



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I766939 B

(45)公告日：中華民國 111 (2022) 年 06 月 11 日

(21)申請案號：107103057

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 05 月 30 日

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

A61K39/395 (2006.01)

(30)優先權：2012/05/30 日本

2012-123781

2012/08/09 日本

2012-177311

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

日本

(72)發明人：井川智之 IGAWA, TOMOYUKI (JP)；丹波茂郎 TAMBA, SHIGERO (JP)；辰巳加奈子 TATSUMI, KANAKO (JP)；清水駿 SHIMIZU, SHUN (JP)；門野正次郎 KADONO, SHOJIRO (JP)

(74)代理人：洪澄文

(56)參考文獻：

US 2006/0141456A1

WO 2008/092117A2

WO 2009/086320A1

期刊 Lukash D et al. "Hypoxia-dependent anti-inflammatory pathways in protection of cancerous tissues" Cancer Metastasis Reviews Vol. 26 Springer 2007/04 P.273-279

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：38 項 圖式數：45 共 590 頁

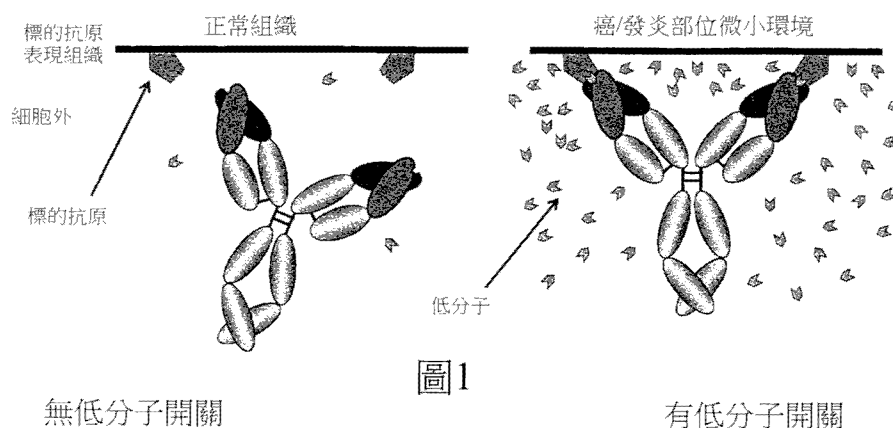
(54)名稱

標的組織專一的抗原結合分子

(57)摘要

本案發明人等發現藉由創作包含依存於標的組織專一性的化合物濃度而改變對抗原的結合活性的抗原結合分子的抗原結合分子，能解決上述課題。藉由使用本發明之抗原結合分子，能標的組織專一性地治療起因於標的組織之各種疾病。

指定代表圖：



I766939

發明摘要

【發明名稱】（中文/英文）

標的組織專一的抗原結合分子

【中文】

本案發明人等發現藉由創作包含依存於標的組織專一性的化合物濃度而改變對抗原的結合活性的抗原結合分子的抗原結合分子，能解決上述課題。藉由使用本發明之抗原結合分子，能標的組織專一性地治療起因於標的組織之各種疾病。

【英文】

無。

【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。

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)

標的組織專一的抗原結合分子

【技術領域】

【0001】 本發明提供一種抗原結合分子，包含會因應標的組織專一的化合物的濃度而改變對抗原之結合活性之抗原結合分子，並提供該抗原結合分子之製造方法及篩選方法、以及包含該抗原結合分子之醫藥組合物。

【先前技術】

【0002】 抗體在血漿中之安定性高，副作用也少，所以作為醫藥品受到重視。其中 IgG 型抗體醫藥已有多數上市，現在也有許多抗體醫藥正在開發(非專利文獻 1、及非專利文獻 2)。

【0003】 作為使用抗體醫藥之癌治療藥，至今已認可對抗 CD20 抗原之 Rituximab、對抗 EGFR 抗原之 Cetuximab、對抗 HER2 抗原之 Herceptin 等(非專利文獻 3)。該等抗體分子係藉由結合於在癌細胞表現之抗原，並利用 ADCC 等發揮對癌細胞之傷害活性。如此之治療用抗體利用 ADCC 等之細胞傷害活性，已知依存於在標的細胞表現之抗原之數目(非專利文獻 4)，所以，從治療用抗體之效果之觀點，成為標的之抗原之表現量高者較佳。但是抗原表現量即使高，若抗原係表現在正常組織，會對正常細胞發揮 ADCC 等傷害活性，故副作用會成為大問題。所以，就癌治療藥而言，當作治療用抗體的標的之抗原，宜於癌細胞專一性表現較佳。例如：已知係癌抗原之 EpCAM

抗原之抗體分子，雖被認為作為有前景的癌治療藥，但是，EpCAM 抗原已知在胰臟也會表現，據報告，實際上在臨床試驗藉由投予抗 EpCAM 抗體，會因對胰臟之細胞傷害活性而觀察到胰炎的副作用(非專利文獻 5)。

【0004】 受到利用 ADCC 活性發揮細胞傷害活性之抗體醫藥之成功，已有人報告藉由去除天然型人類 IgG1 之 Fc 區之 N 型糖鏈之岩藻醣而增強 ADCC 活性(非專利文獻 6)、利用天然型人類 IgG1 之 Fc 區之胺基酸取代而增強對 Fc γ RIIIa 之結合以增強 ADCC 活性(非專利文獻 7)等，以發揮強大之細胞傷害活性之第二世代之改良抗體分子。作為上述 NK 細胞中介之 ADCC 活性以外之機制，也有人報告:作為對癌細胞發揮傷害活性之抗體醫藥，將有強力細胞傷害活性之藥物與抗體接合而得之 Antibody Drug Conjugate(ADC)(非專利文獻 8)、及藉由使癌細胞中補充(recruit)T 細胞而發揮對癌細胞之傷害活性之低分子抗體(非專利文獻 9)等發揮更強大之細胞傷害活性之改良抗體分子。

【0005】 如此之發揮更強大細胞傷害活性之抗體分子，即使對抗原表現不多之癌細胞，仍能發揮細胞傷害活性，另一方面，即使對抗原表現少之正常組織也會同樣發揮細胞傷害活性。實際上，相較於對抗 EGFR 抗原之天然型人類 IgG1Cetuximab，對抗 CD3 與 EGFR 之雙專一性抗體 EGFR-BiTE 可藉由在癌細胞補充 T 細胞而對癌細胞發揮強大的細胞傷害活性並且發揮抗腫瘤效果。另一方面，EGFR 在正常組織也會表現，所以，EGFR-BiTE 對食蟹猴投予時被認定會出現嚴重的

副作用(非專利文獻 10)。又，使對抗在癌細胞高表現之 CD44v6 之抗體結合 mertansine 而得之 ADCbivatuzumab mertansine，由於 CD44v6 在正常組織也會表現，據認為在臨床會有嚴重的皮膚毒性及肝毒性(非專利文獻 11)。

【0006】 如上，當使用即使對抗原表現少之癌細胞也能發揮強大細胞傷害活性之抗體時，標的抗原須極度癌專一性的表現，但是如 Herceptin 之標的抗原 HER2、Cetuximab 之標的抗原 EGFR 在正常組織也會表現，據認為極度地癌專一性的表現的癌抗原的數目有限。所以，雖能強化對癌之細胞傷害活性，但對於正常組織之細胞傷害作用引起的副作用可能會是問題。

【0007】 又，最近，藉由抑制有助於癌之免疫抑制之 CTLA4 而增強腫瘤免疫之 Ipilimumab，顯示對轉移性黑色素瘤能延長整體存活(Overall survival)(非專利文獻 12)。但是 Ipilimumab 係將 CTLA4 以全身性的抑制，所以腫瘤免疫增強，但另一方面，由於全身性免疫活化造成自體免疫疾病狀之嚴重副作用成為問題(非專利文獻 13)。

【0008】 另一方面，作為對付癌以外之疾病的抗體醫藥，藉由抑制發炎性・自體免疫疾病中的發炎細胞激素發揮治療效果之抗體醫藥為已知(非專利文獻 14)。例如以 TNF 作為標的之 Remicade 或 Humira、及以 IL-6R 作為標的之 Actemra，對於類風濕關節炎發揮高治療效果，但另一方面也已知由於該等細胞激素係全身性的中和，故會有觀察到傳染病之副作用(非專利文獻 15)。

【0009】 作為可應用在第二世代之抗體醫藥之技術已有各

種技術開發出來，已有人報告提升效應子機能、抗原結合能力、藥物動態、安定性、或減少免疫原性風險的技術等(非專利文獻 16)，但幾乎沒有用以解決如上述副作用之能使抗體醫藥對標的組織專一性作用之技術。例如：針對如癌組織或發炎性組織之病變部位，已有人報告利用使該等標的組織之 pH 為酸性條件之 pH 依存性抗體(專利文獻 1、及 2)。但是癌組織或發炎性組織相較於正常組織之 pH 之下降(亦即氫離子濃度之上昇)只有少許，製作檢測分子量極小之氫離子濃度之些微上昇並作用之抗體係困難，且同時，有時候破骨細胞骨吸收窩區域等正常組織或成為對象之病變以外之組織其 pH 也會是酸性條件，將 pH 條件利用於作為病變部位專一性環境因子據認為仍有許多的課題。另一方面，有人報告：製作藉由以在如癌組織或發炎性組織之病變部位表現之蛋白酶切斷，才發揮抗原結合活性之抗體之方法(專利文獻 3)。但是蛋白酶所為之抗體之切斷係不可逆，所以在該病變部位被切斷的抗體會隨著血流回到正常組織，因此造成在正常組織也與抗原結合此種問題。又，據認為如此之蛋白酶之癌專一性也存有問題。所以，為了避免副作用並發揮藥效，在正常組織或血液中不會全身性作用，在病變部位之癌或發炎部位會可逆作用之技術尚為未知。

【先前技術文獻】

【專利文獻】

【0010】

【專利文獻 1】 國際公開第 WO2003/105757 號

【專利文獻 2】 國際公開第 WO2012/033953 號

【專利文獻 3】國際公開第 WO2010/081173 號

【非專利文獻】

【0011】

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

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

【非專利文獻 3】 Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. Weiner LM, Surana R, Wang S., Nat. Rev. Immunol. (2010) 10 (5), 317-327

【非專利文獻 4】 Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185HER2 monoclonal antibodies. Lewis GD, Figari I, Fendly B, Wong WL, Carter P, Gorman C, Shepard HM, Cancer Immunol. Immunotherapy (1993) 37, 255-263

【非專利文獻 5】 ING-1, a monoclonal antibody targeting Ep-CAM in patients with advanced adenocarcinomas. de Bono JS, Tolcher AW, Forero A, Vanhove GF, Takimoto C, Bauer RJ, Hammond LA, Patnaik A, White ML, Shen S, Khazaeli MB, Rowinsky EK, LoBuglio AF, Clin. Cancer Res. (2004) 10 (22), 7555-7565

【非專利文獻 6】Non-fucosylated therapeutic antibodies as next-generation therapeutic antibodies. Satoh M, Iida S, Shitara

K., *Expert Opin. Biol. Ther.* (2006) 6 (11), 1161-1173

【非專利文獻 7】 Optimizing engagement of the immune system by anti-tumor antibodies: an engineer's perspective. Desjarlais JR, Lazar GA, Zhukovsky EA, Chu SY., *Drug Discov. Today* (2007) 12 (21-22), 898-910

【非專利文獻 8】 Antibody-drug conjugates: targeted drug delivery for cancer. Alley SC, Okeley NM, Senter PD., *Curr. Opin. Chem. Biol.* (2010) 14 (4), 529-537

【非專利文獻 9】 BiTE: Teaching antibodies to engage T-cells for cancer therapy. Baeuerle PA, Kufer P, Bargou R., *Curr. Opin. Mol. Ther.* (2009) 11 (1), 22-30

【非專利文獻 10】 T cell-engaging BiTE antibodies specific for EGFR potently eliminate KRAS- and BRAF-mutated colorectal cancer cells. Lutterbuese R, Raum T, Kischel R, Hoffmann P, Mangold S, Rattel B, Friedrich M, Thomas O, Lorenczewski G, Rau D, Schaller E, Herrmann I, Wolf A, Urbig T, Baeuerle PA, Kufer P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2010) 107 (28), 12605-12610

【非專利文獻 11】 Phase I trial with the CD44v6-targeting immunoconjugate bivatuzumab mertansine in head and neck squamous cell carcinoma. Riechelmann H, Sauter A, Golze W, Hanft G, Schroen C, Hoermann K, Erhardt T, Gronau S., *Oral Oncol.* (2008) 44 (9), 823-829

【非專利文獻 12】 Ipilimumab in the treatment of melanoma.

Trinh VA, Hwu WJ., Expert Opin. Biol. Ther., (2012) Apr 14
(doi:10.1517/14712598.2012.675325)

【非專利文獻 13】 IPILIMUMAB - A NOVEL IMMUNOMODULATING THERAPY CAUSING AUTOIMMUNE HYPOPHYSITIS: A CASE REPORT AND REVIEW. Juszczak A, Gupta A, Karavitaki N, Middleton MR, Grossman A., Eur. J. Endocrinol. (2012) Apr 10 (doi: 10.1530/EJE-12-0167)

【非專利文獻 14】 The Japanese experience with biologic therapies for rheumatoid arthritis. Takeuchi T, Kameda H., Nat. Rev. Rheumatol. (2010) 6 (11), 644-652

【非專利文獻 15】 Current evidence for the management of rheumatoid arthritis with biological disease-modifying antirheumatic drugs: a systematic literature review informing the EULAR recommendations for the management of RA. Nam JL, Winthrop KL, van Vollenhoven RF, Pavelka K, Valesini G, Hensor EM, Worthy G, Landewe R, Smolen JS, Emery P, Buch MH., Ann. Rheum. Dis. (2010) 69 (6), 976-986

【非專利文獻 16】 Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies. Kim SJ, Park Y, Hong HJ., Mol. Cells. (2005) 20 (1), 17-29

【發明內容】

【發明欲解決之課題】

【0012】 本發明係有鑑於此情況而生，其目的在於提供對起因於標的組織之疾病之治療為有用之醫藥組合物、及其有效

成分。又，也提供該醫藥組合物及該有效成分之篩選方法以及製造方法。

【解決課題之方式】

【0013】 本案發明人等為了達成上述目的而努力研究，並創製了一種抗原結合分子，其包含因應標的組織專一的化合物的濃度而改變對抗原之結合活性之抗原結合分域。又，本案發明人等發現：該抗原結合分子或包含該抗原結合分子之醫藥組合物對起因於治療標的組織之疾病為有用，而且包含投予該抗原結合分子之步驟對於治療引起標的組織之疾病治療有用、及在製造用以治療標的組織引起之疾病之醫藥時，該抗原結合分子為有用。又，本案發明人等，創作該抗原結合分子之篩選方法及製造方法，乃完成本發明。

【0014】 亦即，本發明係以下事項；

(1) 一種抗原結合分子，其包含因應標的組織專一性的化合物的濃度而改變對抗原之結合活性之抗原結合分域。

(2)如(1)之抗原結合分子，其中，該標的組織為癌組織。

(3)如(2)之抗原結合分子，其中，該癌組織專一性的化合物，係癌細胞專一的代謝產物、於癌組織浸潤之免疫細胞專一的代謝產物、癌組織之基質細胞專一的代謝產物。

(4)如(1)之抗原結合分子，其中，該標的組織為發炎性組織。

(5)如(4)之抗原結合分子，其中，該發炎組織專一性的化合物，係於發炎性組織浸潤之免疫細胞專一的代謝產物、發炎組織中受傷害之正常細胞專一的代謝產物。

(6) 如(1)之抗原結合分子，其中，該化合物係選自於具嘧啶環結構之核苷、胺基酸及其代謝產物、脂質及其代謝產物、或糖代謝之一次代謝產物、菸鹼醯胺及其代謝產物中之至少一種化合物。

(7)如(6)之抗原結合分子，其中，該化合物係選自於腺苷、腺苷 3 磷酸、肌苷、丙胺酸、麩胺酸、天冬胺酸、犬尿胺酸、前列腺素 E2、琥珀酸、檸檬酸、或 1-甲基菸鹼醯胺中之至少一種化合物。

(8) 如(1)~(7)中任一項之抗原結合分子，其中，該抗原為膜型分子。

(9)如(1)~(8)中任一項之抗原結合分子，其係具有中和活性之抗原結合分子。

(10)如(1)~(9)中任一項之抗原結合分子，其係具有細胞傷害活性之抗原結合分子。

(11)如(1)~(10)中任一項之抗原結合分子，其包含 Fc 區。

(12)如(11)之抗原結合分子，其中，該 Fc 區係序列編號：5、6、7、或 8 記載之不變區含有之 Fc 區。

(13)如(11)之抗原結合分子，其中，該 Fc 區包含比起天然型人類 IgG 之 Fc 區對 Fc γ 受體之結合活性，對 Fc γ 受體之結合活性較高之 Fc γ R 結合改變 Fc 區。

(14) 如(13)之抗原結合分子，其中，包含該 Fc γ R 結合改變 Fc 區之胺基酸序列之中，選自 EU 編號表示之 221 位、222 位、223 位、224 位、225 位、227 位、228 位、230 位、231 位、232 位、233 位、234 位、235 位、236 位、237 位、238

位、239 位、240 位、241 位、243 位、244 位、245 位、246 位、247 位、249 位、250 位、251 位、254 位、255 位、256 位、258 位、260 位、262 位、263 位、264 位、265 位、266 位、267 位、268 位、269 位、270 位、271 位、272 位、273 位、274 位、275 位、276 位、278 位、279 位、280 位、281 位、282 位、283 位、284 位、285 位、286 位、288 位、290 位、291 位、292 位、293 位、294 位、295 位、296 位、297 位、298 位、299 位、300 位、301 位、302 位、303 位、304 位、305 位、311 位、313 位、315 位、317 位、318 位、320 位、322 位、323 位、324 位、325 位、326 位、327 位、328 位、329 位、330 位、331 位、332 位、333 位、334 位、335 位、336 位、337 位、339 位、376 位、377 位、378 位、379 位、380 位、382 位、385 位、392 位、396 位、421 位、427 位、428 位、429 位、434 位、436 位或 440 位之胺基酸之群組中之至少一種以上之胺基酸係與天然型人類 IgG 之 Fc 區之胺基酸為不同之胺基酸。

(15)如(14)之抗原結合分子，包含該 Fc γ R 結合改變 Fc 區之胺基酸序列之中，選自 EU 編號表示之；

221 位之胺基酸為 Lys 或 Tyr 中之任一者、

222 位之胺基酸為 Phe、Trp、Glu 或 Tyr 中之任一者、

223 位之胺基酸為 Phe、Trp、Glu 或 Lys 中之任一者、

224 位之胺基酸為 Phe、Trp、Glu 或 Tyr 中之任一者、

225 位之胺基酸為 Glu、Lys 或 Trp 中之任一者、

227 位之胺基酸為 Glu、Gly、Lys 或 Tyr 中之任一者、

228 位之胺基酸為 Glu、Gly、Lys 或 Tyr 中之任一者、

230 位之胺基酸為 Ala、Glu、Gly 或 Tyr 中之任一者、

231 位之胺基酸為 Glu、Gly、Lys、Pro 或 Tyr 中之任一者、

232 位之胺基酸為 Glu、Gly、Lys 或 Tyr 中之任一者、

233 位之胺基酸為 Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

234 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

235 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

236 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

237 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

238 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

239 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之

任一者、

240 位之胺基酸為 Ala、Ile、Met 或 Thr 中之任一者、

241 位之胺基酸為 Asp、Glu、Leu、Arg、Trp 或 Tyr 中之任一者、

243 位之胺基酸為 Leu、Glu、Leu、Gln、Arg、Trp 或 Tyr 中之任一者、

244 位之胺基酸為 His、

245 位之胺基酸為 Ala、

246 位之胺基酸為 Asp、Glu、His 或 Tyr 中之任一者、

247 位之胺基酸為 Ala、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Thr、Val 或 Tyr 中之任一者、

