類 FcRn 基因轉殖小鼠系統 276 及系統 32 之比較

至此的體內試驗，係使用人類 FcRn 基因轉殖小鼠系統 276(Jackson Laboratories)進行。為比較與人類 FcRn 基因轉殖小鼠系統 276 不同的基因轉殖系統系統 32 之差異，本案發明人等使用人類 FcRn 基因轉殖小鼠系統 32(B6.mFcRn-/- .hFcRn Tg 系統 32 +/-小鼠(B6.mFcRn-/- hFCRN Tg32; B6.Cg-Fcgrt < tmlDcr > Tg(FCGRT)32Dcr) (Jackson #4915))、Jackson Laboratories; Methods Mol Biol. (2010) 602: 93-104) 進行 H54/L28-IgG1、Fv4-IgG1、及 Fv4-IgG1-v2 之同時投予試驗。試驗方法，除了使用人類 FcRn 基因轉殖小鼠系統 32 代替人類 FcRn 基因轉殖小鼠系統 276 以外，與參考例 3 之試驗方法相

同。

【0489】 圖 47 顯示人類 FcRn 基因轉殖小鼠系統 276 及系統 32 兩者中，血漿中 hsIL-6R 濃度變化。H54/L28-IgG1、Fv4-IgG1、及 Fv4-IgG1-v2，顯示類似之血漿中 hsIL-6R 濃度-時間曲線。任意小鼠均為若 pH7.0 對於人類 FcRn 之結合親和性增大，則抗原從血漿之消失同程度增強（比較 Fv4-IgG1 與 Fv4-IgG1-v2）。

【0490】 圖 48 顯示人類 FcRn 基因轉殖小鼠系統 276 及系統 32 兩者中之血漿中抗體濃度變化。H54/L28-IgG1、Fv4-IgG1、及 Fv4-IgG1-v2 顯示類似之血漿中抗體濃度-時間曲線。

【0491】 就結論而言，系統 276 與系統 32 之間未觀察到顯著差異，於 pH7.0 使對於人類 FcRn 之結合親和性增大之 Fc 變異體，關於血漿中抗原濃度之消失之增強，於表現人類 FcRn 之 2 個不同的基因轉殖小鼠系統為有效。

【0492】 [參考例 12]中性 pH 對於人類 FcRn 之結合親和性增大之各種抗體 Fc 變異體之製作

(12-1)Fc 變異體之製作

為進一步改善抗原消失曲線，以 pH 中性域對於人類 FcRn 之結合親和性增大為目的，將各種變異導入 Fv4-IgG1。具體而言，製作表 15 所示之胺基酸變異導入 Fv4-IgG1 之重鏈恆定區的 Fc 變異體（變異部位之胺基酸編號依 EU 編號法記載）。胺基酸取代之導入，依照參考例 3 記載之該技術領域之人士公知之方法實施。

【0493】 將製備之含重鏈與 L(WT)(序列編號：14)之進一步的變異體(IgG1-F100 至 IgG1-F1052)，依參考例 3 記載之該技術領域之人士公知之方法表現並精製。

【0494】 (12-2)人類 FcRn 結合之評價

抗體與人類 FcRn 之結合之動態，針對 IgG1-v1、IgG1-v2、及 IgG1-F2 至 IgG1-F1052 如參考例 5 記載，或針對 IgG1 及 M73 依參考例 9 記載解析。針對於中性條件下(pH7.0)之人類 FcRn 結合的利用 Biacore 所得之結果，如表 28-1 至 28-21。

【0495】 【表 28-1】

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

【0496】 表 28-2 係接續表 28-1。

【表 28-2】

F52	3.10E-06	H433K/N434F/Y436H
F53	1.00E-06	I332V/N434W
F54	8.40E-08	V308P/N434W
F56	9.40E-07	I332V/M428L/N434Y
F57	1.10E-05	G385D/Q386P/N389S
F58	7.70E-07	G385D/Q386P/N389S/N434W
F59	2.40E-06	G385D/Q386P/N389S/N434Y
F60	1.10E-05	G385H
F61	9.70E-07	G385H/N434W
F62	1.90E-06	G385H/N434Y
F63	2.50E-06	N434F
F64	5.30E-06	N434H
F65	2.90E-07	M252Y/S254T/T256E/N434F
F66	4.30E-07	M252Y/S254T/T256E/N434H
F67	6.30E-07	M252Y/N434F
F68	9.30E-07	M252Y/N434H
F69	5.10E-07	M428L/N434W
F70	1.50E-06	M428L/N434Y
F71	8.30E-08	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434W
F72	2.00E-07	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434Y
F73	1.70E-07	M252Y/M428L/N434W
F74	4.60E-07	M252Y/M428L/N434Y
F75	1.40E-06	M252Y/M428L/N434A
F76	1.00E-06	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434A
F77	9.90E-07	T256E/M428L/N434Y
F78	7.80E-07	S254T/M428L/N434W
F79	5.90E-06	S254T/T256E/N434A
F80	2.70E-06	M252Y/T256Q/N434A
F81	1.60E-06	M252Y/T256E/N434A
F82	1.10E-06	T256Q/N434W
F83	2.60E-06	T256Q/N434Y
F84	2.80E-07	M252W/T256Q/N434W
F85	5.50E-07	M252W/T256Q/N434Y
F86	1.50E-06	S254T/T256Q/N434W
F87	4.30E-06	S254T/T256Q/N434Y
F88	1.90E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434W
F89	3.60E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434Y
F90	1.90E-08	M252Y/T256E/V308P/N434W
F91	4.80E-08	M252Y/V308P/M428L/N434Y
F92	1.10E-08	M252Y/S254T/T256E/V308P/M428L/N434W
F93	7.40E-07	M252W/M428L/N434W
F94	3.70E-07	P257L/M428L/N434Y

【0497】 表 28-3 係接續表 28-2

【表 28-3】

F95	2. 60E-07	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434F
F99	6. 20E-07	M252Y/T256E/N434H
F101	1. 10E-07	M252W/T256Q/P257L/N434Y
F103	4. 40E-08	P238A/M252Y/V308P/N434Y
F104	3. 70E-08	M252Y/D265A/V308P/N434Y
F105	7. 50E-08	M252Y/T307A/V308P/N434Y
F106	3. 70E-08	M252Y/V303A/V308P/N434Y
F107	3. 40E-08	M252Y/V308P/D376A/N434Y
F108	4. 10E-08	M252Y/V305A/V308P/N434Y
F109	3. 20E-08	M252Y/V308P/Q311A/N434Y
F111	3. 20E-08	M252Y/V308P/K317A/N434Y
F112	6. 40E-08	M252Y/V308P/E380A/N434Y
F113	3. 20E-08	M252Y/V308P/E382A/N434Y
F114	3. 80E-08	M252Y/V308P/S424A/N434Y
F115	6. 60E-06	T307A/N434A
F116	8. 70E-06	E380A/N434A
F118	1. 40E-05	M428L
F119	5. 40E-06	T250Q/M428L
F120	6. 30E-08	P257L/V308P/M428L/N434Y
F121	1. 50E-08	M252Y/T256E/V308P/M428L/N434W
F122	1. 20E-07	M252Y/T256E/M428L/N434W
F123	3. 00E-08	M252Y/T256E/V308P/N434Y
F124	2. 90E-07	M252Y/T256E/M428L/N434Y
F125	2. 40E-08	M252Y/S254T/T256E/V308P/M428L/N434Y
F128	1. 70E-07	P257L/M428L/N434W
F129	2. 20E-07	P257A/M428L/N434Y
F131	3. 00E-06	P257G/M428L/N434Y
F132	2. 10E-07	P257I/M428L/N434Y
F133	4. 10E-07	P257M/M428L/N434Y
F134	2. 70E-07	P257N/M428L/N434Y
F135	7. 50E-07	P257S/M428L/N434Y
F136	3. 80E-07	P257T/M428L/N434Y
F137	4. 60E-07	P257V/M428L/N434Y
F139	1. 50E-08	M252W/V308P/N434W
F140	3. 60E-08	S239K/M252Y/V308P/N434Y
F141	3. 50E-08	M252Y/S298G/V308P/N434Y
F142	3. 70E-08	M252Y/D270F/V308P/N434Y
F143	2. 00E-07	M252Y/V308A/N434Y
F145	5. 30E-08	M252Y/V308F/N434Y
F147	2. 40E-07	M252Y/V308I/N434Y
F149	1. 90E-07	M252Y/V308L/N434Y
F150	2. 00E-07	M252Y/V308M/N434Y

【0498】 表 28-4 係接續表 28-3

【表 28-4】

F152	2. 70E-07	M252Y/V308Q/N434Y
F154	1. 80E-07	M252Y/V308T/N434Y
F157	1. 50E-07	P257A/V308P/M428L/N434Y
F158	5. 90E-08	P257T/V308P/M428L/N434Y
F159	4. 40E-08	P257V/V308P/M428L/N434Y
F160	8. 50E-07	M252W/M428I/N434Y
F162	1. 60E-07	M252W/M428Y/N434Y
F163	4. 20E-07	M252W/M428F/N434Y
F164	3. 70E-07	P238A/M252W/N434Y
F165	2. 90E-07	M252W/D265A/N434Y
F166	1. 50E-07	M252W/T307Q/N434Y
F167	2. 90E-07	M252W/V303A/N434Y
F168	3. 20E-07	M252W/D376A/N434Y
F169	2. 90E-07	M252W/V305A/N434Y
F170	1. 70E-07	M252W/Q311A/N434Y
F171	1. 90E-07	M252W/D312A/N434Y
F172	2. 20E-07	M252W/K317A/N434Y
F173	7. 70E-07	M252W/E380A/N434Y
F174	3. 40E-07	M252W/E382A/N434Y
F175	2. 70E-07	M252W/S424A/N434Y
F176	2. 90E-07	S239K/M252W/N434Y
F177	2. 80E-07	M252W/S298G/N434Y
F178	2. 70E-07	M252W/D270F/N434Y
F179	3. 10E-07	M252W/N325G/N434Y
F182	6. 60E-08	P257A/M428L/N434W
F183	2. 20E-07	P257T/M428L/N434W
F184	2. 70E-07	P257V/M428L/N434W
F185	2. 60E-07	M252W/I332V/N434Y
F188	3. 00E-06	P257I/Q311I
F189	1. 90E-07	M252Y/T307A/N434Y
F190	1. 10E-07	M252Y/T307Q/N434Y
F191	1. 60E-07	P257L/T307A/M428L/N434Y
F192	1. 10E-07	P257A/T307A/M428L/N434Y
F193	8. 50E-08	P257T/T307A/M428L/N434Y
F194	1. 20E-07	P257V/T307A/M428L/N434Y
F195	5. 60E-08	P257L/T307Q/M428L/N434Y
F196	3. 50E-08	P257A/T307Q/M428L/N434Y
F197	3. 30E-08	P257T/T307Q/M428L/N434Y
F198	4. 80E-08	P257V/T307Q/M428L/N434Y
F201	2. 10E-07	M252Y/T307D/N434Y
F203	2. 40E-07	M252Y/T307F/N434Y
F204	2. 10E-07	M252Y/T307G/N434Y

【0499】 表 28-5 係接續表 28-4

【表 28-5】

F205	2.00E-07	M252Y/T307H/N434Y
F206	2.30E-07	M252Y/T307I/N434Y
F207	9.40E-07	M252Y/T307K/N434Y
F208	3.90E-07	M252Y/T307L/N434Y
F209	1.30E-07	M252Y/T307M/N434Y
F210	2.90E-07	M252Y/T307N/N434Y
F211	2.40E-07	M252Y/T307P/N434Y
F212	6.80E-07	M252Y/T307R/N434Y
F213	2.30E-07	M252Y/T307S/N434Y
F214	1.70E-07	M252Y/T307V/N434Y
F215	9.60E-08	M252Y/T307W/N434Y
F216	2.30E-07	M252Y/T307Y/N434Y
F217	2.30E-07	M252Y/K334L/N434Y
F218	2.60E-07	M252Y/G385H/N434Y
F219	2.50E-07	M252Y/T289H/N434Y
F220	2.50E-07	M252Y/Q311H/N434Y
F221	3.10E-07	M252Y/D312H/N434Y
F222	3.40E-07	M252Y/N315H/N434Y
F223	2.70E-07	M252Y/K360H/N434Y
F225	1.50E-06	M252Y/L314R/N434Y
F226	5.40E-07	M252Y/L314K/N434Y
F227	1.20E-07	M252Y/N286E/N434Y
F228	2.30E-07	M252Y/L309E/N434Y
F229	5.10E-07	M252Y/R255E/N434Y
F230	2.50E-07	M252Y/P387E/N434Y
F236	8.90E-07	K248I/M428L/N434Y
F237	2.30E-07	M252Y/M428A/N434Y
F238	7.40E-07	M252Y/M428D/N434Y
F240	7.20E-07	M252Y/M428F/N434Y
F241	1.50E-06	M252Y/M428G/N434Y
F242	8.50E-07	M252Y/M428H/N434Y
F243	1.80E-07	M252Y/M428I/N434Y
F244	1.30E-06	M252Y/M428K/N434Y
F245	4.70E-07	M252Y/M428N/N434Y
F246	1.10E-06	M252Y/M428P/N434Y
F247	4.40E-07	M252Y/M428Q/N434Y
F249	6.40E-07	M252Y/M428S/N434Y
F250	2.90E-07	M252Y/M428T/N434Y
F251	1.90E-07	M252Y/M428V/N434Y
F252	1.00E-06	M252Y/M428W/N434Y
F253	7.10E-07	M252Y/M428Y/N434Y
F254	7.50E-08	M252W/T307Q/M428Y/N434Y

【0500】 表 28-6 係接續表 28-5

【表 28-6】

F255	1. 10E-07	M252W/Q311A/M428Y/N434Y
F256	5. 40E-08	M252W/T307Q/Q311A/M428Y/N434Y
F257	5. 00E-07	M252Y/T307A/M428Y/N434Y
F258	3. 20E-07	M252Y/T307Q/M428Y/N434Y
F259	2. 80E-07	M252Y/D270F/N434Y
F260	1. 30E-07	M252Y/T307A/Q311A/N434Y
F261	8. 40E-08	M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F262	1. 90E-07	M252Y/T307A/Q311H/N434Y
F263	1. 10E-07	M252Y/T307Q/Q311H/N434Y
F264	2. 80E-07	M252Y/E382A/N434Y
F265	6. 80E-07	M252Y/E382A/M428Y/N434Y
F266	4. 70E-07	M252Y/T307A/E382A/M428Y/N434Y
F267	3. 20E-07	M252Y/T307Q/E382A/M428Y/N434Y
F268	6. 30E-07	P238A/M252Y/M428F/N434Y
F269	5. 20E-07	M252Y/V305A/M428F/N434Y
F270	6. 60E-07	M252Y/N325G/M428F/N434Y
F271	6. 90E-07	M252Y/D376A/M428F/N434Y
F272	6. 80E-07	M252Y/E380A/M428F/N434Y
F273	6. 50E-07	M252Y/E382A/M428F/N434Y
F274	7. 60E-07	M252Y/E380A/E382A/M428F/N434Y
F275	4. 20E-08	S239K/M252Y/V308P/E382A/N434Y
F276	4. 10E-08	M252Y/D270F/V308P/E382A/N434Y
F277	1. 30E-07	S239K/M252Y/V308P/M428Y/N434Y
F278	3. 00E-08	M252Y/T307Q/V308P/E382A/N434Y
F279	6. 10E-08	M252Y/V308P/Q311H/E382A/N434Y
F280	4. 10E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/N434Y
F281	9. 20E-08	M252Y/V308P/E382A/M428F/N434Y
F282	2. 90E-08	M252Y/V308P/E382A/M428L/N434Y
F283	1. 00E-07	M252Y/V308P/E382A/M428Y/N434Y
F284	1. 00E-07	M252Y/V308P/M428Y/N434Y
F285	9. 90E-08	M252Y/V308P/M428F/N434Y
F286	1. 20E-07	S239K/M252Y/V308P/E382A/M428Y/N434Y
F287	1. 00E-07	M252Y/V308P/E380A/E382A/M428F/N434Y
F288	1. 90E-07	M252Y/T256E/E382A/N434Y
F289	4. 80E-07	M252Y/T256E/M428Y/N434Y
F290	4. 60E-07	M252Y/T256E/E382A/M428Y/N434Y
F292	2. 30E-08	S239K/M252Y/V308P/E382A/M428I/N434Y
F293	5. 30E-08	M252Y/V308P/E380A/E382A/M428I/N434Y
F294	1. 10E-07	S239K/M252Y/V308P/M428F/N434Y
F295	6. 80E-07	S239K/M252Y/E380A/E382A/M428F/N434Y
F296	4. 90E-07	M252Y/Q311A/M428Y/N434Y
F297	5. 10E-07	M252Y/D312A/M428Y/N434Y

【0501】 表 28-7 係接續表 28-6

【表 28-7】

F298	4. 80E-07	M252Y/Q311A/D312A/M428Y/N434Y
F299	9. 40E-08	S239K/M252Y/V308P/Q311A/M428Y/N434Y
F300	8. 30E-08	S239K/M252Y/V308P/D312A/M428Y/N434Y
F301	7. 20E-08	S239K/M252Y/V308P/Q311A/D312A/M428Y/N434Y
F302	1. 90E-07	M252Y/T256E/T307P/N434Y
F303	6. 70E-07	M252Y/T307P/M428Y/N434Y
F304	1. 60E-08	M252W/V308P/M428Y/N434Y
F305	2. 70E-08	M252Y/T256E/V308P/E382A/N434Y
F306	3. 60E-08	M252W/V308P/E382A/N434Y
F307	3. 60E-08	S239K/M252W/V308P/E382A/N434Y
F308	1. 90E-08	S239K/M252W/V308P/E382A/M428Y/N434Y
F310	9. 40E-08	S239K/M252W/V308P/E382A/M428I/N434Y
F311	2. 80E-08	S239K/M252W/V308P/M428F/N434Y
F312	4. 50E-07	S239K/M252W/E380A/E382A/M428F/N434Y
F313	6. 50E-07	S239K/M252Y/T307P/M428Y/N434Y
F314	3. 20E-07	M252Y/T256E/Q311A/D312A/M428Y/N434Y
F315	6. 80E-07	S239K/M252Y/M428Y/N434Y
F316	7. 00E-07	S239K/M252Y/D270F/M428Y/N434Y
F317	1. 10E-07	S239K/M252Y/D270F/V308P/M428Y/N434Y
F318	1. 80E-08	S239K/M252Y/V308P/M428I/N434Y
F320	2. 00E-08	S239K/M252Y/V308P/N325G/E382A/M428I/N434Y
F321	3. 20E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/N325G/N434Y
F322	9. 20E-08	S239K/M252Y/D270F/T307P/V308P/N434Y
F323	2. 70E-08	S239K/M252Y/T256E/D270F/V308P/N434Y
F324	2. 80E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/V308P/N434Y
F325	2. 10E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F326	7. 50E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/Q311A/N434Y
F327	6. 50E-08	S239K/M252Y/T256E/D270F/T307Q/Q311A/N434Y
F328	1. 90E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/M428I/N434Y
F329	1. 20E-08	S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/N434Y
F330	3. 60E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/L309E/N434Y
F331	3. 00E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/P387E/N434Y
F333	7. 40E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/L309E/Q311A/N434Y
F334	1. 90E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/N325G/M428I/N434Y
F335	1. 50E-08	S239K/M252Y/T256E/D270F/V308P/M428I/N434Y
F336	1. 40E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y
F337	5. 60E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/Q311A/M428I/N434Y
F338	7. 70E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/M428I/N434Y
F339	1. 90E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/L309E/M428I/N434Y
F343	3. 20E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/M428L/N434Y
F344	3. 00E-08	S239K/M252Y/V308P/M428L/N434Y
F349	1. 50E-07	S239K/M252Y/V308P/L309P/M428L/N434Y

【0502】 表 28-8 係接續表 28-7

【表 28-8】

F350	1. 70E-07	S239K/M252Y/V308P/L309R/M428L/N434Y
F352	6. 00E-07	S239K/M252Y/L309P/M428L/N434Y
F353	1. 10E-06	S239K/M252Y/L309R/M428L/N434Y
F354	2. 80E-08	S239K/M252Y/T307Q/V308P/M428L/N434Y
F356	3. 40E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/L309E/P387E/N434Y
F357	1. 60E-08	S239K/M252Y/T256E/D270F/V308P/N325G/M428I/N434Y
F358	1. 00E-07	S239K/M252Y/T307Q/N434Y
F359	4. 20E-07	P257V/T307Q/M428I/N434Y
F360	1. 30E-06	P257V/T307Q/M428V/N434Y
F362	5. 40E-08	P257V/T307Q/N325G/M428L/N434Y
F363	4. 10E-08	P257V/T307Q/Q311A/M428L/N434Y
F364	3. 50E-08	P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428L/N434Y
F365	5. 10E-08	P257V/V305A/T307Q/M428L/N434Y
F367	1. 50E-08	S239K/M252Y/E258H/D270F/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F368	2. 00E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/N325G/E382A/M428I/N434Y
F369	7. 50E-08	M252Y/P257V/T307Q/M428I/N434Y
F372	1. 30E-08	S239K/M252W/V308P/M428Y/N434Y
F373	1. 10E-08	S239K/M252W/V308P/Q311A/M428Y/N434Y
F374	1. 20E-08	S239K/M252W/T256E/V308P/M428Y/N434Y
F375	5. 50E-09	S239K/M252W/N286E/V308P/M428Y/N434Y
F376	9. 60E-09	S239K/M252Y/T256E/D270F/N286E/V308P/N434Y
F377	1. 30E-07	S239K/M252W/T307P/M428Y/N434Y
F379	9. 00E-09	S239K/M252W/T256E/V308P/Q311A/M428Y/N434Y
F380	5. 60E-09	S239K/M252W/T256E/N286E/V308P/M428Y/N434Y
F381	1. 10E-07	P257V/T307A/Q311A/M428L/N434Y
F382	8. 70E-08	P257V/V305A/T307A/M428L/N434Y
F386	3. 20E-08	M252Y/V308P/L309E/N434Y
F387	1. 50E-07	M252Y/V308P/L309D/N434Y
F388	7. 00E-08	M252Y/V308P/L309A/N434Y
F389	1. 70E-08	M252W/V308P/L309E/M428Y/N434Y
F390	6. 80E-08	M252W/V308P/L309D/M428Y/N434Y
F391	3. 60E-08	M252W/V308P/L309A/M428Y/N434Y
F392	6. 90E-09	S239K/M252Y/N286E/V308P/M428I/N434Y
F393	1. 20E-08	S239K/M252Y/N286E/V308P/N434Y
F394	5. 30E-08	S239K/M252Y/T307Q/Q311A/M428I/N434Y
F395	2. 40E-08	S239K/M252Y/T256E/V308P/N434Y
F396	2. 00E-08	S239K/M252Y/D270F/N286E/T307Q/Q311A/M428I/N434Y
F397	4. 50E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/Q311A/P387E/M428I/N434Y
F398	4. 40E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y
F399	6. 50E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/T307Q/V308P/M428I/N434Y
F400	6. 10E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/Q311A/M428I/N434Y

【0503】 表 28-9 係接續表 28-8

【表 28-9】

F401	6. 90E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/P387E/M428I/N434Y
F402	2. 30E-08	P257V/T307Q/M428L/N434W
F403	5. 10E-08	P257V/T307A/M428L/N434W
F404	9. 40E-08	P257A/T307Q/L309P/M428L/N434Y
F405	1. 70E-07	P257V/T307Q/L309P/M428L/N434Y
F406	1. 50E-07	P257A/T307Q/L309R/M428L/N434Y
F407	1. 60E-07	P257V/T307Q/L309R/M428L/N434Y
F408	2. 50E-07	P257V/N286E/M428L/N434Y
F409	2. 00E-07	P257V/P387E/M428L/N434Y
F410	2. 20E-07	P257V/T307H/M428L/N434Y
F411	1. 30E-07	P257V/T307N/M428L/N434Y
F412	8. 80E-08	P257V/T307G/M428L/N434Y
F413	1. 20E-07	P257V/T307P/M428L/N434Y
F414	1. 10E-07	P257V/T307S/M428L/N434Y
F415	5. 60E-08	P257V/N286E/T307A/M428L/N434Y
F416	9. 40E-08	P257V/T307A/P387E/M428L/N434Y
F418	6. 20E-07	S239K/M252Y/T307P/N325G/M428Y/N434Y
F419	1. 60E-07	M252Y/T307A/Q311H/K360H/N434Y
F420	1. 50E-07	M252Y/T307A/Q311H/P387E/N434Y
F421	1. 30E-07	M252Y/T307A/Q311H/M428A/N434Y
F422	1. 80E-07	M252Y/T307A/Q311H/E382A/N434Y
F423	8. 40E-08	M252Y/T307W/Q311H/N434Y
F424	9. 40E-08	S239K/P257A/V308P/M428L/N434Y
F425	8. 00E-08	P257A/V308P/L309E/M428L/N434Y
F426	8. 40E-08	P257V/T307Q/N434Y
F427	1. 10E-07	M252Y/P257V/T307Q/M428V/N434Y
F428	8. 00E-08	M252Y/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F429	3. 70E-08	M252Y/P257V/T307Q/N434Y
F430	8. 10E-08	M252Y/P257V/T307Q/M428Y/N434Y
F431	6. 50E-08	M252Y/P257V/T307Q/M428F/N434Y
F432	9. 20E-07	P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428V/N434Y
F433	6. 00E-08	P257V/T307Q/Q311A/N325G/N434Y
F434	2. 00E-08	P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428Y/N434Y
F435	2. 50E-08	P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428F/N434Y
F436	2. 50E-07	P257A/T307Q/M428V/N434Y
F437	5. 70E-08	P257A/T307Q/N434Y
F438	3. 60E-08	P257A/T307Q/M428Y/N434Y
F439	4. 00E-08	P257A/T307Q/M428F/N434Y
F440	1. 50E-08	P257V/N286E/T307Q/Q311A/N325G/M428L/N434Y
F441	1. 80E-07	P257A/Q311A/M428L/N434Y
F442	2. 00E-07	P257A/Q311H/M428L/N434Y
F443	5. 50E-08	P257A/T307Q/Q311A/M428L/N434Y

【0504】 表 28-10 係接續表 28-9

【表 28-10】

F444	1. 40E-07	P257A/T307A/Q311A/M428L/N434Y
F445	6. 20E-08	P257A/T307Q/Q311H/M428L/N434Y
F446	1. 10E-07	P257A/T307A/Q311H/M428L/N434Y
F447	1. 40E-08	P257A/N286E/T307Q/M428L/N434Y
F448	5. 30E-08	P257A/N286E/T307A/M428L/N434Y
F449	5. 70E-07	S239K/M252Y/D270F/T307P/N325G/M428Y/N434Y
F450	5. 20E-07	S239K/M252Y/T307P/L309E/N325G/M428Y/N434Y
F451	1. 00E-07	P257S/T307A/M428L/N434Y
F452	1. 40E-07	P257M/T307A/M428L/N434Y
F453	7. 80E-08	P257N/T307A/M428L/N434Y
F454	9. 60E-08	P257I/T307A/M428L/N434Y
F455	2. 70E-08	P257V/T307Q/M428Y/N434Y
F456	3. 40E-08	P257V/T307Q/M428F/N434Y
F457	4. 00E-08	S239K/P257V/V308P/M428L/N434Y
F458	1. 50E-08	P257V/T307Q/V308P/N325G/M428L/N434Y
F459	1. 30E-08	P257V/T307Q/V308P/Q311A/N325G/M428L/N434Y
F460	4. 70E-08	P257V/T307A/V308P/N325G/M428L/N434Y
F462	8. 50E-08	P257A/V308P/N325G/M428L/N434Y
F463	1. 30E-07	P257A/T307A/V308P/M428L/N434Y
F464	5. 50E-08	P257A/T307Q/V308P/M428L/N434Y
F465	2. 10E-08	P257V/N286E/T307Q/N325G/M428L/N434Y
F466	3. 50E-07	T256E/P257V/N434Y
F467	5. 70E-07	T256E/P257T/N434Y
F468	5. 70E-08	S239K/P257T/V308P/M428L/N434Y
F469	5. 60E-08	P257T/V308P/N325G/M428L/N434Y
F470	5. 40E-08	T256E/P257T/V308P/N325G/M428L/N434Y
F471	6. 60E-08	P257T/V308P/N325G/E382A/M428L/N434Y
F472	5. 40E-08	P257T/V308P/N325G/P387E/M428L/N434Y
F473	4. 50E-07	P257T/V308P/L309P/N325G/M428L/N434Y
F474	3. 50E-07	P257T/V308P/L309R/N325G/M428L/N434Y
F475	4. 30E-08	T256E/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F476	5. 50E-08	P257V/T307Q/E382A/M428L/N434Y
F477	4. 30E-08	P257V/T307Q/P387E/M428L/N434Y
F480	3. 90E-08	P257L/V308P/N434Y
F481	5. 60E-08	P257T/T307Q/N434Y
F482	7. 00E-08	P257V/T307Q/N325G/N434Y
F483	5. 70E-08	P257V/T307Q/Q311A/N434Y
F484	6. 20E-08	P257V/V305A/T307Q/N434Y
F485	9. 70E-08	P257V/N286E/T307A/N434Y
F486	3. 40E-07	P257V/T307Q/L309R/Q311H/M428L/N434Y
F488	3. 50E-08	P257V/V308P/N325G/M428L/N434Y
F490	7. 50E-08	S239K/P257V/V308P/Q311H/M428L/N434Y

【0505】 表 28-11 係接續表 28-10

【表 28-11】

F492	9. 80E-08	P257V/V305A/T307A/N325G/M428L/N434Y
F493	4. 90E-07	S239K/D270F/T307P/N325G/M428Y/N434Y
F497	3. 10E-06	P257T/T307A/M428V/N434Y
F498	1. 30E-06	P257A/M428V/N434Y
F499	5. 20E-07	P257A/T307A/M428V/N434Y
F500	4. 30E-08	P257S/T307Q/M428L/N434Y
F506	1. 90E-07	P257V/N297A/T307Q/M428L/N434Y
F507	5. 10E-08	P257V/N286A/T307Q/M428L/N434Y
F508	1. 10E-07	P257V/T307Q/N315A/M428L/N434Y
F509	5. 80E-08	P257V/T307Q/N384A/M428L/N434Y
F510	5. 30E-08	P257V/T307Q/N389A/M428L/N434Y
F511	4. 20E-07	P257V/N434Y
F512	5. 80E-07	P257T/N434Y
F517	3. 10E-07	P257V/N286E/N434Y
F518	4. 20E-07	P257T/N286E/N434Y
F519	2. 60E-08	P257V/N286E/T307Q/N434Y
F521	1. 10E-08	P257V/N286E/T307Q/M428Y/N434Y
F523	2. 60E-08	P257V/V305A/T307Q/M428Y/N434Y
F526	1. 90E-08	P257T/T307Q/M428Y/N434Y
F527	9. 40E-09	P257V/T307Q/V308P/N325G/M428Y/N434Y
F529	2. 50E-08	P257T/T307Q/M428F/N434Y
F533	1. 20E-08	P257A/N286E/T307Q/M428F/N434Y
F534	1. 20E-08	P257A/N286E/T307Q/M428Y/N434Y
F535	3. 90E-08	T250A/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F538	9. 90E-08	T250F/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F541	6. 00E-08	T250I/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F544	3. 10E-08	T250M/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F549	5. 40E-08	T250S/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F550	5. 90E-08	T250V/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F551	1. 20E-07	T250W/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F552	1. 10E-07	T250Y/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F553	1. 70E-07	M252Y/Q311A/N434Y
F554	2. 80E-08	S239K/M252Y/S254T/V308P/N434Y
F556	1. 50E-06	M252Y/T307Q/Q311A
F559	8. 00E-08	M252Y/S254T/N286E/N434Y
F560	2. 80E-08	M252Y/S254T/V308P/N434Y
F561	1. 40E-07	M252Y/S254T/T307A/N434Y
F562	8. 30E-08	M252Y/S254T/T307Q/N434Y
F563	1. 30E-07	M252Y/S254T/Q311A/N434Y
F564	1. 90E-07	M252Y/S254T/Q311H/N434Y
F565	9. 20E-08	M252Y/S254T/T307A/Q311A/N434Y
F566	6. 10E-08	M252Y/S254T/T307Q/Q311A/N434Y