249 位之胺基酸為 Glu、His、Gln 或 Tyr 中之任一者、

250 位之胺基酸為 Glu 或 Gln 中之任一者、

251 位之胺基酸為 Phe、

254 位之胺基酸為 Phe、Met 或 Tyr 中之任一者、

255 位之胺基酸為 Glu、Leu 或 Tyr 中之任一者、

256 位之胺基酸為 Ala、Met 或 Pro 中之任一者、

258 位之胺基酸為 Asp、Glu、His、Ser 或 Tyr 中之任一者、

260 位之胺基酸為 Asp、Glu、His 或 Tyr 中之任一者、

262 位之胺基酸為 Ala、Glu、Phe、Ile 或 Thr 中之任一者、

263 位之胺基酸為 Ala、Ile、Met 或 Thr 中之任一者、

264 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Trp 或 Tyr 中之任一者、

265 位之胺基酸為 Ala、Leu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

266 位之胺基酸為 Ala、Ile、Met 或 Thr 中之任一者、

267 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

268 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、Gly、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Thr、Val 或 Trp 中之任一者、

269 位之胺基酸為 Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

270 位之胺基酸為 Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Trp 或 Tyr 中之任一者、

271 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

272 位之胺基酸為 Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

273 位之胺基酸為 Phe 或 Ile 中之任一者、

274 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

275 位之胺基酸為 Leu 或 Trp 中之任一者、

276 位之胺基酸為、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

278 位之胺基酸為 Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、

Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val 或 Trp 中之任一者、

279 位之胺基酸為 Ala、

280 位之胺基酸為 Ala、Gly、His、Lys、Leu、Pro、Gln、
Trp 或 Tyr 中之任一者、

281 位之胺基酸為 Asp、Lys、Pro 或 Tyr 中之任一者、

282 位之胺基酸為 Glu、Gly、Lys、Pro 或 Tyr 中之任一者、

283 位之胺基酸為 Ala、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、
Pro、Arg 或 Tyr 中之任一者、

284 位之胺基酸為 Asp、Glu、Leu、Asn、Thr 或 Tyr 中之
任一者、

285 位之胺基酸為 Asp、Glu、Lys、Gln、Trp 或 Tyr 中之
任一者、

286 位之胺基酸為 Glu、Gly、Pro 或 Tyr 中之任一者、

288 位之胺基酸為 Asn、Asp、Glu 或 Tyr 中之任一者、

290 位之胺基酸為 Asp、Gly、His、Leu、Asn、Ser、Thr、
Trp 或 Tyr 中之任一者、

291 位之胺基酸為 Asp、Glu、Gly、His、Ile、Gln 或 Thr
中之任一者、

292 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Pro、Thr 或 Tyr 中之
任一者、

293 位之胺基酸為 Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、
Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

294 位之胺基酸為 Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、
Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

295 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

296 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr 或 Val 中之任一者、

297 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

298 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

299 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

300 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val 或 Trp 中之任一者、

301 位之胺基酸為 Asp、Glu、His 或 Tyr 中之任一者、

302 位之胺基酸為 Ile、

303 位之胺基酸為 Asp、Gly 或 Tyr 中之任一者、

304 位之胺基酸為 Asp、His、Leu、Asn 或 Thr 中之任一者、

305 位之胺基酸為 Glu、Ile、Thr 或 Tyr 中之任一者、

311 位之胺基酸為 Ala、Asp、Asn、Thr、Val 或 Tyr 中之任一者、

313 位之胺基酸為 Phe、

315 位之胺基酸為 Leu、

317 位之胺基酸為 Glu 或 Gln、

318 位之胺基酸為 His、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val 或 Tyr 中之任一者、

320 位之胺基酸為 Asp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Asn、Pro、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

322 位之胺基酸為 Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Pro、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

323 位之胺基酸為 Ile、

324 位之胺基酸為 Asp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

325 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

326 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

327 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

328 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

329 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之

任一者、

330 位之胺基酸為 Cys、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

331 位之胺基酸為 Asp、Phe、His、Ile、Leu、Met、Gln、Arg、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

332 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

333 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Ser、Thr、Val 或 Tyr 中之任一者、

334 位之胺基酸為 Ala、Glu、Phe、Ile、Leu、Pro 或 Thr 中之任一者、

335 位之胺基酸為 Asp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

336 位之胺基酸為 Glu、Lys 或 Tyr 中之任一者、

337 位之胺基酸為 Glu、His 或 Asn 中之任一者、

339 位之胺基酸為 Asp、Phe、Gly、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、Ser 或 Thr 中之任一者、

376 位之胺基酸為 Ala 或 Val 中之任一者、

377 位之胺基酸為 Gly 或 Lys 中之任一者、

378 位之胺基酸為 Asp、

379 位之胺基酸為 Asn、

380 位之胺基酸為 Ala、Asn 或 Ser 中之任一者、

382 位之胺基酸為 Ala 或 Ile 中之任一者、
385 位之胺基酸為 Glu、
392 位之胺基酸為 Thr、
396 位之胺基酸為 Leu、
421 位之胺基酸為 Lys、
427 位之胺基酸為 Asn、
428 位之胺基酸為 Phe 或 Leu 中之任一者、
429 位之胺基酸為 Met、
434 位之胺基酸為 Trp、
436 位之胺基酸為 Ile、或
440 位之胺基酸為 Gly、His、Ile、Leu 或 Tyr 中之任一者
之群組中之至少一種以上之胺基酸。

(16)如(11)之抗原結合分子，其中，該 Fc 區係經修飾，使得 Fc 區之 EU 編號 297 位所結合之糖鏈之組成為結合岩藻醣缺損糖鏈之 Fc 區之比例提高、或加成有二分化 N-乙醯基葡萄糖胺之 Fc 區之比例提高。

(17)如(11)、(13)~(16)中任一項之抗原結合分子，其中，該 Fc 區於 pH 酸性域之條件下對 FcRn 之結合活性，比序列編號：5、6、7、或 8 中之任一者表示之 Fc 區對 FcRn 之結合活性增強。

(18) 如(17)之抗原結合分子，其中，該 Fc 區，係序列編號：5、6、7、或 8 記載之不變區含有之 Fc 區之胺基酸序列之中，選自 EU 編號表示之 238 位、244 位、245 位、249 位、250 位、251 位、252 位、253 位、254 位、255 位、256 位、257

位、258 位、260 位、262 位、265 位、270 位、272 位、279 位、283 位、285 位、286 位、288 位、293 位、303 位、305 位、307 位、308 位、309 位、311 位、312 位、314 位、316 位、317 位、318 位、332 位、339 位、340 位、341 位、343 位、356 位、360 位、362 位、375 位、376 位、377 位、378 位、380 位、382 位、385 位、386 位、387 位、388 位、389 位、400 位、413 位、415 位、423 位、424 位、427 位、428 位、430 位、431 位、433 位、434 位、435 位、436 位、438 位、439 位、440 位、442 位或 447 位之群組中之至少一個以上之胺基酸經取代之 Fc 區。

(19)如(18)之抗原結合分子，其中，該 Fc 區，係序列編號：5、6、7、或 8 記載之不變區含有之 Fc 區之胺基酸序列之中，選自 EU 編號表示之：

238 位之胺基酸為 Leu、

244 位之胺基酸為 Leu、

245 位之胺基酸為 Arg、

249 位之胺基酸為 Pro、

250 位之胺基酸為 Gln 或 Glu 中之任一者、或

251 位之胺基酸為 Arg、Asp、Glu、或 Leu 中之任一者、

252 位之胺基酸為 Phe、Ser、Thr、或 Tyr 中之任一者、

254 位之胺基酸為 Ser 或 Thr 中之任一者、

255 位之胺基酸為 Arg、Gly、Ile、或 Leu 中之任一者、

256 位之胺基酸為 Ala、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Pro、或 Thr 中之任一者、

257 位之胺基酸為 Ala、Ile、Met、Asn、Ser、或 Val 中之任一者、

258 位之胺基酸為 Asp、

260 位之胺基酸為 Ser、

262 位之胺基酸為 Leu、

270 位之胺基酸為 Lys、

272 位之胺基酸為 Leu、或 Arg 中之任一者、

279 位之胺基酸為 Ala、Asp、Gly、His、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Trp、或 Tyr 中之任一者、

283 位之胺基酸為 Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Trp、或 Tyr 中之任一者、

285 位之胺基酸為 Asn、

286 位之胺基酸為 Phe、

288 位之胺基酸為 Asn、或 Pro 中之任一者、

293 位之胺基酸為 Val、

307 位之胺基酸為 Ala、Glu、Gln、或 Met 中之任一者、

311 位之胺基酸為 Ala、Glu、Ile、Lys、Leu、Met、Ser、Val、或 Trp 中之任一者、

309 位之胺基酸為 Pro、

312 位之胺基酸為 Ala、Asp、或 Pro 中之任一者、

314 位之胺基酸為 Ala 或 Leu 中之任一者、

316 位之胺基酸為 Lys、

317 位之胺基酸為 Pro、

318 位之胺基酸為 Asn、或 Thr 中之任一者、

332 位之胺基酸為 Phe、His、Lys、Leu、Met、Arg、Ser、
或 Trp 中之任一者、

339 位之胺基酸為 Asn、Thr、或 Trp 中之任一者、

341 位之胺基酸為 Pro、

343 位之胺基酸為 Glu、His、Lys、Gln、Arg、Thr、或 Tyr
中之任一者、

375 位之胺基酸為 Arg、

376 位之胺基酸為 Gly、Ile、Met、Pro、Thr、或 Val 中之
任一者、

377 位之胺基酸為 Lys、

378 位之胺基酸為 Asp、Asn、或 Val 中之任一者、

380 位之胺基酸為 Ala、Asn、Ser、或 Thr 中之任一者

382 位之胺基酸為 Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、
Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、或 Tyr 中之任一者、

385 位之胺基酸為 Ala、Arg、Asp、Gly、His、Lys、Ser、
或 Thr 中之任一者、

386 位之胺基酸為 Arg、Asp、Ile、Lys、Met、Pro、Ser、
或 Thr 中之任一者、

387 位之胺基酸為 Ala、Arg、His、Pro、Ser、或 Thr 中之
任一者、

389 位之胺基酸為 Asn、Pro、或 Ser 中之任一者、

423 位之胺基酸為 Asn、

427 位之胺基酸為 Asn、

428 位之胺基酸為 Leu、Met、Phe、Ser、或 Thr 中之任一者

430 位之胺基酸為 Ala、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、或 Tyr 中之任一者、

431 位之胺基酸為 His、或 Asn 中之任一者、

433 位之胺基酸為 Arg、Gln、His、Ile、Lys、Pro、或 Ser 中之任一者、

434 位之胺基酸為 Ala、Gly、His、Phe、Ser、Trp、或 Tyr 中之任一者、

436 位之胺基酸為 Arg、Asn、His、Ile、Leu、Lys、Met、或 Thr 中之任一者、

438 位之胺基酸為 Lys、Leu、Thr、或 Trp 中之任一者、

440 位之胺基酸為 Lys、或、

442 位之胺基酸為 Lys、308 位之胺基酸為 Ile、Pro、或 Thr 中之任一者之群組中之至少一個以上之胺基酸。

(20) 如(1)~(19)中任一項之抗原結合分子，其中，該抗原結合分域係多重專一性或多重抗原結合位之抗原結合分域。

(21)如(20)之抗原結合分子，其中，該抗原結合分域當中，至少一個抗原結合分域結合之抗原係於癌細胞之細胞膜表現之膜型分子、且至少一個抗原結合分域結合之抗原係於效應子細胞之細胞膜表現之膜型分子。

(22)如(21)之抗原結合分子，其中，該效應子細胞為 NK 細胞、巨噬體、或 T 細胞。

(23)如(21)或(22)之抗原結合分子，其中，於該效應子細胞

之細胞膜表現之膜型分子，係構成 TCR 之多胜肽、CD2、CD3、CD28、CD44、CD16、CD32、CD64、或 NKG2D。

(24) 如(20)之抗原結合分子，其中，該抗原結合分域之中，至少一個抗原結合分域結合之抗原，係於癌細胞細胞膜表現之膜型分子、且至少一個抗原結合分域結合之抗原係細胞傷害性物質。

(25) 如(20)~(24)中任一項之抗原結合分子，其中，該抗原結合分子係抗體片段。

(26) 如(1)~(24)任一項之抗原結合分子，其中，該抗原結合分子為抗體。

(27) 如(1)~(7)中任一項之抗原結合分子，其中，該抗原為可溶型分子。

(28)如(27)之抗原結合分子，其係具有中和活性之抗原結合分子。

(29) 如(27)或(28)之抗原結合分子，其包含 Fc 區。

(30)如(29)之抗原結合分子，其中，該 Fc 區，係序列編號：5、6、7、或 8 記載之不變區含有之 Fc 區。

(31)如(29)之抗原結合分子，其中，該 Fc 區，係於 pH 酸性域條件下對 FcRn 之結合活性，比起序列編號：5、6、7、或 8 記載之不變區含有之 Fc 區對 FcRn 之結合活性增強之 Fc 區。

(32) 如(31)之抗原結合分子，其中，該 Fc 區，係序列編號：5、6、7、或 8 記載之不變區含有之 Fc 區之胺基酸序列之中，選自 EU 編號表示之 238 位、244 位、245 位、249 位、250 位、251 位、252 位、253 位、254 位、255 位、256 位、257

位、258 位、260 位、262 位、265 位、270 位、272 位、279 位、283 位、285 位、286 位、288 位、293 位、303 位、305 位、307 位、308 位、309 位、311 位、312 位、314 位、316 位、317 位、318 位、332 位、339 位、340 位、341 位、343 位、356 位、360 位、362 位、375 位、376 位、377 位、378 位、380 位、382 位、385 位、386 位、387 位、388 位、389 位、400 位、413 位、415 位、423 位、424 位、427 位、428 位、430 位、431 位、433 位、434 位、435 位、436 位、438 位、439 位、440 位、442 位或 447 位之群組中之至少一個以上之胺基酸經取代之 Fc 區。

(33) 如(32)之抗原結合分子，其中，該 Fc 區，係序列編號：5、6、7、或 8 記載之不變區含有之 Fc 區之胺基酸序列之中，選自 EU 編號表示之：

238 位之胺基酸為 Leu、

244 位之胺基酸為 Leu、

245 位之胺基酸為 Arg、

249 位之胺基酸為 Pro、

250 位之胺基酸為 Gln 或 Glu 中之任一者、或

251 位之胺基酸為 Arg、Asp、Glu、或 Leu 中之任一者、

252 位之胺基酸為 Phe、Ser、Thr、或 Tyr 中之任一者、

254 位之胺基酸為 Ser 或 Thr 中之任一者、

255 位之胺基酸為 Arg、Gly、Ile、或 Leu 中之任一者、

256 位之胺基酸為 Ala、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Pro、或 Thr 中之任一者、

257 位之胺基酸為 Ala、Ile、Met、Asn、Ser、或 Val 中之任一者、

258 位之胺基酸為 Asp、

260 位之胺基酸為 Ser、

262 位之胺基酸為 Leu、

270 位之胺基酸為 Lys、

272 位之胺基酸為 Leu、或 Arg 中之任一者、

279 位之胺基酸為 Ala、Asp、Gly、His、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Trp、或 Tyr 中之任一者、

283 位之胺基酸為 Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Trp、或 Tyr 中之任一者、

285 位之胺基酸為 Asn、

286 位之胺基酸為 Phe、

288 位之胺基酸為 Asn、或 Pro 中之任一者、

293 位之胺基酸為 Val、

307 位之胺基酸為 Ala、Glu、Gln、或 Met 中之任一者、

311 位之胺基酸為 Ala、Glu、Ile、Lys、Leu、Met、Ser、Val、或 Trp 中之任一者、

309 位之胺基酸為 Pro、

312 位之胺基酸為 Ala、Asp、或 Pro 中之任一者、

314 位之胺基酸為 Ala 或 Leu 中之任一者、

316 位之胺基酸為 Lys、

317 位之胺基酸為 Pro、

318 位之胺基酸為 Asn、或 Thr 中之任一者、

332 位之胺基酸為 Phe、His、Lys、Leu、Met、Arg、Ser、
或 Trp 中之任一者、

339 位之胺基酸為 Asn、Thr、或 Trp 中之任一者、

341 位之胺基酸為 Pro、

343 位之胺基酸為 Glu、His、Lys、Gln、Arg、Thr、或 Tyr
中之任一者、

375 位之胺基酸為 Arg、

376 位之胺基酸為 Gly、Ile、Met、Pro、Thr、或 Val 中之
任一者、

377 位之胺基酸為 Lys、

378 位之胺基酸為 Asp、Asn、或 Val 中之任一者、

380 位之胺基酸為 Ala、Asn、Ser、或 Thr 中之任一者

382 位之胺基酸為 Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、
Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、或 Tyr 中之任一者、

385 位之胺基酸為 Ala、Arg、Asp、Gly、His、Lys、Ser、
或 Thr 中之任一者、

386 位之胺基酸為 Arg、Asp、Ile、Lys、Met、Pro、Ser、
或 Thr 中之任一者、

387 位之胺基酸為 Ala、Arg、His、Pro、Ser、或 Thr 中之
任一者、

389 位之胺基酸為 Asn、Pro、或 Ser 中之任一者、

423 位之胺基酸為 Asn、

427 位之胺基酸為 Asn、

428 位之胺基酸為 Leu、Met、Phe、Ser、或 Thr 中之任一者

430 位之胺基酸為 Ala、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、或 Tyr 中之任一者、

431 位之胺基酸為 His、或 Asn 中之任一者、

433 位之胺基酸為 Arg、Gln、His、Ile、Lys、Pro、或 Ser 中之任一者、

434 位之胺基酸為 Ala、Gly、His、Phe、Ser、Trp、或 Tyr 中之任一者、

436 位之胺基酸為 Arg、Asn、His、Ile、Leu、Lys、Met、或 Thr 中之任一者、

438 位之胺基酸為 Lys、Leu、Thr、或 Trp 中之任一者、

440 位之胺基酸為 Lys、或、

442 位之胺基酸為 Lys、308 位之胺基酸為 Ile、Pro、或 Thr 中之任一者群組中之至少一個以上之胺基酸。

(34) 如(29)之抗原結合分子，其中，該 Fc 區，係於 pH 中性域下對 FcRn 之結合活性，比起序列編號：5、6、7、或 8 記載之不變區含有之 Fc 區對 FcRn 之結合活性增強之 Fc 區。

(35)如(34)之抗原結合分子，其中，該 Fc 區，係序列編號：5、6、7、或 8 記載之不變區含有之 Fc 區之胺基酸序列之中，選自 EU 編號表示之 237 位、248 位、250 位、252 位、254 位、255 位、256 位、257 位、258 位、265 位、286 位、289 位、297 位、298 位、303 位、305 位、307 位、308 位、309 位、311 位、312 位、314 位、315 位、317 位、332 位、334 位、360

位、376 位、380 位、382 位、384 位、385 位、386 位、387 位、389 位、424 位、428 位、433 位、434 位或 436 位之群組中之至少一個以上之胺基酸經取代之 Fc 區。

(36)如(35)之抗原結合分子，其中，該 Fc 區，係序列編號：5、6、7、或 8 記載之不變區含有之 Fc 區之胺基酸序列之中，選自 EU 編號表示之；

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 中之任一者、

252 位之胺基酸為 Phe、Trp、或 Tyr 中之任一者、

254 位之胺基酸為 Thr、

255 位之胺基酸為 Glu、

256 位之胺基酸為 Asp、Asn、Glu、或 Gln 中之任一者、

257 位之胺基酸為 Ala、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr、或 Val 中之任一者、

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 中之任一者、

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 中之任一者、

308 位之胺基酸為 Ala、Phe、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、或 Thr 中之任一者、

309 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Pro、或 Arg 中之任一者、

311 位之胺基酸為 Ala、His、或 Ile 中之任一者、

312 位之胺基酸為 Ala 或 His 中之任一者、

314 位之胺基酸為 Lys 或 Arg 中之任一者、

315 位之胺基酸為 Ala、Asp 或 His 中之任一者、

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 中之任一者、

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 中之任一者、

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 中之任一者、

433 位之胺基酸為 Lys、

434 位之胺基酸為 Ala、Phe、His、Ser、Trp、或 Tyr 中之任一者、或

436 位之胺基酸為 His、Ile、Leu、Phe、Thr、或 Val、之群組中之至少一個以上之胺基酸。

(37)如(29)或(31)~(36)中任一項之抗原結合分子，其中，該 Fc 區係比起對活性型 Fc γ 受體之結合活性，對抑制型 Fc γ 受體之結合活性較高之 Fc 區。