【0506】 表 28-12 係接續表 28-11

【表 28-12】

F567	2. 20E-07	M252Y/S254T/M428I/N434Y
F568	1. 10E-07	M252Y/T256E/T307A/Q311H/N434Y
F569	2. 00E-07	M252Y/T256Q/T307A/Q311H/N434Y
F570	1. 30E-07	M252Y/S254T/T307A/Q311H/N434Y
F571	8. 10E-08	M252Y/N286E/T307A/Q311H/N434Y
F572	1. 00E-07	M252Y/T307A/Q311H/M428I/N434Y
F576	1. 60E-06	M252Y/T256E/T307Q/Q311H
F577	1. 30E-06	M252Y/N286E/T307A/Q311A
F578	5. 70E-07	M252Y/N286E/T307Q/Q311A
F580	8. 60E-07	M252Y/N286E/T307Q/Q311H
F581	7. 20E-08	M252Y/T256E/N286E/N434Y
F582	7. 50E-07	S239K/M252Y/V308P
F583	7. 80E-07	S239K/M252Y/V308P/E382A
F584	6. 30E-07	S239K/M252Y/T256E/V308P
F585	2. 90E-07	S239K/M252Y/N286E/V308P
F586	1. 40E-07	S239K/M252Y/N286E/V308P/M428I
F587	1. 90E-07	M252Y/N286E/M428L/N434Y
F592	2. 00E-07	M252Y/S254T/E382A/N434Y
F593	3. 10E-08	S239K/M252Y/S254T/V308P/M428I/N434Y
F594	1. 60E-08	S239K/M252Y/T256E/V308P/M428I/N434Y
F595	1. 80E-07	S239K/M252Y/M428I/N434Y
F596	4. 00E-07	M252Y/D312A/E382A/M428Y/N434Y
F597	2. 20E-07	M252Y/E382A/P387E/N434Y
F598	1. 40E-07	M252Y/D312A/P387E/N434Y
F599	5. 20E-07	M252Y/P387E/M428Y/N434Y
F600	2. 80E-07	M252Y/T256Q/E382A/N434Y
F601	9. 60E-09	M252Y/N286E/V308P/N434Y
F608		G236A/S239D/I332E
F611	2. 80E-07	M252Y/V305T/T307P/V308I/L309A/N434Y
F612	3. 60E-07	M252Y/T307P/V308I/L309A/N434Y
F613		S239D/A330L/I332E
F616		S239D/K326D/L328Y
F617	7. 40E-07	S239K/N434W
F618	6. 40E-07	S239K/V308F/N434Y
F619	3. 10E-07	S239K/M252Y/N434Y
F620	2. 10E-07	S239K/M252Y/S254T/N434Y
F621	1. 50E-07	S239K/M252Y/T307A/Q311H/N434Y
F622	3. 50E-07	S239K/M252Y/T256Q/N434Y
F623	1. 80E-07	S239K/M252W/N434W
F624	1. 40E-08	S239K/P257A/N286E/T307Q/M428L/N434Y
F625	7. 60E-08	S239K/P257A/T307Q/M428L/N434Y
F626	1. 30E-06	V308P

【0507】 表 28-13 係接續表 28-12

【表 28-13】

F629	3. 90E-08	M252Y/V279L/V308P/N434Y
F630	3. 70E-08	S239K/M252Y/V279L/V308P/N434Y
F633	2. 40E-08	M252Y/V282D/V308P/N434Y
F634	3. 20E-08	S239K/M252Y/V282D/V308P/N434Y
F635	4. 50E-08	M252Y/V284K/V308P/N434Y
F636	4. 80E-08	S239K/M252Y/V284K/V308P/N434Y
F637	1. 50E-07	M252Y/K288S/V308P/N434Y
F638	1. 40E-07	S239K/M252Y/K288S/V308P/N434Y
F639	2. 70E-08	M252Y/V308P/G385R/N434Y
F640	3. 60E-08	S239K/M252Y/V308P/G385R/N434Y
F641	3. 00E-08	M252Y/V308P/Q386K/N434Y
F642	3. 00E-08	S239K/M252Y/V308P/Q386K/N434Y
F643	3. 20E-08	L235G/G236R/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F644	3. 00E-08	G236R/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F645	3. 30E-08	S239K/M252Y/V308P/L328R/N434Y
F646	3. 80E-08	S239K/M252Y/N297A/V308P/N434Y
F647	2. 90E-08	P238D/M252Y/V308P/N434Y
F648		P238D
F649	1. 20E-07	S239K/M252Y/N286E/N434Y
F650	1. 70E-07	S239K/M252Y/T256E/N434Y
F651	1. 80E-07	S239K/M252Y/Q311A/N434Y
F652	2. 40E-07	P238D/M252Y/N434Y
F654	3. 20E-08	L235K/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F655	3. 40E-08	L235R/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F656	3. 30E-08	G237K/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F657	3. 20E-08	G237R/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F658	3. 20E-08	P238K/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F659	3. 00E-08	P238R/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F660	3. 10E-08	S239K/M252Y/V308P/P329K/N434Y
F661	3. 40E-08	S239K/M252Y/V308P/P329R/N434Y
F663	6. 40E-09	S239K/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F664	3. 90E-08	M252Y/N286A/V308P/N434Y
F665	2. 00E-08	M252Y/N286D/V308P/N434Y
F666	2. 10E-08	M252Y/N286F/V308P/N434Y
F667	3. 00E-08	M252Y/N286G/V308P/N434Y
F668	4. 00E-08	M252Y/N286H/V308P/N434Y
F669	3. 50E-08	M252Y/N286I/V308P/N434Y
F670	2. 10E-07	M252Y/N286K/V308P/N434Y
F671	2. 20E-08	M252Y/N286L/V308P/N434Y
F672	2. 40E-08	M252Y/N286M/V308P/N434Y
F673	2. 30E-08	M252Y/N286P/V308P/N434Y
F674	3. 20E-08	M252Y/N286Q/V308P/N434Y

【0508】 表 28-14 係接續表 28-13

【表 28-14】

F675	5. 10E-08	M252Y/N286R/V308P/N434Y
F676	3. 20E-08	M252Y/N286S/V308P/N434Y
F677	4. 70E-08	M252Y/N286T/V308P/N434Y
F678	3. 30E-08	M252Y/N286V/V308P/N434Y
F679	1. 70E-08	M252Y/N286W/V308P/N434Y
F680	1. 50E-08	M252Y/N286Y/V308P/N434Y
F681	4. 90E-08	M252Y/K288A/V308P/N434Y
F682	8. 20E-08	M252Y/K288D/V308P/N434Y
F683	5. 00E-08	M252Y/K288E/V308P/N434Y
F684	5. 10E-08	M252Y/K288F/V308P/N434Y
F685	5. 30E-08	M252Y/K288G/V308P/N434Y
F686	4. 60E-08	M252Y/K288H/V308P/N434Y
F687	4. 90E-08	M252Y/K288I/V308P/N434Y
F688	2. 80E-08	M252Y/K288L/V308P/N434Y
F689	4. 10E-08	M252Y/K288M/V308P/N434Y
F690	1. 00E-07	M252Y/K288N/V308P/N434Y
F691	3. 20E-07	M252Y/K288P/V308P/N434Y
F692	3. 90E-08	M252Y/K288Q/V308P/N434Y
F693	3. 60E-08	M252Y/K288R/V308P/N434Y
F694	4. 70E-08	M252Y/K288V/V308P/N434Y
F695	4. 00E-08	M252Y/K288W/V308P/N434Y
F696	4. 40E-08	M252Y/K288Y/V308P/N434Y
F697	3. 10E-08	S239K/M252Y/V308P/N325G/N434Y
F698	2. 20E-08	M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y
F699	2. 30E-08	S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y
F700	5. 20E-08	M252Y/V308P/L328E/N434Y
F705	7. 10E-09	M252Y/N286E/V308P/M428I/N434Y
F706	1. 80E-08	M252Y/N286E/T307Q/Q311A/M428I/N434Y
F707	5. 90E-09	M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F708	4. 10E-09	M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y
F709	2. 00E-08	S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/M428I/N434Y
F710	1. 50E-08	P238D/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/M428I/N434Y
F711	6. 50E-08	S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F712	6. 00E-08	P238D/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F713	2. 00E-08	P238D/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y
F714	2. 30E-07	P238D/M252Y/N325S/N434Y
F715	2. 30E-07	P238D/M252Y/N325M/N434Y
F716	2. 70E-07	P238D/M252Y/N325L/N434Y
F717	2. 60E-07	P238D/M252Y/N325I/N434Y
F718	2. 80E-07	P238D/M252Y/Q295M/N434Y
F719	7. 40E-08	P238D/M252Y/N325G/N434Y
F720	2. 40E-08	M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y

【0509】 表 28-15 係接續表 28-14

【表 28-15】

F721	1. 50E-08	M252Y/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y
F722	2. 70E-07	P238D/M252Y/A327G/N434Y
F723	2. 80E-07	P238D/M252Y/L328D/N434Y
F724	2. 50E-07	P238D/M252Y/L328E/N434Y
F725	4. 20E-08	L235K/G237R/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F726	3. 70E-08	L235K/P238K/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F729	9. 20E-07	T307A/Q311A/N434Y
F730	6. 00E-07	T307Q/Q311A/N434Y
F731	8. 50E-07	T307A/Q311H/N434Y
F732	6. 80E-07	T307Q/Q311H/N434Y
F733	3. 20E-07	M252Y/L328E/N434Y
F734	3. 10E-07	G236D/M252Y/L328E/N434Y
F736	3. 10E-07	M252Y/S267M/L328E/N434Y
F737	3. 10E-07	M252Y/S267L/L328E/N434Y
F738	3. 50E-07	P238D/M252Y/T307P/N434Y
F739	2. 20E-07	M252Y/T307P/Q311A/N434Y
F740	2. 90E-07	M252Y/T307P/Q311H/N434Y
F741	3. 10E-07	P238D/T250A/M252Y/N434Y
F744	9. 90E-07	P238D/T250F/M252Y/N434Y
F745	6. 60E-07	P238D/T250G/M252Y/N434Y
F746	6. 00E-07	P238D/T250H/M252Y/N434Y
F747	2. 80E-07	P238D/T250I/M252Y/N434Y
F749	5. 10E-07	P238D/T250L/M252Y/N434Y
F750	3. 00E-07	P238D/T250M/M252Y/N434Y
F751	5. 30E-07	P238D/T250N/M252Y/N434Y
F753	1. 80E-07	P238D/T250Q/M252Y/N434Y
F755	3. 50E-07	P238D/T250S/M252Y/N434Y
F756	3. 70E-07	P238D/T250V/M252Y/N434Y
F757	1. 20E-06	P238D/T250W/M252Y/N434Y
F758	1. 40E-06	P238D/T250Y/M252Y/N434Y
F759		L235K/S239K
F760		L235R/S239K
F761	1. 10E-06	P238D/N434Y
F762	3. 60E-08	L235K/S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y
F763	3. 50E-08	L235R/S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y
F764	6. 30E-07	P238D/T307Q/Q311A/N434Y
F765	8. 50E-08	P238D/M252Y/T307Q/L309E/Q311A/N434Y
F766	6. 00E-07	T307A/L309E/Q311A/N434Y
F767	4. 30E-07	T307Q/L309E/Q311A/N434Y
F768	6. 40E-07	T307A/L309E/Q311H/N434Y
F769	4. 60E-07	T307Q/L309E/Q311H/N434Y
F770	3. 00E-07	M252Y/T256A/N434Y

【0510】 表 28-16 係接續表 28-15

【表 28-16】

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

【0511】 表 28-17 係接續表 28-16

【表 28-17】

F815	5. 50E-07	M252Y/N434Y/T437R
F816	3. 60E-07	P238D/T250V/M252Y/T307P/N434Y
F817	9. 80E-08	P238D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F819	1. 40E-07	P238D/M252Y/N286E/N434Y
F820	3. 40E-07	L235K/S239K/M252Y/N434Y
F821	3. 10E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y
F822	1. 10E-06	P238D/T250Y/M252Y/W313Y/N434Y
F823	1. 10E-06	P238D/T250Y/M252Y/W313F/N434Y
F828	2. 50E-06	P238D/T250V/M252Y/I253V/N434Y
F831	1. 60E-06	P238D/T250V/M252Y/R255A/N434Y
F832	2. 60E-06	P238D/T250V/M252Y/R255D/N434Y
F833	8. 00E-07	P238D/T250V/M252Y/R255E/N434Y
F834	8. 10E-07	P238D/T250V/M252Y/R255F/N434Y
F836	5. 00E-07	P238D/T250V/M252Y/R255H/N434Y
F837	5. 60E-07	P238D/T250V/M252Y/R255I/N434Y
F838	4. 30E-07	P238D/T250V/M252Y/R255K/N434Y
F839	3. 40E-07	P238D/T250V/M252Y/R255L/N434Y
F840	4. 20E-07	P238D/T250V/M252Y/R255M/N434Y
F841	1. 10E-06	P238D/T250V/M252Y/R255N/N434Y
F843	6. 60E-07	P238D/T250V/M252Y/R255Q/N434Y
F844	1. 30E-06	P238D/T250V/M252Y/R255S/N434Y
F847	3. 40E-07	P238D/T250V/M252Y/R255W/N434Y
F848	8. 30E-07	P238D/T250V/M252Y/R255Y/N434Y
F849	3. 30E-07	M252Y/D280A/N434Y
F850	2. 90E-07	M252Y/D280E/N434Y
F852	3. 30E-07	M252Y/D280G/N434Y
F853	3. 20E-07	M252Y/D280H/N434Y
F855	3. 20E-07	M252Y/D280K/N434Y
F858	3. 20E-07	M252Y/D280N/N434Y
F860	3. 30E-07	M252Y/D280Q/N434Y
F861	3. 20E-07	M252Y/D280R/N434Y
F862	3. 00E-07	M252Y/D280S/N434Y
F863	2. 70E-07	M252Y/D280T/N434Y
F867	2. 80E-07	M252Y/N384A/N389A/N434Y
F868	2. 00E-08	G236A/S239D/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y
F869		G236A/S239D
F870	7. 30E-08	L235K/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F871	7. 10E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F872	1. 30E-07	L235K/S239K/M252Y/N286E/N434Y
F873	1. 20E-07	L235R/S239K/M252Y/N286E/N434Y
F875	4. 80E-07	M252Y/N434Y/Y436A
F877	8. 30E-07	M252Y/N434Y/Y436E

【0512】 表 28-18 係接續表 28-17

【表 28-18】

F878	1. 90E-07	M252Y/N434Y/Y436F
F879	9. 20E-07	M252Y/N434Y/Y436G
F880	3. 90E-07	M252Y/N434Y/Y436H
F881	3. 10E-07	M252Y/N434Y/Y436K
F882	1. 30E-07	M252Y/N434Y/Y436L
F883	2. 10E-07	M252Y/N434Y/Y436M
F884	4. 00E-07	M252Y/N434Y/Y436N
F888	4. 80E-07	M252Y/N434Y/Y436S
F889	2. 20E-07	M252Y/N434Y/Y436T
F890	1. 10E-07	M252Y/N434Y/Y436V
F891	1. 70E-07	M252Y/N434Y/Y436W
F892	7. 10E-08	M252Y/S254T/N434Y/Y436I
F893	9. 80E-08	L235K/S239K/M252Y/N434Y/Y436I
F894	9. 20E-08	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436I
F895	2. 10E-08	L235K/S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N315E/N434Y
F896	2. 00E-08	L235R/S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N315E/N434Y
F897	9. 70E-08	M252Y/N315D/N384A/N389A/N434Y
F898	1. 70E-07	M252Y/N315E/N384A/N389A/N434Y
F899	1. 10E-07	M252Y/N315D/G316A/N434Y
F900	1. 70E-07	M252Y/N315D/G316D/N434Y
F901	1. 30E-07	M252Y/N315D/G316E/N434Y
F902	2. 20E-07	M252Y/N315D/G316F/N434Y
F903	2. 30E-07	M252Y/N315D/G316H/N434Y
F904	1. 00E-07	M252Y/N315D/G316I/N434Y
F905	1. 30E-07	M252Y/N315D/G316K/N434Y
F906	1. 50E-07	M252Y/N315D/G316L/N434Y
F907	1. 30E-07	M252Y/N315D/G316M/N434Y
F908	1. 50E-07	M252Y/N315D/G316N/N434Y
F909	1. 30E-07	M252Y/N315D/G316P/N434Y
F910	1. 40E-07	M252Y/N315D/G316Q/N434Y
F911	1. 30E-07	M252Y/N315D/G316R/N434Y
F912	1. 20E-07	M252Y/N315D/G316S/N434Y
F913	1. 10E-07	M252Y/N315D/G316T/N434Y
F914	1. 50E-07	M252Y/N315D/G316V/N434Y
F915	2. 30E-07	M252Y/N315D/G316W/N434Y
F917	2. 50E-07	M252Y/N286S/N434Y
F918	2. 80E-07	M252Y/D280E/N384A/N389A/N434Y
F919	3. 30E-07	M252Y/D280G/N384A/N389A/N434Y
F920	2. 50E-07	M252Y/N286S/N384A/N389A/N434Y
F921	1. 20E-07	M252Y/N286E/N384A/N389A/N434Y
F922	5. 90E-08	L235K/S239K/M252Y/N286E/N434Y/Y436I
F923	6. 00E-08	L235R/S239K/M252Y/N286E/N434Y/Y436I

【0513】 表 28-19 係接續表 28-18

【表 28-19】

F924	3. 40E-08	L235K/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436I
F925	3. 20E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436I
F926	1. 10E-07	L235K/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436I
F927	1. 00E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436I
F928	2. 90E-08	M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436I
F929	2. 90E-08	M252Y/S254T/T307Q/Q311A/N434Y/Y436I
F930	1. 40E-07	P238D/T250V/M252Y/N286E/N434Y
F931	1. 20E-07	P238D/T250V/M252Y/N434Y/Y436I
F932	3. 20E-07	T250V/M252Y/N434Y
F933	3. 00E-07	L234R/P238D/T250V/M252Y/N434Y
F934	3. 10E-07	G236K/P238D/T250V/M252Y/N434Y
F935	3. 20E-07	G237K/P238D/T250V/M252Y/N434Y
F936	3. 20E-07	G237R/P238D/T250V/M252Y/N434Y
F937	3. 10E-07	P238D/S239K/T250V/M252Y/N434Y
F938	1. 60E-07	L235K/S239K/M252Y/N434Y/Y436V
F939	1. 50E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V
F940	1. 50E-07	P238D/T250V/M252Y/N434Y/Y436V
F941	1. 20E-08	M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F942	4. 20E-08	L235K/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F943	4. 00E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F944	1. 70E-07	T250V/M252Y/N434Y/Y436V
F945	1. 70E-08	T250V/M252Y/V308P/N434Y/Y436V
F946	4. 30E-08	T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F947	1. 10E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F954	5. 30E-07	M252Y/N434Y/H435K/Y436V
F957	7. 70E-07	M252Y/N434Y/H435N/Y436V
F960	8. 00E-07	M252Y/N434Y/H435R/Y436V
F966	3. 10E-07	M252Y/S254A/N434Y
F970	2. 50E-06	M252Y/S254G/N434Y
F971	2. 60E-06	M252Y/S254H/N434Y
F972	2. 60E-07	M252Y/S254I/N434Y
F978	1. 30E-06	M252Y/S254Q/N434Y
F980	1. 80E-07	M252Y/S254V/N434Y
F987	4. 00E-08	P238D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F988	6. 90E-08	P238D/T250V/M252Y/N286E/N434Y/Y436V
F989	1. 40E-08	L235R/S239K/M252Y/V308P/N434Y/Y436V
F990	9. 40E-09	L235R/S239K/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F991	1. 30E-08	L235R/S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F992	5. 10E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/M428I/N434Y/Y436V
F993	3. 80E-08	M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F994	2. 80E-07	M252Y/N325G/N434Y
F995	2. 90E-07	L235R/P238D/S239K/M252Y/N434Y

【0514】 表 28-20 係接續表 28-19

【表 28-20】

F996	1. 30E-07	L235R/P238D/S239K/M252Y/N434Y/Y436V
F997	3. 80E-07	K248I/T250V/M252Y/N434Y/Y436V
F998	8. 50E-07	K248Y/T250V/M252Y/N434Y/Y436V
F999	2. 10E-07	T250V/M252Y/E258H/N434Y/Y436V
F1005		N325G
F1008	1. 70E-07	L235R/S239K/T250V/M252Y/N434Y/Y436V
F1009	1. 20E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1010	1. 90E-07	L235R/S239K/M252Y/T307A/Q311H/N434Y
F1011	4. 50E-08	T250V/M252Y/V308P/N434Y
F1012	4. 70E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/V308P/N434Y
F1013	3. 00E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F1014	3. 20E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F1015	2. 20E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F1016	3. 80E-09	T250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1017	4. 20E-09	L235R/S239K/T250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1018	3. 20E-09	L235R/S239K/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1019	3. 40E-07	P238D/T250V/M252Y/N325G/N434Y
F1020	8. 50E-08	P238D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N325G/N434Y
F1021	3. 30E-07	P238D/T250V/M252Y/N325A/N434Y
F1022		K326D/L328Y
F1023	4. 40E-08	S239D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F1024	4. 00E-08	T250V/M252Y/T307Q/Q311A/K326D/L328Y/N434Y/Y436V
F1025	3. 60E-08	S239D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/K326D/L328Y/N434Y/Y436V
F1026	8. 40E-08	M252Y/T307A/Q311H/N434Y/Y436V
F1027	8. 60E-08	L235R/S239K/M252Y/T307A/Q311H/N434Y/Y436V
F1028	4. 60E-08	G236A/S239D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F1029	5. 10E-08	T250V/M252Y/T307Q/Q311A/I332E/N434Y/Y436V
F1030		I332E
F1031	5. 30E-08	G236A/S239D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/I332E/N434Y/Y436V
F1032	4. 30E-08	P238D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N325G/N434Y/Y436V
F1033	1. 00E-06	P238D/N434W
F1034	1. 50E-08	L235K/S239K/M252Y/V308P/N434Y/Y436V
F1035	1. 00E-08	L235K/S239K/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1036	1. 40E-08	L235K/S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F1037	6. 10E-08	L235K/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/M428I/N434Y/Y436V
F1038	2. 80E-07	L235K/P238D/S239K/M252Y/N434Y
F1039	1. 30E-07	L235K/P238D/S239K/M252Y/N434Y/Y436V

【0515】 表 28-21 係接續表 28-20

【表 28-21】

F1040	2. 00E-07	L235K/S239K/T250V/M252Y/N434Y/Y436V
F1041	1. 40E-08	L235K/S239K/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1042	2. 00E-07	L235K/S239K/M252Y/T307A/Q311H/N434Y
F1043	5. 20E-08	L235K/S239K/T250V/M252Y/V308P/N434Y
F1044	3. 50E-08	L235K/S239K/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F1045	2. 50E-08	L235K/S239K/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F1046	4. 50E-09	L235K/S239K/T250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1047	3. 40E-09	L235K/S239K/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1048	9. 90E-08	L235K/S239K/M252Y/T307A/Q311H/N434Y/Y436V
F1050	3. 50E-09	T250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y/Y436V
F1051	3. 90E-09	L235R/S239K/T250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y/Y436V
F1052	3. 20E-09	L235R/S239K/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y/Y436V

【0516】 [參考例 13]使用人類 FcRn 基因轉殖小鼠系統 32 之穩定狀態注入模型進行各種 Fc 變異體抗體之體內試驗

將參考例 12 製作之 Fc 變異體，於使用人類 FcRn 基因轉殖小鼠系統 32 之穩定狀態注入模型，進行血漿中抗原消失能力相關之試驗。穩定狀態注入模型體內試驗，使用人類 FcRn 基因轉殖小鼠系統 32 替代系統 276，並投予單株抗小鼠 CD4 抗體 2 次(埋入注入泵浦之前、與投予抗體 14 日後)或 3 次(埋入注入泵浦前、與投予抗體 10 日後及 20 日後)，除此以外依實施例 1 記載實施。

【0517】 將從表 28-1 至 28-21 記載之 Fc 變異體選擇之以下記載之抗體 Fc 變異體，依參考例 3 記載之該技術領域之人士公知之方法表現並精製：

含 VH3-IgG1 與 VL3-CK 之 Fv4-IgG1；

含 VH3-IgG1-F11 與 VL3-CK 之 Fv4-IgG1-F11；

含 VH3-IgG1-F14 與 VL3-CK 之 Fv4-IgG1-F14 ;
 含 VH3-IgG1-F39 與 VL3-CK 之 Fv4-IgG1-F39 ;
 含 VH3-IgG1-F48 與 VL3-CK 之 Fv4-IgG1-F48 ;
 含 VH3-IgG1-F140 與 VL3-CK 之 Fv4-IgG1-F140 ;
 含 VH3-IgG1-F157 與 VL3-CK 之 Fv4-IgG1-F157 ;
 含 VH3-IgG1-F194 與 VL3-CK 之 Fv4-IgG1-F194 ;
 含 VH3-IgG1-F196 與 VL3-CK 之 Fv4-IgG1-F196 ;
 含 VH3-IgG1-F198 與 VL3-CK 之 Fv4-IgG1-F198 ;
 含 VH3-IgG1-F262 與 VL3-CK 之 Fv4-IgG1-F262 ;
 含 VH3-IgG1-F264 與 VL3-CK 之 Fv4-IgG1-F264 ;
 含 VH3-IgG1-F393 與 VL3-CK 之 Fv4-IgG1-F393 ;
 含 VH3-IgG1-F434 與 VL3-CK 之 Fv4-IgG1-F424 ; 及
 含 VH3-IgG1-F447 與 VL3-CK 之 Fv4-IgG1-F447 。

【0518】 該等抗體對於人類 FcRn 基因轉殖小鼠系統 32 以 1 mg/kg 之用量投予。

圖 49 顯示小鼠之血漿中 hsIL-6R 濃度變化。與 Fv4-IgG1 相比，pH7.0 對於人類 FcRn 之結合親和性增大之 Fc 變異體均顯示血漿中 hsIL-6R 濃度減少，故抗原從血漿之消失增大。抗原濃度減少之程度及持續，視 Fc 變異體間不同，但全部變異體一致比起 IgG1，血漿中 hsIL-6R 濃度減少。此顯示：藉由使於 pH7.0 對於人類 FcRn 之結合親和性增大，抗原從血漿之消失一般而言會增大。圖 50 顯示於小鼠之血漿中抗體濃度變化。抗體之藥物動態，於 Fc 變異體間不同。

【0519】 如參考例 9 記載，就每抗體 1 分子，從血漿消失

之抗原之量係於藉由投予於 pH7.0 對於人類 FcRn 之結合親和性增大之抗體 Fc 變異體以評價抗原消失效率時之重要要因。故，針對各抗體之 C 值(抗原/抗體莫耳比)之變化記載於圖 51。圖 52 顯示 pH7.0 對於人類 FcRn 之 Fc 變異體之結合親和性、與抗體投予 1 日後之 C 值(抗原/抗體莫耳比)之間的關係。此顯示:於該試驗中經試驗的所有抗體 Fc 變異體比起 Fv4-IgG1 具較小 C 值。本試驗中所試驗之全部 Fc 變異體，比起人類 FcRn，在 pH7.0 具有強於 KD 3.0 μ M 之結合親和性，故此等比起天然型人類 IgG1 會達成較高抗原消失效率。此點與參考例 9 獲得之結果一致 (圖 42)。

【0520】 圖 53 顯示本試驗所試驗之 Fc 變異體中，具 F11、F39、F48、及 F264 之 Fc 變異體之抗體顯示與 IgG1 類似藥物動態。該試驗係使用人類 FcRn 基因轉殖小鼠進行，因此可預料該等 Fc 變異體於人類也會具有與 IgG1 類似之長半衰期。圖 54 顯示投予具有與天然型人類 IgG1 為類似藥物動態之抗體 (F11、F39、F48、及 F264)之小鼠，其血漿中 hsIL-6R 濃度變化。該等變異體比起 IgG1，使血漿中 hsIL-6R 濃度減少約 10 倍。故，該等抗體，使 hsIL-6R 濃度比起基線 hsIL-6R 濃度(無抗體之濃度)減少。因此，該等抗體，能使抗原從血漿長期消失，據認為能使用對於慢性疾病之抗體治療有利的長投予間隔。

【0521】 圖 55 及 56 各代表針對 IgG1、及 Fc 變異體 F157、F196、及 F262 之血漿中抗體濃度及血漿中 hsIL-6R 濃度變化。令人意外地，F157 及 F262 之抗體藥物動態比起天然型 IgG1，

顯示顯著較快從血漿之廓清，但 F157 及 F262 顯示從血漿大幅且持續的 hsIL-6R 消失。具體而言，於 F157 之血漿中 hsIL-6R 濃度，從第 1 日至 28 日（不含第 14 日）為檢測極限(1.56 ng/ml)下，於 F262 之血漿中 hsIL-6R 濃度，從第 14 日至 28 日在檢測極限(1.56 ng/ml)下。另一方面，關於與 F157 相比之抗體之廓清較慢的 F196，抗原濃度於第 14 日開始增加，於第 28 日回到基線。本試驗所試驗之 Fc 變異體之中，F157 及 F262 為血漿中 hsIL-6R 濃度在第 28 日之時點減少到低於 1.56 ng/ml 的唯一 Fc 變異體。

【0522】 抗體比起天然型人類 IgG1，非常快速從血漿消失，故 F157 及 F262 獲得如此的持續的長期效果，係從抗體之藥物動態料想之外。尤其，於 F157 之血漿中抗體濃度，於第 21 日未能檢測到。儘管如此，血漿中 hsIL-6R 濃度，於第 21 日及 28 日之時點，持續減少到低於檢測極限之 1.56 ng/ml 為低之水平。本發明不拘於特定理論，但該料想外之效果，據認為是由於抗體以 FcRn 結合型存在於血管內皮細胞表面存在的原故。該等抗體在血漿中顯示低濃度，但該等抗體也會以 FcRn 結合型(無法以血漿中抗體濃度的形式測定)存在於血管隔間。該等 FcRn 結合抗體也會與血漿中之抗原結合，並且抗原/抗體複合體藉由 FcRn 攝入後，抗原於核內體內游離並由溶體分解，但是抗體會以 FcRn 結合型的形式回到細胞表面並再循環。如此，該等 FcRn 結合抗體貢獻於抗原之消失。藉此，可說明抗體濃度在血漿中降低後，該等抗體還能維持抗原消失能力的理由。

【產業上利用性】

【0523】 依照本發明，可提供促進利用抗原結合分子使抗原攝入細胞內之方法、增加 1 分子之抗原結合分子對於抗原之結合次數之方法、利用抗原結合分子之投予促進血漿中之抗原濃度之減少之方法、改善抗原結合分子之血漿中滯留性之方法。藉由促進利用抗原結合分子使抗原攝入細胞內，能促進由於抗原結合分子投予所致之抗原之血漿中之抗原濃度減少，同時可改善抗原結合分子之血漿中滯留性，能增加 1 分子之抗原結合分子對於抗原之結合次數，能於體內比起通常之抗原結合分子發揮更優異之效果。

【符號說明】

無。

序列表

<110> 中外製藥股份有限公司

<120> 重複結合複數個分子的抗原之抗原結合分子

<130> C1-A1009Y1-TW

<150> JP 2010-266121

<151> 2010-11-30

<150> JP 2011-217886

<151> 2011-09-30

<160> 113

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 449

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 1

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

Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20					25					30		

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

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Asp Pro Gly Gly Gly Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

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

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

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

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

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

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

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

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445

Pro

<210> 2

<211> 216

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 2

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Arg Ser Asn Met Gly Ala Gly
 20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Leu Leu Pro Gly Ala Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Leu Ile Ser His Asn Thr His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

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

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser His Asp Ser Ser
 85 90 95

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

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys
 210 215

<210> 3
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工合成的序列

<400> 3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Arg Asp Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Asp Ala Phe
 100 105 110

Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 115 120 125

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

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

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

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

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 195 200 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 210 215 220

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 225 230 235 240

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 245 250 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 260 265 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 290 295 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 325 330 335

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 340 345 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 355 360 365

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 385 390 395 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 405 410 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro
 450

<210> 4
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工合成的序列

<400> 4

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Thr Thr Asp Ile Asp Asp Asp
 20 25 30

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

Ser Glu Gly Asn Ile Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser
 50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Lys Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 5
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工合成的序列

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

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

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

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

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

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

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

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

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

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

<210> 6

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 7
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工合成的序列

<400> 7

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Arg Asp Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Asp Ala Phe
 100 105 110

Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 115 120 125

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

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

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

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

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 195 200 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 210 215 220

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 225 230 235 240

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 245 250 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 260 265 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 290 295 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 325 330 335

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 340 345 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 355 360 365

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 385 390 395 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 405 410 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Trp His Tyr Thr Gln Lys Ser
 435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro
 450

<210> 8

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 8

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Thr Thr Asp Ile Asp Asp Asp
 20 25 30

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

Ser Glu Gly Asn Ile Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser
 50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Lys Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 9
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工合成的序列

<400> 9

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Asp Pro Gly Gly Gly Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

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

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

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

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

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

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

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

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Trp His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445

Pro

<210> 10

<211> 216

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 10

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Arg Ser Asn Met Gly Ala Gly
 20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Leu Leu Pro Gly Ala Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Leu Ile Ser His Asn Thr His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

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

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser His Asp Ser Ser
 85 90 95

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

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys
 210 215

<210> 11

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

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

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

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

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

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

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

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

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

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

<210> 12

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 13
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工合成的序列

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

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

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

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

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

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

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

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

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

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

Lys

<210> 14

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 14

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 15

<211> 468

<212> PRT

<213> 人

<400> 15

Met Leu Ala Val Gly Cys Ala Leu Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ala Pro
 1 5 10 15

Gly Ala Ala Leu Ala Pro Arg Arg Cys Pro Ala Gln Glu Val Ala Arg
 20 25 30

Gly Val Leu Thr Ser Leu Pro Gly Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Pro
 35 40 45