(38) 如(37)之抗原結合分子，其中，該抑制型 Fc γ 受體係人類 Fc γ RIIb。

(39)如(37)或(38)之抗原結合分子，其中，該活性型 Fc γ 受體，係人類 Fc γ RIa、人類 Fc γ RIIa(R)、人類 Fc γ RIIa(H)、人類 Fc γ RIIIa(V)或人類 Fc γ RIIIa(F)。

(40) 如(37)~(39)中任一項之抗原結合分子，其中，包含該 Fc 區之 EU 編號表示之 238 位或 328 位之胺基酸為與天然型人類 IgG 之 Fc 區之胺基酸為不同之胺基酸。

(41) 如(40)之抗原結合分子，其中，該 Fc 區之 EU 編號表示之 238 位之胺基酸為 Asp、或 328 位之胺基酸為 Glu。

(42)如(40)或(41)之抗原結合分子，其中，該 Fc 區之胺基酸序列之中，選自 EU 編號表示之；

233 位之胺基酸為 Asp、

234 位之胺基酸為 Trp、或 Tyr 中之任一者、

237 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Leu、Met、Phe、Trp 或 Tyr 中之任一者、

239 位之胺基酸為 Asp、

267 位之胺基酸為 Ala、Gln 或 Val 中之任一者、

268 位之胺基酸為 Asn、Asp、或 Glu 中之任一者、

271 位之胺基酸為 Gly、

326 位之胺基酸為 Ala、Asn、Asp、Gln、Glu、Leu、Met、Ser 或 Thr 中之任一者、

330 位之胺基酸為 Arg、Lys、或 Met 中之任一者、

323 位之胺基酸為 Ile、Leu、或 Met 中之任一者、或

296 位之胺基酸為 Asp、

之群組中之至少一個以上之胺基酸。

(43) 如(27)至(42)中任一項之抗原結合分子，其中，該抗原結合分子為抗體。

(44) 一種如(1)至(43)中任一項之抗原結合分子之製造方法，包含以下步驟：

選擇因應標的組織專一性的化合物之濃度而改變對抗原之結合活性之抗原結合分域。

(45) 一種如(1)至(43)中任一項之抗原結合分子之篩選方法，包含以下步驟：

選擇因應標的組織專一性的化合物之濃度而改變對抗原之結合活性之抗原結合分域。

(46) 一種醫藥組合物，包含如(1)至(43)中任一項之抗原結合分子。

【圖式簡單說明】**【0015】**

圖 1 顯示於低分子不存在之正常環境中，低分子開關抗體 (Small molecule switch antibody) 不與抗原結合，於低分子以高濃度存在之標的組織，與抗原結合之圖。

圖 2 顯示低分子藉由夾於低分子抗體與抗原之複合體以發揮開關功能之圖。若低分子不存在，抗體與抗原之交互作用不足，抗體無法與抗原結合，但若低分子存在，藉由夾於抗體與抗原之間，抗體可以與抗原結合。

圖 3 顯示抗體對人類 IL-6 之結合之 ELISA 結果。縱軸為評價由於各低分子之有無所致之各抗體對人類 IL-6 之結合活性之吸光度值。

圖 4 顯示 100 $\mu\text{mol/L}$ 犬尿胺酸存在下、不存在下時，A11 與 4 $\mu\text{mol/L}$ 人類 IL-6 之交互作用之感測圖。

圖 5 顯示評價將 1 $\mu\text{mol/L}$ 之 IL-6 作為分析物進行 60 秒交互作用時，對於固定於感測晶片 CM5 上之 A11 之結合之回應之變化。縱軸代表 IL-6 交互作用前後之回應變化 (RU)、橫軸代表此時之溶液中含有之犬尿胺酸濃度 ($\mu\text{mol/L}$)。

圖 6 顯示評價將 1 $\mu\text{mol/L}$ 之 IL-6 作為分析物進行 60 秒交互作用時，對於固定於感測晶片 CM5 上之 H01 之結合之回應之變化。縱軸代表 IL-6 交互作用前後之回應變化 (RU)、橫軸代表此時之溶液中含有之犬尿胺酸濃度 ($\mu\text{mol/L}$)。

圖 7 顯示評價將 1 $\mu\text{mol/L}$ 之 A11 作為分析物進行 60 秒交互作用時，對於固定於感測晶片 CM5 上之 IL-6 之結合之回應

之變化。縱軸代表 A11 交互作用前後之回應變化(RU)、橫軸代表此時之溶液中含有之犬尿胺酸濃度($\mu\text{mol/L}$)。

圖 8 顯示對於固定於感測晶片 CM5 之 IL-6, 於 $100\mu\text{mol/L}$ 犬尿胺酸存在下使 A11 交互作用, 之後於含 $100\mu\text{mol/L}$ 犬尿胺酸之緩衝條件或不含犬尿胺酸之緩衝條件下, 觀察 A11 從 IL6 解離之圖。圖縱軸係代表將 $100\mu\text{mol/L}$ 犬尿胺酸存在下之 A11 之結合量定為 100 並標準化之值, 橫軸代表從交互作用開始後之經過時間(秒)。

圖 9 顯示對於固定於感測晶片之 IL-6, 使 800、400、200、100、50、25 nmol/L 之犬尿胺酸交互作用時之感測圖。圖縱軸係代表犬尿胺酸對 IL-6 之結合量之變化(RU)(交互作用實驗開始時之回應定為 0)、橫軸代表交互作用實驗開始時之經過時間。

圖 10 顯示對兔免疫使用之腺苷類似物 2'-Adenosine-PEG-peptide 之結構。

圖 11 顯示對兔免疫使用之腺苷類似物 5'-Adenosine-PEG-peptide 之結構。

圖 12 顯示對兔免疫使用之腺苷類似物之胜肽部分取代為生物素而得之 2'-Adenosine-PEG-biotin 之結構。

圖 13 顯示對兔免疫使用之腺苷類似物之胜肽部分取代為生物素而得之 5'-Adenosine-PEG-biotin 之結構。

圖 14 顯示各抗體與 2'-Adenosine-PEG-Biotin 交互作用時之結合量除以各抗體之捕捉量(RU)而得之值($N_{\text{binding}}/100$)作為縱軸, 2'-Adenosine-PEG-Biotin 交互作用後從各抗體解離

2'-Adenosine-PEG-Biotin60秒後之值除以各抗體之捕捉量(RU)而得之值(N_stability_100)作為橫軸之圖。

圖 15A 顯示選殖體 SMB0002 與腺苷結合 (交互作用)之表面電漿共振分析之感測圖。感測圖從下而上依序表示 7.81、31.3、125、500 nM 之抗原與 SMB0002 之交互作用。

圖 15B 顯示選殖體 SMB0002 與 ATP 結合 (交互作用)之表面電漿共振分析之感測圖。感測圖從下而上依序表示 78.1、313、1250、5000 nM 之抗原與 SMB0002 之交互作用。

圖 15C 顯示選殖體 SMB0089 與腺苷結合 (交互作用)之表面電漿共振分析之感測圖。。感測圖從下而上依序表示 7.81、31.3、125、500 nM 之抗原與 SMB0089 之交互作用。

圖 15D 顯示選殖體 SMB0089 與 ATP 結合之(交互作用)之表面電漿共振分析之感測圖。感測圖從下而上依序表示 78.1、313、1250、5000 nM 之抗原與 SMB00089 之交互作用。

圖 15E 顯示選殖體 SMB0104 與腺苷結合 (交互作用)之表面電漿共振分析之感測圖。。感測圖從下而上依序表示 7.81、31.3、500 nM 之抗原與 SMB0104 之交互作用。

圖 15F 顯示選殖體 SMB0104 與 ATP 結合之(交互作用)之表面電漿共振分析之感測圖。感測圖從下而上依序表示 78.1、313、1250、5000 nM 之抗原與 SMB0104 之交互作用。

圖 16 顯示選殖體 SMB0171 與 ATP 結合之(交互作用)之表面電漿共振分析之感測圖。感測圖從下而上依序表示 5、50 μ M 之抗原與 SMB0171 之交互作用。

圖 17 顯示選殖體 SMB0002 與腺苷及 ATP 結合之競爭

ELISA 之結果。

圖 18 顯示評價 ATP 所致抑制 ATNLSA1-4_D12 對生物素標記抗原 (5'-Adenosine-PEG-biotin, ATP-PEG-biotin 之混合) 結合之能力之圖。

圖 19 顯示將腺苷或 ATP 夾於抗體與抗原間，且將與抗原接觸之抗體可變區部分予以庫化，能取得對於任意抗原之腺苷/ATP 開關抗體之合理設計抗體庫之概念圖。

圖 20 顯示將腺苷或 ATP 夾於抗體與抗原間，能取得對於任意抗原之腺苷/ATP 開關抗體之腺苷免疫兔抗體庫之概念圖。

圖 21 顯示抗體對人類 IL-6 之結合之 ELISA 之結果。縱軸代表 450nm 波長之吸光度值表示之胺基酸及胺基酸代謝物(犬尿胺酸、色胺酸、苯基丙胺酸、鄰胺苯甲酸 (anthranilic acid)、及 3-羥基犬尿胺酸、犬尿喹啉酸)之有無所致之各抗體對於人類 IL-6 之結合活性。

圖 22 顯示抗體對人類 IL-6 之結合之 ELISA 之結果。縱軸代表從 450nm 波長之吸光度算出之比活性值表示之各低分子(ATP、腺苷、肌苷、PGE2、琥珀酸、乳酸、犬尿胺酸、低分子雞尾酒)之有無所致之 I6NMSC1-3_#03 抗體對人類 IL-6 之結合活性。

圖 23 顯示抗體對人類 IL-6 之結合之 ELISA 之結果。縱軸代表從 450nm 波長之吸光度算出之比活性值表示之各低分子(ATP、腺苷、肌苷、PGE2、琥珀酸、乳酸、犬尿胺酸、低分子雞尾酒)之有無所致之 I6NMSC1-3_#17 抗體對人類 IL-6 之結合活性。

圖 24 顯示抗體對 HSA 之結合之 ELISA 之結果。縱軸代表從 450nm 波長之吸光度算出之比活性值表示之各低分子 (ATP、腺苷、肌苷、PGE2、琥珀酸、乳酸、犬尿胺酸、低分子雞尾酒) 之有無所致之 HSNMSC1-4_#22 抗體對 HSA 之結合活性。

圖 25 顯示由合理設計抗體庫獲得之選殖體 I6DL2C5-4_076 對人類 IL-6 於 ATP 及/或 Adenosine 1 mM 存在/不存在下之 ELISA 之結果。縱軸代表評價抗體對人類 IL-6 之結合活性之吸光度值。陰性對照 (Negative Control)，代表使用 M13KO7 Helper Phage 時之結果。

圖 26 顯示由合理設計抗體庫獲得之選殖體 HSDL3C5-4_015 對人類血清白蛋白於 ATP 及/或 Adenosine 1 mM 存在/不存在下之 ELISA 之結果。縱軸代表評價抗體對人類血清白蛋白之結合活性之吸光度值。陰性對照 (Negative Control)，代表使用 M13KO7 Helper Phage 時之結果。

圖 27 顯示由合理設計抗體庫獲得之選殖體 6RAD2C1-4_011、及 6RAD2C1-4_076 對人類 IL-6 Receptor 於 ATP 及/或 Adenosine (記為 ADO) 1 mM 存在/不存在下、及低分子雞尾酒 (SC) 存在或不存在下之 ELISA 之結果。縱軸代表評價抗體對人類 IL-6 Receptor 之結合活性之吸光度值。陰性對照 (Negative Control)，代表使用 M13KO7 Helper Phage 時之結果。

圖 28 顯示選殖體 6RNMSC1-2_F02 對人類 IL-6R 之結合 ELISA 之結果。縱軸代表評價各低分子之有無所致抗體對人類 IL-6R 之結合活性之吸光度值。

圖 29 顯示選殖體 6RNMSC1-3_G02 對人類 IL-6R 之結合 ELISA 之結果。縱軸代表評價各低分子之有無所致抗體對人類 IL-6R 之結合活性之吸光度值。

圖 30 顯示抗體對人類 IL-6R 之結合 ELISA 之結果圖。縱軸代表評價各胺基酸或胺基酸代謝物之有無所致抗體對人類 IL-6R 之結合活性之吸光度值。

圖 31 顯示 100 μ mol/L 犬尿胺酸存在下、10 mmol/L ATP 存在下、犬尿胺酸、ATP 不存在下時，6RNMSC1-2_F02 與 1 μ mol/L IL-6R 之交互作用之感測圖。實線代表犬尿胺酸存在下之交互作用、點線代表 ATP 存在下之交互作用、及破折線代表該等不存在下之交互作用。

圖 32 顯示對固定在感測晶片 CM5 之 IL-6R，在 100 μ mol/L 犬尿胺酸存在下使 6RNMSC1-2_F02 交互作用，之後於含 100 μ mol/L 犬尿胺酸之緩衝條件或不含犬尿胺酸之緩衝條件下，觀察 6RNMSC1-2_F02 從 IL-6R 解離之圖。圖縱軸代表 100 μ mol/L 犬尿胺酸存在下之 6RNMSC1-2_F02 之結合量定為 100 並標準化之值，橫軸代表交互作用開始後之經過時間(秒)。實線代表犬尿胺酸存在下，6RNMSC1-2_F02 從 IL-6R 之解離，點線代表犬尿胺酸不存在下，6RNMSC1-2_F02 從 IL-6R 之解離。

圖 33 顯示將 5 μ g/L 之 6RNMSC1-2_F02 作為分析物，使交互作用 180 秒，評價對於固定於感測晶片 CM5 上之 IL-6R 之回應。縱軸代表使 6RNMSC1-2_F02 交互作用前後之回應之變化(RU)、橫軸代表溶液中含有之犬尿胺酸濃度(μ mol/L)。

圖 34 顯示以 FCM 評價抗體對膜型人類 IL-6R 之結合之圖。上段表示犬尿胺酸存在下、下段表示犬尿胺酸不存在下之結果。橫軸表示螢光強度、縱軸表示細胞數。

圖 35A 顯示低分子存在下，與抗原結合之抗體所致對表現抗原之細胞之 ADCC 活性。犬尿胺酸存在下，與 hIL-6R 結合之選殖體 6RNMSC1-2_F02 所致對在犬尿胺酸存在下(三角)或不存在下(圓)表現 hIL-6R 之 BaF 細胞之 ADCC 活性。白為個別之測定值、黑為平均值。

圖 35B 顯示低分子存在下，與抗原結合之抗體所致對表現抗原之細胞之 ADCC 活性。無論犬尿胺酸之有無，與 hIL-6R 結合之 MRA 所致對在犬尿胺酸存在下(三角)或不存在下(圓)表現 hIL-6R 之 BaF 細胞之 ADCC 活性。白為個別之測定值、黑為平均值。

圖 36 顯示低分子存在下，與抗原結合之抗體所致對表現抗原之細胞之 ADCC 活性。犬尿胺酸存在下，與 hIL-6R 結合之選殖體 6RNMSC1-2_F02 所致對在犬尿胺酸存在下(三角)或不存在下(圓)表現 hIL-6R 之 BaF 細胞之 ADCC 活性。橫軸代表犬尿胺酸濃度，縱軸代表 ADCC 活性(%)。ADCC 活性表示平均值與標準偏差。

圖 37 顯示選殖體 6RNMSC1-2_F02 在小鼠血清中與人類 IL-6R 結合之 ELISA 之結果。縱軸代表評價犬尿胺酸之有無所致抗體對人類 IL-6R 之結合活性之吸光度之值。

圖 38 顯示利用合理設計抗體庫獲得之選殖體 I6RLSA1-6_011 對人類 IL-6 於 ATP 及 Adenosine 10 mM 存在

或不存在下之 ELISA 之結果。縱軸代表評價抗體對人類 IL-6 之結合活性之吸光度之值。陽性對照(Positive Control)，代表使用由合理設計抗體庫獲得，無論低分子有無，顯示對人類 IL-6 有結合活性之選殖體之結果。陰性對照(Negative Control)代表使用 M13KO7 Helper Phage 時之結果。

圖 39 顯示利用合理設計抗體庫獲得之選殖體 6RRLSA1-6_037、6RRLSA1-6_045 對人類 IL-6 於 ATP 及 Adenosine 10 mM 存在或不存在下之 ELISA 之結果。縱軸代表評價抗體對人類 IL-6 之結合活性之吸光度之值。陰性對照(Negative Control)代表使用 M13KO7 Helper Phage 時之結果。

圖 40 顯示針對合理設計抗體庫，實施 4 次對於人類 IgA-Fc 而言利用抗體多價提示噬菌體展示所為之淘選而得之 96 個選殖體之 ELISA 之結果。縱軸代表評價於 ATP 及腺苷不存在下、橫軸代表於存在下抗體對人類 IgA-Fc 之結合活性之吸光度之值。

圖 41 顯示針對合理設計抗體庫，實施 4 次對於人類 IgA-Fc 而言利用抗體一價提示噬菌體展示所為之淘選而得之 96 個選殖體之 ELISA 之結果。縱軸代表評價於 ATP 及腺苷不存在下、橫軸代表於存在下抗體對人類 IgA-Fc 之結合活性之吸光度之值。

圖 42 顯示利用合理設計抗體庫獲得之選殖體 IADL3C5-4_048 對人類 IgA-Fc 於 ATP 及 Adenosine 10 mM 存在或不存在下之 ELISA 之結果。縱軸代表評價抗體對人類 IgA-Fc 之結合活性之吸光度之值。陽性對照(Positive

Control), 代表使用由合理設計抗體庫獲得, 無論低分子有無, 顯示對人類 IgA-Fc 有結合活性之選殖體之結果。陰性對照 (Negative Control) 代表使用 M13KO7 Helper Phage 時之結果。

圖 43 顯示各低分子 1 mM 存在下・不存在下, 使各選殖體 1 Mm 與固定在感測晶片 CM5 上之 IL-6R 交互作用 120 秒時之結合量 (Binding response(RU))。

圖 44A 顯示低分子存在下, 與抗原結合之抗體所致對表現抗原之細胞之 ADCC 活性之圖。於 ATP 存在下與 hIL-6R 結合之選殖體 6RAD2C1-4_030 所致之 ATP 存在下(三角)或不存在下(圓)之對表現 hIL-6R 之 CHO 細胞之 ADCC 活性。白代表個別之測定值、黑代表平均值。

圖 44B 顯示低分子存在下, 與抗原結合之抗體所致對表現抗原之細胞之 ADCC 活性之圖。於 ATP 存在下與 hIL-6R 結合之選殖體 6RAD2C1-4_011 所致之 ATP 存在下(三角)或不存在下(圓)之對表現 hIL-6R 之 CHO 細胞之 ADCC 活性。白代表個別之測定值、黑代表平均值。

圖 44C 顯示低分子存在下, 與抗原結合之抗體所致對表現抗原之細胞之 ADCC 活性之圖。不論 ATP 是否存在, 與 hIL-6R 結合之 MRA 所致之 ATP 存在下(三角)或不存在下(圓)之對表現 hIL-6R 之 CHO 細胞之 ADCC 活性。白代表個別之測定值、黑代表平均值。

圖 45 顯示利用合理設計抗體庫獲得之選殖體 HSADSA1-6_020 對 HSA 於 ATP 及 Adenosine 10 mM 存在或不存在下之 ELISA 之結果。縱軸代表評價抗體對 HSA 之結合活

性之吸光度之值。陽性對照(Positive Control)，代表使用由合理設計抗體庫獲得，無論低分子有無，顯示對 HSA 有結合活性之選殖體之結果。陰性對照(Negative Control)代表使用 M13KO7 Helper Phage 時之結果。

【實施方式】

【0016】 以下定義及詳細說明，係為了容易理解在本說明書本發明之說明而提供。

胺基酸

本說明書中，以例如 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，將胺基酸以單字母碼或三字母碼、或其兩者表示記載。