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

Pro Ala Ala Gly Ser His Pro Ser Arg Trp Ala Gly Met Gly Arg Arg
 65 70 75 80

Leu Leu Leu Arg Ser Val Gln Leu His Asp Ser Gly Asn Tyr Ser Cys
 85 90 95

Tyr Arg Ala Gly Arg Pro Ala Gly Thr Val His Leu Leu Val Asp Val
 100 105 110

Pro Pro Glu Glu Pro Gln Leu Ser Cys Phe Arg Lys Ser Pro Leu Ser
 115 120 125

Asn Val Val Cys Glu Trp Gly Pro Arg Ser Thr Pro Ser Leu Thr Thr
 130 135 140

Lys Ala Val Leu Leu Val Arg Lys Phe Gln Asn Ser Pro Ala Glu Asp
 145 150 155 160

Phe Gln Glu Pro Cys Gln Tyr Ser Gln Glu Ser Gln Lys Phe Ser Cys
 165 170 175

Gln Leu Ala Val Pro Glu Gly Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Val Ser Met
 180 185 190

Cys Val Ala Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe Ser Lys Thr Gln Thr Phe
 195 200 205

Gln Gly Cys Gly Ile Leu Gln Pro Asp Pro Pro Ala Asn Ile Thr Val
 210 215 220

Thr Ala Val Ala Arg Asn Pro Arg Trp Leu Ser Val Thr Trp Gln Asp
 225 230 235 240

Pro His Ser Trp Asn Ser Ser Phe Tyr Arg Leu Arg Phe Glu Leu Arg
 245 250 255

Tyr Arg Ala Glu Arg Ser Lys Thr Phe Thr Thr Trp Met Val Lys Asp
 260 265 270

Leu Gln His His Cys Val Ile His Asp Ala Trp Ser Gly Leu Arg His
 275 280 285

Val Val Gln Leu Arg Ala Gln Glu Glu Phe Gly Gln Gly Glu Trp Ser
 290 295 300

Glu Trp Ser Pro Glu Ala Met Gly Thr Pro Trp Thr Glu Ser Arg Ser
 305 310 315 320

Pro Pro Ala Glu Asn Glu Val Ser Thr Pro Met Gln Ala Leu Thr Thr
325 330 335

Asn Lys Asp Asp Asp Asn Ile Leu Phe Arg Asp Ser Ala Asn Ala Thr
340 345 350

Ser Leu Pro Val Gln Asp Ser Ser Ser Val Pro Leu Pro Thr Phe Leu
355 360 365

Val Ala Gly Gly Ser Leu Ala Phe Gly Thr Leu Leu Cys Ile Ala Ile
370 375 380

Val Leu Arg Phe Lys Lys Thr Trp Lys Leu Arg Ala Leu Lys Glu Gly
385 390 395 400

Lys Thr Ser Met His Pro Pro Tyr Ser Leu Gly Gln Leu Val Pro Glu
405 410 415

Arg Pro Arg Pro Thr Pro Val Leu Val Pro Leu Ile Ser Pro Pro Val
420 425 430

Ser Pro Ser Ser Leu Gly Ser Asp Asn Thr Ser Ser His Asn Arg Pro
435 440 445

Asp Ala Arg Asp Pro Arg Ser Pro Tyr Asp Ile Ser Asn Thr Asp Tyr
450 455 460

Phe Phe Pro Arg
465

<210> 16
 <211> 1407
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 16

```

atgctggccg tcggctgcgc gctgctggct gccctgctgg ccgcgccggg agcggcgctg      60

gccccaaaggc gctgccctgc gcaggaggtg gcgagaggcg tgctgaccag tctgccagga      120

gacagcgtga ctctgacctg cccgggggta gagccggaag acaatgccac tgttacttgg      180

gtgctcagga agccggctgc aggctcccac ccagcagat gggctggcat gggaaggagg      240

ctgctgctga ggtcgggtgca gctccacgac tctggaaact attcatgcta ccgggccggc      300

cgcccagctg ggactgtgca ctgtctgggt gatgttcccc ccgaggagcc ccagctctcc      360

tgcttccgga agagccccct cagcaatgtt gtttgtgagt ggggtcctcg gagcacccca      420

tccctgacga caaaggctgt gctcttgggt aggaagtttc agaacagtcc ggccgaagac      480

ttccaggagc cgtgccagta ttcccaggag tcccagaagt tctcctgcca gttagcagtc      540

ccggaggggag acagctcttt ctacatagtg tccatgtgcg tcgccagtag tgtcgggagc      600

aagttcagca aaactcaaac ctttcagggt tgtggaatct tgcagcctga tccgcctgcc      660

aacatcacag tcactgccgt ggccagaaac ccccgctggc tcagtgtcac ctggcaagac      720

ccccactcct ggaactcatc ttcttacaga ctacggtttg agctcagata tcgggctgaa      780

cgggtcaaaga cattcacaac atggatggtc aaggacctcc agcatcactg tgtcatccac      840

gacgcctgga gcggcctgag gcacgtgggt cagcttcgtg ccaggagga gttcgggcaa      900

ggcgagtgga gcgagtggag cccggaggcc atgggcacgc ctggacaga atccaggagt      960

cctccagctg agaacgaggt gtccaccccc atgcaggcac ttactactaa taaagacgat     1020

```

gataatattc tcttcagaga ttctgcaaat gcgacaagcc tcccagtgca agattcttct 1080
 tcagtaccac tgcccacatt cctggttgct ggaggagacc tggccttcgg aacgctcctc 1140
 tgcattgcc a ttgttctgag gttcaagaag acgtggaagc tgcgggctct gaaggaaggc 1200
 aagacaagca tgcattccgc gtactctttg gggcagctgg tcccggagag gcctcgaccc 1260
 accccagtgc ttgttcctct catctcccca ccggtgtccc ccagcagcct ggggtctgac 1320
 aatacctcga gccacaaccg accagatgcc agggacccac ggagccctta tgacatcagc 1380
 aatacagact acttcttccc cagatag 1407

<210> .17

<211> 365

<212> PRT

<213> 人

<400> 17

Met Gly Val Pro Arg Pro Gln Pro Trp Ala Leu Gly Leu Leu Leu Phe
 1 5 10 15

Leu Leu Pro Gly Ser Leu Gly Ala Glu Ser His Leu Ser Leu Leu Tyr
 20 25 30

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

Val Ser Gly Trp Leu Gly Pro Gln Gln Tyr Leu Ser Tyr Asn Ser Leu
 50 55 60

Arg Gly Glu Ala Glu Pro Cys Gly Ala Trp Val Trp Glu Asn Gln Val

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

225	230	235	240
Ala Ala Gly Thr Gly Gln Gly Asp Phe Gly Pro Asn Ser Asp Gly Ser			
	245	250	255
Phe His Ala Ser Ser Ser Leu Thr Val Lys Ser Gly Asp Glu His His			
	260	265	270
Tyr Cys Cys Ile Val Gln His Ala Gly Leu Ala Gln Pro Leu Arg Val			
	275	280	285
Glu Leu Glu Ser Pro Ala Lys Ser Ser Val Leu Val Val Gly Ile Val			
	290	295	300
Ile Gly Val Leu Leu Leu Thr Ala Ala Ala Val Gly Gly Ala Leu Leu			
305	310	315	320
Trp Arg Arg Met Arg Ser Gly Leu Pro Ala Pro Trp Ile Ser Leu Arg			
	325	330	335
Gly Asp Asp Thr Gly Val Leu Leu Pro Thr Pro Gly Glu Ala Gln Asp			
	340	345	350
Ala Asp Leu Lys Asp Val Asn Val Ile Pro Ala Thr Ala			
	355	360	365

<210> 18
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 18

Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser
 1 5 10 15

Gly Leu Glu Ala Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg
 20 25 30

His Pro Ala Glu Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser
 35 40 45

Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu
 50 55 60

Arg Ile Glu Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp
 65 70 75 80

Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp
 85 90 95

Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile
 100 105 110

Val Lys Trp Asp Arg Asp Met
 115

<210> 19

<211> 447

<212> PRT

<213> 人

<400> 19

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

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

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

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

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

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

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

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

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

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

<210> 20

<211> 214

<212> PRT

<213> 人

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 21

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 21

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

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

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

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

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

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

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

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

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

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

<210> 22

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 22

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

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

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

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

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

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

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

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

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

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

<210> 23

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 23

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

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

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

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

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

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

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Phe Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

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

<210> 24

<211> 443

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 24

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 25

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 25

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Ala Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Thr Asp Ala
100 105 110

Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 26
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 26

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Phe Asp Ala Ser Asn Arg Ala Ala Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asp Lys Trp Val Thr
85 90 95

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

<210> 27
<211> 454
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 27

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Ala Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Thr Asp Ala
 100 105 110

Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115 120 125

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

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 195 200 205

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 210 215 220

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 225 230 235 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 245 250 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 260 265 270

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 325 330 335

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 385 390 395 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 405 410 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450

<210> 28

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 28

201730217

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 29

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

<223> 人工合成的序列

<400> 29

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Phe Asp Ala Ser Asn Arg Ala Ala Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asp Lys Trp Val Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Thr Val Glu Ile Arg Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 30
 <211> 454
 <212> .PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工合成的序列

<400> 30

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Ala Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Ala Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Thr Asp Ala
100 105 110

Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120 125

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

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
195 200 205

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
210 215 220

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 225 230 235 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 245 250 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 260 265 270

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 325 330 335

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385 390 395 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
405 410 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450

<210> 31
<211> 454
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 31

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ala Ala Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Thr Asp Ala
 100 105 110

Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115 120 125

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

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 195 200 205

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 210 215 220

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 225 230 235 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 245 250 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 260 265 270

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 325 330 335

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 385 390 395 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 405 410 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450

<210> 32

<211> 454

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 32

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Ala Pro Tyr Tyr Tyr Ala Ser Ser Gly Tyr Thr Asp Ala
 100 105 110

Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115 120 125

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

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 195 200 205

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 210 215 220

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 225 230 235 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 245 250 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 260 265 270

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 325 330 335

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 385 390 395 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 405 410 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450

<210> 33

<211> 454

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 33

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Ala Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Thr Ala Ala
 100 105 110

Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115 120 125

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

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 195 200 205

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 210 215 220

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 225 230 235 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 245 250 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 260 265 270

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 325 330 335

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 385 390 395 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 405 410 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450

<210> 34

<211> 454

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 34

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Ala Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Thr Asp Ala
 100 105 110

Phe Ala Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115 120 125

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

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 195 200 205

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 210 215 220

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 225 230 235 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 245 250 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 260 265 270

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 325 330 335

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 385 390 395 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 405 410 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450

<210> 35
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 35

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Phe Ala Ala Ser Asn Arg Ala Ala Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asp Lys Trp Val Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Thr Val Glu Ile Arg Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 36

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 36

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Phe Asp Ala Ser Asn Arg Ala Ala Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Ala Lys Trp Val Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Thr Val Glu Ile Arg Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 37
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 37

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 38

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 38

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Asp Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Val
85 90 95

Leu Arg Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Gln
100 105 110

<210> 39

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 39

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 85 90 95

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

<210> 40

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 40

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

Gly Thr Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30

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

Pro Pro Thr Leu Leu Phe Ser Trp Ala Ser Ile Arg Asp Ser Gly Val
 50 55 60

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

Ile Ser Asp Leu Gln Ala Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Tyr Tyr Arg Ala Pro Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Lys
 100 105 110

<210> 41

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 41

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

Asp Lys Val Asn Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Asp Asp
 20 25 30

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

Gln Glu Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Ile Ser Pro Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Tyr
 85 90 95

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

<210> 42
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工合成的序列

<400> 42

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

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

Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 43

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 43

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

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

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 44
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工合成的序列

<400> 44

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Ser Pro Val Pro Gly Val Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
 100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 45

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 45

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg His Arg Ala Gly Asp Leu Gly Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 46

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 46

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

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

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Asp Tyr Asn Pro Gln Phe
 50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 47

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 47

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

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

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

Gln Glu Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Ile Ser Pro Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Tyr
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 48
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工合成的序列

<400> 48

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

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

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Asp Tyr Asn Pro Gln Phe
 50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 49
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工合成的序列

<400> 49

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Tyr
 85 90 95

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

<210> 50
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工合成的序列

<400> 50

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Asp Asp
 20 25 30

Met Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile
 35 40 45

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

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

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Tyr
 85 90 95

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

<210> 51
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工合成的序列

<400> 51

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Asp Asp
 20 25 30

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

Tyr Glu Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Tyr
 85 90 95

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

<210> 52
 <211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 52

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Asp Asp
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Tyr
 85 90 95

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

<210> 53

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 53

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

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

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

Gln Glu Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Ile Ser Pro Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Tyr
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 54
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 54

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

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

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

Gln Glu Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Ile Ser Pro Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Tyr
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 55

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 55

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

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

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

Gln Glu Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Ile Ser Pro Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Tyr
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 56

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 56

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

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

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

Gln Ala Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Ile Ser Pro Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Tyr
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 57
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工合成的序列

<400> 57

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

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

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

Gln Glu Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Ile Ser Pro Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Tyr
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 58

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 58

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

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

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

Gln Ala Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Ile Ser Pro Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Tyr
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 59

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 59

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

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

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

Gln Ala Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Ile Ser Pro Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Tyr
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 60

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 60

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

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

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

Gln Glu Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Ile Ser Pro Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Ala Asn Phe Pro Tyr
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 61
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 61

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 62

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 62

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 63

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 63

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

Asp Lys Val Asn Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Asp Asp
 20 25 30

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

Gln Glu Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Leu
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 64
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工合成的序列

<400> 64

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

Asp Lys Val Asn Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Glu Asp Asp
 20 25 30

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

Gln Glu Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Ile Ser Pro Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Leu
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

- <210> 65
- <211> 328
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 人工合成的序列

<400> 65

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

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

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

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

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

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

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325

<210> 66
<211> 462
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 66

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Leu Gly Asp Ile Val Val Val Pro Ala Ala Pro Asp Met
100 105 110

Pro Lys Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125

Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 130 135 140

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 145 150 155 160

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 165 170 175

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 180 185 190

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 195 200 205

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 210 215 220

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 225 230 235 240

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 245 250 255

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 260 265 270

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 275 280 285

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 290 295 300

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 305 310 315 320

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 325 330 335

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 340 345 350

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 355 360 365

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 370 375 380

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 385 390 395 400

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 405 410 415

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 420 425 430

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 435 440 445

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450 455 460

<210> 67

<211> 215

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 67

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Asp Asn
 20 25 30

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

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 68

<211> 446

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 68

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Leu Val Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Glu Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Thr Ala Gly Ser Ser Ser Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

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

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

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

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

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

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205

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

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

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

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

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

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

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

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

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

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

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

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

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

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

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

<210> 69

<211> 216

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 69

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

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

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

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

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

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Cys Ser Tyr Ala Gly Ser
 85 90 95

Tyr Thr Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

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

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
 130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210>	70
<211>	452
<212>	PRT
<213>	人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

 $\langle 400 \rangle$ 70

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

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

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

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

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

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Leu Ile Ala Ala Ala Gly Gly Asp Phe Asp
 100 105 110

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

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

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

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 195 200 205

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 210 215 220

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 225 230 235 240

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275 280 285

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 290 295 300

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315 320

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 325 330 335

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 340 345 350

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 355 360 365

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370 375 380

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 385 390 395 400

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 405 410 415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 420 425 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435 440 445

Ser Leu Ser Pro
 450

<210> 71

<211> 217

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 71

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30

Phe Asp Val His Trp Tyr Arg Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

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

Ser Gly Ser Lys Ser Asp Thr Ser Val Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
85 90 95

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

Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val
145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 72

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 72

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 73
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工合成的序列

<400> 73

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 74

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 74

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 75

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 75

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 76

<211> 383

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 76

Lys Lys Val Val Leu Gly Lys Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys
 1 5 10 15

Thr Ala Ser Gln Lys Lys Ser Ile Gln Phe His Trp Lys Asn Ser Asn
 20 25 30

Gln Ile Lys Ile Leu Gly Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro
 35 40 45

Ser Lys Leu Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln
 50 55 60

Gly Asn Phe Pro Leu Ile Ile Lys Asn Leu Lys Ile Glu Asp Ser Asp
 65 70 75 80

Thr Tyr Ile Cys Glu Val Glu Asp Gln Lys Glu Glu Val Gln Leu Leu
 85 90 95

Val Phe Gly Leu Thr Ala Asn Ser Asp Thr His Leu Leu Gln Gly Gln
 100 105 110

Ser Leu Thr Leu Thr Leu Glu Ser Pro Pro Gly Ser Ser Pro Ser Val
 115 120 125

Gln Cys Arg Ser Pro Arg Gly Lys Asn Ile Gln Gly Gly Lys Thr Leu
 130 135 140

Ser Val Ser Gln Leu Glu Leu Gln Asp Ser Gly Thr Trp Thr Cys Thr
 145 150 155 160

Val Leu Gln Asn Gln Lys Lys Val Glu Phe Lys Ile Asp Ile Val Val
 165 170 175

Leu Ala Phe Gln Lys Ala Ser Ser Ile Val Tyr Lys Lys Glu Gly Glu
 180 185 190

Gln Val Glu Phe Ser Phe Pro Leu Ala Phe Thr Val Glu Lys Leu Thr
 195 200 205

Gly Ser Gly Glu Leu Trp Trp Gln Ala Glu Arg Ala Ser Ser Ser Lys
 210 215 220

Ser Trp Ile Thr Phe Asp Leu Lys Asn Lys Glu Val Ser Val Lys Arg
 225 230 235 240

Val Thr Gln Asp Pro Lys Leu Gln Met Gly Lys Lys Leu Pro Leu His
 245 250 255

Leu Thr Leu Pro Gln Ala Leu Pro Gln Tyr Ala Gly Ser Gly Asn Leu
 260 265 270

Thr Leu Ala Leu Glu Ala Lys Thr Gly Lys Leu His Gln Glu Val Asn
 275 280 285

Leu Val Val Met Arg Ala Thr Gln Leu Gln Lys Asn Leu Thr Cys Glu
290 295 300

Val Trp Gly Pro Thr Ser Pro Lys Leu Met Leu Ser Leu Lys Leu Glu
305 310 315 320

Asn Lys Glu Ala Lys Val Ser Lys Arg Glu Lys Ala Val Trp Val Leu
325 330 335

Asn Pro Glu Ala Gly Met Trp Gln Cys Leu Leu Ser Asp Ser Gly Gln
340 345 350

Val Leu Leu Glu Ser Asn Ile Lys Val Leu Pro Thr Trp Glu Gln Lys
355 360 365

Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
370 375 380

<210> 77
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 77

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Val Ile His Trp Val Arg Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Asp Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Asp Tyr Asp Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Lys Asp Asn Tyr Ala Thr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp
 100 105 110

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

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

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

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

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

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270

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

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro
450

<210> 78
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 78

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

Glu Arg Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

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

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Tyr Tyr Ser Tyr Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 79
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 79

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

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

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Asn Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg His Glu Asp Gly Asn Trp Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

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

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

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

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

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

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

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

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

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

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

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

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

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

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

<210> 80

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 80

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

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

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Pro Pro Lys Phe Phe Ile
35 40 45

Ser Glu Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Val Phe Thr Ile Glu Asn Met Leu Ser
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 81

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 81

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

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

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Asn Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg His Glu Asp Gly Asn Trp Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

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

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

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

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

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

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

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

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

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

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

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

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

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

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

<210> 82

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 82

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

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

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Pro Pro Lys Phe Phe Ile
 35 40 45

Ser Asn Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser
 50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Val Phe Thr Ile Glu Asn Met Leu Ser
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 83

<211> 464

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 83

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Leu Ser Leu Cys Ser Thr Gln Pro Asp Gly Asn Val Val Ile Ala
130 135 140

Cys Leu Val Gln Gly Phe Phe Pro Gln Glu Pro Leu Ser Val Thr Trp
145 150 155 160

Ser Glu Ser Gly Gln Gly Val Thr Ala Arg Asn Phe Pro Pro Ser Gln
 165 170 175

Asp Ala Ser Gly Asp Leu Tyr Thr Thr Ser Ser Gln Leu Thr Leu Pro
 180 185 190

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

Tyr Thr Asn Pro Ser Gln Asp Val Thr Val Pro Cys Pro Val Pro Ser
 210 215 220

Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser
 225 230 235 240

Cys Cys His Pro Arg Leu Ser Leu His Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu
 245 250 255

Leu Leu Gly Ser Glu Ala Asn Leu Thr Cys Thr Leu Thr Gly Leu Arg
 260 265 270

Asp Ala Ser Gly Val Thr Phe Thr Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Ser
 275 280 285

Ala Val Gln Gly Pro Pro Glu Arg Asp Leu Cys Gly Cys Tyr Ser Val
 290 295 300

Ser Ser Val Leu Pro Gly Cys Ala Glu Pro Trp Asn His Gly Lys Thr
 305 310 315 320

Phe Thr Cys Thr Ala Ala Tyr Pro Glu Ser Lys Thr Pro Leu Thr Ala
325 330 335

Thr Leu Ser Lys Ser Gly Asn Thr Phe Arg Pro Glu Val His Leu Leu
340 345 350

Pro Pro Pro Ser Glu Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Ala Arg Gly Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu
370 375 380

Gln Gly Ser Gln Glu Leu Pro Arg Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala Ser
385 390 395 400

Arg Gln Glu Pro Ser Gln Gly Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile
405 410 415

Leu Arg Val Ala Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys
420 425 430

Met Val Gly His Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile
435 440 445

Asp Arg Leu Ala Gly Lys Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
450 455 460

<210> 84

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 84

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Val Ala Pro Gly Asn Trp Gly Ser Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

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

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

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

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

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

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270

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

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445

Ser Pro
450

<210> 85

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 85

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asp Ser Ser Pro Leu
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 86

<211> 451

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 86

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Pro Arg Trp Glu Thr Ala Ile Ser Ser Asp Ala Phe Asp Ile
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125

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

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

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

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445

Leu Ser Pro
 450

<210> 87
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 87

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Asp
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Ser Ser Ser Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 88
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 88

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Asn Gly Asp Tyr Leu Glu Tyr Phe Gln His Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 89
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 89

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Asp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asp Ser Ser Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 90

<211> 452

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 90

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Ile Leu Gly Gly Ser Ile Ser Gly His
 20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asp Tyr Ser Gly Ser Thr His Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Asn Trp Asp Phe Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Asn Trp Phe Asp
100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
130 135 140

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
195 200 205

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
210 215 220

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225 230 235 240

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275 280 285

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 290 295 300

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315 320

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 325 330 335

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 340 345 350

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 355 360 365

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370 375 380

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 385 390 395 400

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 405 410 415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 420 425 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435 440 445

Ser Leu Ser Pro
 450

<210> 91

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 91

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Glu Asp Asp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr His Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Asn Ser Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 92

<211> 451

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 92

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Pro Arg Trp Glu Thr Ala Ile Ser Ser Asp Ala Phe Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Trp His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro
450

<210> 93
<211> 545
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 93

Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro Asp Ala Thr Cys His Gln Val Arg Ser
1 5 10 15

Phe Phe Gln Arg Leu Gln Pro Gly Leu Lys Trp Val Pro Glu Thr Pro
20 25 30

Val Pro Gly Ser Asp Leu Gln Val Cys Leu Pro Lys Gly Pro Thr Cys
35 40 45

Cys Ser Arg Lys Met Glu Glu Lys Tyr Gln Leu Thr Ala Arg Leu Asn
50 55 60

Met Glu Gln Leu Leu Gln Ser Ala Ser Met Glu Leu Lys Phe Leu Ile
65 70 75 80

Ile Gln Asn Ala Ala Val Phe Gln Glu Ala Phe Glu Ile Val Val Arg
85 90 95

His Ala Lys Asn Tyr Thr Asn Ala Met Phe Lys Asn Asn Tyr Pro Ser
 100 105 110

Leu Thr Pro Gln Ala Phe Glu Phe Val Gly Glu Phe Phe Thr Asp Val
 115 120 125

Ser Leu Tyr Ile Leu Gly Ser Asp Ile Asn Val Asp Asp Met Val Asn
 130 135 140

Glu Leu Phe Asp Ser Leu Phe Pro Val Ile Tyr Thr Gln Leu Met Asn
 145 150 155 160

Pro Gly Leu Pro Asp Ser Ala Leu Asp Ile Asn Glu Cys Leu Arg Gly
 165 170 175

Ala Arg Arg Asp Leu Lys Val Phe Gly Asn Phe Pro Lys Leu Ile Met
 180 185 190

Thr Gln Val Ser Lys Ser Leu Gln Val Thr Arg Ile Phe Leu Gln Ala
 195 200 205

Leu Asn Leu Gly Ile Glu Val Ile Asn Thr Thr Asp His Leu Lys Phe
 210 215 220

Ser Lys Asp Cys Gly Arg Met Leu Thr Arg Met Trp Tyr Cys Ser Tyr
 225 230 235 240

Cys Gln Gly Leu Met Met Val Lys Pro Cys Gly Gly Tyr Cys Asn Val
 245 250 255

Val Met Gln Gly Cys Met Ala Gly Val Val Glu Ile Asp Lys Tyr Trp
 260 265 270

Arg Glu Tyr Ile Leu Ser Leu Glu Glu Leu Val Asn Gly Met Tyr Arg
 275 280 285

Ile Tyr Asp Met Glu Asn Val Leu Leu Gly Leu Phe Ser Thr Ile His
 290 295 300

Asp Ser Ile Gln Tyr Val Gln Lys Asn Ala Gly Lys Leu Thr Thr Thr
 305 310 315 320

Ile Gly Lys Leu Cys Ala His Ser Gln Gln Arg Gln Tyr Arg Ser Ala
 325 330 335

Tyr Tyr Pro Glu Asp Leu Phe Ile Asp Lys Lys Val Leu Lys Val Ala
 340 345 350

His Val Glu His Glu Glu Thr Leu Ser Ser Arg Arg Arg Glu Leu Ile
 355 360 365

Gln Lys Leu Lys Ser Phe Ile Ser Phe Tyr Ser Ala Leu Pro Gly Tyr
 370 375 380

Ile Cys Ser His Ser Pro Val Ala Glu Asn Asp Thr Leu Cys Trp Asn
 385 390 395 400

Gly Gln Glu Leu Val Glu Arg Tyr Ser Gln Lys Ala Ala Arg Asn Gly
 405 410 415

Met Lys Asn Gln Phe Asn Leu His Glu Leu Lys Met Lys Gly Pro Glu
 420 425 430

Pro Val Val Ser Gln Ile Ile Asp Lys Leu Lys His Ile Asn Gln Leu
 435 440 445

Leu Arg Thr Met Ser Met Pro Lys Gly Arg Val Leu Asp Lys Asn Leu
 450 455 460

Asp Glu Glu Gly Phe Glu Ala Gly Asp Cys Gly Asp Asp Glu Asp Glu
 465 470 475 480

Cys Ile Gly Gly Ala Gly Asp Gly Met Ile Lys Val Lys Asn Gln Leu
 485 490 495

Arg Phe Leu Ala Glu Leu Ala Tyr Asp Leu Asp Val Asp Asp Ala Pro
 500 505 510

Gly Asn Ser Gln Gln Ala Thr Pro Lys Asp Asn Glu Ile Ser Thr Phe
 515 520 525

His Asn Leu Gly Asn Val His Ser Pro Leu Lys His His His His His
 530 535 540

His
 545

<210> 94

<211> 443

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 94

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Ala Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440

<210> 95
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工合成的序列

<400> 95

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Glu Asp Asp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asp Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

- <210> 96
- <211> 459
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 人工合成的序列

<400> 96

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Pro Ala Gly Arg His Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr
 100 105 110

Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
 115 120 125

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 130 135 140

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 145 150 155 160

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 165 170 175

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 180 185 190

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 195 200 205

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 210 215 220

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 225 230 235 240

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 245 250 255

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 260 265 270

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 275 280 285

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 290 295 300

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 305 310 315 320

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 325 330 335

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 340 345 350

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 355 360 365

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 370 375 380

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 385 390 395 400

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 405 410 415

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 420 425 430

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 435 440 445

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450 455

<210> 97

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 97

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Asp
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Leu Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 98

<211> 451

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 98

Gln Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Asp Arg Thr Pro Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Leu Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro
450

- <210> 99
- <211> 214
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 人工合成的序列

<400> 99

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Glu Asp Asp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asp Ser Ser Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 100

<211> 451

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 100

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Ser Pro Leu Leu Trp Phe Gly Glu Pro Phe Phe Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445

Leu Ser Pro
 450

<210> 101

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 101

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Glu Asp Asp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr His Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 102

<211> 443

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 102

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	

Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr
			20					25					30		

Glu	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			

Gly	Ala	Leu	Asp	Pro	Lys	Thr	Gly	Asp	Thr	Ala	Tyr	Ser	Gln	Lys	Phe
		50				55					60				

Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80

Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	

Thr	Arg	Phe	Tyr	Ser	Tyr	Thr	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr
			100						105					110	

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440

<210> 103

<211> 219

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 103

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
85 90 95

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 104

<211> 567

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 104

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80

Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Gln Ser Pro Ser Val Phe
 115 120 125

Pro Leu Thr Arg Cys Cys Lys Asn Ile Pro Ser Asn Ala Thr Ser Val
 130 135 140

Thr Leu Gly Cys Leu Ala Thr Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Met Val
 145 150 155 160

Thr Trp Asp Thr Gly Ser Leu Asn Gly Thr Thr Met Thr Leu Pro Ala
 165 170 175

Thr Thr Leu Thr Leu Ser Gly His Tyr Ala Thr Ile Ser Leu Leu Thr
 180 185 190

Val Ser Gly Ala Trp Ala Lys Gln Met Phe Thr Cys Arg Val Ala His
 195 200 205

Thr Pro Ser Ser Thr Asp Trp Val Asp Asn Lys Thr Phe Ser Val Cys
 210 215 220

Ser Arg Asp Phe Thr Pro Pro Thr Val Lys Ile Leu Gln Ser Ser Cys
 225 230 235 240

Asp Gly Gly Gly His Phe Pro Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val
 245 250 255

Ser Gly Tyr Thr Pro Gly Thr Ile Asn Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly
 260 265 270

Gln Val Met Asp Val Asp Leu Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly
 275 280 285

Glu Leu Ala Ser Thr Gln Ser Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp
 290 295 300

Leu Ser Asp Arg Thr Tyr Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr
 305 310 315 320

Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys Cys Ala Asp Ser Asn Pro Arg Gly Val
325 330 335

Ser Ala Tyr Leu Ser Arg Pro Ser Pro Phe Asp Leu Phe Ile Arg Lys
340 345 350

Ser Pro Thr Ile Thr Cys Leu Val Val Asp Leu Ala Pro Ser Lys Gly
355 360 365

Thr Val Asn Leu Thr Trp Ser Arg Ala Ser Gly Lys Pro Val Asn His
370 375 380

Ser Thr Arg Lys Glu Glu Lys Gln Arg Asn Gly Thr Leu Thr Val Thr
385 390 395 400

Ser Thr Leu Pro Val Gly Thr Arg Asp Trp Ile Glu Gly Glu Thr Tyr
405 410 415

Gln Cys Arg Val Thr His Pro His Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser
420 425 430

Thr Thr Lys Thr Ser Gly Pro Arg Ala Ala Pro Glu Val Tyr Ala Phe
435 440 445

Ala Thr Pro Glu Trp Pro Gly Ser Arg Asp Lys Arg Thr Leu Ala Cys
450 455 460

Leu Ile Gln Asn Phe Met Pro Glu Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu His
465 470 475 480

Asn Glu Val Gln Leu Pro Asp Ala Arg His Ser Thr Thr Gln Pro Arg
485 490 495

Lys Thr Lys Gly Ser Gly Phe Phe Val Phe Ser Arg Leu Glu Val Thr
500 505 510

Arg Ala Glu Trp Glu Gln Lys Asp Glu Phe Ile Cys Arg Ala Val His
515 520 525

Glu Ala Ala Ser Pro Ser Gln Thr Val Gln Arg Ala Val Ser Val Asn
530 535 540

Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala
545 550 555 560

Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
565

<210> 105

<211> 438

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 105

Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly Thr
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Ser Ser Ala Tyr
20 25 30

Asp Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Ala Cys Ile Tyr Thr Gly Asp Gly Val Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Thr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
 85 90 95

Arg Gly Gly Asp Tyr Tyr Asp Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser Gly Gln Pro Lys Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125

Cys Cys Gly Asp Thr Pro Ser Ser Thr Val Thr Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Gly Tyr Leu Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Thr
 145 150 155 160

Leu Thr Asn Gly Val Arg Thr Phe Pro Ser Val Arg Gln Ser Ser Gly
 165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Ser Val Thr Ser Ser Ser Gln Pro
 180 185 190

Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Thr Asn Thr Lys Val Asp Lys
 195 200 205

Thr Val Ala Pro Ser Thr Cys Ser Lys Pro Met Cys Pro Pro Pro Glu
 210 215 220

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 225 230 235 240

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 245 250 255

Val Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Thr Trp Tyr Ile Asn Asn
 260 265 270

Glu Gln Val Arg Thr Ala Arg Pro Pro Leu Arg Glu Gln Gln Phe Asn
 275 280 285

Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Ala His Gln Asp Trp
 290 295 300

Leu Arg Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val His Asn Lys Ala Leu Pro
 305 310 315 320

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Pro Leu Glu
 325 330 335

Pro Lys Val Tyr Thr Met Gly Pro Pro Arg Glu Glu Leu Ser Ser Arg
 340 345 350

Ser Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Asn Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 355 360 365

Ser Val Glu Trp Glu Lys Asn Gly Lys Ala Glu Asp Asn Tyr Lys Thr
 370 375 380

Thr Pro Thr Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys
 385 390 395 400

Leu Ser Val Pro Thr Ser Glu Trp Gln Arg Gly Asp Val Phe Thr Cys
 405 410 415

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile
 420 425 430

Ser Arg Ser Pro Gly Lys
 435

<210> 106

<211> 215

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 106

Ala Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Lys Ser Val Pro Val Gly
 1 5 10 15