【0017】 胺基酸之改變

為了抗原結合分子之胺基酸序列中之胺基酸之改變，可適當採用部位專一性的變異誘發法(Kunkel 等(Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82, 488-492))或 Overlap extension PCR 等公眾所知方法。又，作為取代為天然胺基酸以外之胺基酸之胺基酸改變方法，也可採用多數公眾所知之方法(Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. (2006) 35, 225-249、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003) 100 (11), 6353-6357)。例如於含有為終止密碼子的 1 個 UAG 密碼子(amber codon)的互補 amber suppressor tRNA 結合有非天然胺基酸之 tRNA 的無細胞轉譯系系統(Clover Direct(Protein Express))等也可理想地使用。

【0018】 本說明書中，表示胺基酸之改變部位時使用之「及

/或」之用語之意義，包括「及」與「或」適當組合的所有組合。具體而言，例如「33 位、55 位、及/或 96 位之胺基酸經取代」，包括以下胺基酸之改變之多樣性；

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

【0019】 又，本說明書中，表示胺基酸改變之表達，可適當使用在表示特定位置之數字前後一併記載胺基酸之單字母碼或 3 字母碼之表達。例如：對抗體可變區所含之胺基酸施以取代時使用之所謂 N100bL 或 Asn100bLeu 之改變，代表將 Kabat 編號表示之 100b 位之 Asn 取代為 Leu。亦即，數字係代表 Kabat 編號表示之胺基酸之位置，在其之前記載之胺基酸之單字母碼或 3 字母碼代表取代前之胺基酸、在其後記載之胺基酸之單字母碼或 3 字母碼代表取代後之胺基酸。同樣地，例如，對抗體不變區所含之 Fc 區施以胺基酸取代時之稱為 P238D 或 Pro238Asp 之改變，係表示 EU 編號表示之 238 位之 Pro 取代為 Asp。亦即數字表示 EU 編號表示之胺基酸之位置，在其前記載之胺基酸單字母碼或 3 字母碼代表取代前之胺基酸，之後記載之胺基酸之單字母碼或 3 字母碼代表取代後之胺基酸。

【0020】 抗原

本說明書中，「抗原」只要含有抗原結合分域所結合之抗原決定部位(epitope)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。抗原可列舉如下列分子；17-IA、4-1BB、4Dc、6-酮-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、aFGF、ALCAM、ALK、ALK-1、ALK-7、alpha-1-antitrypsin、alpha-V/beta-1 拮抗劑、ANG、Ang、APAF-1、APE、APJ、APP、APRIL、AR、ARC、ART、Artemin、抗 Id、ASPARTIC、心房性鈉利尿因子、av/b3 細胞黏合素、Axl、b2M、B7-1、B7-2、B7-H、B-淋巴球刺激因子(BlyS)、BACE、BACE-1、Bad、BAFF、BAFF-R、Bag-1、BAK、Bax、BCA-1、BCAM、Bcl、BCMA、BDNF、b-ECGF、bFGF、BID、Bik、BIM、BLC、BL-CAM、BLK、BMP、BMP-2、BMP-2a、BMP-3、Osteogenin(Osteogenin)、BMP-4、BMP-2b、BMP-5、BMP-6、Vgr-1、BMP-7(OP-1)、BMP-8(BMP-8a、OP-2)、BMPR、BMPR-IA(ALK-3)、BMPR-IB(ALK-6)、BRK-2、RPK-1、BMPR-II(BRK-3)、BMP、b-NGF、BOK、Bombesin、骨來源神經營養因子(Bone-derived neurotrophic factor)、BPDE、BPDE-DNA、BTC、補體因子 3(C3)、C3a、C4、C5、C5a、C10、CA125、CAD-8、calcitonin、cAMP、癌胎兒抗原(CEA)、癌關連抗原、Cathepsin A、Cathepsin B、Cathepsin C/DPPI、Cathepsin D、Cathepsin E、Cathepsin H、Cathepsin L、Cathepsin O、Cathepsin S、Cathepsin V、Cathepsin X/Z/P、CBL、CCI、CCK2、CCL、CCL1、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL2、CCL20、CCL21、CCL22、

CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、CCL3、
 CCL4、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9/10、CCR、CCR1、
 CCR10、CCR10、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、
 CCR8、CCR9、CD1、CD2、CD3、CD3E、CD4、CD5、CD6、
 CD7、CD8、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD13、CD14、
 CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、
 CD25、CD27L、CD28、CD29、CD30、CD30L、CD32、CD33(p67
 蛋白質)、CD34、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、
 CD49a、CD52、CD54、CD55、CD56、CD61、CD64、CD66e、
 CD74、CD80(B7-1)、CD89、CD95、CD123、CD137、CD138、
 CD140a、CD146、CD147、CD148、CD152、CD164、CEACAM5、
 CFTR、cGMP、CINC、肉毒桿菌(*Clostridium botulinum*)毒素、
 產氣莢膜梭狀芽孢桿菌(*Clostridium perfringens*)毒素、
 CKb8-1、CLC、CMV、CMV UL、CNTF、CNTN-1、COX、C-Ret、
 CRG-2、CT-1、CTACK、CTGF、CTLA-4、PD1、PDL1、LAG3、
 TIM3、galectin-9、CX3CL1、CX3CR1、CXCL、CXCL1、CXCL2、
 CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、
 CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、
 CXCL16、CXCR、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、
 CXCR6、cytokeratin 腫瘤關連抗原、DAN、DCC、DcR3、
 DC-SIGN、補體控制因子(Decay accelerating factor)、
 des(1-3)-IGF-I(腦 IGF-1)、Dhh、Digoxin、DNAM-1、Dnase、
 Dpp、DPPIV/CD26、Dtk、ECAD、EDA、EDA-A1、EDA-A2、
 EDAR、EGF、EGFR(ErbB-1)、EMA、EMMPRIN、ENA、endothelin

受體、enkephalinase、eNOS、Eot、eotaxin 1、EpCAM、Ephrin B2/EphB4、EPO、ERCC、E-selectin、ET-1、第 IIa 因子、第 VII 因子、第 VIIIc 因子、第 IX 因子、纖維母細胞活化蛋白質 (FAP)、Fas、FcR1、FEN-1、ferritin、FGF、FGF-19、FGF-2、FGF3、FGF-8、FGFR、FGFR-3、fibrin、FL、FLIP、Flt-3、Flt-4、卵泡刺激荷爾蒙、fractalkine、FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、FZD10、G250、Gas6、GCP-2、GCSF、GD2、GD3、GDF、GDF-1、GDF-3(Vgr-2)、GDF-5(BMP-14、CDMP-1)、GDF-6(BMP-13、CDMP-2)、GDF-7(BMP-12、CDMP-3)、GDF-8(myostatin)、GDF-9、GDF-15(MIC-1)、GDNF、GDNF、GFAP、GFRA-1、GFR-alpha1、GFR-alpha2、GFR-alpha3、GITR、升糖素、Glut4、糖蛋白 IIb/IIIa(GPIIb/IIIa)、GM-CSF、gp130、gp72、GRO、成長荷爾蒙釋放因子、半抗原(NP-cap 或 NIP-cap)、HB-EGF、HCC、HCMV gB 外被糖蛋白、HCMV gH 外被糖蛋白、HCMV UL、造血成長因子 (HGF)、Hep B gp120、heparanase、Her2、Her2/neu(ErbB-2)、Her3(ErbB-3)、Her4(ErbB-4)、單純疱疹病毒(HSV) gB 糖蛋白、HSV gD 糖蛋白、HGFA、高分子量黑色素瘤關連抗原(High molecular weight melanoma-associated antigen)(HMW-MAA)、HIV gp120、HIV IIIB gp 120 V3 環圈、HLA、HLA-DR、HM1.24、HMFG PEM、HRG、Hrk、人類心肌凝蛋白、人類細胞巨病毒(HCMV)、人類成長荷爾蒙(hGH)、HVEM、I-309、IAP、ICAM、ICAM-1、ICAM-3、ICE、ICOS、IFNg、Ig、IgA 受體、IgE、IGF、IGF 結合蛋白質、IGF-1R、

IGFBP、IGF-I、IGF-II、IL、IL-1、IL-1R、IL-2、IL-2R、IL-4、IL-4R、IL-5、IL-5R、IL-6、IL-6R、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-18R、IL-21、IL-23、IL-27、干擾素 (INF)- alpha、INF- beta、INF-gamma、inhibin、iNOS、胰島素 A 鏈、胰島素 B 鏈、胰島素狀增殖因子 1、細胞黏合素 alpha2、細胞黏合素(integrin) alpha3、細胞黏合素 alpha4、細胞黏合素 alpha4/ beta 1、細胞黏合素 alpha4/ beta 7、細胞黏合素 alpha5(alphaV)、細胞黏合素 alpha5/ beta 1、細胞黏合素 alpha5/ beta 3、細胞黏合素 alpha6、細胞黏合素 beta 1、細胞黏合素 beta 2、干擾素 gamma、IP-10、I-TAC、JE、kallikrein2、kallikrein5、kallikrein6、kallikrein11、kallikrein12、kallikrein14、kallikrein15、kallikreinL1、kallikreinL2、kallikreinL3、kallikreinL4、KC、KDR、角質化細胞增殖因子(KGF)、laminin 5、LAMP、LAP、LAP(TGF-1)、潛在型 TGF-1、潛在型 TGF-1 bp1、LBP、LDGF、LECT2、lefty、Lewis-Y 抗原、Lewis-Y 關連抗原、LFA-1、LFA-3、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、lympotoxin beta 受體、Mac-1、MAdCAM、MAG、MAP2、MARC、MCAM、MCAM、MCK-2、MCP、M-CSF、MDC、Mer、METALLOPROTEASES、MGDF 受體、MGMT、MHC(HLA-DR)、MIF、MIG、MIP、MIP-1-alpha、MK、MMAC1、MMP、MMP-1、MMP-10、MMP-11、MMP-12、MMP-13、MMP-14、MMP-15、MMP-2、MMP-24、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、MPIF、

Mpo、MSK、MSP、mutin(Muc1)、MUC18、Muller 管抑制物質、Mug、MuSK、NAIP、NAP、NCAD、N-Cadherin、NCA 90、NCAM、NCAM、neprilysin、neurotrophin -3、-4、或 -6、neurturin、神經成長因子(NGF)、NGFR、NGF- beta、nNOS、NO、NOS、Npn、NRG-3、NT、NTN、OB、OGG1、OPG、OPN、OSM、OX40L、OX40R、p150、p95、PADPr、副甲狀腺荷爾蒙、PARC、PARP、PBR、PBSF、PCAD、P-Cadherin、PCNA、PDGF、PDGF、PDK-1、PECAM、PEM、PF4、PGE、PGF、PGI2、PGJ2、PIN、PLA2、胎盤性鹼性磷解酶(PLAP)、PlGF、PLP、PP14、胰島素前體、prorelaxin、proteinC、PS、PSA、PSCA、前列腺專一性膜抗原 (PSMA)、PTEN、PTHrp、Ptk、PTN、R51、RANK、RANKL、RANTES、RANTES、relaxinA 鏈、relaxinB 鏈、腎素(renin)、呼吸器多核體病毒(RSV)F、RSV Fgp、Ret、風濕因子、RLIP76、RPA2、RSK、S100、SCF/KL、SDF-1、SERINE、血清白蛋白、sFRP-3、Shh、SIGIRR、SK-1、SLAM、SLPI、SMAC、SMDF、SMOH、SOD、SPARC、Stat、STEAP、STEAP-II、TACE、TACI、TAG-72(腫瘤關連糖蛋白-72)、TARC、TCA-3、T 細胞受體(例如 T 細胞受體 alpha/ beta)、TdT、TECK、TEM1、TEM5、TEM7、TEM8、TERT、睪丸 PLAP 狀鹼性磷解酶、TfR、TGF、TGF-alpha、TGF-beta、TGF-beta Pan Specific、TGF-betaRI(ALK-5)、TGF-betaRII、TGF-betaRIIb、TGF-betaRIII、TGF-beta1、TGF-beta2、TGF-beta3、TGF-beta4、TGF-beta5、凝血酶(thrombin)、胸腺 Ck-1、甲狀腺刺激荷爾蒙、Tie、TIMP、TIQ、組織因子、TMEFF2、Tmpo、TMPRSS2、

TNF、TNF-alpha、TNF-alphabeta、TNF-beta2、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)、
 TNFRSF13B(TACI)、TNFRSF13C(BAFF R)、TNFRSF14(HVEM
 ATAR、HveA、LIGHT R、TR2)、TNFRSF16(NGFR p75NTR)、
 TNFRSF17(BCMA)、TNFRSF18(GITR AITR)、TNFRSF19(TROY
 TAJ、TRADE)、TNFRSF19L(RELT)、TNFRSF1A(TNF RI
 CD120a、p55-60)、TNFRSF1B(TNF RII CD120b、p75-80)、
 TNFRSF26(TNFRH3)、TNFRSF3(LTbR TNF RIII、TNFC R)、
 TNFRSF4(OX40 ACT35、TXGP1 R)、TNFRSF5(CD40 p50)、
 TNFRSF6(Fas Apo-1、APT1、CD95)、TNFRSF6B(DcR3 M68、
 TR6)、TNFRSF7(CD27)、TNFRSF8(CD30)、TNFRSF9(4-1BB
 CD137、ILA)、TNFRSF21(DR6)、TNFRSF22(DcTRAIL R2
 TNFRH2)、TNFRST23(DcTRAIL R1 TNFRH1)、TNFRSF25(DR3
 Apo-3、LARD、TR-3、TRAMP、WSL-1)、TNFSF10(TRAIL Apo-2
 配體、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(4-1BB 配體 CD137 配體)、TP-1、t-PA、Tpo、TRAIL、TRAIL R、TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRANCE、transferrin 受體、TRF、Trk、TROP-2、TLR(Toll-like receptor)1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、TSG、TSLP、腫瘤關連抗原 CA125、腫瘤關連抗原表現 Lewis Y 關連碳水化合物、TWEAK、TXB2、Ung、uPAR、uPAR-1、尿激酶、VCAM、VCAM-1、VECAD、VE-Cadherin、VE-cadherin-2、VEGFR-1(flt-1)、VEGF、VEGFR、VEGFR-3(flt-4)、VEGI、VIM、病毒抗原、VLA、VLA-1、VLA-4、VNR 細胞黏合素、Von Willebrand 因子、WIF-1、WNT1、WNT2、WNT2B/13、WNT3、WNT3A、WNT4、WNT5A、WNT5B、WNT6、WNT7A、WNT7B、WNT8A、WNT8B、WNT9A、WNT9A、WNT9B、WNT10A、WNT10B、WNT11、WNT16、XCL1、XCL2、XCR1、XCR1、XEDAR、XIAP、XPD、HMGB1、IgA、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 以及荷爾蒙及成長因子用之受體。作為抗原，宜為在癌組織或發炎性組織之癌細胞、免疫細胞、基質細胞等表現之抗原為較佳。

【0021】 上述抗原例示也有記載受體，但該等受體係於活體液中以可溶型存在的情形，可作為本發明之包含因應標的組織專一性化合物之濃度而與抗原之結合活性改變之抗原結合分域之抗原結合分子所結合之抗原使用。如此之可溶型受體之一非限定態樣，例如：Mullberg 等人(J. Immunol. (1994) 152 (10), 4958-4968)記載之可溶型 IL-6R，即由序列編號：1 表示之 IL-6R 多胜肽序列中之 1 至 357 號胺基酸構成的蛋白質。

【0022】 上述抗原之例示，包含於細胞膜表現之膜型分子、及從細胞向細胞外分泌之可溶型分子。本發明之包含因應標的組織專一性化合物之濃度而對抗原之結合活性有改變之抗原結合分域的抗原結合分子，當係與從細胞分泌之可溶型分子結合時，作為該抗原結合分子，宜如後述具有中和活性較理想。

【0023】 可溶型分子存在之溶液不限定，本可溶型分子能存在於活體液，亦即可存在於充滿活體內之脈管或組織・細胞之間的所有液體。非限定之一態樣中，本發明之抗原結合分子結合之可溶型分子，可存在於細胞外液。細胞外液，在脊椎動物係指血漿、組織間液、淋巴液、緻密的結締組織、腦脊髓液、髓液、穿刺液、或關節液等骨及軟骨中之成分、肺泡液(支氣管肺泡洗滌液)、腹水、胸水、心囊水、囊泡液、或眼房水(房水)等細胞透過液(細胞之主動輸送・分泌活動之結果產生的各種腺腔內的液體、及消化管腔等體腔內液)的總稱。

【0024】 本發明之包含因應標的組織專一性化合物之濃度而對抗原之結合活性有改變之抗原結合分域的抗原結合分子，當與在細胞膜表現之膜型分子結合的情形，作為該抗原結合分子之理想例，可列舉如後述具有細胞傷害活性、或結合細胞傷害性物質或有結合能力之抗原結合分子為理想。又，具有替換細胞傷害活性、或結合細胞傷害性物質或有結合能力之性質，或該性質以外更有中和活性之抗原結合分子，也是非限定之一理想態樣。

【0025】 抗原決定部位(epitope)

意指抗原中存在之抗原決定基之抗原決定部位，係指本說明書揭示之抗原結合分子中之抗原結合分域所結合之抗原上之部位。因此，例如：抗原決定部位可由其構造定義。又，該抗原決定部位也可由認識該抗原決定部位之抗原結合分子中對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部位之胺基酸殘基指定抗原決定部位。又，抗原決

定部位為糖鏈時，也可利用特定糖鏈構造來指定抗原決定部位。

【0026】 直線狀抗原決定部位，係包含認識胺基酸一次序列的抗原決定部位的抗原決定部位。直線狀抗原決定部位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。

【0027】 立體構造抗原決定部位，與直線狀抗原決定部位相對照，係指含有抗原決定部位之胺基酸之一次序列並非所認識之抗原決定部位之單一規定成分的抗原決定部位(例如:胺基酸之一次序列不一定由規定抗原決定部位之抗體所認識之抗原決定部位)。立體構造抗原決定部位，可能包含對直線狀抗原決定部位為更多之數之胺基酸。關於立體構造抗原決定部位之認識，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部位之某個胺基酸及/或多胜肽主鏈，可以並排，抗體可認識抗原決定部位。決定抗原決定部位之立體構造之方法，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常磁性共振分光學，但不限於該等。例如參考:Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology (1996)、第 66 卷、Morris(編)。

【0028】 與抗原決定部位結合之抗原結合分域之結構，稱為抗原結合位(paratope)。利用在抗原決定部位與抗原結合位之間作用之氫鍵、靜電力、凡得瓦力、疏水鍵等，使得抗原決定部位與抗原結合位安定結合。此抗原決定部位與抗原結合位

間之結合力，稱為親和性(affinity)。多數抗原與多數抗原結合分子結合時之結合力之總和，稱為結合性(avidity)。當包含多數抗原結合分域之(亦即多價之)抗體等結合於多數抗原決定部位時，結合力(affinity)會相乘地作用，因此結合性高於親和性。

【0029】 結合活性

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

【0030】 例如：含有對抗 IL-6R 之抗原結合分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部位之情事，例如可以如下方式確認。為了上述目的，合成由構成 IL-6R 之細胞外分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分域之胺基酸序列之區域，以基因工程方法可獲得。其次，評價由構成細胞外分域之胺基酸序列所構成的線狀胜肽與含有對 IL-6R 之抗原結合分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，可以明確獲得對線狀胜肽之結合活性。利用該等試驗，可以明確了解該抗原結合分子對線狀胜肽之結合活性。

【0031】 又，含有對抗 IL-6R 之抗原結合分域的待驗抗原

結合分子會認識立體構造抗原決定部位之情事，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 之抗原結合分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 之細胞外分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。

【0032】 包含對抗 IL-6R 之抗原結合分域之待驗抗原結合分子其對 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。

【0033】 ELISA 格式中，包含對抗 IL-6R 之抗原結合分域之待驗抗原結合分子其對 IL-6R 表現細胞之結合活性，可利用比較酵素反應所生成之信號水平而定量評價。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 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 IL-6R 表現細胞之結合活性。

【0034】 待驗抗原結合分子對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 公司之商品名)

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)

【0035】 例如:包含對抗 IL-6R 之抗原結合分域之待驗抗原結合分子其對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 軟體(BD 公司)解析所得之螢光強度，亦即幾何平均值(Geometric Mean)。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。