Asp Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Glu Ser Val Tyr Ser Asn
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asp Val Gln
 65 70 75 80

Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Tyr Lys Ser Asp Asn
 85 90 95

Thr Asp Gly Ile Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys Gly
 100 105 110

Asp Pro Val Ala Pro Thr Val Leu Ile Phe Pro Pro Ala Ala Asp Gln
 115 120 125

Val Ala Thr Gly Thr Val Thr Ile Val Cys Val Ala Asn Lys Tyr Phe
 130 135 140

Pro Asp Val Thr Val Thr Trp Glu Val Asp Gly Thr Thr Gln Thr Thr
 145 150 155 160

Gly Ile Glu Asn Ser Lys Thr Pro Gln Asn Ser Ala Asp Cys Thr Tyr
 165 170 175

Asn Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Ser Thr Gln Tyr Asn Ser His
180 185 190

Lys Glu Tyr Thr Cys Lys Val Thr Gln Gly Thr Thr Ser Val Val Gln
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Asp Cys
210 215

<210> 107
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的序列

<400> 107

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Asp
20 25 30

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
35 40 45

Asp Ile Asp Thr Thr Thr Gly Thr Thr Ile Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile
65 70 75 80

Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Cys
85 90 95

Ala Gly Gly Thr Gly Tyr Cys Glu Asp Gly Leu Asp Pro Trp Gly Pro
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

<210> 108

<211> 217

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 108

Ala Phe Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Val Ala Val Gly
 1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Tyr
 20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Gly Ser Asn
85 90 95

Val Asp Asn Ile Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys Arg Thr
100 105 110

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
115 120 125

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
130 135 140

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
145 150 155 160

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
180 185 190

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
195 200 205

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 109

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 109

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
 1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Asp
 20 25 30

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45

Asp Ile Asp Thr Ala Ser Gly Thr Thr Ile Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Cys
 85 90 95

Ala Gly Ser Ser Gly Tyr Cys Glu Asn Gly Leu Asp Pro Trp Gly Pro
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

<210> 110
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工合成的序列

<400> 110

Ala Ile Glu Met Thr Gln Thr Pro Phe Ser Val Ser Ala Thr Val Gly
 1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asp Tyr
 20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
 65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Gly Ser Asp
 85 90 95

Val Asp Asn Ile Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys Arg Thr
 100 105 110

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
115 120 125

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
130 135 140

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
145 150 155 160

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
180 185 190

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
195 200 205

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 111

<211> 449

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 111

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Ser Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Val Ala Ser Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Phe Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His Trp His Phe Ala Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445

Pro

<210> 112

<211> 218

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 112

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
 20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His
 85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 113

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 113

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser

發明摘要

※ 申請案號：106112884 (由100143904分割)

※ 申請日：100/11/30

※IPC 分類：**C07K 16/44** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

具有鈣依存性的抗原結合能力之抗體 /ANTIBODY HAVING
CALCIUM-DEPENDENT ANTIGEN-BINDING ABILITY

【中文】

本發明的課題在於提供:促進利用抗原結合分子使抗原攝入細胞內之方法、增加 1 分子的抗原結合分子對於抗原的結合次數之方法、利用抗原結合分子之投予促進血漿中抗原濃度減少之方法、改善抗原結合分子的血漿中滯留性之方法、促進抗原攝入細胞內之抗原結合分子、增加對抗原的結合次數之抗原結合分子、能利用投予而促進血漿中之抗原濃度減少之抗原結合分子、改善血漿中滯留性之抗原結合分子、含有該抗原結合分子之醫藥組成物、及此等之製造方法。

本案發明人等發現藉由使用顯示具鈣依存性之抗原抗體反應的抗原結合分子，能解決上述課題。

【英文】

An objective of the present invention is to provide methods for promoting antigen uptake into cells by antigen-binding molecules, methods for increasing the number of times of antigen binding by one antigen-binding molecule, methods for promoting reduction of the antigen concentration in plasma by

administering antigen-binding molecules, and methods for improving the plasma retention of an antigen-binding molecule, as well as antigen-binding molecules that allow enhanced antigen uptake into cells, antigen-binding molecules having an increased number of times of antigen binding, antigen-binding molecules that can promote reduction of the antigen concentration in plasma when administered, antigen-binding molecules with improved plasma retention, pharmaceutical compositions comprising the above antigen-binding molecules, and methods for producing them. The present inventors revealed that the above objective can be achieved by using antigen-binding molecules that show calcium-dependent antigen-antibody reaction.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（1）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：無。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無。

申請專利範圍

1. 一種抗體，其包含抗原結合域與人類 FcRn 結合域，於 2 種不同的鈣濃度條件下的抗原結合活性不同，抗體在低鈣濃度條件下的抗原結合活性比起在高鈣濃度條件下的抗原結合活性為低，且其中抗原結合域的輕鏈含有以 Kabat 編號法表示之在位置 30、31、32、50 及/或 92 的一或多個具有金屬螯合活性的胺基酸，其中該低鈣濃度係指離子化鈣濃度為 $0.1\mu\text{M}$ 至 $30\mu\text{M}$ ，以及該高鈣濃度係指離子化鈣濃度為 $100\mu\text{M}$ 至 10mM 。
2. 如申請專利範圍第 1 項之抗體，其中該抗原結合域的輕鏈包含選自於以 Kabat 編號法表示之在位置 30、31、32、50 及 92 的至少 4 個具有金屬螯合活性的胺基酸。
3. 如申請專利範圍第 1 項之抗體，其中該抗體的抗原為 IgA、或 Glypican3 任一者。
4. 如申請專利範圍第 1 項之抗體，其包含於 pH 中性域之條件下對於 FcRn 具結合活性之 FcRn 結合域。
5. 如申請專利範圍第 4 項之抗體，其中該 FcRn 結合域為 Fc 區域。
6. 如申請專利範圍第 4 或 5 項之抗體，其中，該 Fc 區域之胺基酸序列當中，以 EU 編號法表示之 237、248、250、252、254、255、256、257、258、265、286、289、297、303、305、307、308、309、311、312、314、315、317、332、334、360、376、380、382、384、385、386、387、389、424、428、433、434、及 436 中任一者以上之胺基酸為與

天然型 Fc 區域之胺基酸不同的 Fc 區域。

7. 如申請專利範圍第 6 項之抗體，其中，該 Fc 區域之以 EU 編號法表示之胺基酸為；

237 位之胺基酸為 Met、

248 位之胺基酸為 Ile、

250 位之胺基酸為 Ala、Phe、Ile、Met、Gln、Ser、Val、
Trp、或 Tyr、

252 位之胺基酸為 Phe、Trp、或 Tyr、

254 位之胺基酸為 Thr、

255 位之胺基酸為 Glu、

256 位之胺基酸為 Asp、Glu、或 Gln、

257 位之胺基酸為 Ala、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、
Thr、或 Val、

258 位之胺基酸為 His、

265 位之胺基酸為 Ala、

286 位之胺基酸為 Ala 或 Glu、

289 位之胺基酸為 His、

297 位之胺基酸為 Ala、

303 位之胺基酸為 Ala、

305 位之胺基酸為 Ala、

307 位之胺基酸為 Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、
Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、Trp、或 Tyr、

308 位之胺基酸為 Ala、Phe、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、
或 Thr、

309 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Pro、或 Arg、
311 位之胺基酸為 Ala、His、或 Ile、
312 位之胺基酸為 Ala 或 His、
314 位之胺基酸為 Lys 或 Arg、
315 位之胺基酸為 Ala、Asp 或 His、
317 位之胺基酸為 Ala、
332 位之胺基酸為 Val、
334 位之胺基酸為 Leu、
360 位之胺基酸為 His、
376 位之胺基酸為 Ala、
380 位之胺基酸為 Ala、
382 位之胺基酸為 Ala、
384 位之胺基酸為 Ala、
385 位之胺基酸為 Asp 或 His、
386 位之胺基酸為 Pro、
387 位之胺基酸為 Glu、
389 位之胺基酸為 Ala 或 Ser、
424 位之胺基酸為 Ala、
428 位之胺基酸為 Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、
Leu、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、Trp、或 Tyr、
433 位之胺基酸為 Lys、
434 位之胺基酸為 Ala、Phe、His、Ser、Trp、或 Tyr、或
436 位之胺基酸為 His、Ile、Leu、Val、
中任一者以上之組合。

8. 一種醫藥組成物，其包含如申請專利範圍第 1 至 7 項中任一項之抗體及藥學上可容許之載體。
9. 如申請專利範圍第 8 項之醫藥組成物，為用於促進抗原攝入細胞內之醫藥組成物。
10. 如申請專利範圍第 8 項之醫藥組成物，為用於促進血漿中抗原濃度減少之醫藥組成物。
11. 一種醫藥組成物，其用於促進抗原攝入細胞內或促進血漿中之抗原濃度減少，包含抗體，該抗體含有抗原結合域與人類 FcRn 結合域且於 2 種不同的鈣濃度條件下的抗原結合活性不同，抗體在低鈣濃度條件下之抗原結合活性比起於高鈣濃度條件下之抗原結合活性為低，其中低鈣濃度為離子化鈣濃度 $0.1\mu\text{M}\sim 30\mu\text{M}$ ，以及其中高鈣濃度為離子化鈣濃度 $100\mu\text{M}\sim 10\text{mM}$ 。
12. 如申請專利範圍第 11 項之醫藥組成物，其用於促進抗原攝入細胞內或促進血漿中之抗原濃度減少，其中該抗原結合域之輕鏈包含以 Kabat 編號法表示之在位置 30、31、32、50 及/或 92 的一或多個具有金屬螯合活性的胺基酸。
13. 如申請專利範圍第 12 項之醫藥組成物，其用於促進抗原攝入細胞內或促進血漿中之抗原濃度減少，其中該抗原結合域的輕鏈包含選自於以 Kabat 編號法表示之在位置 30、31、32、50 及 92 的至少 4 個具有金屬螯合活性的胺基酸。
14. 一種抗體的用途，其係用於製備促進利用抗體使抗原攝入細胞內之藥物，其中該抗體為包含抗原結合域與人類 FcRn 結合域之抗體，且於 2 種不同的鈣濃度條件下的抗原結合

活性不同，抗體之低鈣濃度條件下之抗原結合活性低於高鈣濃度條件下之抗原結合活性，其中低鈣濃度為離子化鈣濃度 $0.1\mu\text{M}\sim 30\mu\text{M}$ ，及其中高鈣濃度為離子化鈣濃度 $100\mu\text{M}\sim 10\text{mM}$ 。

15.一種抗體的用途，其係用於製備促進血漿中抗原濃度減少之藥物，其中該抗體為包含抗原結合域與人類 FcRn 結合域之抗體，且於 2 種不同的鈣濃度條件下的抗原結合活性不同，抗體之低鈣濃度條件下之抗原結合活性低於高鈣濃度條件下之抗原結合活性，其中低鈣濃度為離子化鈣濃度 $0.1\mu\text{M}\sim 30\mu\text{M}$ ，及其中高鈣濃度為離子化鈣濃度 $100\mu\text{M}\sim 10\text{mM}$ 。

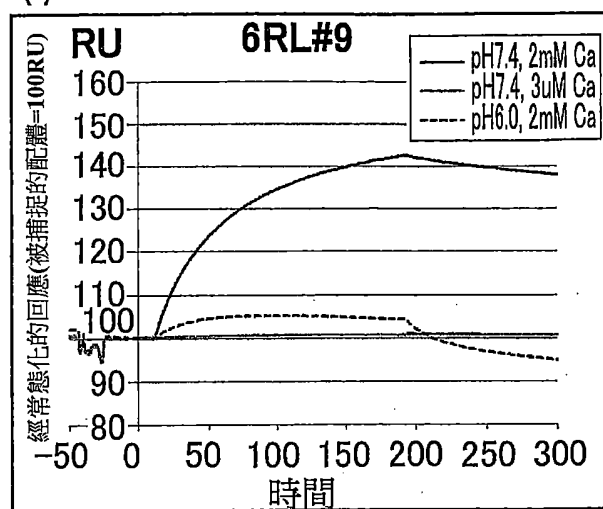
16.一種抗體的用途，其係用於製備增加一抗體對抗原的結合次數之藥物，其係藉由使用如下的其中該抗體為包含抗原結合域與人類 FcRn 結合域之抗體，且於 2 種不同的鈣濃度條件下的抗原結合活性不同，抗體之低鈣濃度條件下之抗原結合活性低於高鈣濃度條件下之抗原結合活性，其中低鈣濃度為離子化鈣濃度 $0.1\mu\text{M}\sim 30\mu\text{M}$ ，及其中高鈣濃度為離子化鈣濃度 $100\mu\text{M}\sim 10\text{mM}$ 。

17.一種抗體的用途，其係用於製備改善抗體之血漿中滯留性之藥物，其中該抗體為包含抗原結合域與人類 FcRn 結合域之抗體，且於 2 種不同的鈣濃度條件下的抗原結合活性不同，抗體之低鈣濃度條件下之抗原結合活性低於高鈣濃度條件下之抗原結合活性，其中低鈣濃度為離子化鈣濃度 $0.1\mu\text{M}\sim 30\mu\text{M}$ ，及其中高鈣濃度為離子化鈣濃度

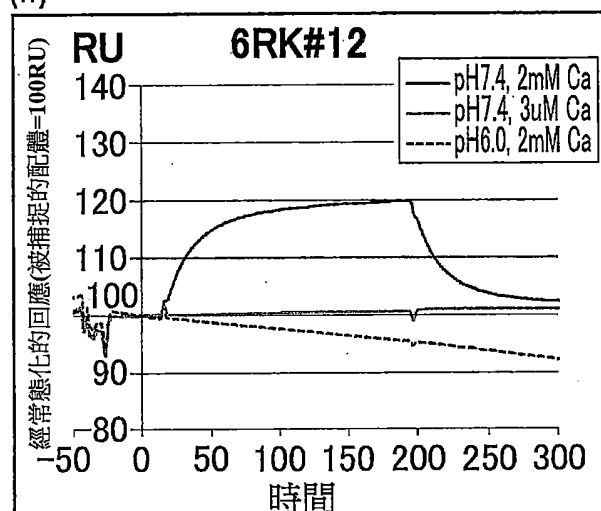
100 μ M~10mM。

- 18.如申請專利範圍第 14 至 17 項中任一項之用途，其中該抗體係第 1 至 7 項中任一項之抗體。

(i)



(ii)



(iii)