【0036】 包含對抗 IL-6R 之抗原結合分域之待驗抗原結合分子與某抗原結合分子共有抗原決定部位之情事，可藉由兩者

對於相同抗原決定部位之彼此競爭而確認。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。

【0037】 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不存在下，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部位之結合之結合能力。亦即，彼此競爭抗原結合分子對於相同抗原決定部位之親和性愈大，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。

【0038】 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(avidin)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眾所知。

【0039】 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 之抗原結合分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部位，或對於相同抗原決定部位之結合為彼

此競爭之抗原結合分子。

【0040】 包含對抗 IL-6R 之抗原結合分域之待驗抗原結合分子所結合之抗原決定部位在鑑定構造時，待驗抗原結合分子與對照抗原結合分子共有抗原決定部位之情事，可藉由比較兩者之抗原結合分子對於構成該抗原決定部位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。

【0041】 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。

【0042】 又，當鑑定的抗原決定部位為立體抗原決定部位時，待驗抗原結合分子與對照抗原結合分子共有抗原決定部位之情事，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部位導入有變異之 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抗原結合分子與對照抗原結合分子。其次，對於經適當緩衝液洗滌的細胞懸浮液，添加能夠認識待驗抗原結合分子與對照抗原結合分子的經 FITC 標記的抗體。利用 FACSCalibur(BD 公司)測定由標記抗體染色之細胞之螢光強度及細胞數。將待驗抗原結合分子與對照抗原結合分子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 μ g/ml 至 10

ng/ml 之間的任一濃度。標記抗體對該細胞之結合量，反映於使用 CELL QUEST 軟體(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抗原結合分子與對照抗原結合分子之結合活性。

【0043】 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 軟體解析。從多胜肽組合體存在下及不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 1 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。

【0044】 (式 1)

Δ 幾何平均值 = 幾何平均值 (多胜肽組合體存在下) / 幾何平均值 (多胜肽組合體不存在下)

【0045】 將由解析獲得之反映待驗抗原結合分子對變異 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 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 中之抗原決定部位

的抗原結合分子當做對照抗原結合分子。

【0046】 待驗抗原結合分子對變異 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 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部位為相同。

【0047】 標的組織

本說明書中使用之用語「標的組織」，係指包含存在本發明之抗原結合分子以化合物依存性結合之抗原之細胞的組織，且該抗原結合分子對於在該細胞表現之膜型分子之結合、或對於該組織存在之可溶型分子之結合係對含該組織之活體帶來正面藥理作用之組織。此時之「正面藥理作用」，係指包含標的組織之病變部位，對於含該組織之活體帶來症狀減輕、緩和、寬解、或治癒之作用。帶來如此藥理作用之一非限定機制之態樣，例如：於癌等惡性腫瘤帶來之症狀之情形，可列舉對癌細胞之細胞傷害活性及增殖抑制及癌組織之免疫活化等。如此之一非限定機制之態樣，例如：發炎性疾病之情形，可列舉在發炎組織之發炎性細胞激素之作用之遮斷活性或免疫抑制等。

【0048】 癌組織專一的化合物

本說明書中使用之用語「癌組織專一性的化合物(癌組織

專一的化合物)」，係指比起非癌組織，在癌組織中以差別存在之化合物。本說明書中，用語「癌」，一般用於代表惡性新生物，其也可為轉移性或非轉移性。例如：從消化道或皮膚等上皮組織發生之癌腫瘤之非限定例，可列舉腦腫瘤、皮膚癌、頸頭部癌、食道癌、肺癌、胃癌、十二指腸癌、乳癌、前列腺癌、子宮頸癌、子宮體癌、胰臟癌、肝臟癌、大腸癌、結腸癌、膀胱癌、及卵巢癌等。又，肌肉等非上皮性組織(間質)發生之肉瘤之非限定例，例如骨肉瘤、軟骨肉瘤、橫紋肌肉瘤、平滑肌肉瘤、脂肪肉瘤、及血管肉瘤等。再者，從造血器官來的血液癌之非限定例，可列舉包括 Hodgkin 淋巴腫瘤(Hodgkin's lymphoma)及非 Hodgkin 淋巴腫瘤(non Hodgkin's lymphoma)之惡性淋巴腫瘤、包括急性(acute myelocytic leukemia)或慢性骨髓性白血病(chronic myelocytic leukemia)、及急性(acute lymphatic leukemia)或慢性淋巴性白血病(chronic lymphatic leukemia)之白血病、以及多發性骨髓瘤(multiple myeloma)。本說明書廣用之「新生物」之用語，也意指新生出之各種病變組織腫瘤。本發明中，新生物之特徵為形成腫瘤，且部分有血管形成。新生物可能為例如：血管腫瘤、神經膠腫瘤、畸形腫瘤等良性、或例如：癌腫瘤、肉腫瘤、膠細胞腫瘤、星狀膠細胞腫瘤、神經芽細胞腫瘤、網膜芽腫瘤等惡性。

【0049】 用語「癌組織」，指包括至少一個癌細胞之組織。因此係指例如癌組織含有癌細胞與血管般，包括貢獻於癌細胞及內皮細胞之腫瘤(tumor mass)形成的所有細胞類型。本說明書中，腫瘤係指腫瘤組織巢(a foci of tumor tissue)。用語「腫

瘤」，一般用於指良性新生物或惡性新生物。

【0050】 例如：在一些實施形態中，癌組織專一的化合物，可為存在於癌組織，不存在於非癌組織，在或癌組織不存在但於非癌組織存在等定性上由癌組織專一性規定之化合物。別的實施形態中，癌組織專一的化合物，可為比起非癌組織以相異濃度(例如：高濃度或低濃度)於癌組織存在之等以定量的癌組織專一性規定之化合物。例如：癌組織專一的化合物以任意濃度差別的存在。但是一般，癌組織專一的化合物，可能增加到至少 5%、至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 100%、至少 110%、至少 120%、至少 130%、至少 140%、至少 150%、至少 2 倍、至少 5 倍、至少 10 倍、至少 50 倍、至少 100 倍、至少 10^3 倍、至少 10^4 倍、至少 10^5 倍、至少 10^6 倍、或更高、乃至無限大(亦即非癌組織不存在之情形)之濃度存在，或一般可能減少至至少 5%、至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、或至少 100%(亦即，代表不存在)之濃度存在。癌組織專一的化合物，如統計上以顯著濃度(亦即，使用 Welch 之 t 檢定或 Wilcoxon 之順位和檢定中之任一者決定般，p 值小於 0.05 及/或 q 值小於 0.10)較佳為差別地存在。癌組織專一的化合物之非限定態樣，可列舉如以下癌組織包括之癌細胞、免疫細

胞、基質細胞特有之代謝活性所產生之癌組織專一性的代謝產物(癌組織專一的代謝產物；癌細胞專一的代謝產物、於癌組織浸潤之免疫細胞專一性的代謝產物、癌基質細胞專一的代謝產物)化合物。

【0051】 癌組織專一的代謝產物

用語「代謝」，係指在生物之組織內產生之化學變化，包括「同化」及「異化」。同化係指分子之生合成或堆積，異化指分子之分解。「代謝產物」係物質代謝而來之中間體或產物。「一次代謝產物」，係指細胞或生物之成長或繁殖過程直接相關之代謝產物，「二次代謝產物」指與此等之成長或繁殖過程非直接相關，與生合成細胞或生物共通之生命現象未直接相關之物質之代謝結果產生之抗生物質或色素等生產物。代謝產物，可為「活體高分子」之代謝產物，也可為「低分子」之代謝產物。「活體高分子」，係由一種以上之重複單元構成之高分子。活體高分子，一般於生物系找到，形成組織生物之細胞及於其附著之細胞間間質、組織間間質等結構物的分子量約 5000 以上之分子，尤其多糖類(碳水化合物等)及胜肽(此用語以包括多胜肽及蛋白質之方式使用)及聚核苷酸，同樣地，此等之類似體，例如胺基酸類似體或非胺基酸基構成或包含此等之化合物。「低分子」，指在活體存在之「活體高分子」以外之天然化學物質。本說明書記載之非限定態樣之癌組織專一的代謝產物，可列舉癌細胞專一性的低分子代謝產物為理想例(Eva Gottfried, Katrin Peter and Marina P. Kreutz, *From Molecular to Modular Tumor Therapy* (2010) 3 (2), 111-132)。又，也包括於

癌組織浸潤之免疫細胞高量產生之代謝產物或支持癌細胞生存及/或成長之基質細胞(癌基質細胞或癌間質纖維芽細胞(CAF))高量產生之代謝產物。浸潤之免疫細胞，可列舉樹狀細胞、抑制性樹狀細胞、抑制性 T 細胞、疲弊 T 細胞(exhausted T cell)、骨髓系來源抑制細胞(myeloma derived suppressor cell、MDSC)等。又，本發明中，代謝產物包括癌組織存在之細胞(癌細胞、免疫細胞、基質細胞)由於細胞凋零或壞死等而細胞死時，從細胞內往細胞外放出之化合物。

【0052】 為了鑑別癌細胞專一的代謝產物，可適當使用轉錄物層級之解析、(例如:Dhanasekaran 等(Nature (2001) 412, 822-826)、Lapointe 等人(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2004) 101, 811-816 或 Perou 等人(Nature (2000) 406, 747-752 等)或蛋白質組(proteome)層級之解析(例如:Ahrm 等人(Mol. Carcinog. (2002) 33, 9-15、Hood 等人(Mol. Cell. Proteomics (2005) 4, 1741-1753)，此外可適當使用以代謝學的變化為中心之代謝學(Metabolomics)解析。亦即，為了鑑別待驗試樣中之代謝產物，可適當使用單獨或組合使用高壓液體層析(HPLC)、核磁共振(NMR)(Brindle 等人(J. Mol. Recognit. (1997) 10, 182-187)、質量分析法(Gates 及 Sweeley(Clin. Chem. (1978) 24, 1663-1673)(GC/MS 及 LC/MS))及 ELISA 等之代謝學的曲線變化(profiling)。

【0053】 由該等研究已了解癌細胞可在低氧壓條件下生長之代謝產物(例如葡萄糖或氧)及生長因子之濃度梯度改變而構成之腫瘤內之異質性 (Dang 及 Semenza(Trends Biochem. Sci.

(1999) 24, 68-72))。該等研究中，為了理解腫瘤惡性度之不同程度所致能量利用路徑之變化，也使用細胞株模型 (Vizan 等人 (Cancer Res. (2005) 65, 5512-5515)。代謝學平台之技術構成要素之非限定態樣，可列舉 Lawton 等人 (Pharmacogenomics (2008) 9, 383) 記載之試樣萃取、分離、檢測、分光分析、數據正規化、類別專一的代謝產物之描寫、路徑輿圖、確認、及候選代謝產物之功能性特徵附加。利用該等方法可鑑別所望之癌組織之癌細胞專一的代謝產物。

【0054】 本發明使用之癌組織專一的化合物、或癌組織專一的代謝產物之非限定態樣，可列舉從以下化合物選擇之至少一種化合物。至少一種化合物，包括後述相同抗原結合分域對抗原之結合活性係依存於一種癌組織專一的化合物、或依存癌組織專一的代謝產物，此外也包含依存多數種類之癌組織專一的化合物、或癌組織專一的代謝產物之情況。

【0055】 (1) 乳酸、琥珀酸、檸檬酸等解糖系、或克氏循環之一次代謝產物

本發明使用之癌組織專一的化合物，尤其癌細胞專一的代謝產物之非限定態樣，可列舉乳酸、琥珀酸、檸檬酸等的比起在周圍存在之非癌部組織，於癌組織以較高濃度存在之葡萄糖代謝之結果生成之一次代謝產物為理想例。丙酮酸激酶、己糖激酶、及乳酸脫氫酵素(LDH)等解糖系(Embden-Myerhof 路徑)酵素之上方調節(upregulation)為特徵之解糖系表現型，自以往已知就 Warburg 效果而言，為固形腫瘤之特徵。

【0056】 亦即，腫瘤細胞中，非 M1 構造同型，而是於嫌氣

條件下對於解糖 (erobic glycolysis) 為必要之 M2 構造同型之丙酮酸激酶高表現據認為活體內對於腫瘤細胞之生長有利 (Christofk 等人 (Nature (2008) 452, 230-233))。利用丙酮酸激酶生成之丙酮酸，於嫌氣條件下會受到因乳酸脫氫酵素 (LDH) 之平衡反應結果生成之乳酸所為之反饋抑制。由於該反饋抑制，會促進粒腺體之呼吸 (克氏循環)，及抑制細胞增殖，所以被人稱為 LDH、己糖激酶、及葡萄糖運送蛋白 (GLUT) 之上方調節對於腫瘤細胞增殖發揮重要作用 (Fantin 等人 (Cancer Cell (2006) 9, 425-434))。葡萄糖由解糖系代謝，其最終代謝產物乳酸於腫瘤之周圍與質子一起共輸送之結果，被認為腫瘤之周邊組織之 pH 會變成酸性條件。解糖系之最終產物乳酸、粒腺體之呼吸促進而生成之琥珀酸及檸檬酸，已知會堆積在癌組織 (Teresa 等人 (Mol. Cancer (2009) 8, 41-59))。本發明使用之癌組織專一的化合物，尤其癌細胞專一的代謝產物之非限定態樣，可列舉如此之由解糖系之代謝生成之一次代謝產物即乳酸、琥珀酸、檸檬酸等。又，已知因細胞死會使細胞內高濃度存在之琥珀酸往細胞外漏出 (Nature Immunology, (2008) 9, 1261-1269)。所以據認為細胞死頻繁發生的癌組織中，琥珀酸之濃度上昇。

【0057】 (2) 丙胺酸、麩胺酸、天冬胺酸等胺基酸

上述葡萄糖代謝以外，也已知嫌氣條件下須要連續供給對於活體高分子之生合成為必要之必須胺基酸及非必須胺基酸之腫瘤細胞中，胺基酸代謝也會變化。據稱：麩醯胺酸作為在其側鏈包括二個氫之氮運搬體，係於活體最廣泛分布之胺基

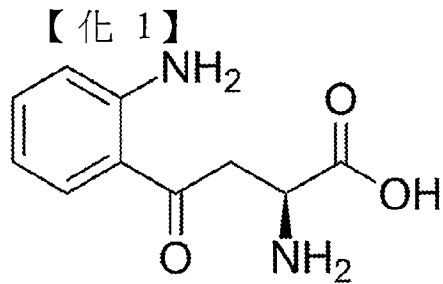
酸。攝入麩醯胺酸到細胞內之速度上昇之腫瘤細胞，據稱作為麩醯胺酸捕集器 (glutamine trap) 的功能。如此之麩醯胺酸之攝入及變換為麩胺酸及乳酸之活性之上昇，稱為「麩醯胺酸分解 (glutaminolysis)」，被認為是已轉形之(腫瘤)細胞之特徵 (Mazurek 及 Eigenbrodt (Anticancer Res. (2003) 23, 1149-1154、以及 Mazurek 等人 (J. Cell. Physiol. (1999) 181, 136-146))。其結果，癌患者血漿中之麩醯胺酸水平減少，但麩胺酸濃度增大 (Droge 等人 (Immunobiology (1987) 174, 473-479)。並且，利用肺癌組織之經 ^{13}C 放射標記之葡萄糖之代謝研究，觀察到 ^{13}C 標記琥珀酸、 ^{13}C 標記丙胺酸、 ^{13}C 標記麩胺酸、及 ^{13}C 標記檸檬酸之濃度間有相關。本發明使用之癌組織專一的化合物之非限定態樣中，如此之由於麩醯胺酸分解等而在癌組織以高濃度堆積之丙胺酸、麩胺酸、天冬胺酸等為理想例。

【0058】 (3) 犬尿胺酸 (kyneurine) 等胺基酸之代謝產物

吲哚胺 2, 3-二氧合酶 (IDO)，係黑色素瘤、結腸癌、及腎臟癌等許多癌中為高表現之色胺酸代謝酵素 (Uyttenhove 等人 (Nat. Med. (2003) 9, 1269-127)，已知有二種構造同型存在 (Lob 等人 (Cancer Immunol. Immunother. (2009) 58, 153-157))。IDO 係催化色胺酸變換為犬尿胺酸(化 1 表示之)，且為菸鹼醯胺核苷酸 (NAD) 之新生路徑之最初之酵素。又，在不表現 IDO 之腦膠質瘤，利用肝臟之色胺酸 2, 3-二氧合酶 (TDO)，從色胺酸生成犬尿胺酸 (Opitz 等人 (Nature (2011) 478, 7368, 197-203))。又，IDO 在於癌組織浸潤之樹狀細胞也會表現，樹

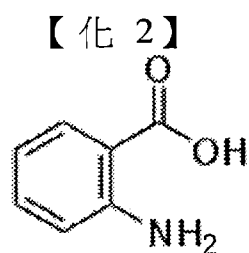
狀細胞也產生犬尿胺酸 (J. Immunol. (2008) 181, 5396-5404)。又，IDO 也會在癌組織之骨髓系來源抑制細胞 (MDSC)表現，MDSC 也產生犬尿胺酸 (Yu 等人(J. Immunol. (2013) 190, 3783-3797))。

【0059】



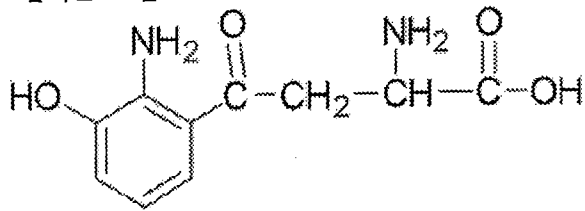
【0060】 犬尿胺酸已知會抑制同種 T 細胞回應 (Frumento 等人(J. Exp. Med. (2002) 196, 459-468)，有人提倡藉由如此之抑制，腫瘤細胞潛行通過抗腫瘤免疫回應，且藉由犬尿胺酸作用在腦膠質瘤表現之烯丙基煙受體之內因性配體之自泌增殖機構，促進腦膠質瘤細胞之增殖 (Opitz 等人(上揭))。犬尿胺酸係由犬尿胺酸酶變換為鄰胺苯甲酸(anthranilic acid)([化 2]表示)，並由犬尿胺酸 3-脫羧酶變換為 3-羥基犬尿胺酸([化 3]表示)。鄰胺苯甲酸(anthranilic acid)、及 3-羥基犬尿胺酸，均變換為成為 NAD 之前驅體之 3-羥基鄰胺苯甲酸(anthranilic acid)。

【0061】



【0062】

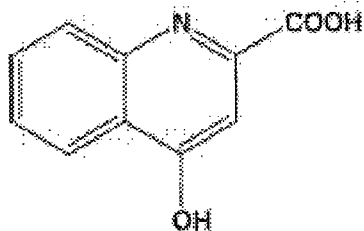
【化 3】



【0063】 犬尿胺酸，由於犬尿胺酸胺基轉移酶變換為犬尿喹啉酸(Kynurenic acid)([化 4]表示)。本發明使用之癌組織專一的化合物，尤其癌細胞專一的代謝產物之非限定態樣，可列舉如此之犬尿胺酸、及其代謝產物、鄰胺苯甲酸(anthranilic acid)、3-羥基犬尿胺酸、及犬尿喹啉酸等胺基酸之代謝產物為理想例。

【0064】

【化 4】



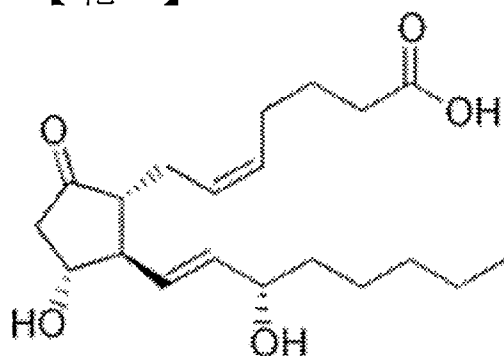
【0065】 (4)前列腺素 E2(Prostaglandin E2)等花生四烯酸之代謝產物