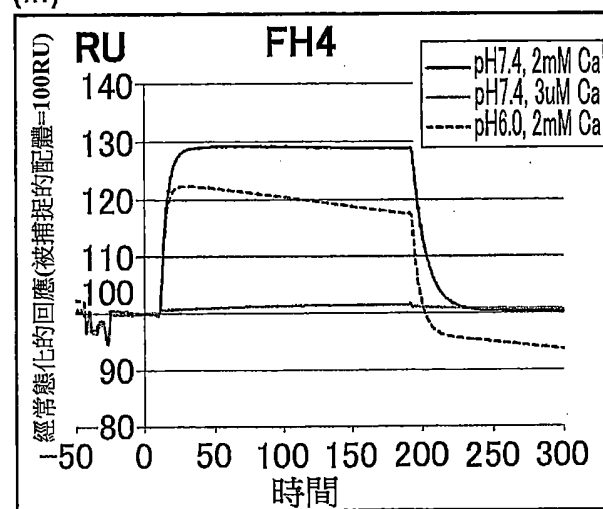


圖6

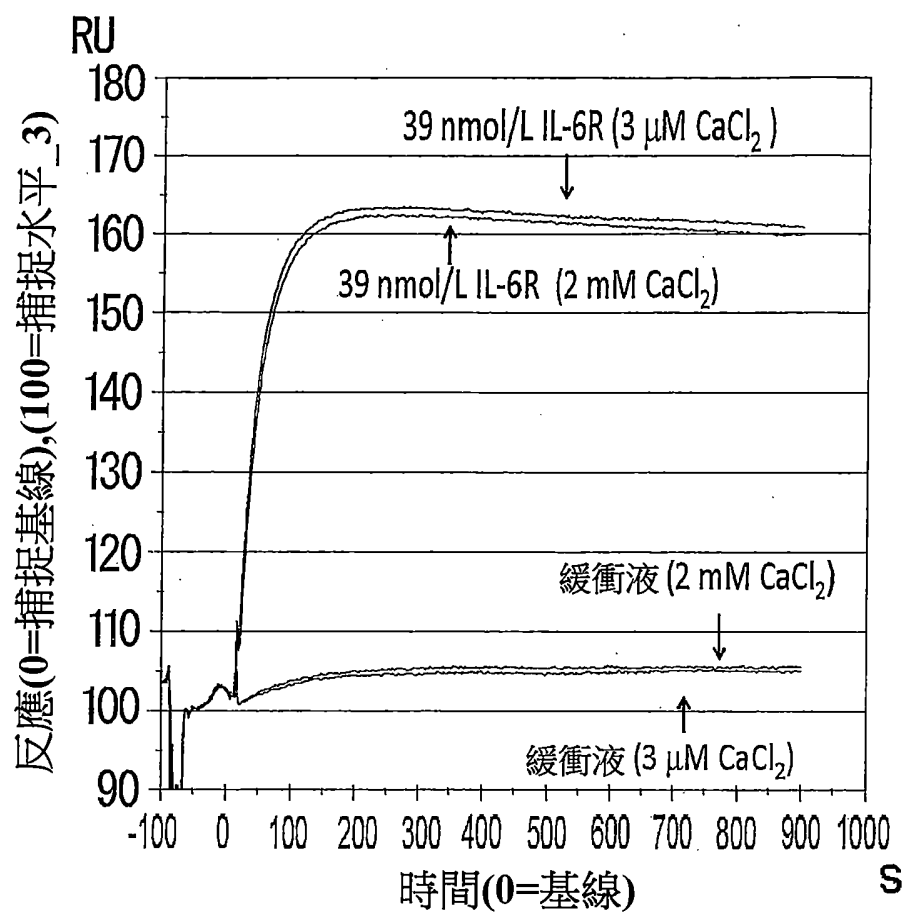


圖7

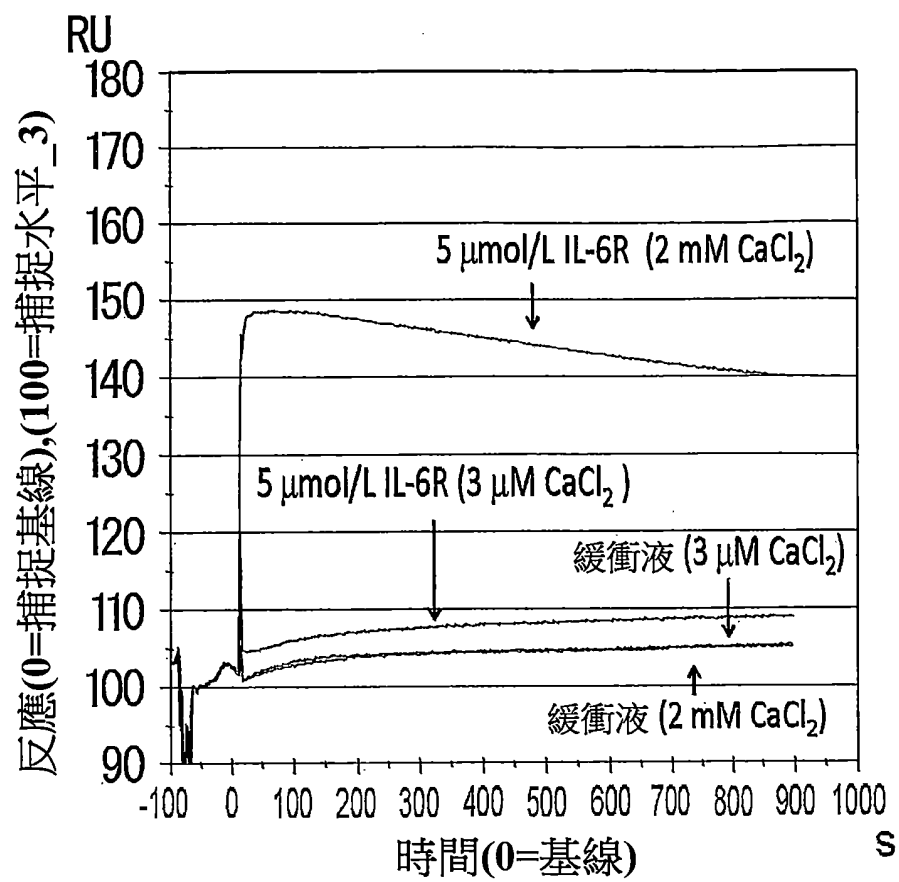


圖8

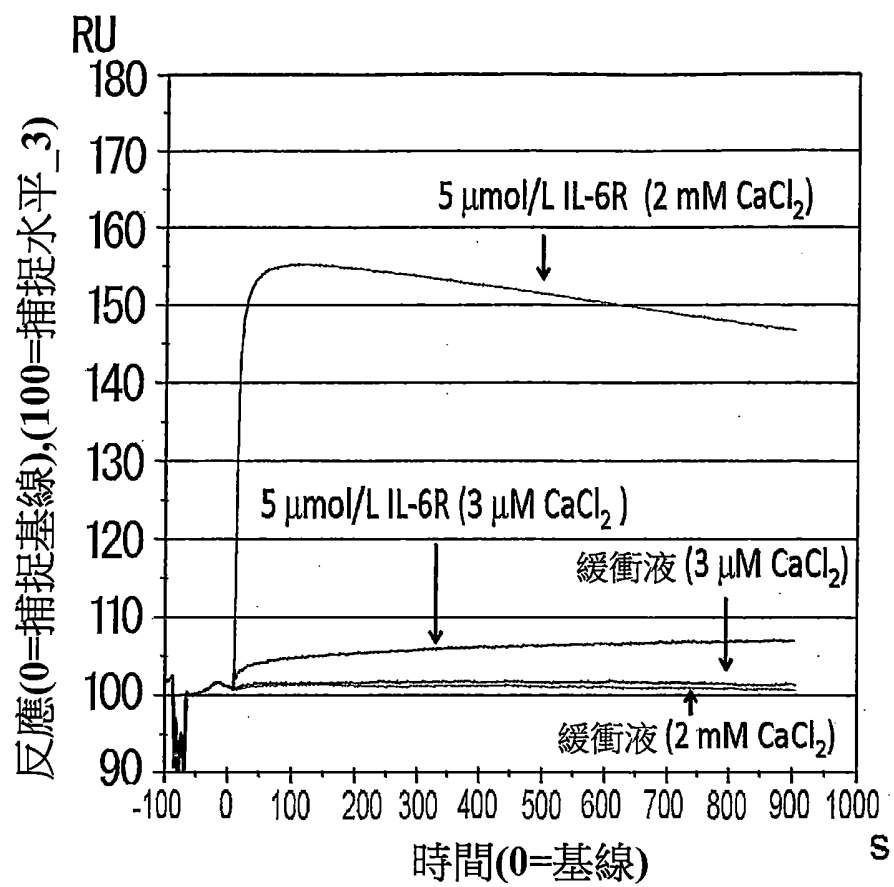


圖9

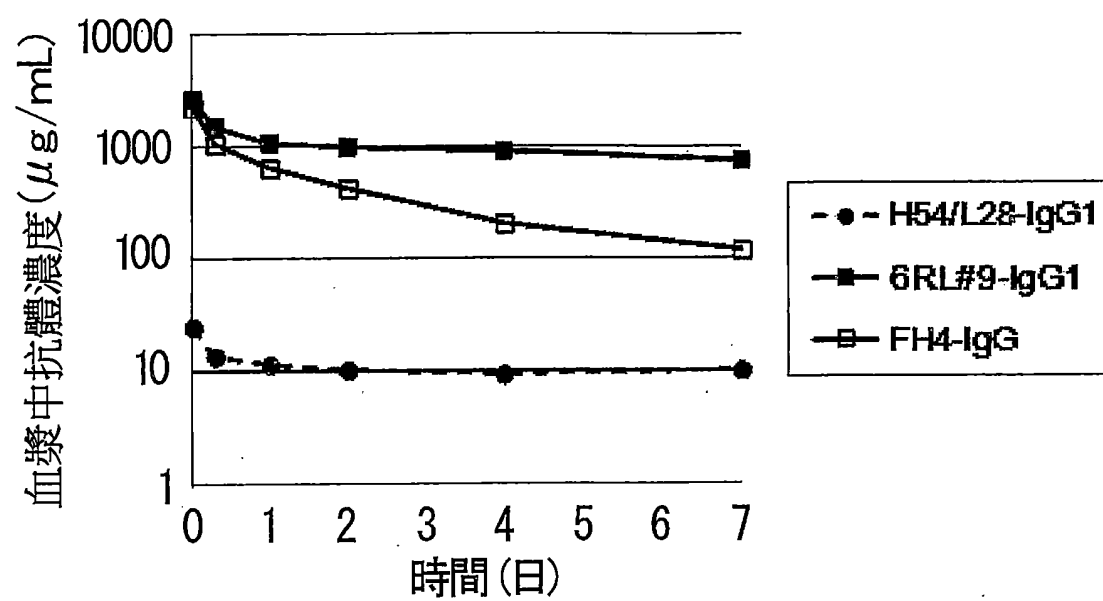


圖10

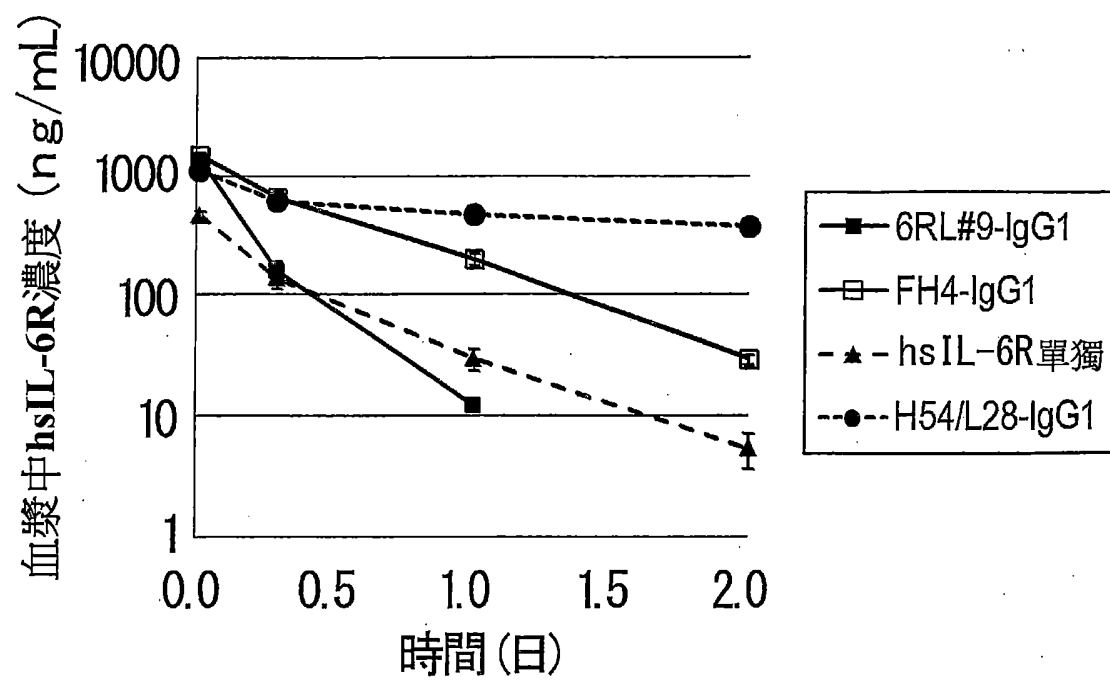


圖 11

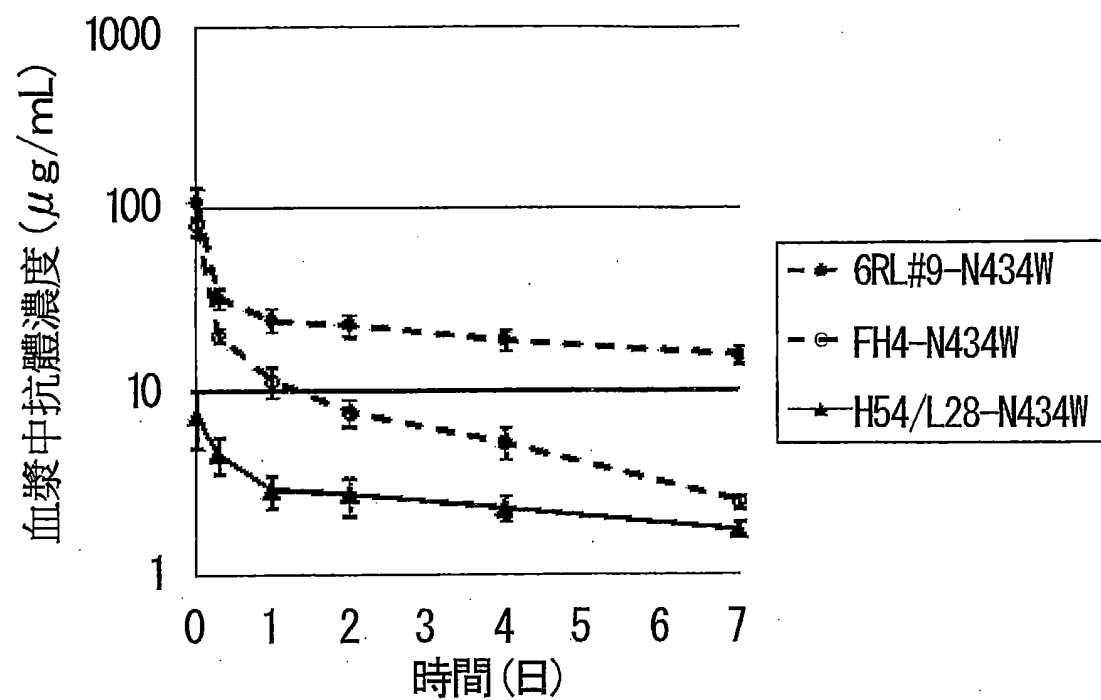


圖12

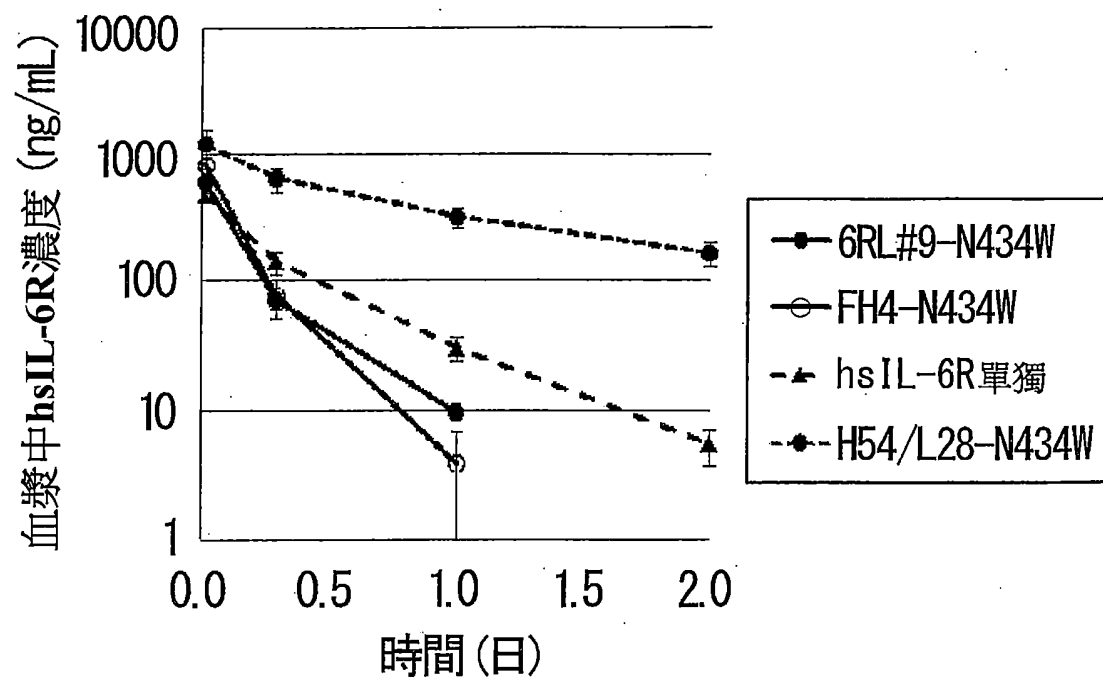


圖13

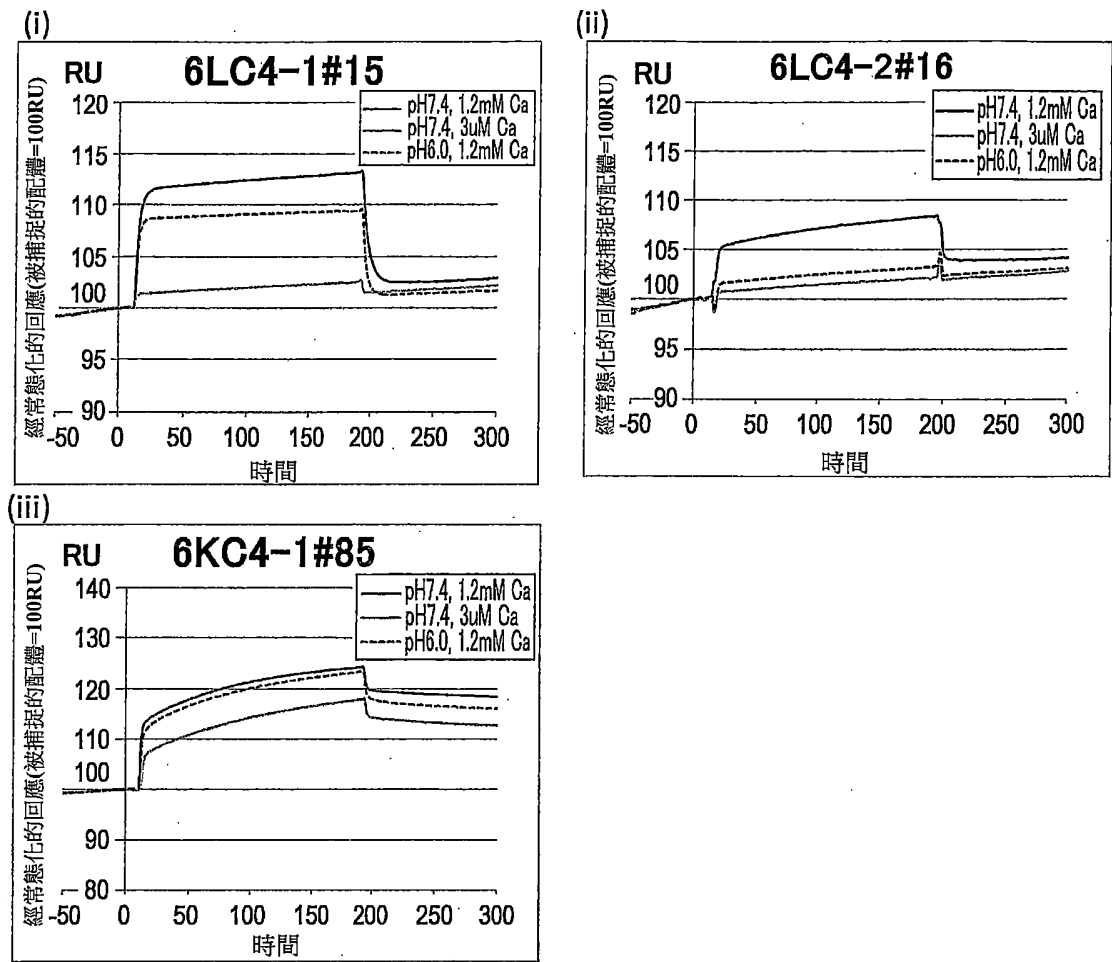


圖15

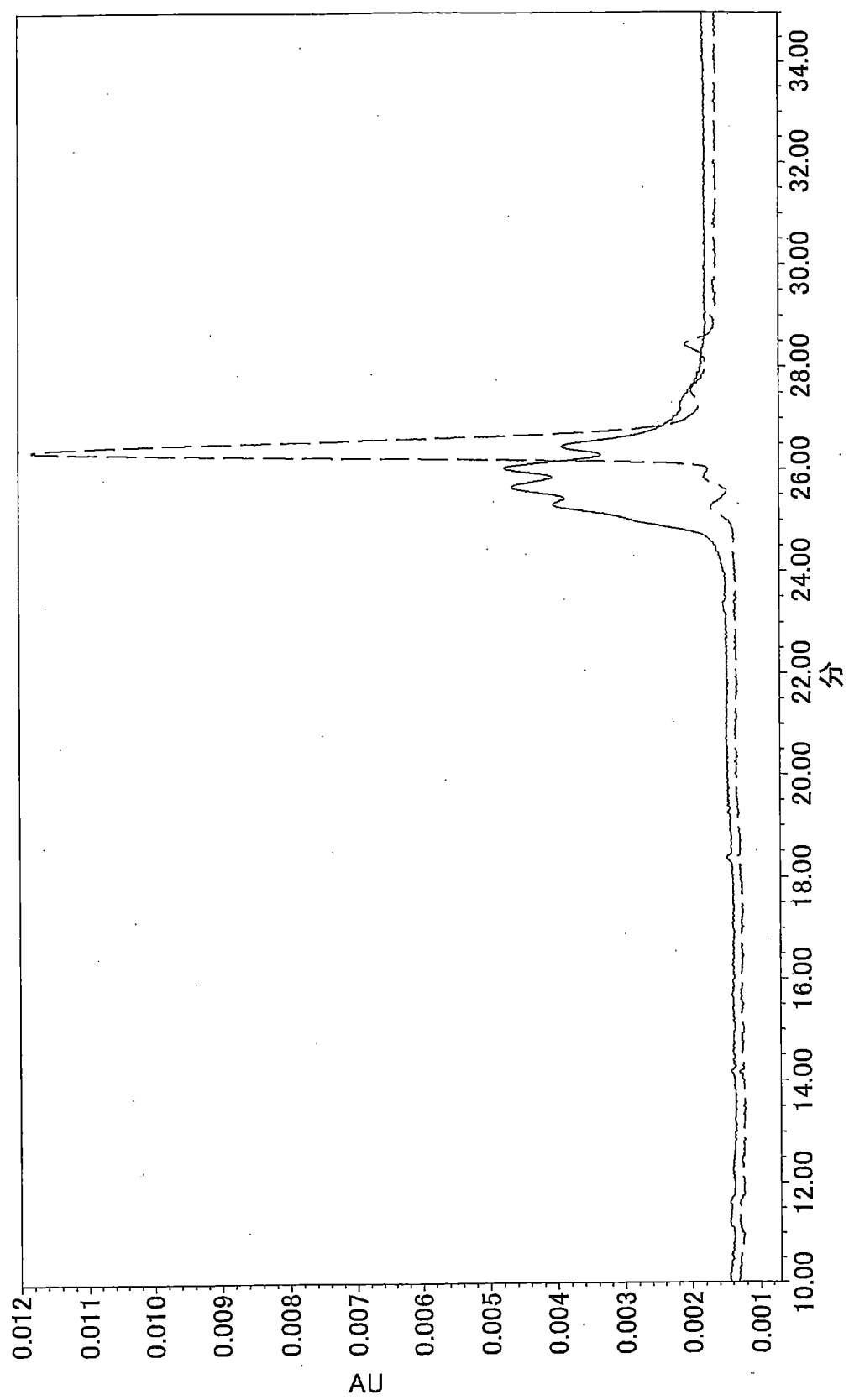


圖16

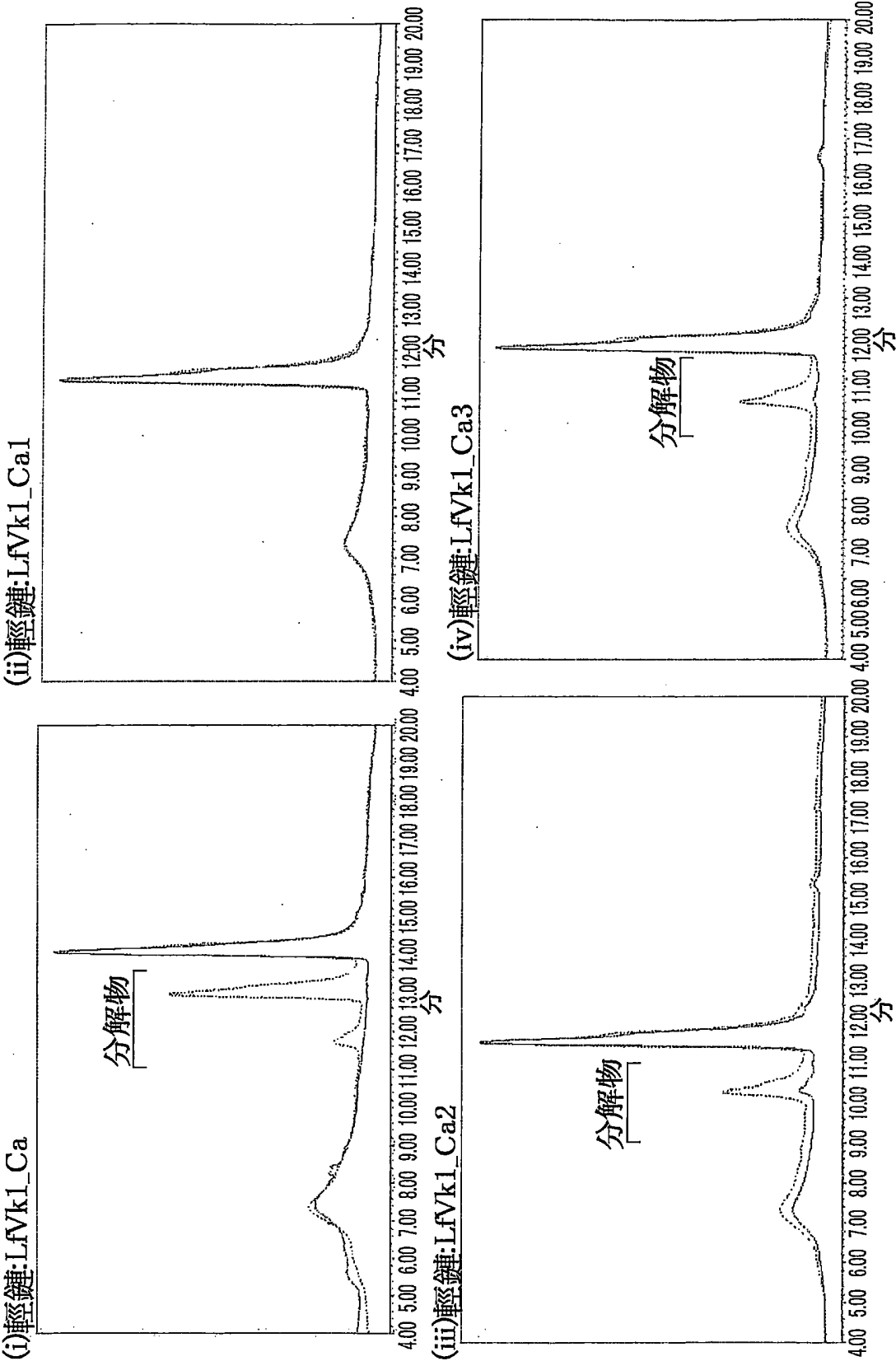
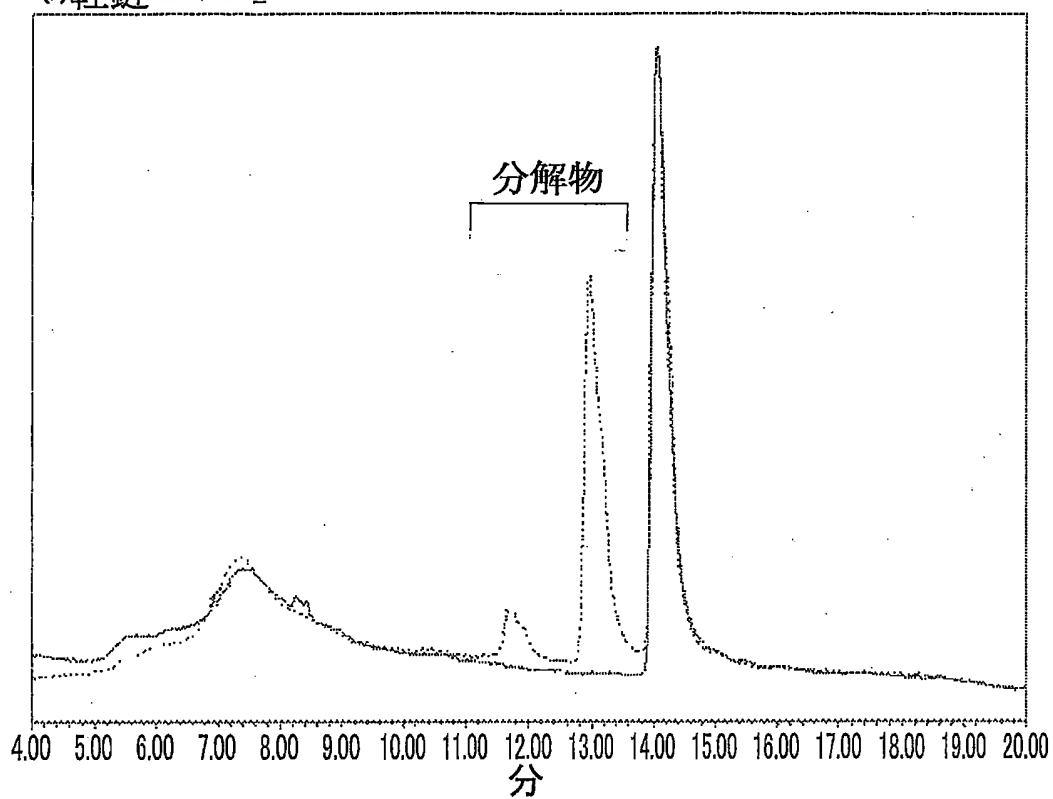


圖17

(i)輕鏈:LfVkl_Ca



(ii)輕鏈LfVkl_Ca6

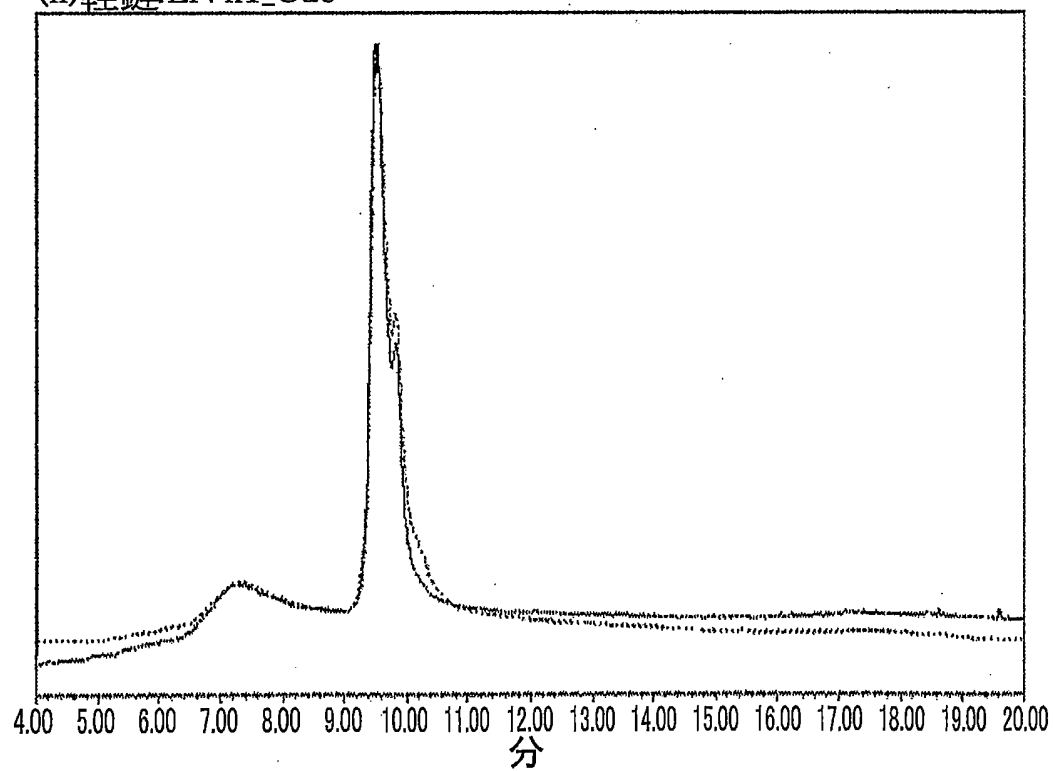


圖18

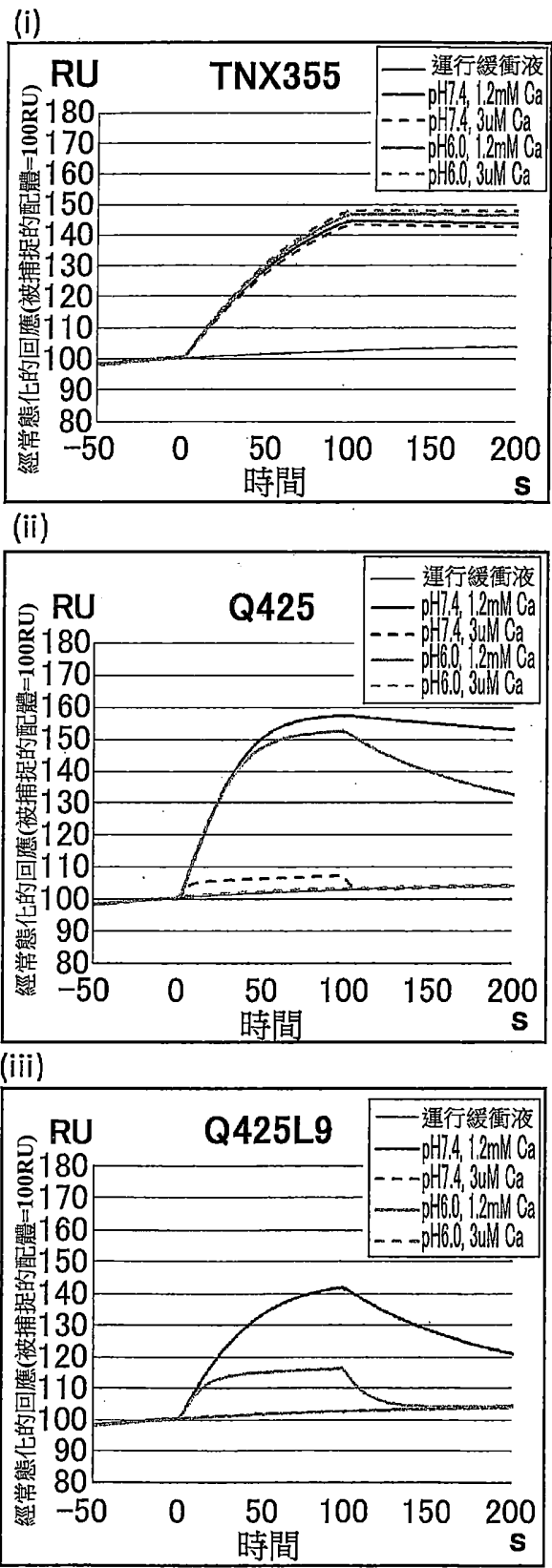


圖19

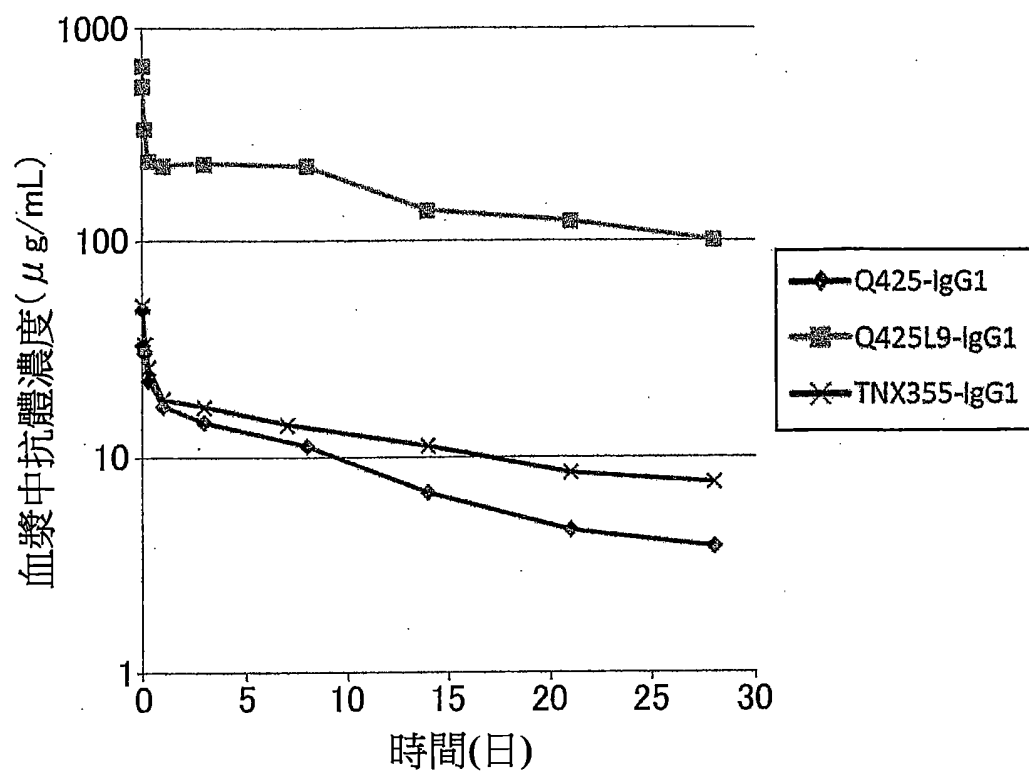


圖20

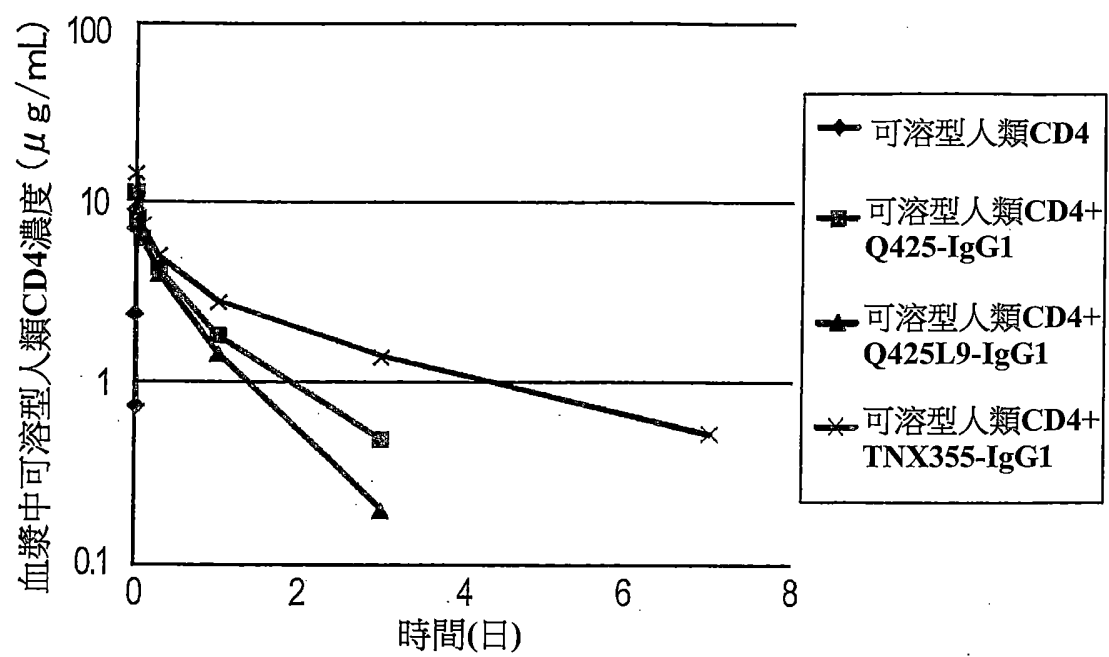


圖21

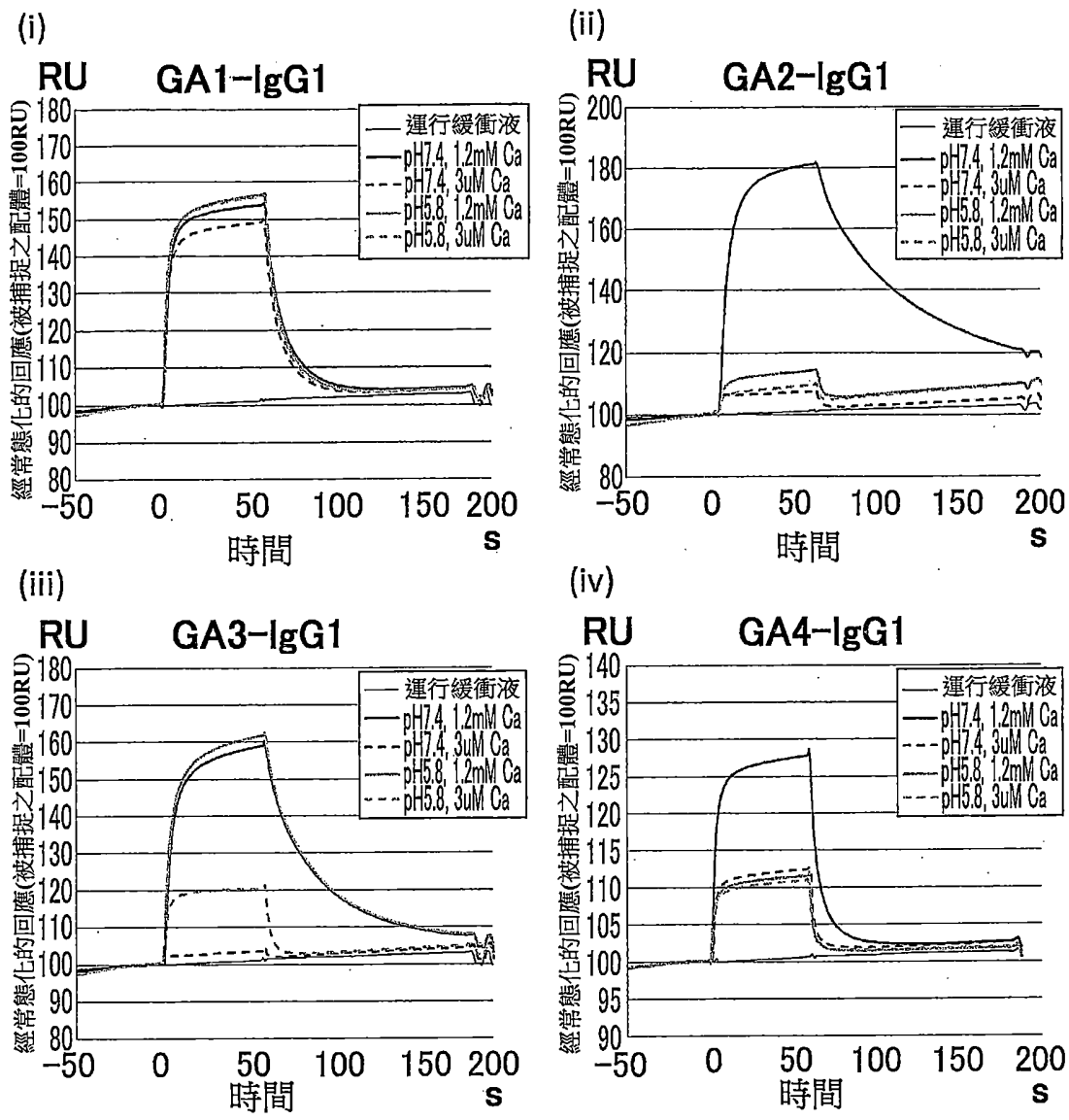


圖22

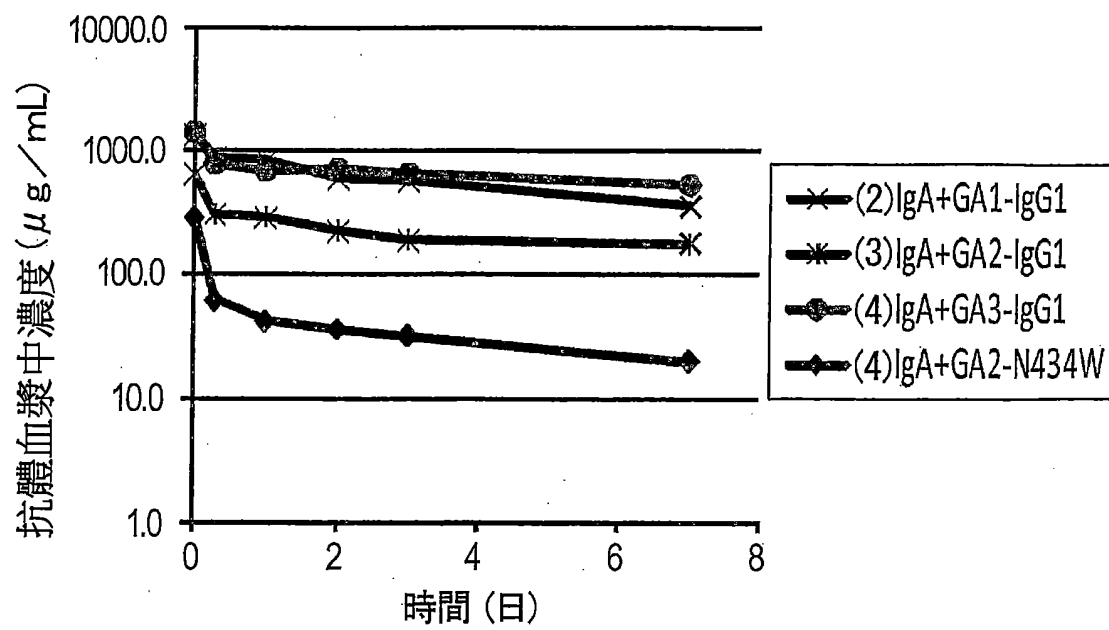


圖23

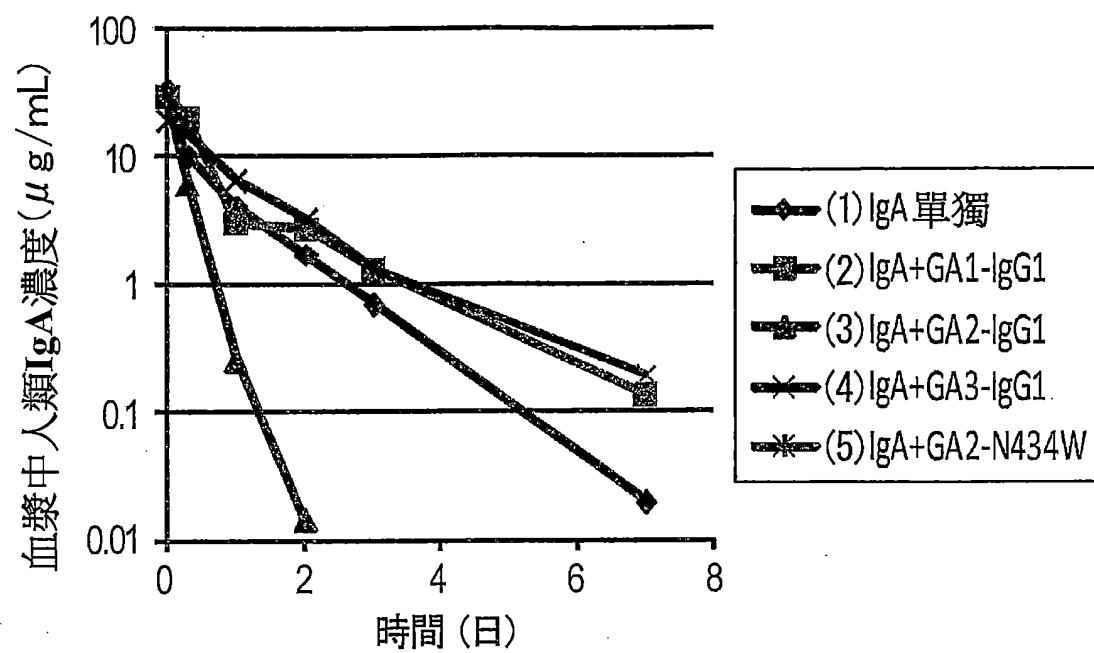


圖24

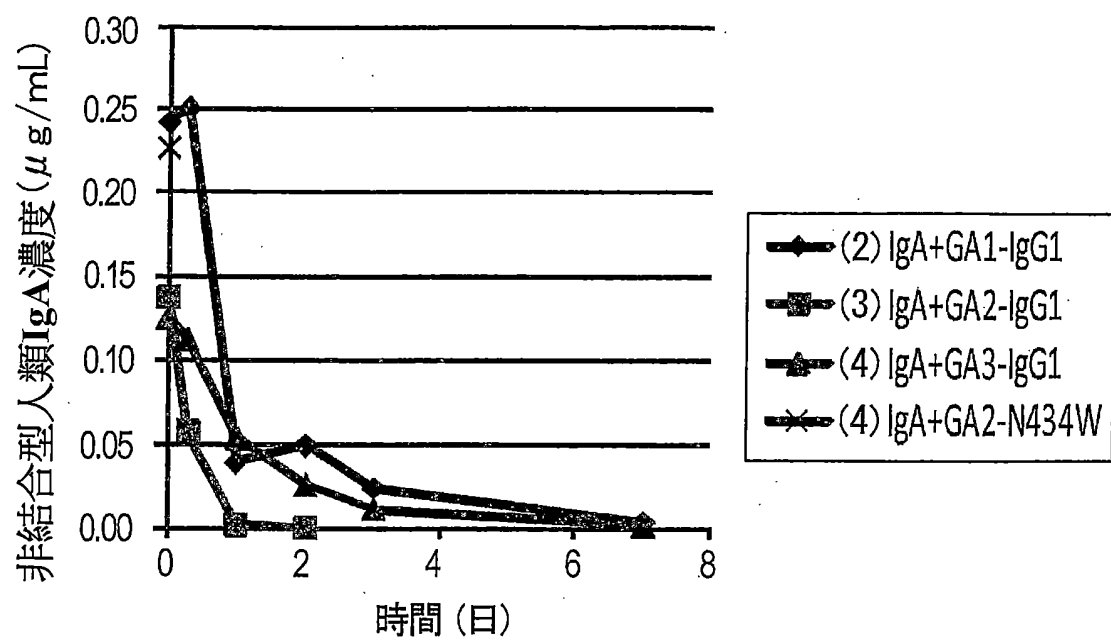


圖25

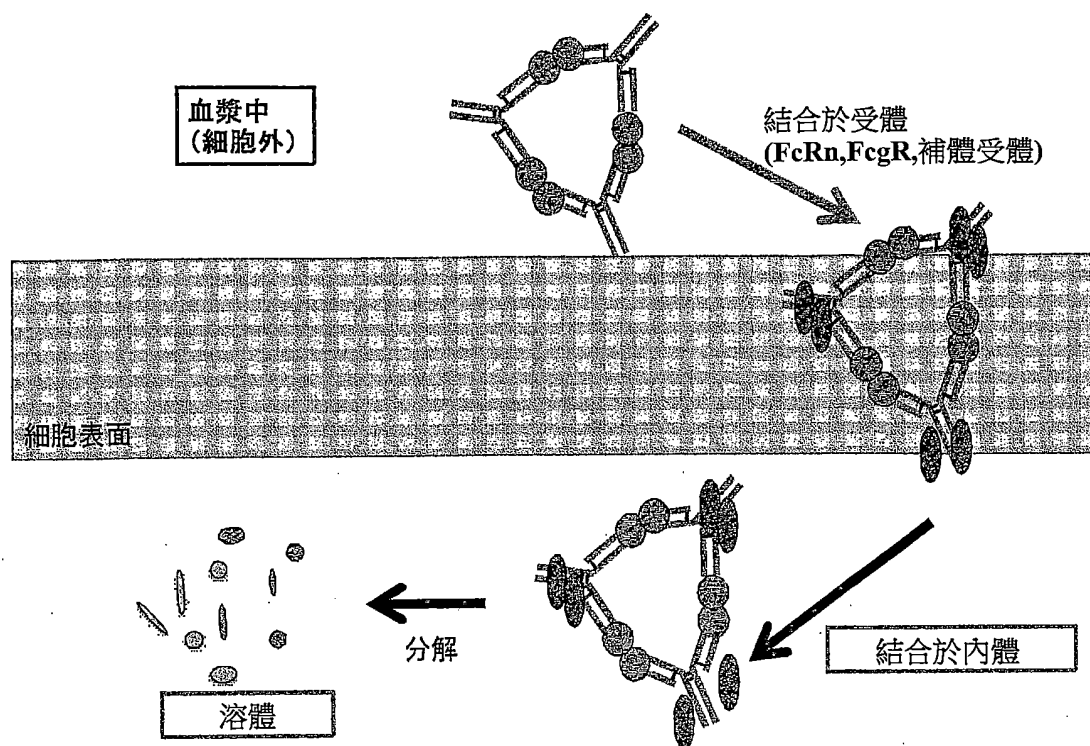
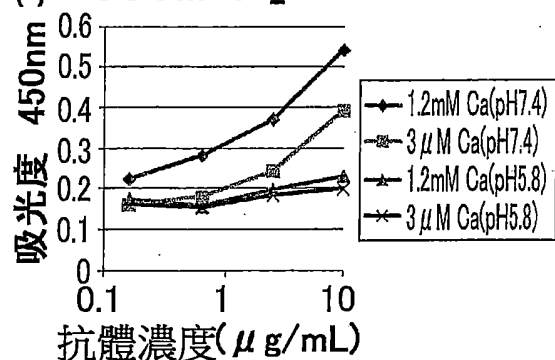
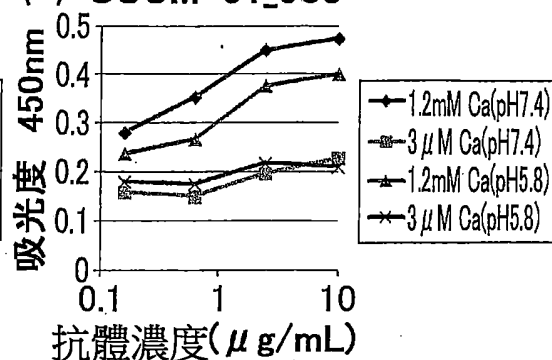


圖26

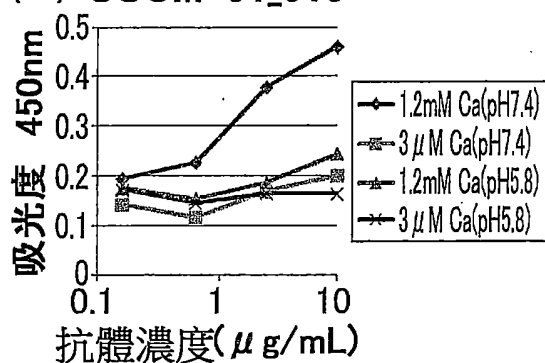
(i) CSCM-01_005



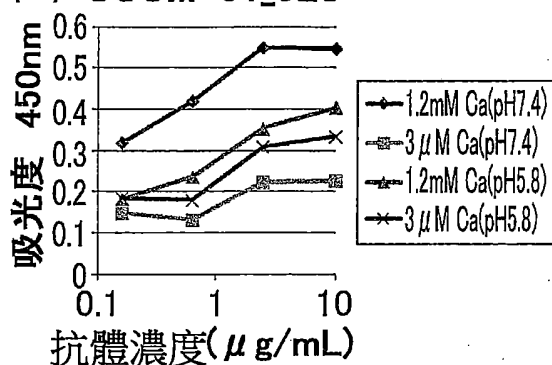
(ii) CSCM-01_009



(iii) CSCM-01_015



(iv) CSCM-01_023



(v)