前列腺素 E2(PGE2)([化 5])，係包括由環氧合酶(COX)-1/2合成之前列腺素及前列凝素(Thromboxane)之稱為前列腺素類(prostanoid)之花生四烯酸之代謝物(Warner 及 Mitchell(FASEB J. (2004) 18, 790-804))。促進 PGE2 結腸癌細胞之增殖，並抑制其細胞凋零(apoptosis)(Sheng 等人(Cancer Res. (1998) 58, 362-366))。已知許多癌細胞中，環氧合酶之表現改變。亦即，

COX-1 在幾乎所有組織中以結構性表現，相對於此，COX-2 主要於腫瘤因某種發炎性細胞激素及癌基因誘導發現(Warner 及 Mitchell(前揭))。COX-2 之過量表現，據報告與乳癌之預後惡度(Denkert 等人(Clin. Breast Cancer (2004) 4, 428-433)、及卵巢癌急速疾病進行(Denker 等人(Mod. Pathol. (2006) 19, 1261-1269)有關連性。又，於癌組織浸潤之抑制性 T 細胞也產生前列腺素 E2 (Curr. Med. Chem. (2011) 18, 5217-5223)。花生四烯酸之代謝物之前列腺素、白三烯等低分子已知作為控制癌之自泌、及/或旁泌增殖之刺激因子 (Nat. Rev. Cancer (2012) 12 (11) 782-792)。本發明使用之癌組織專一的化合物，尤其癌細胞專一的代謝產物或於癌組織浸潤之免疫細胞專一的代謝物之一非限定態樣，可列舉如此之前列腺素 E2 等花生四烯酸之代謝產物為理想例。前列腺素 E2 以外，Thromboxane A2 (TXA2)在大腸癌等癌組織的產生有增加 (J. Lab. Clin. Med. (1993) 122, 518-523)，可列舉為本發明之花生四烯酸之代謝產物之一非限定態樣。

【0066】

【化 5】



【0067】 (5)腺苷、腺苷 3 磷酸(ATP)、腺苷 2 磷酸(ADP)、

腺苷 1 磷酸(AMP)等具嘌呤環結構之核苷

癌細胞已知若死亡，會有細胞內大量之 ATP 往細胞外漏出。所以，癌組織之 ATP 濃度，比正常組織顯著較高(PLoS One. (2008) 3, e2599)。多數類型的細胞會將 ATP、ADP 及 AMP 型之腺核苷酸游離。會由細胞外 -5'-核苷酸酶(eco-5'-nucleotidase)(CD73)之類之細胞表面之細胞外酵素代謝 (Resta 及 Thompson(Immunol. Rev. (1998) 161, 95-109)以及 Sadej 等人(Melanoma Res. (2006) 16, 213-222)。腺苷係低濃度且於細胞外環境以結構性存在之嘌呤核苷，但據報告固體癌發現的低氧組織中，細胞外腺苷濃度顯著增加 (Blay 及 Hoskin(Cancer Res. (1997) 57, 2602-2605)。CD73 在腫瘤及免疫細胞之表面表現 (Kobie 等人(J. Immunol. (2006) 177, 6780-6786)，於乳癌(Canbolat 等人(Breast Cancer Res. Treat. (1996) 37, 189-193)、胃癌(Durak 等人(Cancer Lett. (1994) 84, 199-202)、胰臟癌(Flocke 及 Mannherz(Biochim. Biophys. Acta (1991) 1076, 273-281)及膠質母細胞瘤(Bardot 等人(Br. J. Cancer (1994) 70, 212-218))發現活性上昇。腺苷在癌組織堆積，有人認為係因細胞質由於 5'-核苷酸酶造成 AMP 之脫磷酸，而使細胞內腺苷生成增加所引起 (Headrick 及 Willis(Biochem. J. (1989) 261, 541-550)。又，於癌組織浸潤之抑制性 T 細胞等也表現 ATP 分解酵素，並產生腺苷 (Proc. Natl. Acad. Sci. (2006) 103 (35), 13132-13137、Curr. Med. Chem. (2011) 18, 5217-5223)。產生之腺苷，據認為經由 A2A 受體等腺苷受體使癌組織成為受免疫抑制之環境 (Curr. Med. Chem.

(2011),18,5217-23)。本發明使用之癌組織專一的化合物之非限定態樣，如此因 ATP 等嘌呤核苷酸之代謝造成於癌組織以高濃度堆積之 ATP、ADP、AMP、或腺苷等為理想例。又，因腺苷會被腺苷去胺基酶(adenosine deaminase)分解成肌苷，故肌苷以高濃度堆積。

【0068】 (6)尿酸

尿酸係活體內，嘌呤核苷之代謝路徑之產物，於血液或間質腔等細胞外游離。又，近年已知癌組織等病變部位存在之死細胞會游離出尿酸 (Nat. Med. (2007) 13, 851-856)。本發明使用之癌組織專一的化合物之非限定態樣中，如此之因 ATP 等嘌呤核苷酸之代謝而於癌組織以高濃度堆積之尿酸，亦為理想例。

【0069】 (7)1-甲基菸鹼醯胺

多數人類癌組織中，已知酵素菸鹼醯胺 N-甲基轉移酶為高表現。本酵素當從菸鹼醯胺產生安定代謝物即 1-甲基菸鹼醯胺時，因為會消耗成為甲基提供體之 S-腺苷甲硫胺酸(SAM)之甲基，有人認為由於癌細胞之 SAM 濃度減少所伴隨之 DNA 之甲基化能力減損之機構，使菸鹼醯胺 N-甲基轉移酶之高表現會幫助腫瘤化(tumorigenesis) (Ulanovskaya 等人(Nat. Chem. Biol. (2013) 9 (5) 300-306))。本酵素之安定代謝產物 1-甲基菸鹼醯胺，已知會分泌到癌細胞之細胞外 (Yamada 等人(J. Nutr. Sci. Vitaminol. (2010) 56, 83-86))，本發明使用之癌組織專一的化合物之非限定之態樣，可列舉如此之因菸鹼醯胺之代謝而於癌組織以高濃度堆積之 1-甲基菸鹼醯胺等為理想例。

【0070】 發炎組織專一的化合物

本說明書中使用之用語「發炎組織專一性的化合物(發炎組織專一的化合物)」，係比起非發炎組織，於發炎組織中差別存在之化合物。本說明書中，「發炎組織」，係指

類風濕關節炎或退化性關節炎之關節

支氣管氣喘或 COPD 之肺(肺泡)

發炎性腸疾病或克羅病或潰瘍性大腸炎之消化器官

肝臟、腎臟、肺之纖維化症之纖維化組織

臟器移植時發生排斥反應之組織

動脈硬化或心衰竭之血管、心臟(心肌)

代謝症候群之內臟脂肪

異位性皮膚炎等皮膚炎之皮膚組織

椎間板脫出或慢性腰痛之脊髓神經等為理想例。

【0071】 發炎組織專一的代謝產物

發炎組織專一的代謝產物，係指於發炎性組織浸潤之免疫細胞高量產生之代謝產物、及於發炎組織中受傷害之正常細胞專一的高量產生之代謝產物。浸潤之免疫細胞，可舉效應子 T 細胞、成熟樹狀細胞、嗜中球、顆粒細胞(肥胖細胞)、嗜鹼球等。又，本發明中，代謝產物也包括發炎組織存在之細胞(免疫細胞、正常細胞)由於細胞凋零或壞死等而死亡時，從細胞內往細胞外放出之化合物。

【0072】 本發明使用之發炎組織專一的化合物、或發炎組織專一的代謝產物之非限定之態樣，可列舉從以下化合物選擇之至少一種化合物為宜。至少一種化合物，包括指後述相同抗

原結合分域所致對於抗原之結合活性，係依存於一種發炎組織專一的化合物、或發炎組織專一的代謝產物，此外，宜存於多數種類之發炎組織專一的化合物、或發炎組織專一的代謝產物的情況。

【0073】 (1)前列腺素 E2(Prostaglandin E2)等花生四烯酸之代謝產物

類風濕關節炎或退化性關節炎，已知 PGE2 濃度高 (Eur. J. Clin. Pharmacol. (1994) 46, 3-7.、Clin. Exp. Rheumatol. (1999) 17, 151-160、Am. J. Vet. Res. (2004) 65, 1269-1275.)。本發明使用之發炎組織專一的化合物，尤其發炎細胞專一的代謝產物或於發炎組織浸潤之免疫細胞專一的代謝物之非限定之態樣，可列舉如此之前列腺素 E2 等花生四烯酸之代謝產物為理想例。

【0074】 (2)腺苷、腺苷 3 磷酸(ATP)、腺苷 2 磷酸(ADP)、腺苷 1 磷酸(AMP)等具嘌呤環結構之核苷

發生支氣管氣喘引起之發炎的肺泡中，已知 ATP 濃度高 (Nat. Med. (2007) 13, 913-919)。又，發生 COPD 引起之發炎之肺泡中，已知 ATP 濃度為高 (Am. J. Respir. Crit. Care Med. (2010) 181, 928-934)。又，類風濕關節炎患者之關節液中，觀察到腺苷濃度為高 (Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (2004) 36 877-882)。又，在因 GVHD 引起排斥反應之組織中，已知 ATP 濃度為高 (Nat. Med. (2010) 16, 1434-1438)。又，已知肺、肝臟、腎臟之纖維化組織，腺苷濃度增加 (FASEB J. (2008) 22, 2263-2272、J. Immunol. (2006)

176, 4449-4458、J. Am. Soc. Nephrol. (2011) 22 (5), 890-901、PLoS ONE J. (2010) 5 (2), e9242)。又，在肺纖維症患者之纖維化組織，觀察到 ATP 濃度為上昇 (Am. J. Respir. Crit. Care Med. (2010) 182, 774-783)。本發明使用之發炎性組織專一的化合物之非限定之態樣，可列舉如此之因 ATP 等嘌呤核苷酸之代謝而於發炎組織以高濃度堆積之 ATP、ADP、AMP、或腺苷等為理想例。又，腺苷因 adenosine deaminase 分解為肌苷，故肌苷以高濃度堆積。

【0075】 (3)尿酸

尿酸係於活體內之嘌呤核苷之代謝路徑之產物，在血液或間質腔等細胞外游離。又，近年已知從壞死(necrosis)進行之細胞游離的尿酸，會促進發炎性回應 (J. Clin. Invest. (2010) 120 (6), 1939-1949)。本發明使用之發炎組織專一的化合物之非限定之態樣，可列舉如此之因 ATP 等嘌呤核苷酸之代謝而於發炎性組織以高濃度堆積之尿酸為理想例。

【0076】 抗原結合分域

本說明書中，「抗原結合分域」只要能結合於目的之抗原則可使用任意構造之分域。如此的分域，例如：抗體之重鏈及輕鏈之可變區、存在於活體內之細胞膜蛋白質 Avimer 所含之約 35 個胺基酸之稱為 A 分域之模組 (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 分域之 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 結合分域為支架(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 Ankyrin Repeat 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))模組返覆層疊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。本發明之抗原結合分域之較佳例，例如含抗體之重鏈及輕鏈之可變區的抗原結合分域。如此的抗原結合分域，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。

【0077】 本發明之抗原結合分子中，抗原結合分域可以結合於相同的抗原決定部位。在此，相同之抗原決定部位可存在於由例如：序列編號：1 記載之胺基酸序列構成的蛋白質中。或，本發明之抗原結合分子中，抗原結合分域可以結合於彼此不同的抗原決定部位。在此，不同的抗原決定部位，可存在於由例如：序列編號：1 記載之胺基酸序列構成的蛋白質中。

【0078】

專一性

專一性，係指專一性結合之分子的其中一分子對於其結合之一或多數之對手分子以外之分子為實質上不結合之狀態。又，抗原結合分域對於某抗原中含有多數抗原決定部位中之特定之抗原決定部位為專一的情形也可使用。又，抗原結合分域所結合之抗原決定部位係含於多數不同抗原之情形，具有該抗原結合分域之抗原結合分子可與包含該抗原決定部位之各種抗原結合。在此，實質上不結合，係依如前述結合活性之項目所記載之方法決定，指對於該對手方之分子以外之分子之結合活性為對手方之分子之結合活性之 80%以下、通常 50%以下，較佳為 30%以下，尤佳為 15%以下。

【0079】 細胞傷害活性

本發明之一非限定態樣中，提供包括因應癌組織專一的化合物之濃度而改變對抗原之結合活性之抗原結合分域，且對於膜型分子表現於其細胞膜之細胞有細胞傷害活性之抗原結合分子、及包含該抗原結合分子作為有效成分之醫藥組合物。本發明中，細胞傷害活性，例如抗體依存性細胞媒介性細胞傷害 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: ADCC) 活性、補體依存性細胞傷害 (complement-dependent cytotoxicity: CDC) 活性及由於 T 細胞所致的細胞傷害活性等。本發明中，CDC 活性係指利用補體系之細胞傷害活性。另一方面，ADCC 活性係指包括於標的細胞之細胞膜表現之膜型分子所結合之抗原結合分域之抗原結合分子之 Fc 區，經由免疫細胞等由該免疫細胞表現之 Fc γ 受體中介而結合且該免疫細胞對於標的細

胞造成傷害之活性。目的抗原結合分子是否有 ADCC 活性，或是否有 CDC 活性，可依公知方法測得(例如 Current protocols in Immunology, Chapter7. Immunologic studies in humans、Coligan 等人編(1993)等)。

【0080】 具體而言，首先製備效應子細胞、補體溶液、標的細胞。

【0081】 (1)效應子細胞之製備

從 CBA/N 小鼠等摘出之脾臟，在 RPMI1640 培養基 (Invitrogen) 中將脾臟細胞分離。以含 10% 胎牛血清 (FBS、HyClone) 之同培養基洗滌過的該脾臟細胞之濃度調整為 5×10^6 /ml，可製備效應子細胞。

(2)補體溶液之製備

以含 10% FBS 之培養基 (Invitrogen) 將 Baby Rabbit Complement (CEDARLANE) 稀釋為 10 倍，可製備補體溶液。

(3)標的細胞之製備

將表現抗原之細胞與 0.2 mCi 之 ^{51}Cr -鉻酸鈉 (GEhealthcare bioscience) 一起在含 10% FBS 之 DMEM 培養基中，於 37°C 培養 1 小時，將該標的細胞做放射性標記。放射性標記後，以含 10% FBS 之 RPMI1640 培養基洗滌 3 次後的細胞濃度調整為 2×10^5 /ml，可製備該標的細胞。

【0082】 ADCC 活性、或 CDC 活性依下列所述方法測定。測定 ADCC 活性的情形，在加到 96 井 U 底板 (Becton Dickinson) 各 50 μl 的標的細胞與抗原結合分子在室溫反應 15 分鐘。之後，將加有效應子細胞 100 μl 之該板在二氧化碳培養箱內靜置

4 小時。抗體之終濃度可設為例如 0 或 10 μ g/ml 等的濃度。靜置後，使用 gamma 計數器(COBRAII AUTO-GAMMA、MODEL D5005、Packard Instrument Company)測定從各井回收的 100 μ l 上清的放射活性。使用測定值依(A-C) / (B-C) x 100 之計算式可計算細胞傷害活性(%)。A 係表示在各試樣之放射活性(cpm)、B 係表示在加有 1% NP-40(nacalai tesque)之試樣之放射活性(cpm)、C 係表示在僅含標的細胞之試樣之放射活性(cpm)。

【0083】 另一方面，測定 CDC 活性之情形。係將在 96 井平底板(Becton Dickinson)加入的各 50 μ l 的標的細胞與抗原結合分子加在冰上反應 15 分鐘。之後，將加有補體溶液 100 μ l 之該板於二氧化碳培養箱靜置 4 小時。抗體之終濃度可設為例如 0 或 3 μ g/ml 等濃度。靜置後使用 gamma 計數器測定從各井回收之 100 μ l 之上清之放射活性。細胞傷害活性與 ADCC 活性測定以同樣方式可計算。

【0084】 又，後述化學療法劑、毒性胜肽或放射性化學物質等細胞傷害性物質結合之修飾抗原結合分子修飾物，也可理想地作為本發明之具細胞傷害活性之抗原結合分子使用。如此之修飾抗原結合分子(以下稱為抗原結合分子藥物接合物)，可藉由將獲得之抗原結合分子進行化學性修飾以取得。又，作為抗原結合分子之修飾方法，可適當使用於抗體藥物接合物等的領域已確立的方法。又，有毒性胜肽結合之修飾抗原結合分子，可藉由將編碼為該毒性胜肽之基因與編碼為本發明之抗原結合分子之基因於讀框內連結而得之融合基因於適當寄主細

胞中表現後，從該細胞之培養液單離以取得。

【0085】 中和活性

本發明之一非限定態樣中，提供包括因應癌組織專一的化合物之濃度而改變對於抗原之結合活性的抗原結合分域且該對於膜型分子具有中和活性之抗原結合分子為有效成分之誘導免疫回應之醫藥組合物。本發明之一另外的非限定態樣中，提供包括因應癌組織專一的化合物濃度而改變對抗原之結合活性之抗原結合分域且對膜型分子係表現於其細胞膜之細胞顯示細胞傷害活性，此外對於該膜型分子有中和活性之作為抗原結合分子有效成分之誘導免疫回應之醫藥組合物。一般而言，中和活性係指抑制對病毒或毒素等對細胞有生物學活性之配體之該生物學活性之活性。亦即，有中和活性之物質，係指結合於該配體或該配體所結合之受體，並抑制該配體與受體之結合之物質。利用中和活性使與配體結合受抑制之受體，不能發揮經由該受體媒介之生物學活性。具有如此之中和活性之抗體，一般稱為中和抗體。該中和活性，係藉由將在成為對象的配體存在下其生物學活性在待驗物質存在或非存在下之條件之間比較而測定。

【0086】 例如，作為 IL-6 受體之主要配體考量者，以序列編號：27 表示之 IL-6 為理想例。其胺基末端形成細胞外分域之 I 型膜蛋白質 IL-6 受體，會與因 IL-6 而誘導二聚物化之 gp130 受體一起形成異四聚物(HEINRICH 等人(Biochem. J. (1998) 334, 297-314))。由於該異四聚物之形成，組合於 gp130 受體之 Jak 活化。Jak 進行自磷酸化及受體之磷酸化。受體及

Jak 之磷酸化部位，對於屬於如 Stat3 之有 SH2 之 Stat 家族之分子、或 MAP 激酶、PI3/Akt、其他具 SH2 之蛋白質或適應子 (adaptor)，發揮結合部位之作用。其次，結合於 gp130 受體之 Stat 由於 Jak 而磷酸化。經磷酸化之 Stat 形成二聚物並移到核內，調整標的基因之轉錄。Jak 或 Stat 經由其他類別之受體而涉及信號的串流。脫離控制的 IL-6 之信號串流，會觀察到自體免疫疾病之病態或發炎、多發性骨髓癌或前列腺癌等癌。能作為癌基因之 Stat3，在許多癌中係持續地被活化。前列腺癌與多發性骨髓瘤中，來自 IL-6 受體之信號串流與來自上皮成長因子受體 (EGFR) 家族成員之信號串流之間有串音 (crosstalk)(Ishikawa 等人(J. Clin. Exp. Hematopathol. (2006) 46 (2), 55-66))。

【0087】 如此之細胞內之信號串流對每一細胞種類不同，可因應目的標的細胞適當設定標的分子，不限定於上述因子。藉由測定活體內信號之活化，可評價中和活性。又，以對於存在活體內信號串流之下游的標的基因的轉錄誘導作用作為指標，可檢測活體內信號之活化。標的基因之轉錄活性之改變，可利用報告子試驗法的原理檢測。具體而言，在標的基因之轉錄因子或起動子區之下游配置 GFP(Green Fluorescence Protein) 或發光酶等報告子基因，並測定其報告子活性，可就轉錄活性之改變測定作為報告子活性。活體內信號活化之測定套組，也可適當使用市售品(例如，Mercury Pathway Profiling Luciferase System(Clontech)等)。