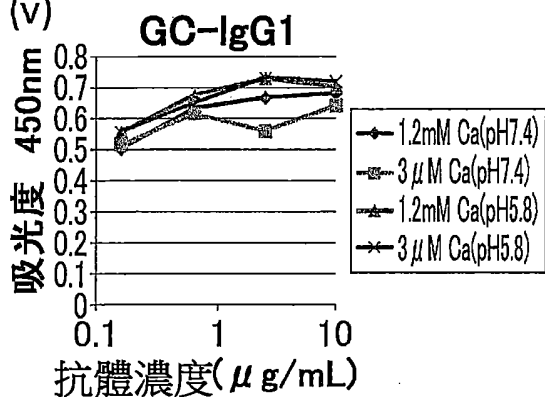


圖29

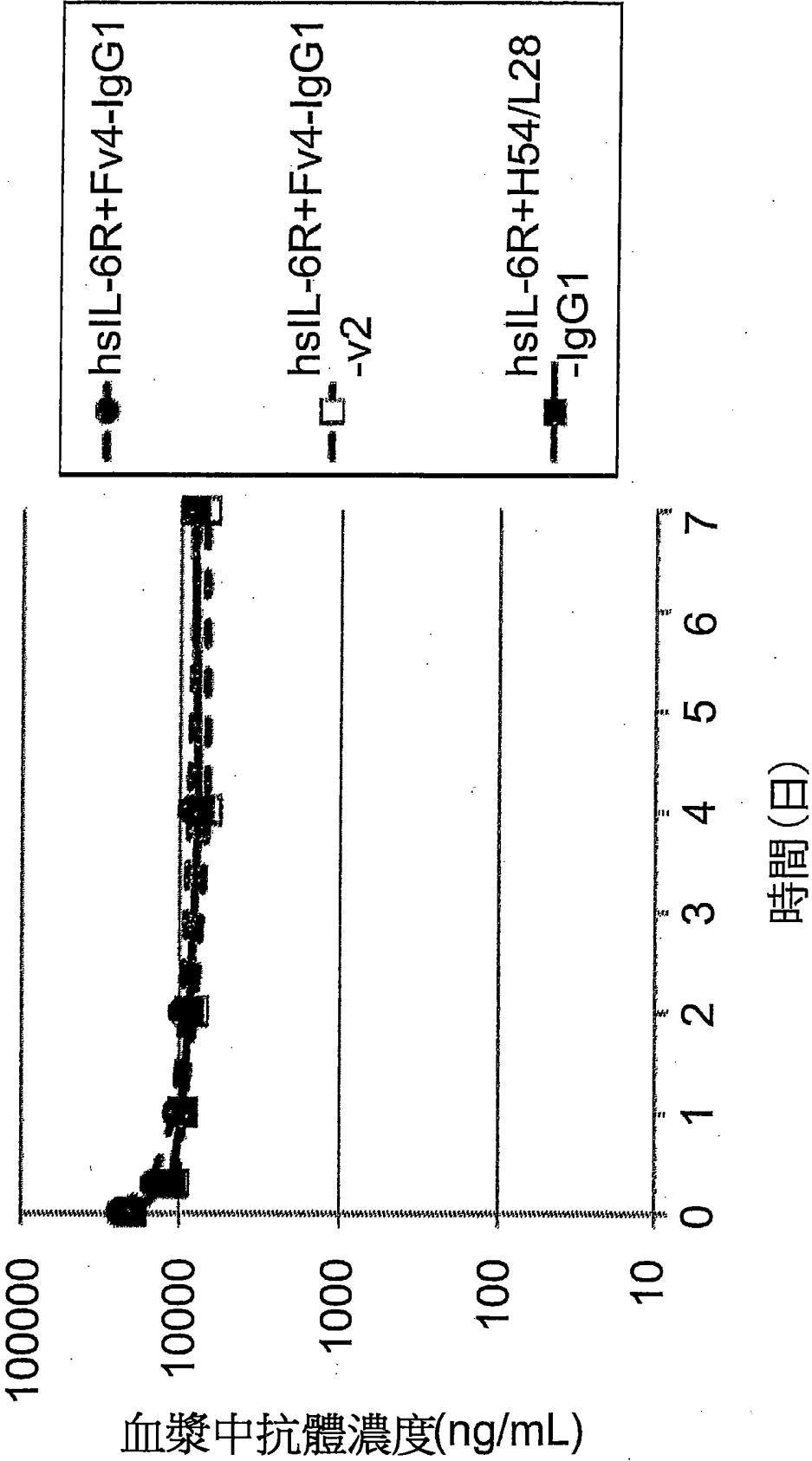


圖31

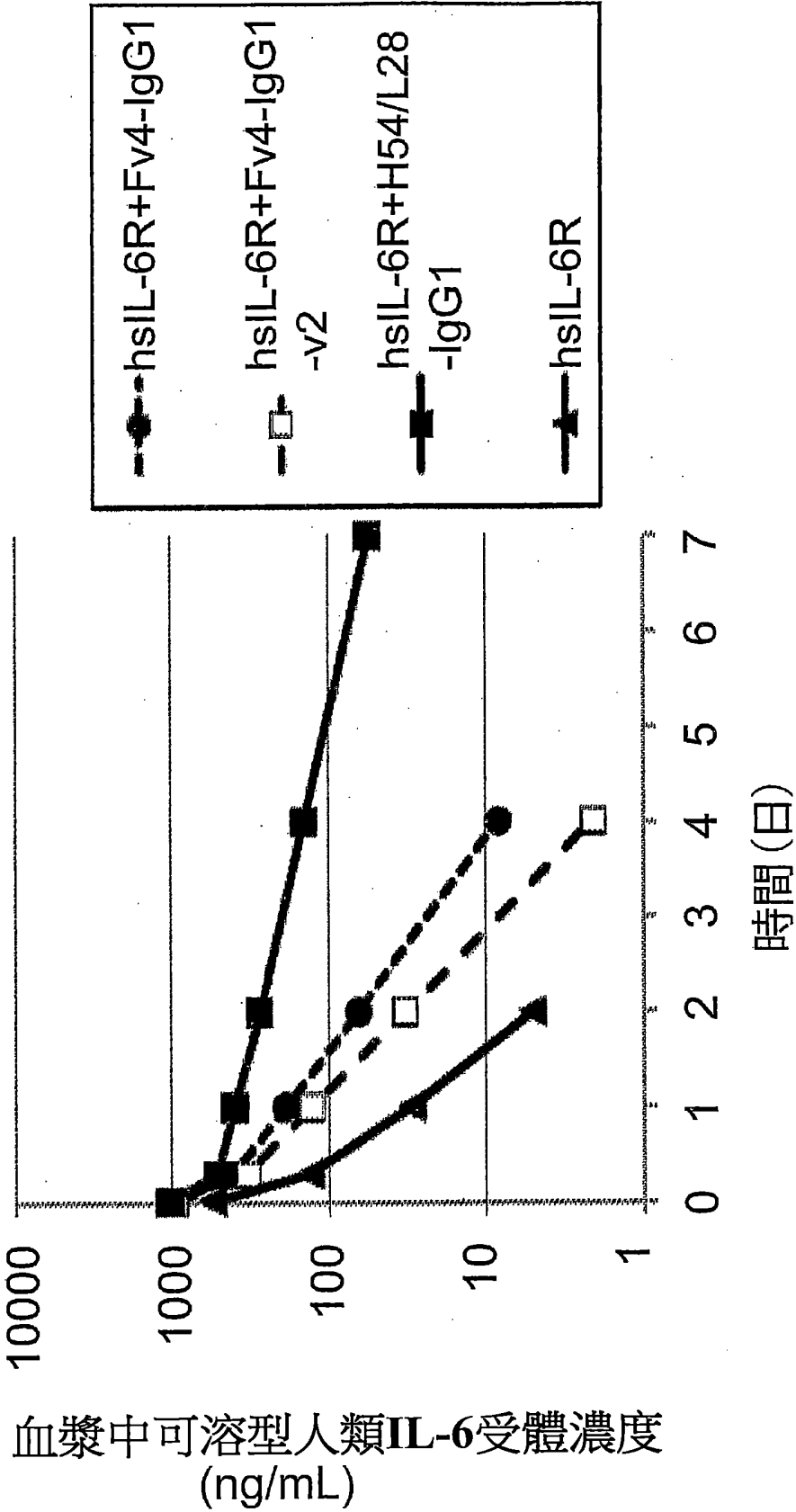


圖32

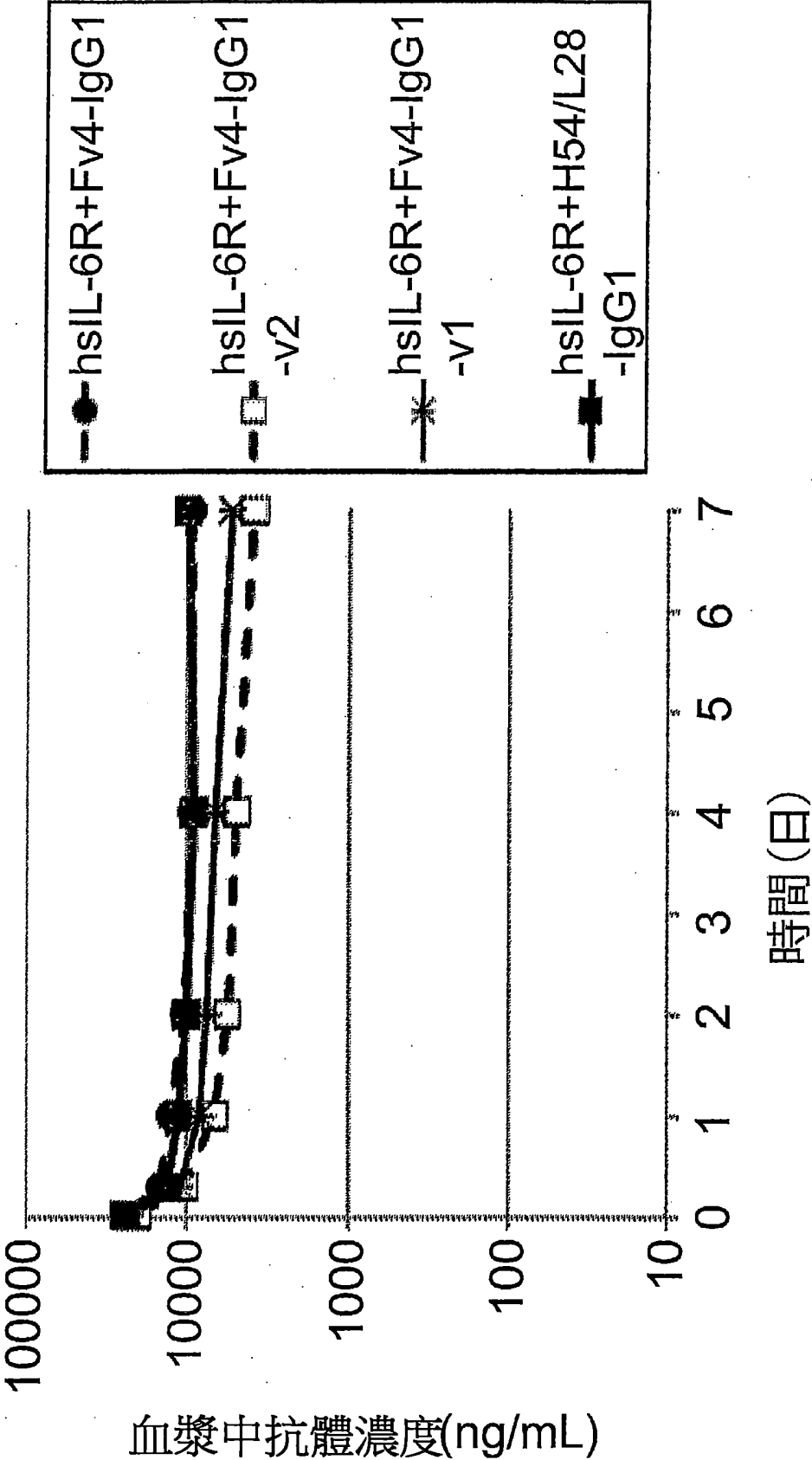


圖33

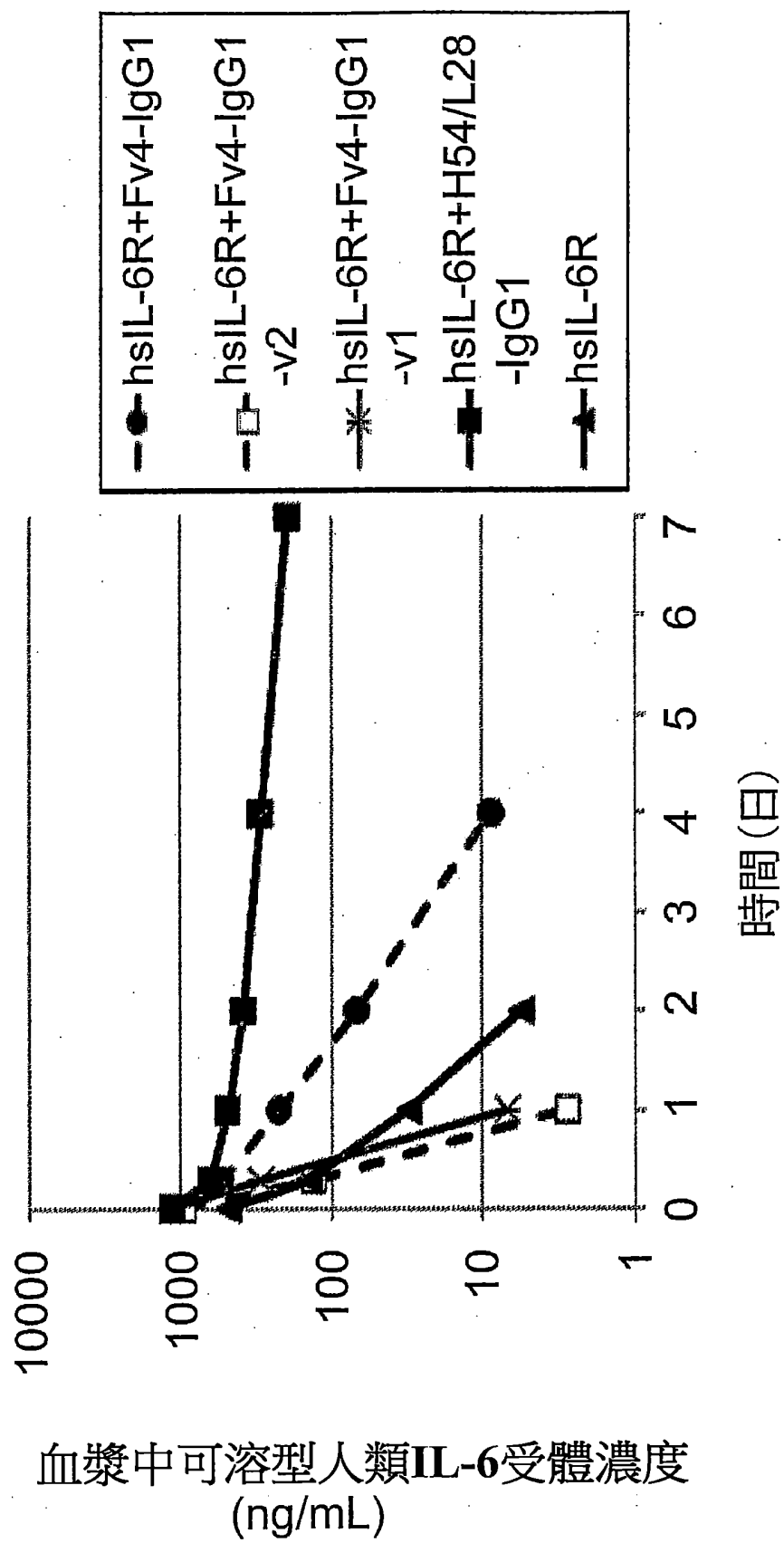


圖34

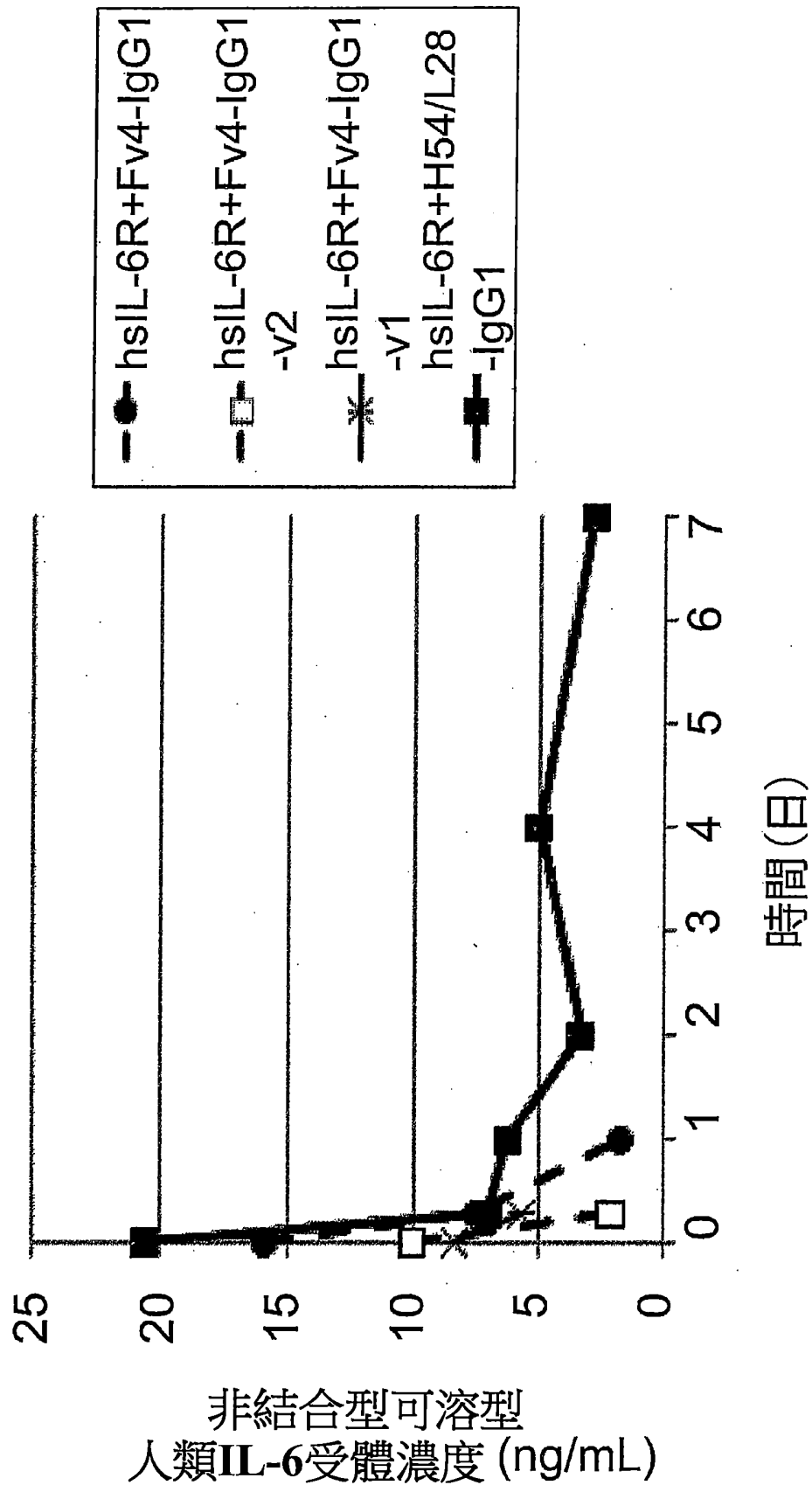


圖35

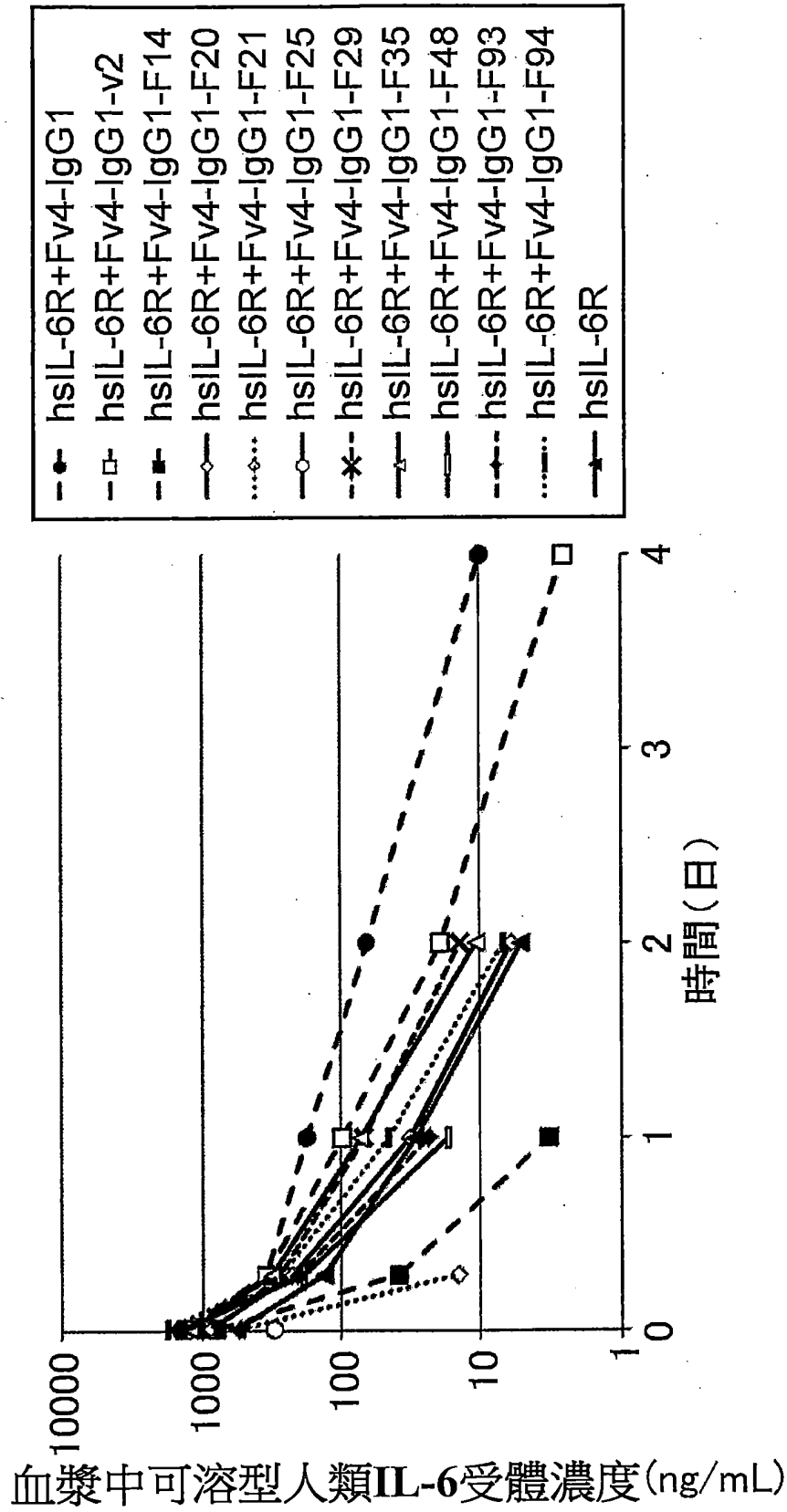


圖36

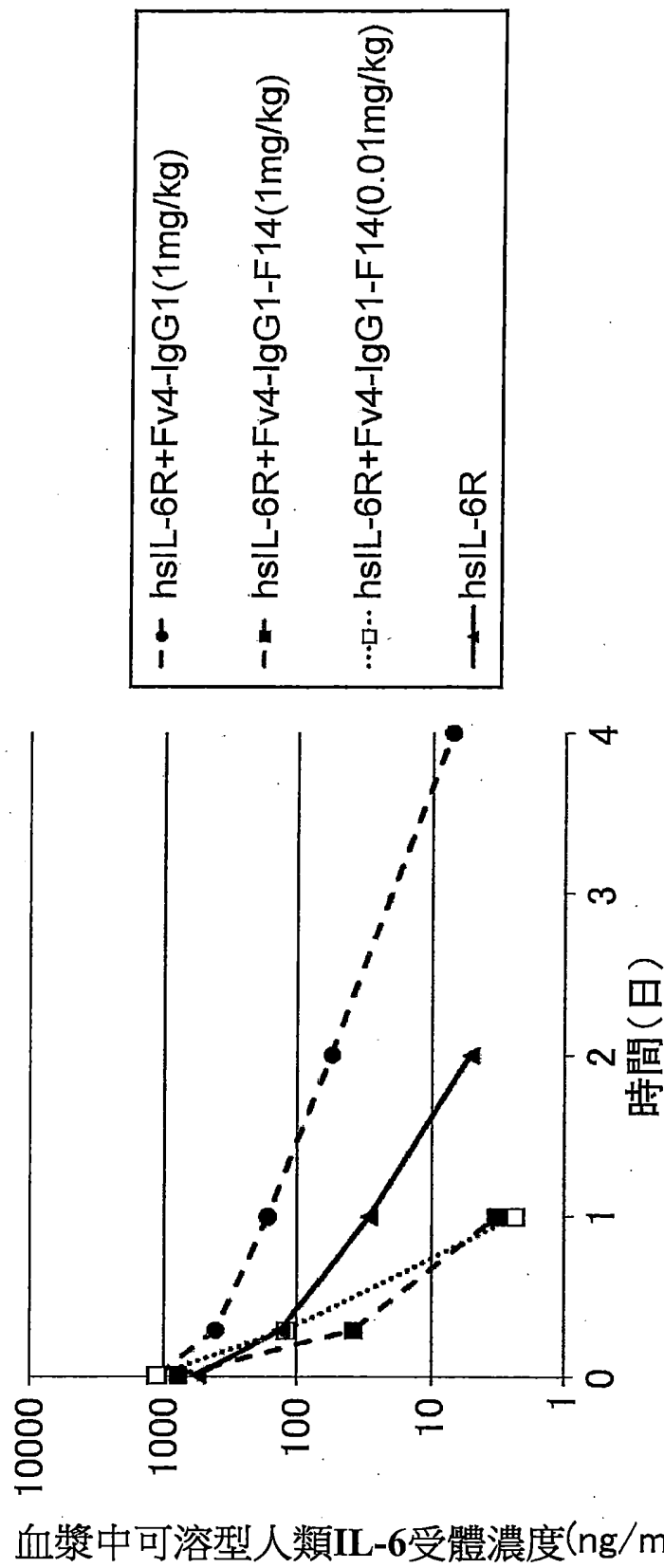


圖37

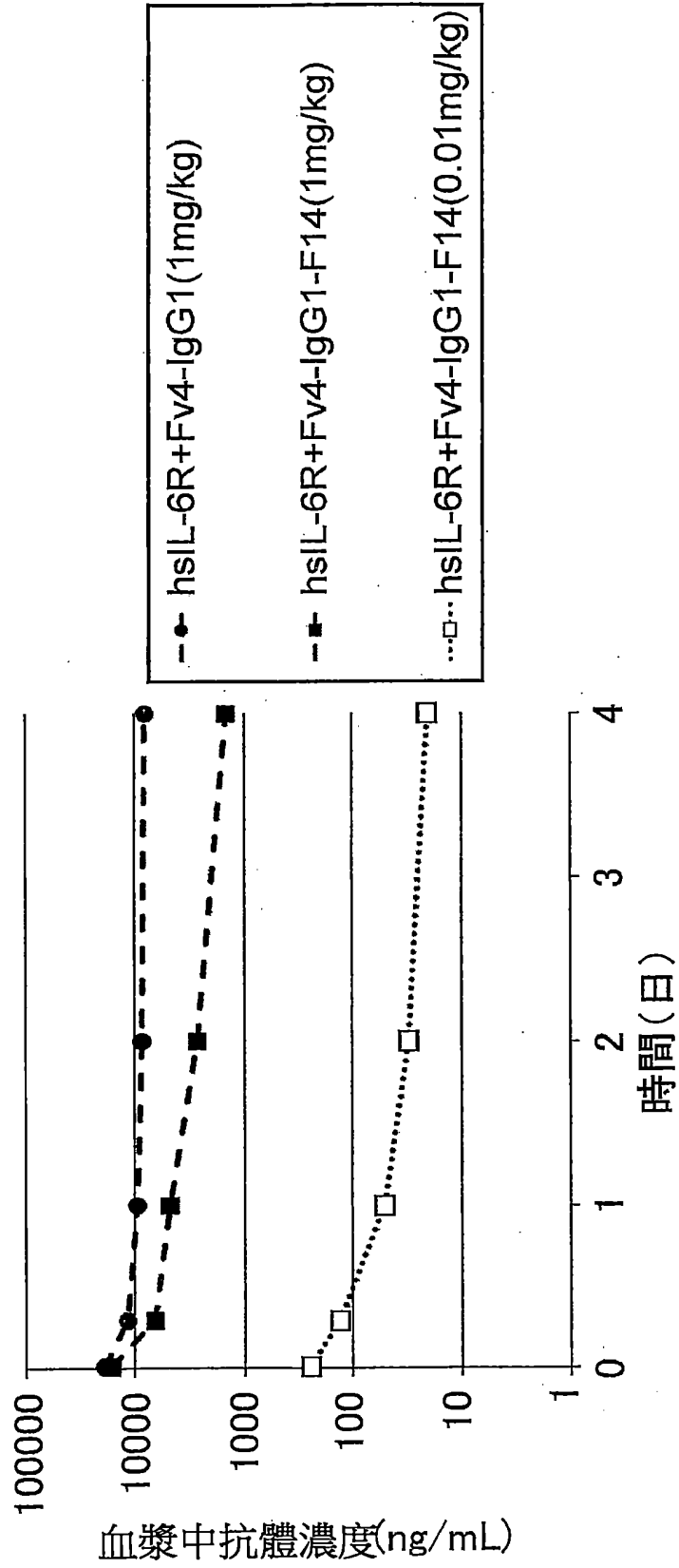


圖38

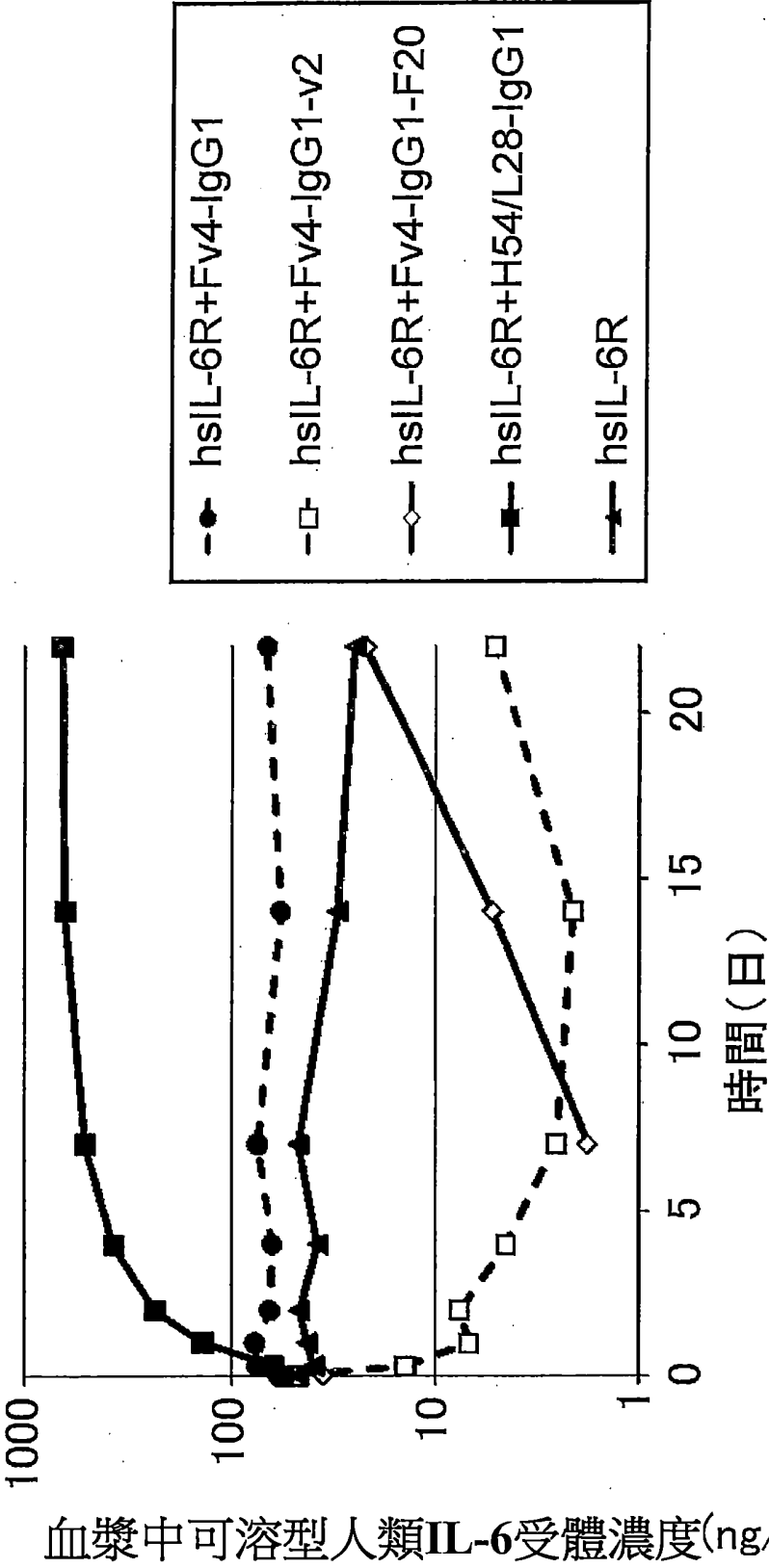


圖39

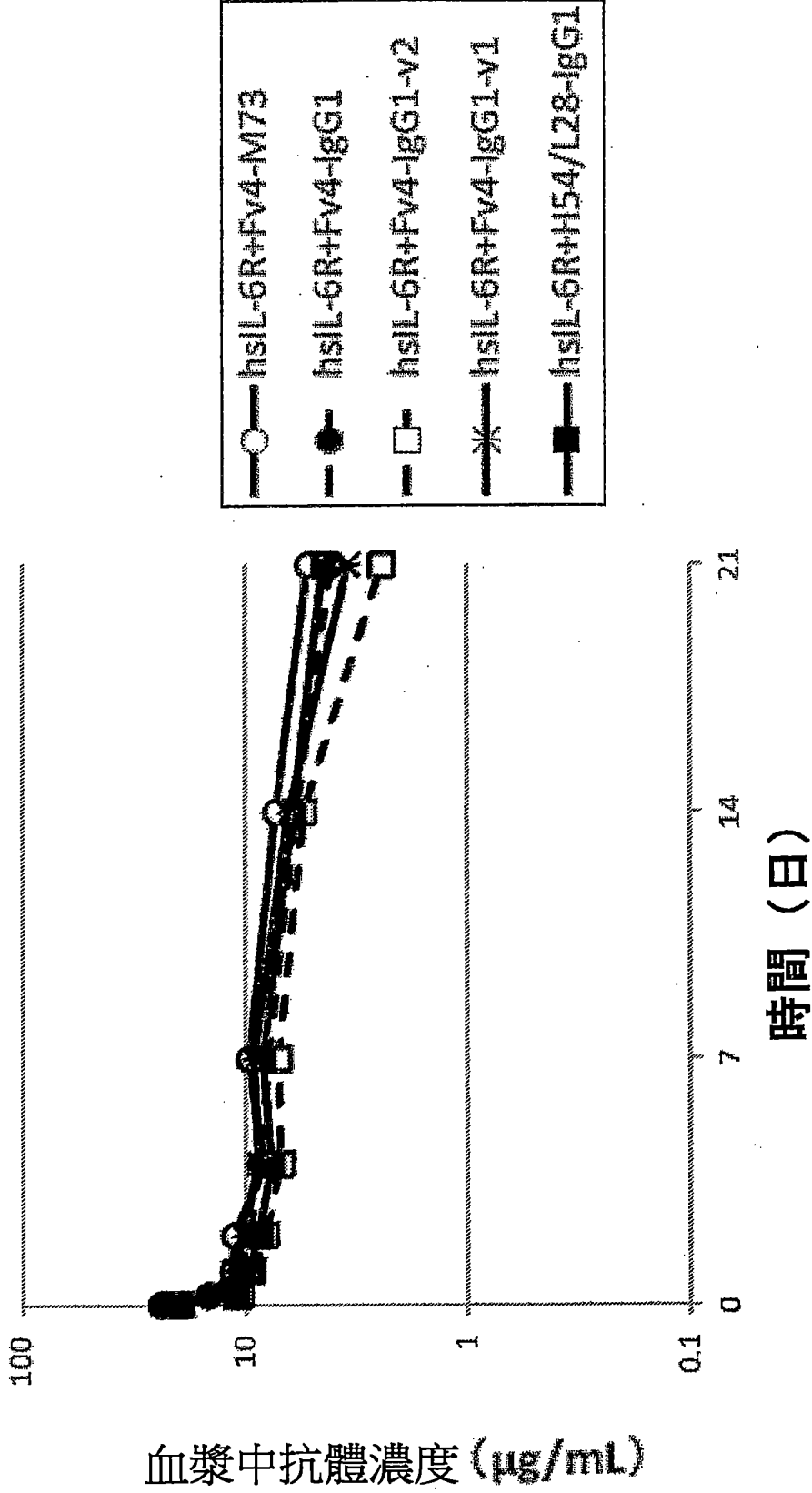


圖40

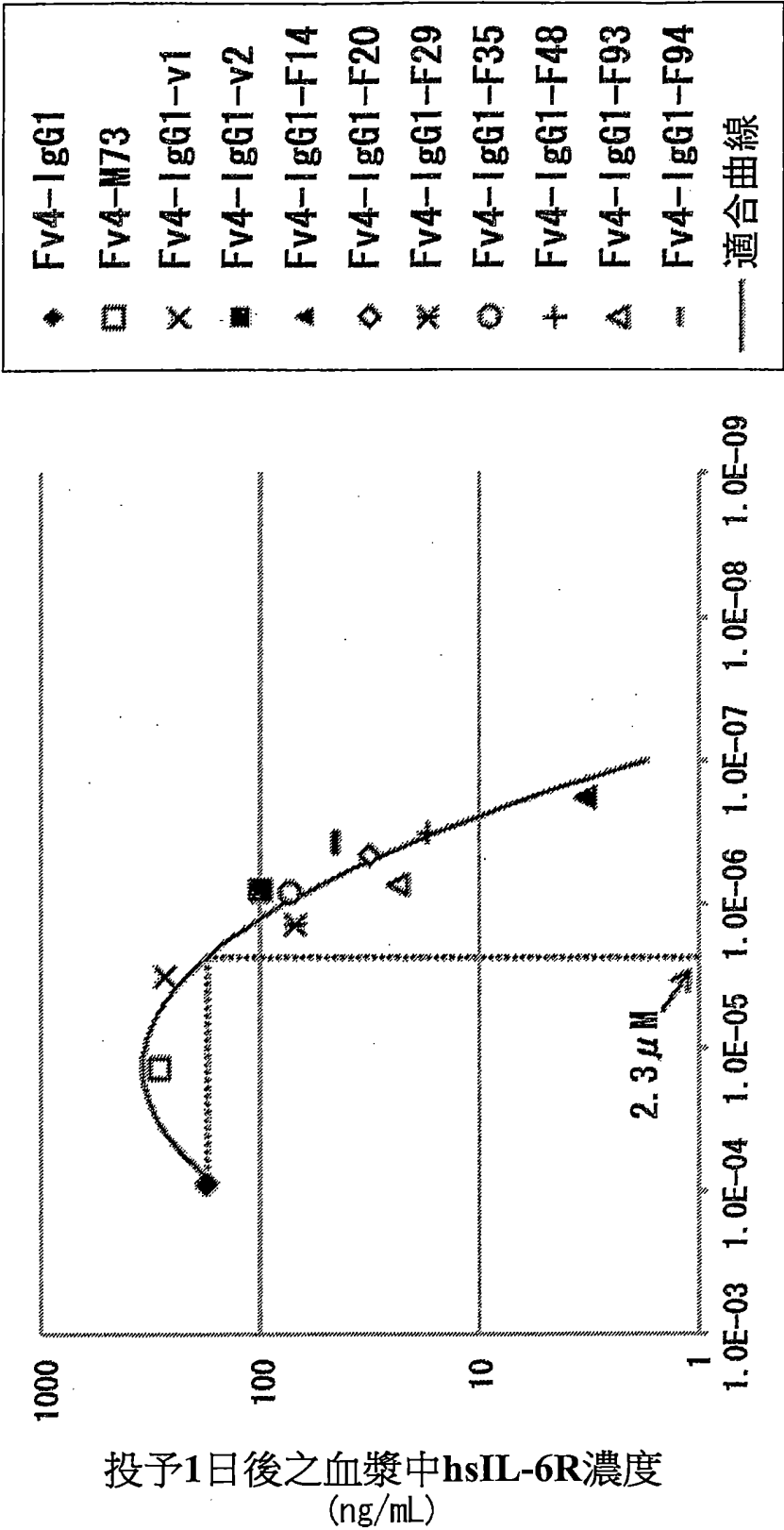


圖42

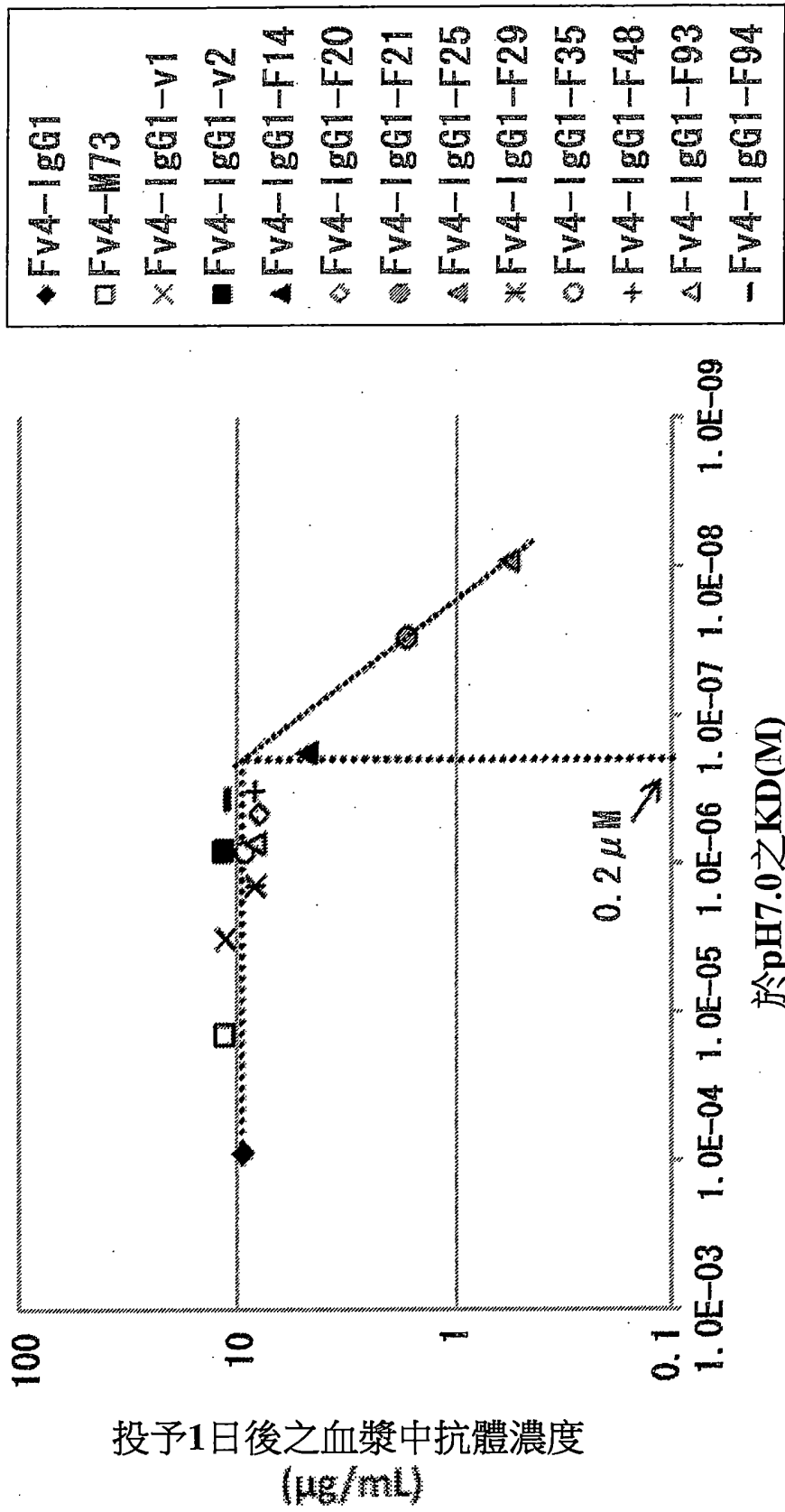


圖 43

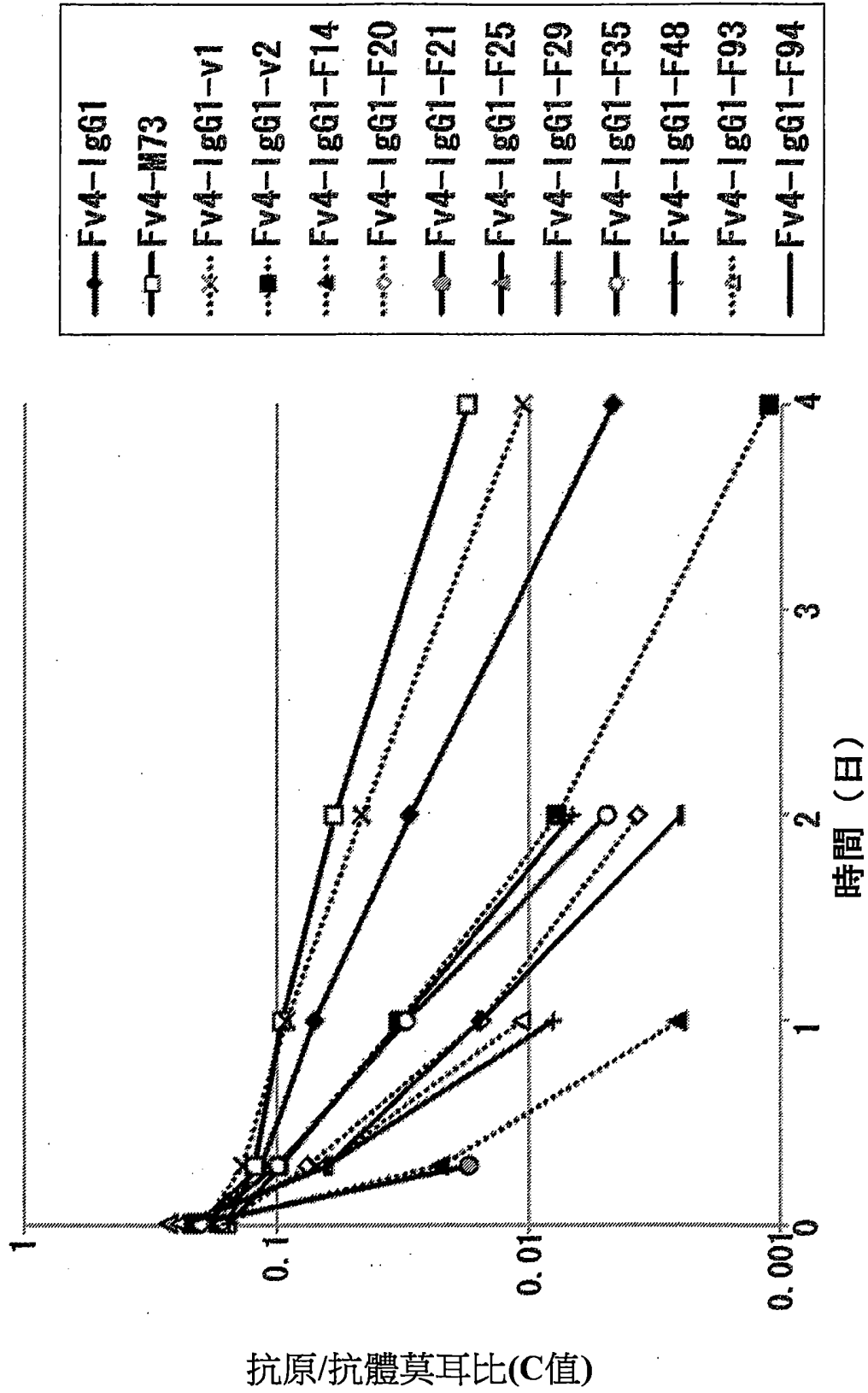


圖44

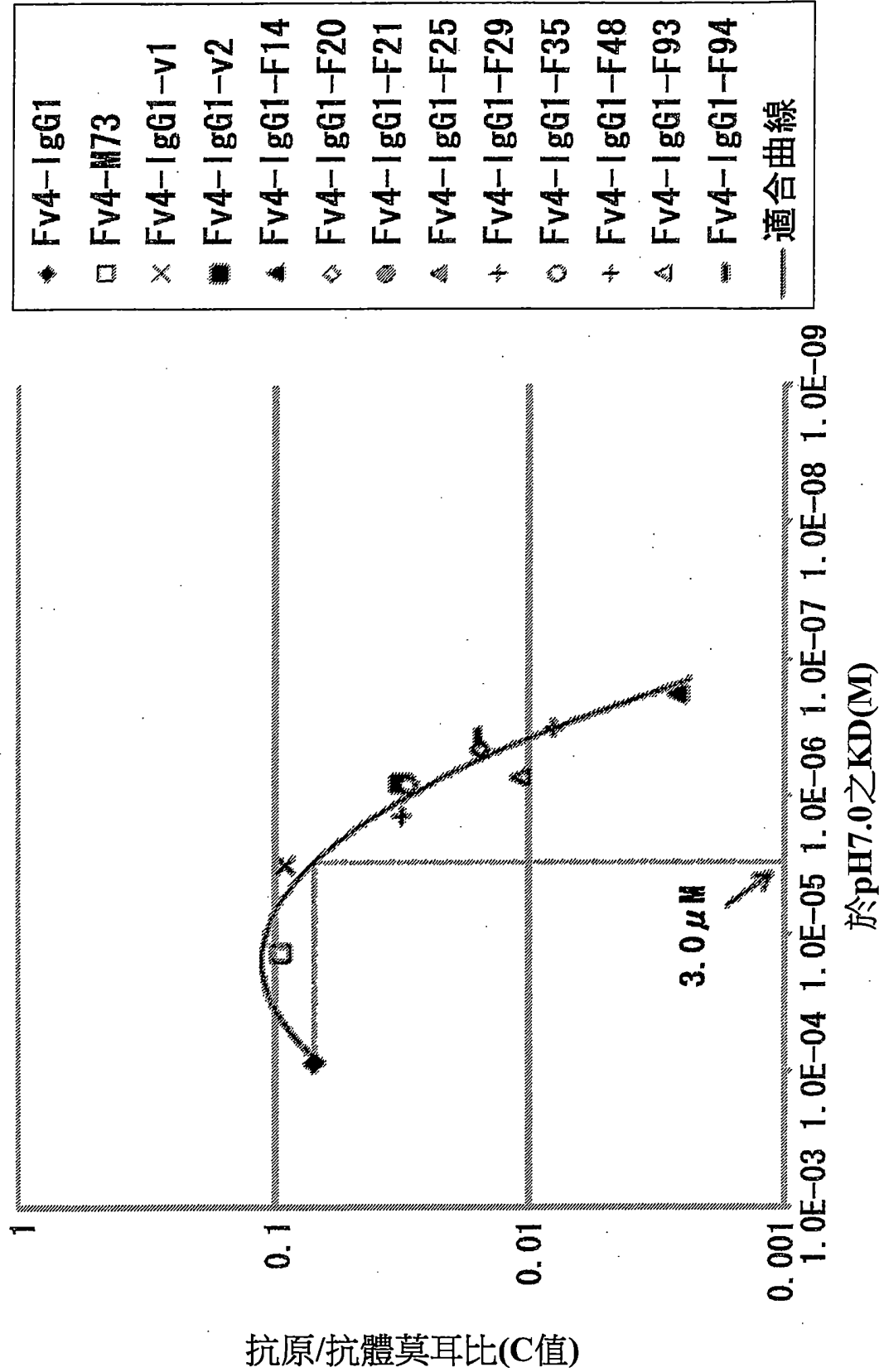


圖45

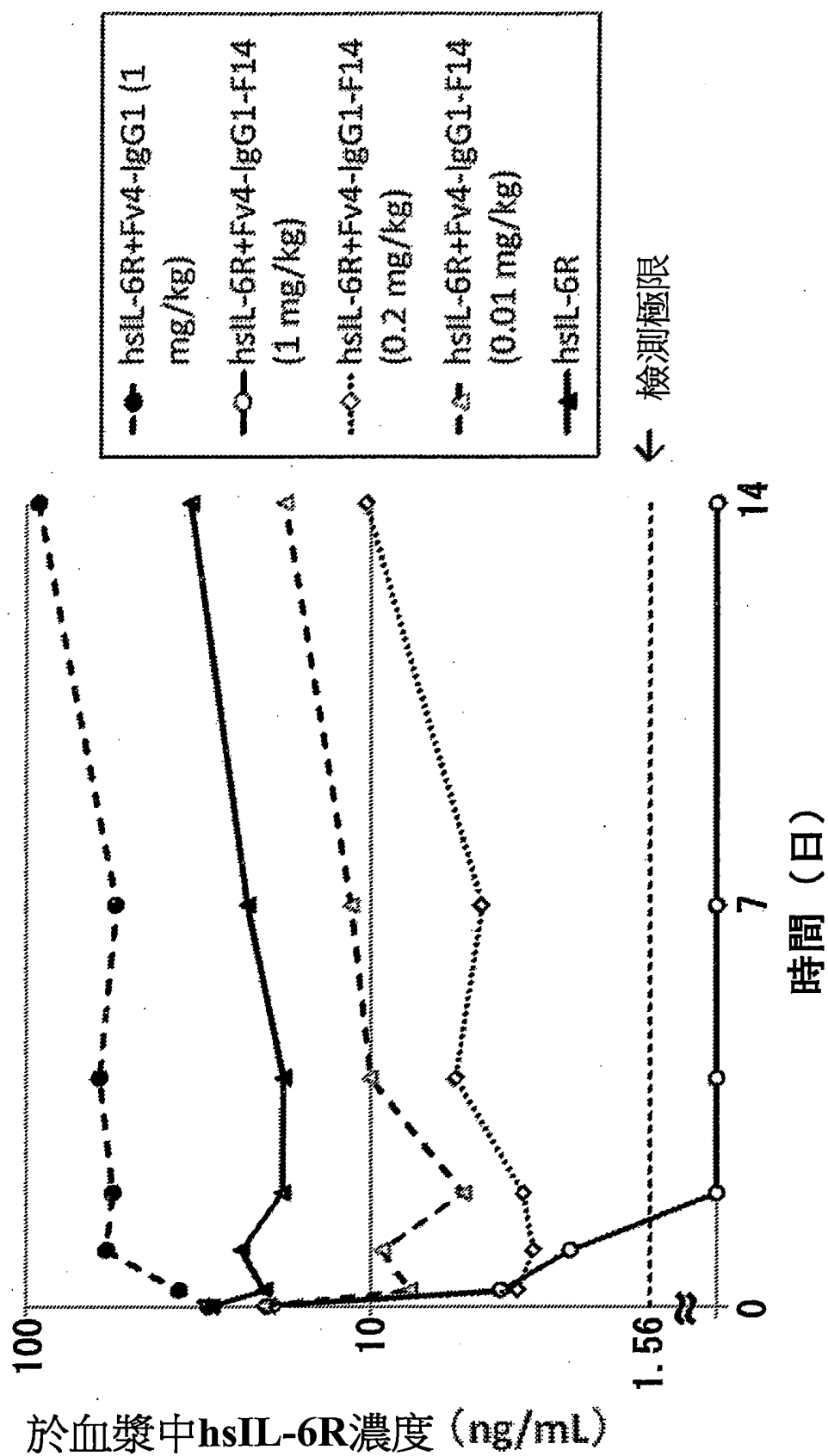


圖 46

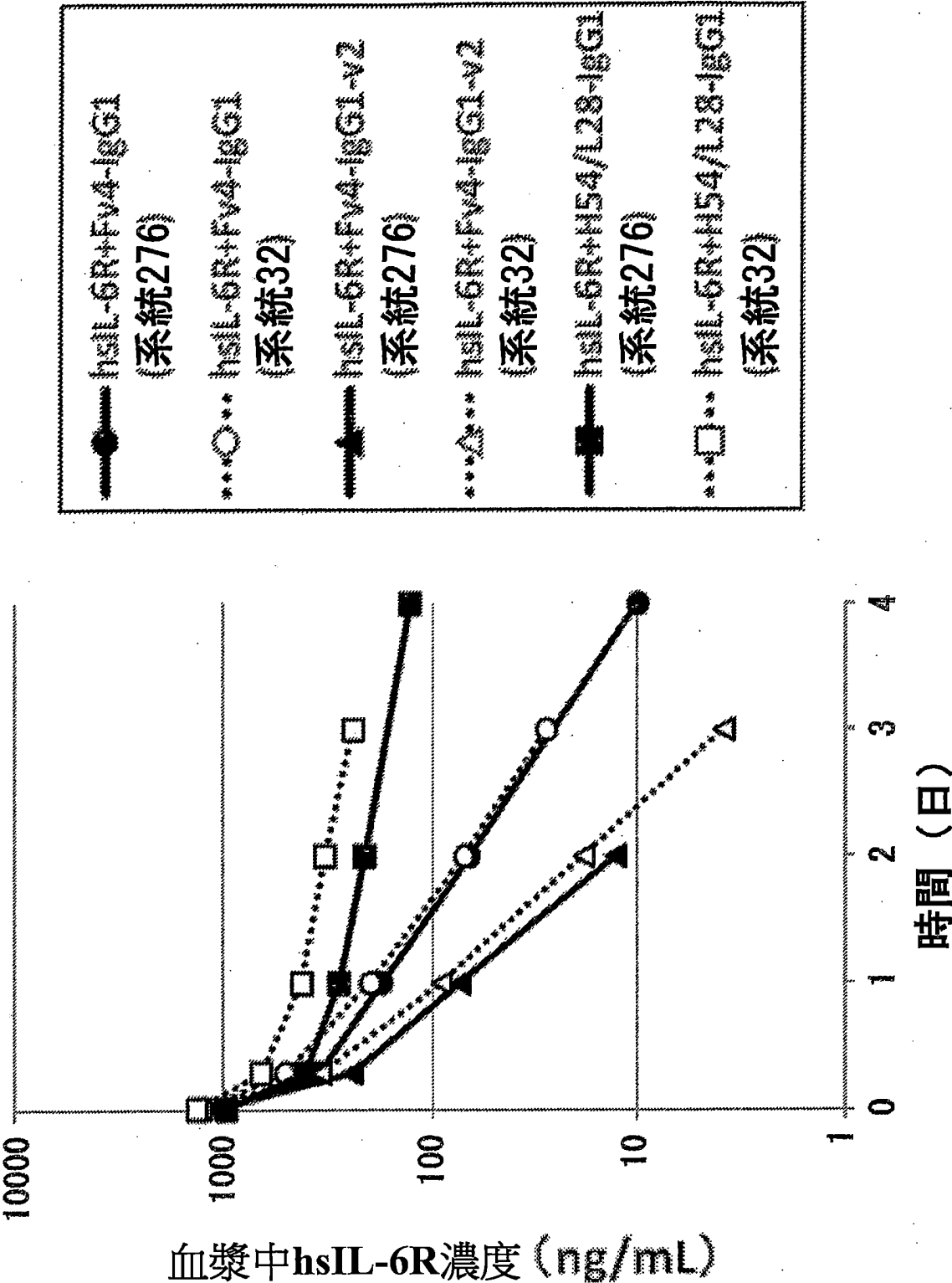


圖47

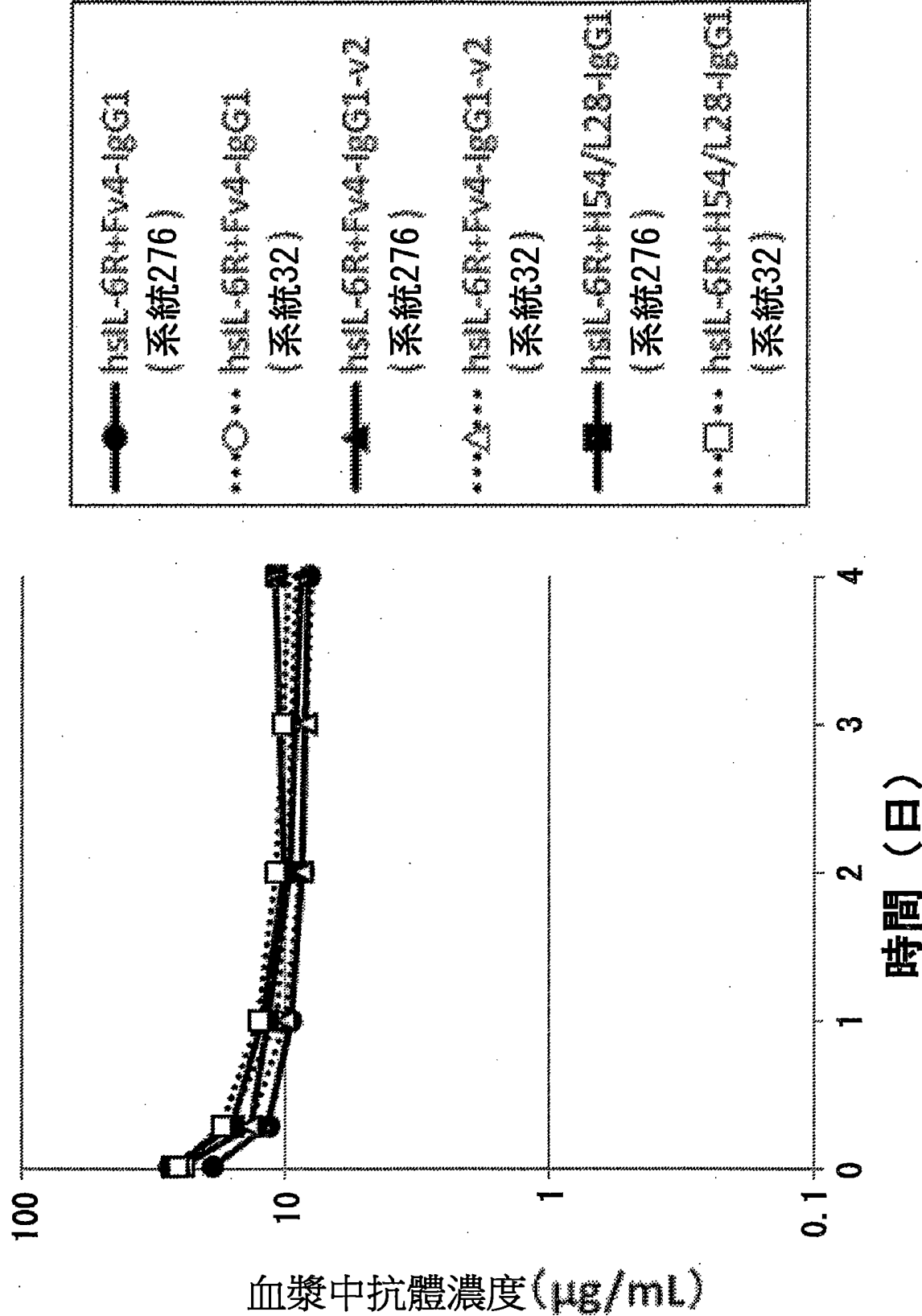


圖48

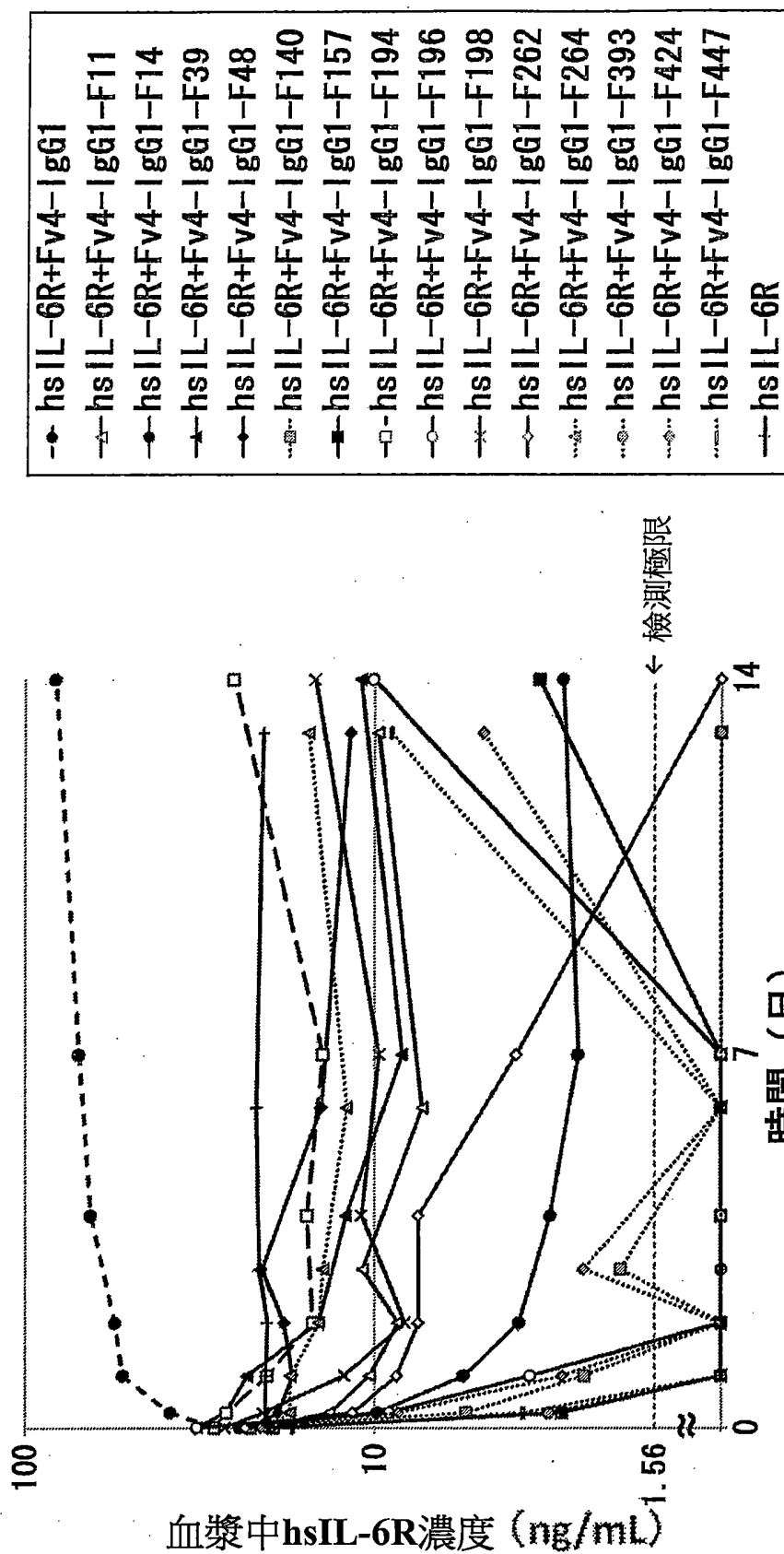


圖49

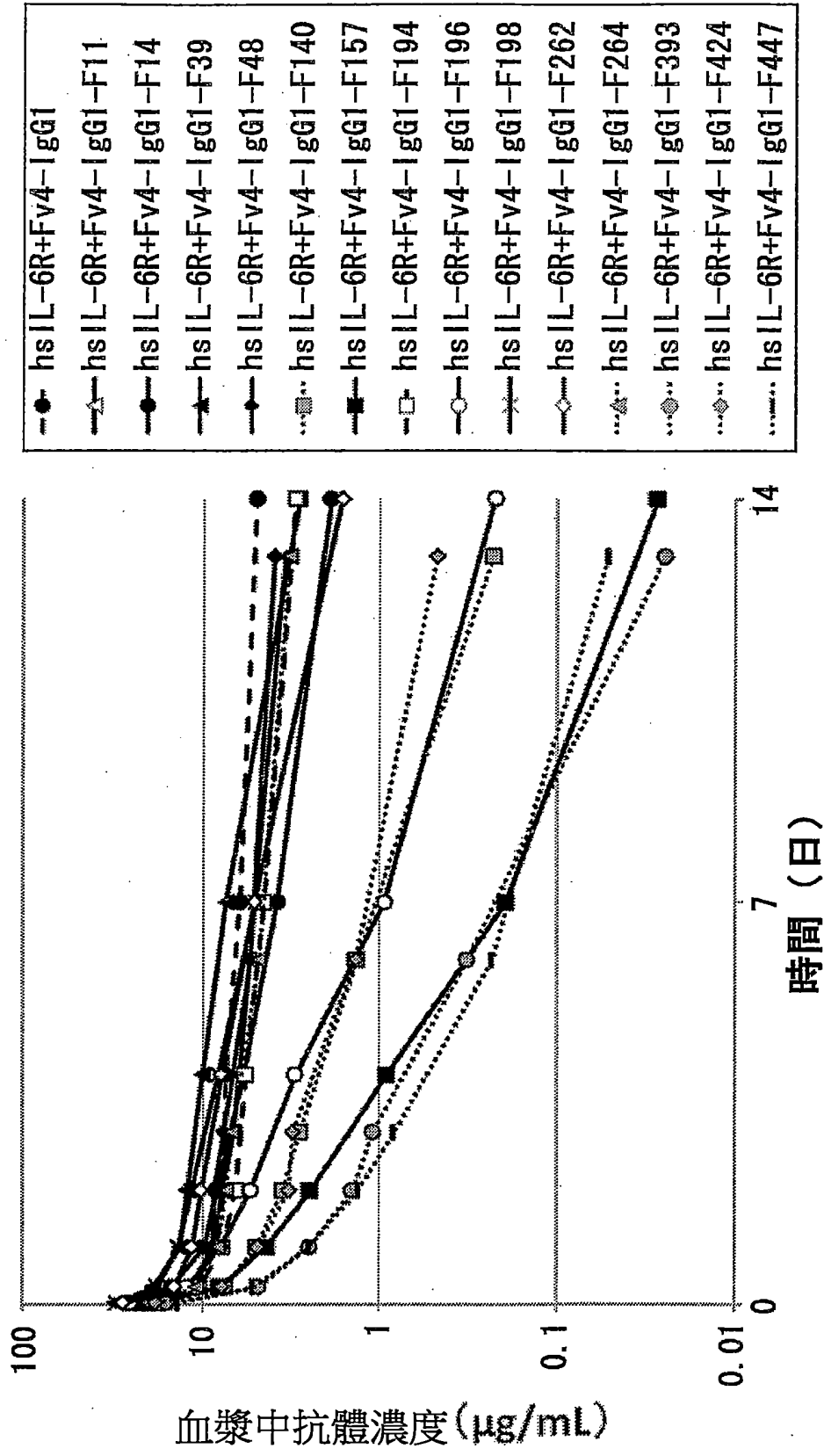


圖50

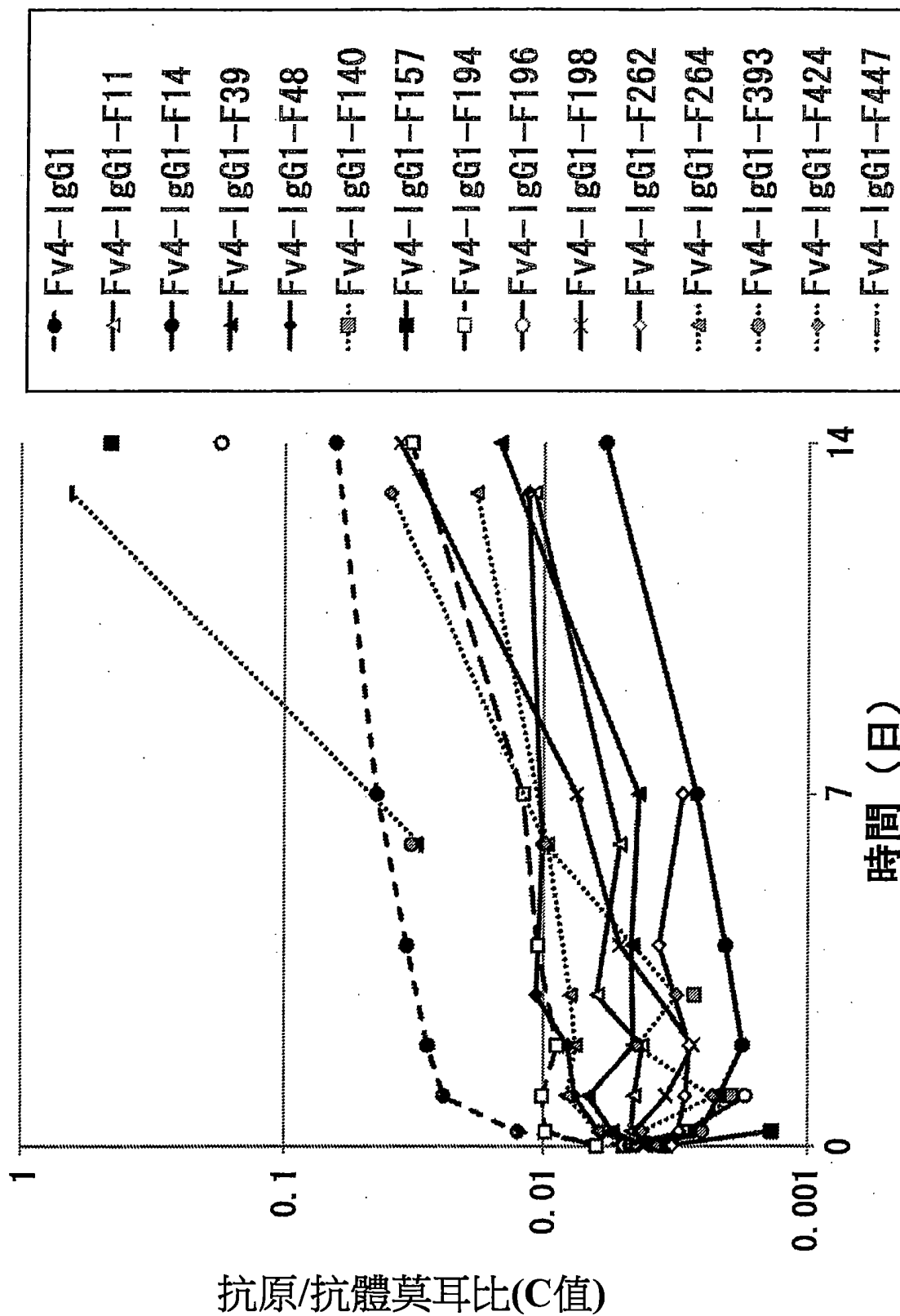


圖 51

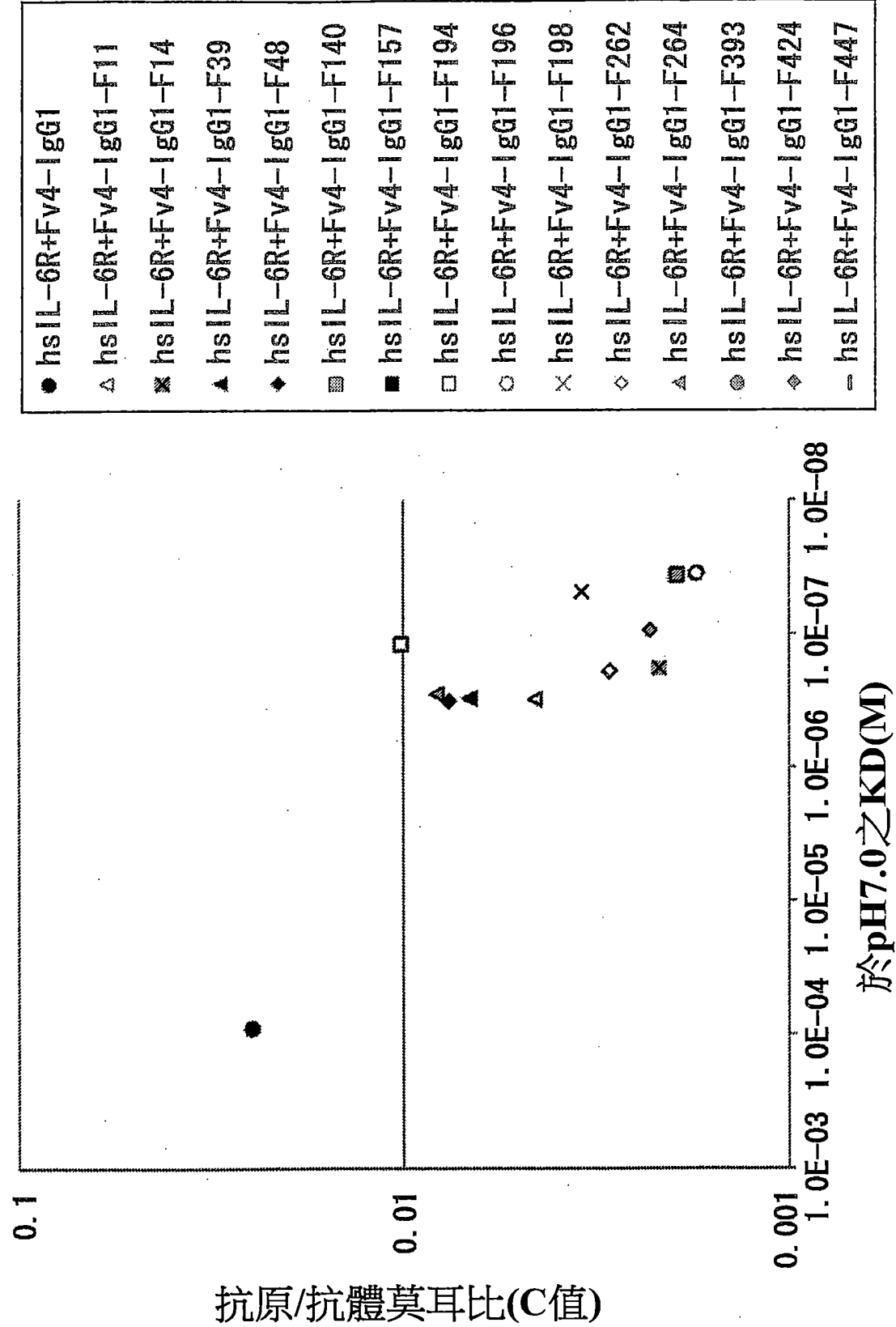


圖52

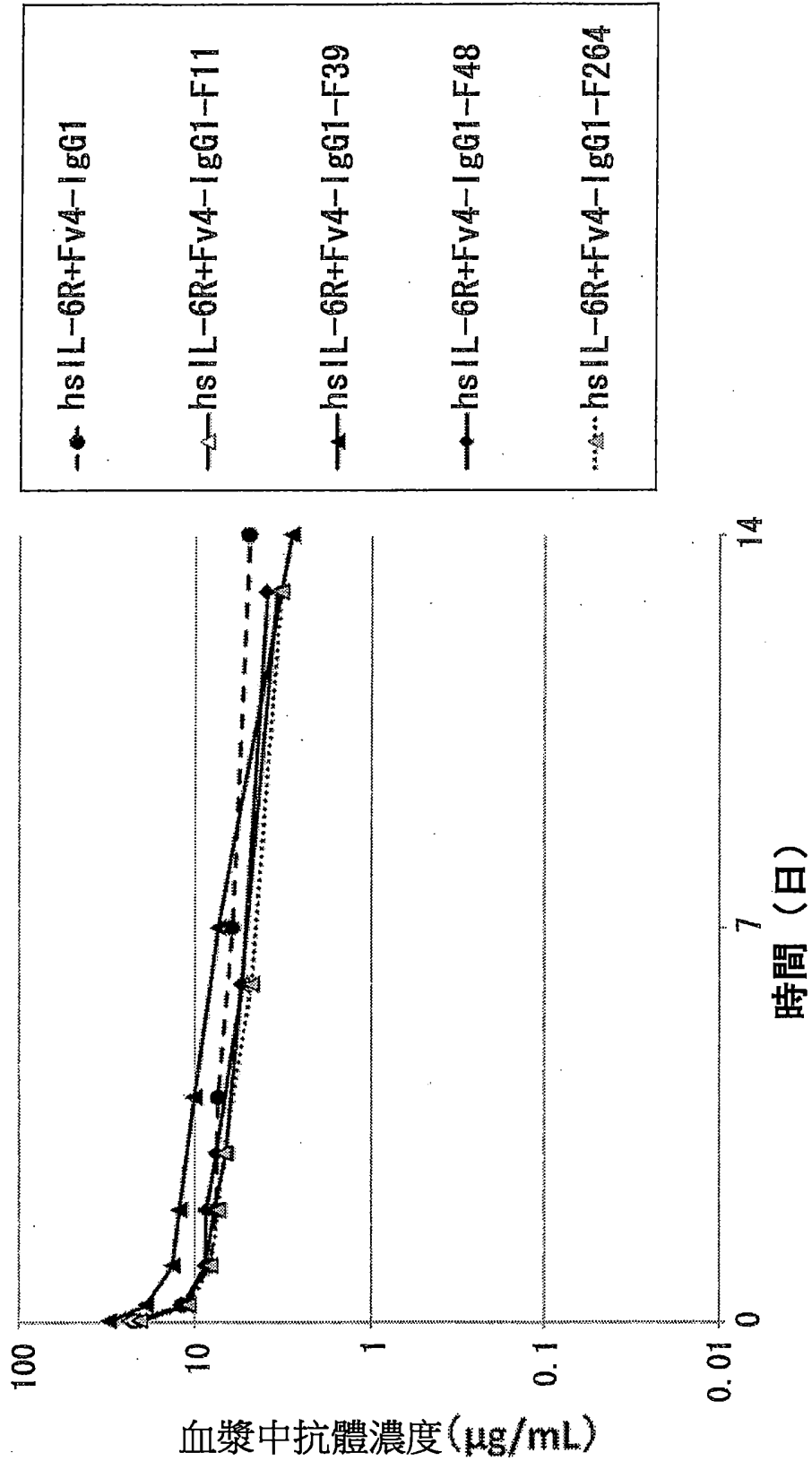


圖 53

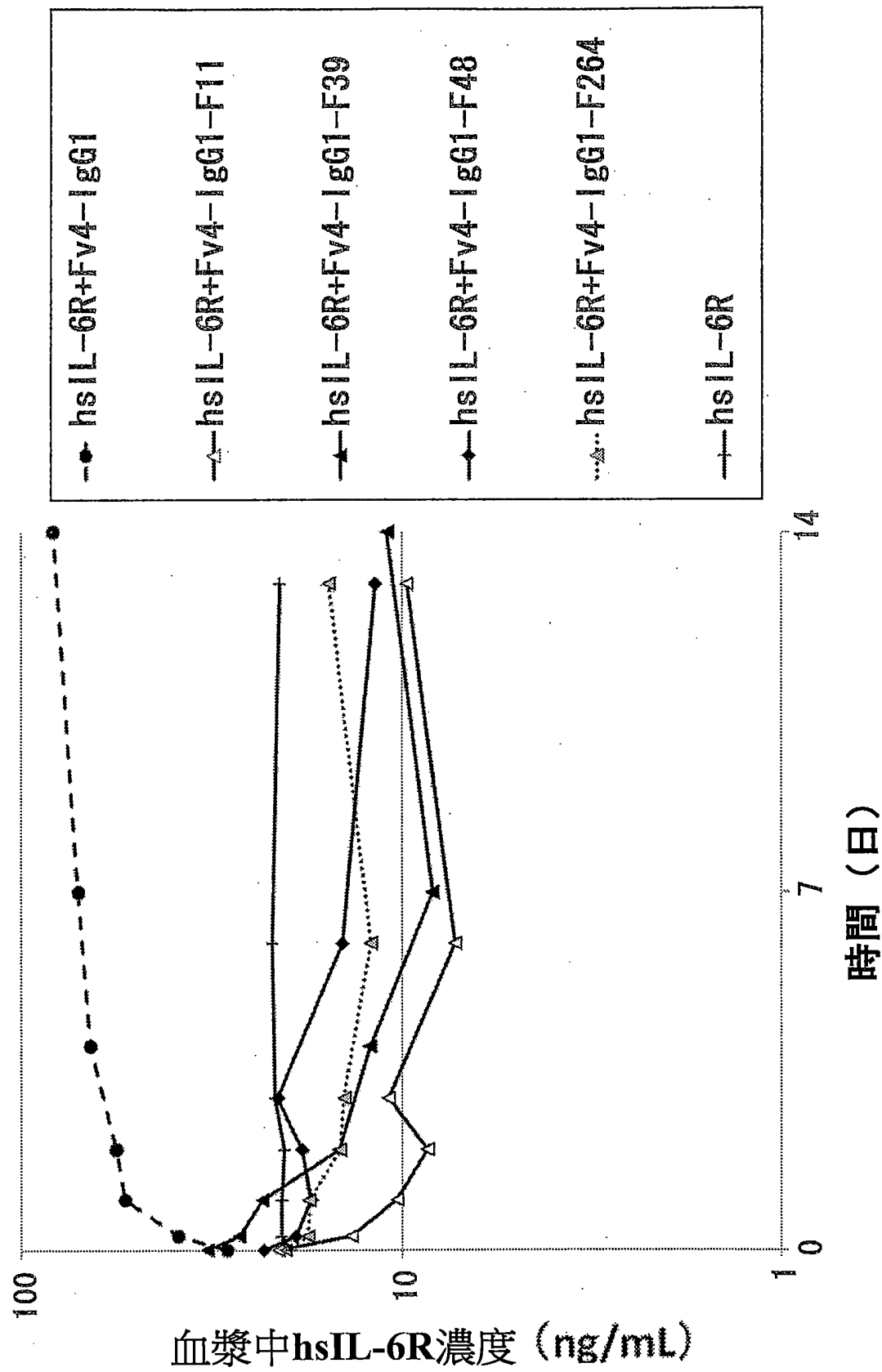


圖54

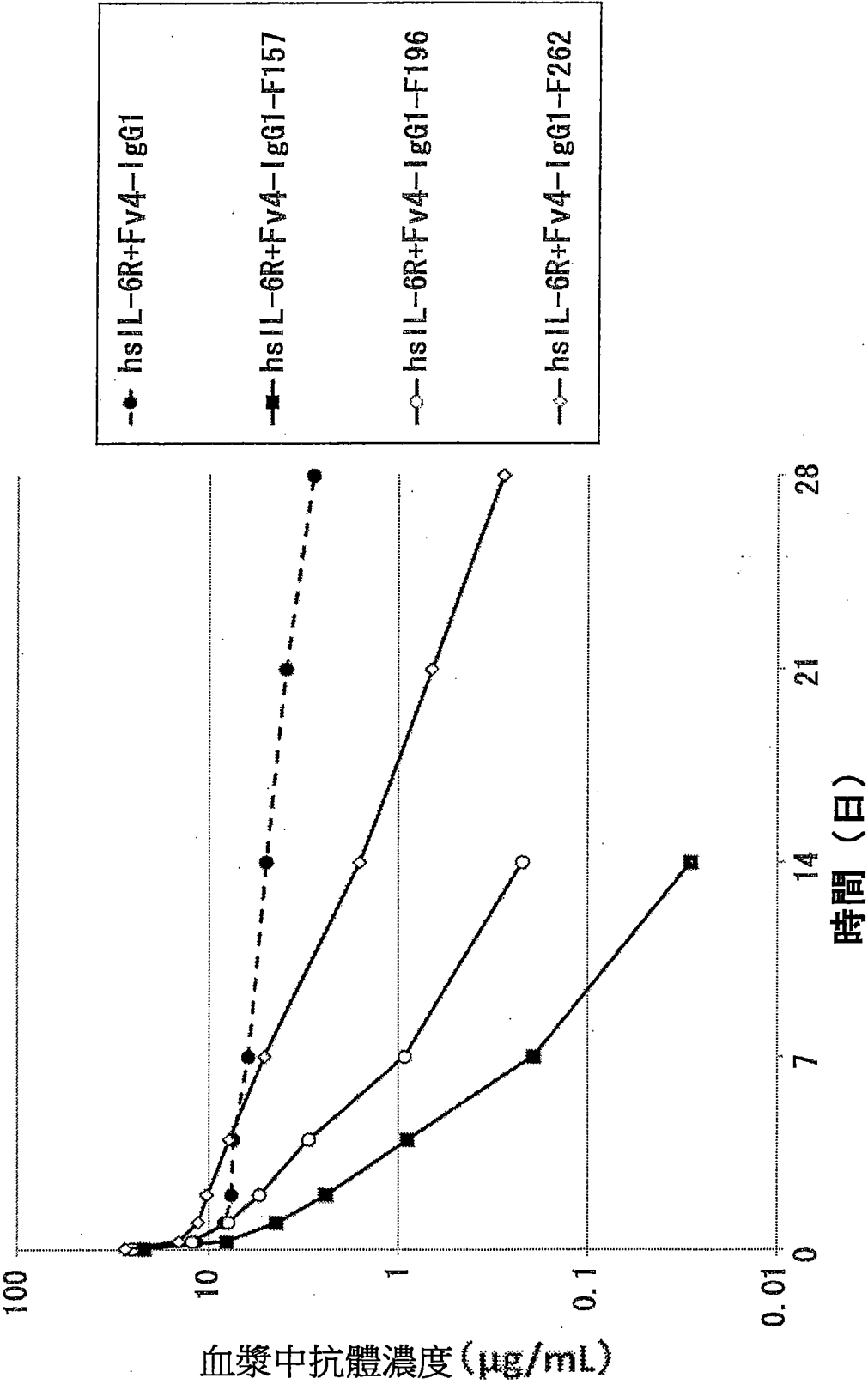


圖55

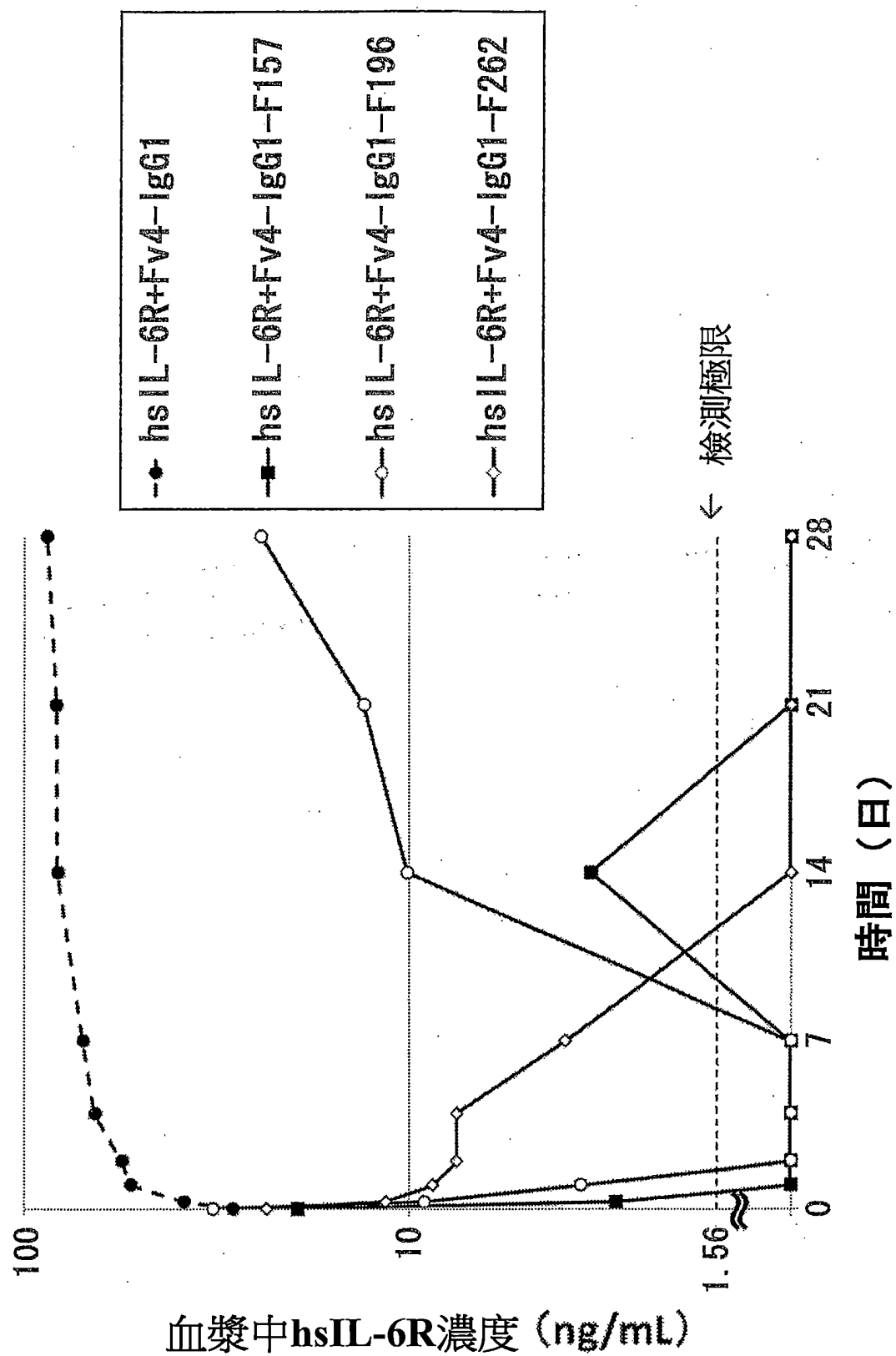


圖56