【0088】 再者，通常就測定作用於促進細胞增殖之方向之

作用於信號串流的 EGF 受體家族等受體配體之中和活性之方法而言，可藉由測定標的細胞之增殖活性而評價中和抗體之中和活性。例如，就抗 HB-EGF 抗體基於中和活性對於例如 HB-EGF 等其增殖受 EGF 家族之成長因子而促進之細胞增殖之抑制效果予以評價或測定之方法而言，可理想地使用以下方法。在試管內評價或測定該細胞增殖抑制活性之方法，可使用測定培養基中添加之 [³H] 標記胸腺嘧啶由活細胞之攝入作為 DNA 複製能力指標的方法。就更簡便的方法，有於顯微鏡下計測將 trypan blue 等色素排除到細胞外之能力的色素排除法、或 MTT 法。後者係利用活細胞有將四唑鎘鹽 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 轉換為藍色的 formazan 產物的能力。更具體而言，在待驗細胞的培養液中同時加入配體及待驗抗體並經過一定時間後，將 MTT 溶液加入培養液並靜置一定時間以使細胞攝入 MTT。其結果黃色化合物 MTT 由於細胞內之粒腺體內的琥珀酸脫氫酵素而變換為藍色的化合物。使該藍色生成物溶解並呈色後測定其吸光度，作為活細胞數的指標。MTT 以外，也有 MTS、XTT、WST-1、WST-8 等試藥有市售(nacalai tesque 等)，可理想地使用。活性測定時，作為對照抗體，將與抗 HB-EGF 抗體有相同之構造同型之抗體且不具有該細胞增殖抑制活性之結合抗體與抗 HB-EGF 抗體同樣地使用，藉由抗 HB-EGF 抗體顯示比對照抗體強的細胞增殖抑制活性，可判定活性。

【0089】 用於評價活性之細胞，例如其增殖受 HB-EGF 促進之細胞，例如卵巢癌細胞 RMG-1 細胞株、經利用將以編碼

為人類 EGFR 之細胞外分域與小鼠 GCSF 受體之細胞內分域於同一讀框融合而得之融合蛋白質 hEGFR/mG-CSFR 之基因表現之方式結合之載體轉形之小鼠 Ba/F3 細胞等可理想地使用。如此，該技術領域中具有通常知識者可適當選擇用於評價活性之細胞而使用於測定前述細胞增殖活性。

【0090】 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構造同型(isotype)及此等構造同型之次類(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(構造同型)。本發明之抗體在該等構造同型之中，可含 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。人類 IgG1、人類 IgG2、人類 IgG3、人類 IgG4 抗體之不變區，由於基因多型而致之多數副型序列記載於 Sequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No.91-3242，但本發明可為其中任一者。尤其人類 IgG1 之序列，可為 EU 編號 356-358 號之胺基酸序列為 DEL，也可為 EEM。又，就人類 Igκ(Kappa)不變區與人類 Igλ (Lambda)不變區而言，由於基因多型而致之多數副型序列記載於 Sequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No.91-3242，但本發明可為其中任一者。

【0091】 製作具有所望結合活性之抗體之方法於該技術領域之具有通常知識者為公知。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。

【0092】 抗 IL-6R 抗體可使用公眾所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，及由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括「人類化抗體」或「嵌合抗體」。

【0093】 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親代細胞融合。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。

【0094】 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：2 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：1 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：1 表示之可溶型 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：1 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。

【0095】 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：1 之胺基酸序列當中相當於 20-357 號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。

【0096】 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同一讀框(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。

【0097】 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親代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。

【0098】 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擔體。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 limpet hemocyanin)等擔體蛋白質的該感作抗原胜肽進行免疫為理想。

【0099】 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

【0100】 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。

【0101】 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。

【0102】 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-胺基喋呤-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。

【0103】 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 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。

【0104】 如此的骨髓瘤細胞例如可理想地使用例如：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。

【0105】 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。

【0106】 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砷等輔助劑。

【0107】 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。

【0108】 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°C 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，反復實施離心並去除上清之操作，可將對融合瘤之生長不利的細胞融合劑等除去。

【0109】 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。

【0110】 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。

【0111】 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，而可測定抗體對細胞表面之結合的系統。

【0112】 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。

【0113】 或抗體對經固定化之 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 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。

【0114】 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。

【0115】 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。

【0116】 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。

【0117】 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)

【0118】 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。

【0119】 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。

【0120】 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。

【0121】 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。

【0122】 具體而言，當目的為取得例如編碼為小鼠 IgG 之基因時，可利用能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

不變區之部分的引子。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。

【0123】 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。

【0124】 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。

【0125】 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。

【0126】 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。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，若將編碼為抗體不變區(C 區)之基因、與編碼為前述 V 區之基因於同一讀框融合，則可取得嵌合抗體。在此，嵌合抗體係指不變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。藉由預先在具不變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不變區(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同一讀框融合，可以構建嵌合抗體表現載體。

【0127】 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，包含例如增強子或啟動子。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：3)之胜肽當做信號序列，但是也可附加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。

【0128】 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 1994/11523)。

【0129】 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分域。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(中國倉鼠卵巢細胞株 (Chinese hamster ovary cell line))、COS(猴腎細胞株 (Monkey kidney cell line))、骨髓瘤 (Sp2/O、NS0 等)、BHK (幼倉鼠腎細胞株 (baby hamster kidney cell line))、Hela、Vero、HEK293(有受剪切之腺病毒的人類胚胎腎細胞株 (human embryonic kidney cell line with sheared adenovirus) (Ad)5 DNA)、PER.C6 細胞 (經腺病毒型 E1A 及 E1B 基因轉形的人類胚胎網膜細胞株 (human embryonic retinal cell line transformed with the Adenovirus Type 5 (Ad5) E1A and E1B genes))等 (Current Protocols in Protein Science (May、2001、Unit 5.9、Table 5.9.1))

(2)兩生類細胞：非洲爪蟾卵母細胞等

(3)昆蟲細胞：sf9、sf21、Tn5 等

【0130】 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。

【0131】 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

【0132】 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。

【0133】 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，將抗體基因藉由於同一讀框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，可對基因轉殖羊投予荷爾蒙(Bio/Technology (1994), 12 (7), 699-702)。

【0134】 本說明書記載之抗原結合分子對於人類投予時，該分子中之抗原結合分域，可適當採用以降低對人類之異種抗原性等為目的經人類為改變過的基因重組型抗體來源的抗原結合分域。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。

【0135】 本說明書記載之用於製作抗原結合分子中的抗原結合分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。

【0136】 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。引子係針對 4 個 FR 各別準備。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。

【0137】 又，連結之鹼基序列可設計為彼此於同一讀框連接。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。

【0138】 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 以於同一讀框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)。

【0139】 以定性或定量測定以上述方式製作之人類化抗體對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(Cancer Res, 1993, 53, 851-856)。

【0140】 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。

【0141】 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 區之序列於同一讀框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)。

【0142】 又，就取得抗體基因之方法而言，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。

【0143】 EU 編號及 Kabat 編號

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，不變區之胺基酸係依照 Kabat 之胺基酸位置的 EU 編號表示。

【0144】 標的組織專一的化合物依存性的抗原結合分域

為了取得因應標的組織專一性的化合物濃度而改變對抗原之結合活性之抗原結合分域(或包含該分域之抗原結合分子)，亦即，標的組織專一性的化合物依存性的抗原結合分域(或包含該分域之抗原結合分子)，可適當使用上述結合活性項目所示之方法等。作為一非限定態樣，以下列舉一些具體例。例如為了確認比起於標的組織專一性的化合物不存在下抗原結合分域(或包含該分域之抗原結合分子)對抗原之結合活性，於該化合物存在下抗原結合分域(或包含該分域之抗原結合分子)對抗原之結合活性變化為較高，比較於標的組織專一性的化合物不存在下及存在下、或低濃度存在下及高濃度存在下時，抗原結合分域(或包含該分域之抗原結合分子)對抗原之結合活性。於一不同的非限定態樣中，為了確認例如：比起存在低濃

度標的組織專一性的化合物時，抗原結合分域(或包含該分域之抗原結合分子)對抗原之結合活性，於該化合物高濃度存在下抗原結合分域(或包含該分域之抗原結合分子)對抗原之結合活性變化為較高，比較於標的組織專一性的化合物低濃度存在下及高濃度存在下時，抗原結合分域(或包含該分域之抗原結合分子)對抗原之結合活性。

【0145】 又，本發明中，「標的組織專一性的化合物存在下對抗原之結合活性，高於該化合物不存在下對抗原之結合活性」之表現法，也可表達為「抗原結合分域(或包含該分域之抗原結合分子)於標的組織專一性的化合物不存在下對抗原之結合活性低於該化合物存在下對抗原之結合活性」。又，本發明中，「抗原結合分域(或包含該分域之抗原結合分子)於標的組織專一性的化合物不存在下對抗原之結合活性低於該化合物存在下對抗原之結合活性」，有時也會記載為「抗原結合分域(或包含該分域之抗原結合分子)於標的組織專一性的化合物不存在下對抗原之結合活性弱於該化合物存在下對抗原之結合活性」。

【0146】 又，本發明中，「存在高濃度標的組織專一性的化合物時對抗原之結合活性高於該化合物低濃度存在下對抗原之結合活性」之表達，也可表達為「抗原結合分域(或包含該分域之抗原結合分子)於存在低濃度標的組織專一性的化合物時對抗原之結合活性低於該化合物高濃度存在下對抗原之結合活性」。又，本發明中，「抗原結合分域(或包含該分域之抗原結合分子)於存在低濃度標的組織專一性的化合物時對抗原

之結合活性低於該化合物高濃度存在下對抗原之結合活性」，有時記載為「抗原結合分域(或包含該分域之抗原結合分子)於存在低濃度標的組織專一性的化合物時對抗原之結合活性弱於該化合物高濃度存在下對抗原之結合活性」。

【0147】 測定對抗原之結合活性時，標的組織專一性的化合物濃度以外之條件可由該技術領域中具有通常知識者適當選擇，不特別限定。例如可於 HEPES 緩衝液、37°C 之條件測定。例如可使用 Biacore(GE Healthcare)等測定。抗原結合分域(或包含該分域之抗原結合分子)與抗原之結合活性之測定，於抗原為可溶型分子時，可將抗原作為分析物流過固定有抗原結合分域(或包含該分域之抗原結合分子)之晶片，以評價對可溶型分子之結合活性，抗原為膜型分子時，可將抗原結合分域(或包含該分域之抗原結合分子)作為分析物，流過固定有抗原之晶片，以評價對膜型分子之結合活性。

【0148】 本發明之抗原結合分子所含之抗原結合分域(或包含該分域之抗原結合分子)於標的組織專一性的化合物不存在下對抗原之結合活性，只要弱於標的組織專一性的化合物存在下對抗原之結合活性即可，於該化合物不存在下對抗原之結合活性與該化合物存在下對抗原之結合活性之比不特別限定，較佳為對抗原之標的組織專一性的化合物不存在下之 KD(Dissociation constant：解離常數)與存在下之 KD 之比 $KD(\text{化合物不存在下})/KD(\text{化合物存在下})$ 之值為 2 以上，更佳為 $KD(\text{化合物不存在下})/KD(\text{化合物存在下})$ 之值為 10 以上，又更佳為 $KD(\text{化合物不存在下})/KD(\text{化合物存在下})$ 之值為 40 以

上。 $KD(\text{化合物不存在下})/KD(\text{化合物存在下})$ 之值之上限不特別限定，只要該技術領域中具有通常知識者之技術可製作即可，可為 400、1000、10000 等任意值。標的組織專一性的化合物不存在下時，未觀察到對抗原之結合活性之情形，其上限成為無限大之數值。

【0149】 本發明之抗原結合分子所含之抗原結合分域(或包含該分域之抗原結合分子)，只要於存在低濃度標的組織專一性的化合物時對抗原之結合活性弱於存在高濃度標的組織專一性的化合物時對抗原之結合活性即可，在低濃度存在該化合物時對抗原之結合活性與在高濃度存在該化合物時對抗原之結合活性之比不特別限定，較佳為對抗原，存在低濃度標的組織專一性的化合物時 $KD(\text{Dissociation constant: 解離常數})$ 與高濃度存在時之 KD 之比，即 $KD(\text{化合物低濃度存在下})/KD(\text{化合物高濃度存在下})$ 之值為 2 以上，更佳為 $KD(\text{化合物低濃度存在下})/KD(\text{化合物高濃度存在下})$ 之值為 10 以上，又更佳為 $KD(\text{化合物低濃度存在下})/KD(\text{化合物高濃度存在下})$ 之值為 40 以上。 $KD(\text{化合物低濃度存在下})/KD(\text{化合物高濃度存在下})$ 之值之上限不特別限定，只要該技術領域中具有通常知識者之技術能製作，可為 400、1000、10000 等任意值。於低濃度存在標的組織專一性的化合物時未觀察到對抗原之結合活性之情形，其上限成為無限大之數值。

【0150】 對抗原之結合活性之值，於抗原為可溶型抗原之情形，可使用 $KD(\text{解離常數})$ ，於抗原為膜型抗原之情形，可使用視 $KD(\text{Apparent dissociation constant: 視解離常數})$ 。 $KD(\text{解$

離常數)、及視 KD (視解離常數)可依該技術領域中具有通常知識者公知之方法測定，例如可使用 **Biacore**(GE healthcare)、**scatchard** 作圖法、流式細胞計數器等。

【0151】 又，代表本發明之抗原結合分域(或包含該分域之抗原結合分子)在標的組織專一性的化合物不存在下對抗原之結合活性與存在下對抗原之結合活性之比之其他指標，例如也可理想地使用解離速度常數 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，對抗原在標的組織專一性的化合物不存在下對抗原之結合活性之比之 k_d (解離速度常數)與在該化合物存在下之 k_d (解離速度常數)之比，即 k_d (化合物不存在下)/ k_d (化合物存在下)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 (化合物不存在下)/ k_d (化合物存在下)之值之上限不特別限定，只要該技術領域中具有通常知識者之技術常識可製作即可，可為 50、100、200 等各種值。標的組織專一性的化合物不存在下時，未觀察到對抗原之結合活性之情形也不生解離，因此其上限成為無限大之數值。

【0152】 又，代表本發明之抗原結合分域(或包含該分域之抗原結合分子)在標的組織專一性的化合物存在低濃度時對抗原之結合活性與高濃度存在時對抗原之結合活性之比之其他指標，例如也可理想地使用解離速度常數 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，對抗原在標的組織專

一性的化合物存在低濃度時對抗原之結合活性之比之 k_d (解離速度常數)與在該化合物高濃度存在時之 k_d (解離速度常數)之比，即 k_d (化合物低濃度存在下)/ k_d (化合物高濃度存在下)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 (化合物低濃度存在下)/ k_d (化合物高濃度存在下)之值之上限不特別限定，只要該技術領域中具有通常知識者之技術常識可製作即可，可為 50、100、200 等各種值。標的組織專一性的化合物低濃度存在時，未觀察到對抗原之結合活性之情形也不生解離，因此其上限成為無限大之數值。

【0153】 抗原結合活性之值，於抗原為可溶型抗原之情形，可使用 k_d (解離速度常數)，於抗原為膜型抗原之情形，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)，可使用該技術領域中具有通常知識者公知之方法測定，例如可使用 Biacore(GE healthcare)、流式細胞計數器等。又，本發明中，當測定某濃度標的組織專一性的化合物時抗原結合分域(或包含該分域之抗原結合分子)對抗原之結合活性時，宜將該化合物濃度以外之條件設為相同。

【0154】 例如本發明提供之一個態樣，即在標的組織專一性的化合物不存在時對抗原之結合活性低於在該化合物存在時對抗原之結合活性之抗原結合分域(或包含該分域之抗原結合分子)，可依包含以下步驟(a)~(c)之抗原結合分域(或抗原結合分子)之篩選取得。

(a) 獲得標的組織專一性的化合物不存在時抗原結合分

域(或抗原結合分子)之抗原結合活性

(b) 獲於標的組織專一性的化合物存在時抗原結合分域(或抗原結合分子)之抗原結合活性

(c) 選擇標的組織專一性的化合物不存在時抗原結合活性低於該化合物存在時抗原結合活性之抗原結合分域(或抗原結合分子)。

【0155】 例如本發明提供之一個態樣，即存在低濃度標的組織專一性的化合物時對抗原之結合活性低於在該化合物以高濃度存在時對抗原之結合活性之抗原結合分域(或包含該分域之抗原結合分子)，可依包含以下步驟(a)~(c)之抗原結合分域(或抗原結合分子)之篩選取得。

(a) 獲得存在低濃度標的組織專一性的化合物時抗原結合分域(或抗原結合分子)之抗原結合活性

(b) 獲得存在高濃度標的組織專一性的化合物時抗原結合分域(或抗原結合分子)之抗原結合活性

(c) 選擇存在低濃度標的組織專一性的化合物時抗原結合活性低於該化合物以高濃度存在時抗原結合活性之抗原結合分域(或抗原結合分子)。

【0156】 例如本發明提供之一個態樣，即存在標的組織專一性的化合物不存在時對抗原之結合活性低於在該化合物存在時對抗原之結合活性之抗原結合分域(或包含該分域之抗原結合分子)，可依包含以下步驟(a)~(c)之抗原結合分域(或抗原結合分子) 或此等之庫之篩選取得。

(a) 於標的組織專一性的化合物存在時，使抗原結合分域

(或抗原結合分子)或此等之庫接觸抗原

(b) 將於前述步驟(a)結合於抗原之抗原結合分域(或抗原結合分子)置於該化合物不存在下

(c) 單離於前述步驟(b)解離之抗原結合分域(或抗原結合分子)。

【0157】 例如本發明提供之一個態樣，即存在低濃度標的組織專一性的化合物時對抗原之結合活性低於在該化合物以高濃度存在時對抗原之結合活性之抗原結合分域(或包含該分域之抗原結合分子)，可依包含以下步驟(a)~(c)之抗原結合分域(或抗原結合分子) 或此等之庫之篩選取得。

(a) 於存在高濃度標的組織專一性的化合物時使抗原結合分域(或抗原結合分子)或此等之庫與抗原接觸

(b) 將於前述步驟(a)結合於抗原之抗原結合分域(或抗原結合分子)置於該化合物低濃度存在下

(c) 單離於前述步驟(b)解離之抗原結合分域(或抗原結合分子)。

【0158】 例如本發明提供之一個態樣，即標的組織專一性的化合物不存在時對抗原之結合活性低於在該化合物存在時對抗原之結合活性之抗原結合分域(或包含該分域之抗原結合分子)，可依包含以下步驟(a)~(d)之抗原結合分域(或抗原結合分子) 或此等之庫之篩選取得。

(a) 於標的組織專一性的化合物不存在下使抗原結合分域(或抗原結合分子)之庫與抗原接觸、

(b) 選擇於前述步驟(a)未與抗原結合之抗原結合分域(或

抗原結合分子)

(c) 使於前述步驟(b)選擇之抗原結合分域(或抗原結合分子)於該化合物存在下與抗原結合

(d) 單離於前述步驟(c)結合於抗原之抗原結合分域(或抗原結合分子)。

【0159】 例如本發明提供之一個態樣，即存在低濃度標的組織專一性的化合物時對抗原之結合活性低於在該化合物以高濃度存在時對抗原之結合活性之抗原結合分域(或包含該分域之抗原結合分子)，可依包含以下步驟(a)~(d)之抗原結合分域(或抗原結合分子) 或此等之庫之篩選取得。

(a) 於標的組織專一性的化合物低濃度存在下使抗原結合分域(或抗原結合分子)之庫與抗原接觸、

(b) 選擇於前述步驟(a)未與抗原結合之抗原結合分域(或抗原結合分子)

(c) 使於前述步驟(b)選擇之抗原結合分域(或抗原結合分子)於該化合物高濃度存在下與抗原結合

(d) 單離於前述步驟(c)結合於抗原之抗原結合分域(或抗原結合分子)。

【0160】 例如本發明提供之一個態樣，即標的組織專一性的化合物不存在時對抗原之結合活性低於在該化合物存在時對抗原之結合活性之抗原結合分域(或包含該分域之抗原結合分子)，可依包含以下步驟(a)~(c)之抗原結合分域(或抗原結合分子) 或此等之庫之篩選取得。

(a) 於標的組織專一性的化合物存在下使抗原結合分域

(或抗原結合分子)之庫接觸固定有抗原之管柱；

(b) 使於前述步驟(a)結合於管柱之抗原結合分域(或抗原結合分子)於該化合物不存在下從管柱溶出；

(c) 將於前述步驟(b)溶出之抗原結合分域(或抗原結合分子)予以單離。

【0161】 例如本發明提供之一個態樣，即存在低濃度標的組織專一性的化合物時對抗原之結合活性低於該化合物以高濃度存在時對抗原之結合活性之抗原結合分域(或包含該分域之抗原結合分子)，可依包含以下步驟(a)~(c)之抗原結合分域(或抗原結合分子)或此等之庫之篩選取得。

(a) 於標的組織專一性的化合物以高濃度存在下使抗原結合分域(或抗原結合分子)之庫接觸固定有抗原之管柱；

(b) 使於前述步驟(a)結合於管柱之抗原結合分域(或抗原結合分子)於該化合物以低濃度存在下從管柱溶出；

(c) 將於前述步驟(b)溶出之抗原結合分域(或抗原結合分子)予以單離。

【0162】 例如本發明提供之一個態樣，即標的組織專一性的化合物不存在時對抗原之結合活性低於在該化合物存在時對抗原之結合活性之抗原結合分域(或包含該分域之抗原結合分子)，可依包含以下步驟(a)~(d)之篩選方法取得。

(a) 於標的組織專一性的化合物不存在下使抗原結合分域(或抗原結合分子)之庫通過固定有抗原之管柱；

(b) 回收於前述步驟(a)未結合於管柱而溶出之抗原結合分域(或抗原結合分子)；

(c) 使前述步驟(b)回收之抗原結合分域(或抗原結合分子)於該化合物存在下結合於抗原;

(d) 將於前述步驟(c)結合於抗原之抗原結合分域(或抗原結合分子)單離。

【0163】 例如本發明提供之一個態樣，即存在低濃度標的組織專一性的化合物時對抗原之結合活性低於在該化合物以高濃度存在時對抗原之結合活性之抗原結合分域(或包含該分域之抗原結合分子)，可依包含以下步驟(a)~(d)之篩選方法取得。

(a) 於標的組織專一性的化合物於低濃度存在下使抗原結合分域(或抗原結合分子)之庫通過固定有抗原之管柱;

(b) 回收於前述步驟(a)未結合於管柱而溶出之抗原結合分域(或抗原結合分子);

(c) 使前述步驟(b)回收之抗原結合分域(或抗原結合分子)於該化合物高濃度存在下結合於抗原;

(d) 將於前述步驟(c)結合於抗原之抗原結合分域(或抗原結合分子)單離。

【0164】 例如本發明提供之一個態樣，即標的組織專一性的化合物不存在時對抗原之結合活性低於在該化合物存在時對抗原之結合活性之抗原結合分域(或包含該分域之抗原結合分子)，可依包含以下步驟(a)~(d)之篩選方法取得。

(a) 於標的組織專一性的化合物存在下使抗原結合分域(或抗原結合分子)之庫與抗原接觸;

(b) 取得於前述步驟(a)結合於抗原之抗原結合分域(或抗

原結合分子)；

(c) 將前述步驟(b)取得之抗原結合分域(或抗原結合分子)置於化合物不存在下；

(d) 將前述步驟(c)中抗原結合活性弱於在前述步驟(b)選擇之基準之抗原結合分域(或抗原結合分子)予以單離。

【0165】 例如本發明提供之一個態樣，即存在低濃度標的組織專一性的化合物時對抗原之結合活性低於在該化合物以高濃度存在時對抗原之結合活性之抗原結合分域(或包含該分域之抗原結合分子)，可依包含以下步驟(a)~(d)之篩選方法取得。

(a) 於標的組織專一性的化合物高濃度存在下使抗原結合分域(或抗原結合分子)之庫與抗原接觸；

(b) 取得於前述步驟(a)結合於抗原之抗原結合分域(或抗原結合分子)；

(c) 將前述步驟(b)取得之抗原結合分域(或抗原結合分子)置於化合物低濃度存在下；

(d) 將前述步驟(c)中抗原結合活性弱於在前述步驟(b)選擇之基準之抗原結合分域(或抗原結合分子)予以單離。

【0166】 又，前述步驟也可重複 2 次以上。因此依本發明，提供藉由在上述篩選方法更包括重複(a)~(c)或(a)~(d)之步驟 2 次以上之步驟的篩選方法取得之標的組織專一性的化合物不存在時對抗原之結合活性低於該化合物存在時對抗原之結合活性之抗原結合分域(或包含該分域之抗原結合分子)或存在低濃度標的組織專一性的化合物時對抗原之結合活性低於該化

合物以高濃度存在時對抗原之結合活性之抗原結合分域(或包含該分域之抗原結合分子)。(a)~(c)或(a)~(d)之步驟重複的次數不特別限定，通常為 10 次以內。

【0167】 本發明之篩選方法中，標的組織專一性的化合物，可為相較於非標的組織，以相異濃度(例如:高濃度或低濃度)存在於標的組織等之定量性標的組織專一性規定之化合物。例如:標的組織專一的化合物以任意濃度差示地存在。但是一般而言，標的組織專一性的化合物，可於至少 5%、至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 100%、至少 110%、至少 120%、至少 130%、至少 140%、至少 150%、至少 2 倍、至少 5 倍、至少 10 倍、至少 50 倍、至少 100 倍、至少 10^3 倍、至少 10^4 倍、至少 10^5 倍、至少 10^6 倍、或更多且直到無限大(亦即於非標的組織不存在之情形)之增加濃度存在。

【0168】 區別低濃度及高濃度之閾值可因應化合物適當設定。例如:於 ATP 或腺苷之閾值之一非限定態樣中，作為閾值，低濃度條件可從 10 nM、1 nM、100 pM、10 pM、1 pM 或 0 M 之值適當設定。因應設定之閾值，高濃度條件，可從各閾值之至少 110%、至少 120%、至少 130%、至少 140%、至少 150%、至少 2 倍、至少 5 倍、至少 10 倍、至少 50 倍、至少 100 倍、至少 10^3 倍、至少 10^4 倍、至少 10^5 倍、至少 10^6 倍之值適當設定。又，於 PGE2 之一非限定態樣中，作為閾值，低濃度條件

可從 10 pM、1 pM、100 fM、10 fM、1 fM 或 0 M 之值適當設定。因應設定之閾值，高濃度條件可從各閾值之至少 110%、至少 120%、至少 130%、至少 140%、至少 150%、至少 2 倍、至少 5 倍、至少 10 倍、至少 50 倍、至少 100 倍、至少 10^3 倍、至少 10^4 倍、至少 10^5 倍、至少 10^6 倍之值適當設定。再者，作為犬尿胺酸之一非限定態樣中，作為閾值，低濃度條件可從 10 μ M、1 μ M、100 nM、10 nM、1 nM 或 0 M 之值適當設定。因應設定之閾值，高濃度條件可從各閾值之至少 110%、至少 120%、至少 130%、至少 140%、至少 150%、至少 2 倍、至少 5 倍、至少 10 倍、至少 50 倍、至少 100 倍、至少 10^3 倍、至少 10^4 倍、至少 10^5 倍、至少 10^6 倍之值適當設定。

【0169】 抗原結合分域(或抗原結合分子)之抗原結合活性，可利用對該技術領域中具有通常知識者為公眾所知之方法測定，針對標的組織專一性的化合物之濃度以外之條件，可由該技術領域中具有通常知識者適當決定。抗原結合分域(或抗原結合分子)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 kd(Dissociation rate：解離速度常數)、或視 kd(Apparent dissociation：視解離速度常數)等的形式進行評價。此等可利用對該技術領域中具有通常知識者為公眾所知之方法測定，例如可使用 Biacore(GE healthcare)、scatchard 作圖法、FACS 等。

【0170】 本發明中，選擇標的組織專一性的化合物存在時抗原結合活性高於該化合物不存在時抗原結合活性之抗原結

合分域或抗體之步驟，係與選擇標的組織專一性的化合物不存在時抗原結合活性低於該化合物存在時抗原結合活性之抗原結合分域或抗體之步驟之含意相同。

【0171】 又，本發明中，選擇存在高濃度標的組織專一性的化合物時抗原結合活性高於該化合物於低濃度存在下時之抗原結合活性之抗原結合分域或抗體之步驟，係與選擇標的組織專一性的化合物不存在時抗原結合活性低於該化合物存在時抗原結合活性之抗原結合分域或抗體的步驟的含意相同。

【0172】 只要是標的組織專一性的化合物不存在時對抗原之結合活性低於該化合物存在時對抗原之結合活性，則該化合物存在時之抗原結合活性與不存在時之抗原結合活性之差距不特別限定，較佳為該化合物存在時之抗原結合活性為不存在時之抗原結合活性之 2 倍以上，更佳為 10 倍以上，又更佳為 40 倍以上。該抗原結合活性之差距之上限不特別限定，只要是該技術領域中具有通常知識者之技術可製作，亦可為 400 倍、1000 倍、10000 倍等各種值。標的組織專一性的化合物不存在下，未觀察到對抗原之結合活性之情形，其上限成為無限大之數值。

【0173】 利用前述篩選方法篩選之本發明之抗原結合分域(或包含該分域之抗原結合分子)可為任意抗原結合分域(或抗原結合分子)，可篩選例如上述抗原結合分域(或抗原結合分子)。例如：可篩選具有天然序列之抗原結合分域(或抗原結合分子)，也可篩選胺基酸序列經取代之抗原結合分域(或抗原結合分子)。

【0174】 庫

依某一態樣，本發明之抗原結合分域(或包含該分域之抗原結合分子)，可從使抗原結合分子對抗原之結合活性依存於標的組織專一性的化合物變化之至少一個胺基酸殘基含於抗原結合分域之彼此序列不同之多數抗原結合分子為主而成之庫取得。作為該化合物之例，可列舉：(1)乳酸、琥珀酸、檸檬酸等解糖系、或克氏循環(Krebs cycle)之一次代謝產物、(2)丙胺酸、麩胺酸、或天冬胺酸等胺基酸、(3)犬尿胺酸、及其代謝產物、鄰胺苯甲酸、3-羥基犬尿胺酸、及犬尿喹啉酸等胺基酸之代謝產物、(4)前列腺素 E2 等花生四烯酸之代謝產物、以及(5)腺苷、腺苷 3 磷酸(ATP)、腺苷 2 磷酸(ADP)、腺苷 1 磷酸(AMP)等具有嘌呤環結構之核苷等。以下，針對如此之使抗原結合分子對抗原之結合活性依存於作為標的組織專一性的化合物之腺苷、及/或 ATP 變化之至少一個胺基酸殘基含於抗原結合分域之彼此序列互異之多數抗原結合分子為主而成之庫舉例說明。

【0175】 本說明書中，「庫」係指多數抗原結合分子或含有抗原結合分子之多數融合多胜肽、或編碼為該等序列之核酸、聚核苷酸。庫中所含之多數抗原結合分子或含有抗原結合分子之多數融合多胜肽之序列，可為單一序列，也可為彼此序列互異之抗原結合分子或含有抗原結合分子之融合多胜肽。

【0176】 本說明書中，彼此序列互異之多數抗原結合分子之記載中的「彼此序列互異」之用語，係指庫中之各個抗原結合分子之序列彼此相異。亦即，庫中之彼此互異之序列之數

目，係反映庫中之序列相異之獨立選殖體之數目，有時也稱為「庫尺寸」。通常之噬菌體展示庫，係 10^6 至 10^{12} ，可利用核糖體展示法等公眾所知之技術將庫尺寸擴大到 10^{14} 。但是噬菌體庫之淘選選擇時使用之噬菌體粒子之實際數目，通常比庫尺寸大 10 至 10,000 倍。該過剩的倍數，也稱為「庫當量數」，但代表可能存在具有相同胺基酸序列之各個選殖體 10 至 10,000 個。所以本發明中之「彼此序列互異」之用語，係指排除庫當量數後之庫中之各個抗原結合分子之序列彼此不同，更具體而言，係指彼此序列互異之抗原結合分子存在 10^6 至 10^{14} 個分子，較佳為 10^7 至 10^{12} 分子，更佳為 10^8 至 10^{11} ，尤佳為 10^8 至 10^{10} 個分子。

【0177】 又，本發明之由多數抗原結合分子為主而成之庫之記載中之用語「多數」，例如本發明之抗原結合分子、融合多胜肽、聚核苷酸分子、載體或病毒通常係指其物質 2 種以上之集合。例如：若某 2 種以上之物質就特定形質彼此互異，則代表此物質存在有 2 種以上。舉例而言，在胺基酸序列中之特定胺基酸位置觀察到的變異體胺基酸。例如：柔性殘基以外、或在表面露出之非常多樣化的胺基酸位置的特定變異體胺基酸以外係實質相同，較佳為有相同序列之本發明之 2 種以上之抗原結合分子時，本發明之抗原結合分子存在多個。其他例中，若有編碼為柔性殘基之鹼以外、或編碼為於表面露出之非常多樣之胺基酸位置之特定之變異體胺基酸之鹼以外實質相同，較佳為相同序列之本發明之 2 種以上之聚核苷酸分子，則本發明之聚核苷酸分子存在多數個。

【0178】 再者，本發明之由多數抗原結合分子為主而成之庫之記載中，「為主而成」之用語，係反映庫中之序列之不同獨立選殖體之數目當中，依標的組織專一性化合物之濃度條件而抗原結合分子對抗原之結合活性相異之抗原結合分子之數目。具體而言，顯示如此結合活性之抗原結合分子在庫中至少有 10^4 個分子存在較佳。又，更佳為本發明之抗原結合分域係從顯示如此結合活性之抗原結合分子至少存在 10^5 分子之庫取得。更佳為本發明之抗原結合分域可從顯示如此結合活性之抗原結合分子至少存在 10^6 分子之庫取得。尤佳為本發明之抗原結合分域可從顯示如此結合活性之抗原結合分子至少存在 10^7 分子之庫取得。又，較佳為本發明之抗原結合分域可從顯示如此結合活性之抗原結合分子至少存在 10^8 分子之庫取得。於另一表達中，庫中不同序列之獨立選殖體之數目中，依腺苷、及/或 ATP 之存在或不存在而抗原結合分域對抗原之結合活性不同之抗原結合分子之比例，也可理想地表達。具體而言，本發明之抗原結合分域，可從顯示如此結合活性之抗原結合分子含於庫中不同序列之獨立選殖體之數目之 0.1% 至 80%，較佳為 0.5% 至 60%，更佳為 1% 至 40%，又更佳為 2% 至 20%，尤佳為 4% 至 10% 的庫取得。融合多胜肽、聚核苷酸分子或載體之情形，亦與上述相同，可由分子數目或在分子全體之比例表達。又，病毒之情形，亦與上述相同，可由病毒個體之數目或在個體全體之比例表達。

【0179】 依腺苷、及/或 ATP 存在或不存在使抗原結合分域對抗原之結合活性變化之胺基酸

依前述篩選方法篩選之本發明之抗原結合分域或抗體可以任意地製備，可從預先存在之抗體、預先存在之庫(噬菌體庫等)、由對於動物免疫獲得之融合瘤或來自免疫動物之 B 細胞製作之抗體或庫、與腺苷或 ATP 適當連結之高免疫原性之 T 細胞抗原決定部位胜肽之類的佐劑作用劑間之連結物 (conjugate) 免疫之動物之 B 細胞等免疫細胞製作之抗體或庫等。作為該 T 細胞抗原決定部位胜肽之一非限定例，可理想地列舉來自 Tetanus toxin 之 p30 幫助者胜肽(以序列編號：4 表示，也稱為 Fragment C(FrC))等。

【0180】 作為如前述依腺苷及/或 ATP 存在或不存在而使抗原結合分子對抗原之結合活性變化之胺基酸，可列舉形成腺苷及/或 ATP 結合模體之胺基酸。含有前述胺基酸之抗原結合分域中之胺基酸之位置不限於特定位置，只要依腺苷及/或 ATP 存在或不存在使抗原結合分域對抗原之結合活性變化即可，形成抗原結合分域之重鏈可變區或輕鏈可變區中之任一位置均有可能。亦即，本發明之抗原結合分域，可從依腺苷及/或 ATP 存在或不存在使抗原結合分子對抗原之結合活性變化之胺基酸含於重鏈之抗原結合分域之彼此序列互異的抗原結合分子為主而成之庫取得。於一非限定態樣中，本發明之抗原結合分域，可從依腺苷及/或 ATP 存在或不存在使抗原結合分子對抗原之結合活性變化之胺基酸係含於重鏈之 CDR1、CDR2、及/或 CDR3 之彼此序列互異之抗原結合分子為主而成之庫取得。於一非限定之另一態樣中，本發明之抗原結合分域，可從依腺苷及/或 ATP 存在或不存在使抗原結合分子對抗原之結合活性

變化之胺基酸係含於重鏈之 FR1、FR2、FR3 及/或 FR4 的彼此序列互異之抗原結合分子為主而成的庫取得。

【0181】 又，本發明之一態樣中，本發明之抗原結合分域，可從依腺苷及/或 ATP 存在或不存在使抗原結合分子對抗原之結合活性變化之胺基酸係含於重鏈及/或輕鏈之抗原結合分域之彼此序列互異之抗原結合分子為主而成之庫取得。於一非限定態樣中，本發明之抗原結合分域，可從依腺苷及/或 ATP 存在或不存在而使抗原結合分子對抗原之結合活性變化之胺基酸係含於重鏈及/或輕鏈之 CDR1、CDR2、及/或 CDR3 之彼此序列互異之抗原結合分子為主而成之庫取得。於另一非限定態樣中，本發明之抗原結合分域，係從依腺苷及/或 ATP 存在或不存在使抗原結合分子對抗原之結合活性變化之胺基酸係含於重鏈及/或輕鏈之 FR1、FR2、FR3 及/或 FR4 之彼此序列互異之抗原結合分子為主而成之庫取得。

【0182】 作為如此之胺基酸之一非限定態樣，可列舉重鏈可變區所含之 52 位、52a 位、53 位、96 位、100a 位、或 100c 位之胺基酸中任一者以上之胺基酸等。又，作為如此之胺基酸之一非限定態樣，可列舉重鏈可變區所含之 52 位之 Ser、52a 位之 Ser、53 位之 Arg、96 位之 Gly、100a 位之 Leu、100c 位之 Trp 等胺基酸中之任一者以上之胺基酸。

【0183】 只要抗原結合分子之輕鏈及/或重鏈可變區之框架序列依腺苷及/或 ATP 存在或不存在使抗原結合分子對抗原之結合活性變化之胺基酸係含有於重鏈及/或輕鏈之抗原結合分域，可使用任意框架序列。框架序列之起源雖不限定，但可從

非人類動物之任意生物或人類取得。較佳為作為任意生物，列舉從小鼠、大鼠、豚鼠、倉鼠、沙鼠、貓、兔、狗、羊、山羊、牛、馬、駱駝、及非人類靈長類選擇之生物為理想。尤理想的實施形態中，抗原結合分子之輕鏈及/或重鏈可變區之框架序列，以具有人類之生殖細胞系框架序列為理想。因此，於本發明之一態樣中，若框架序列完全為人類序列，且對人類投予(例如疾病之治療)時，可認為本發明之抗原結合分子幾乎或完全不會引起免疫原性反應。由上述含意，本發明之「含有生殖細胞系列之序列」，係指本發明之框架序列的一部分與任一人類之生殖細胞系框架序列的一部分為相同。例如，當為本發明之抗原結合分子之重鏈 FR2 之序列與多數不同之人類之生殖細胞系框架序列之重鏈 FR2 序列組合而得之序列時，亦為本發明之「含有生殖細胞系列之序列」抗原結合分子。又，本發明之抗原結合分子之框架序列係經取代之序列的情形，係為本發明之「含有生殖細胞系列之序列」之抗原結合分子。作為經如此取代之序列之例，尤其可列舉人類之生殖細胞系框架序列之一部分胺基酸取代為依腺苷及/或 ATP 存在或不存在使抗原結合分子對抗原之結合活性變化之胺基酸之序列。

【0184】 框架，例如 V-Base(<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>)等網站包括的現在已知之完全人類型之框架區之序列為理想。該等框架區之序列可適當使用作為在本發明之抗原結合分子包含之生殖細胞系列之序列。生殖細胞系列之序列，也可依其類似性分類(Tomlinson 等人(J. Mol. Biol. (1992) 227, 776-798)Williams 及 Winter(Eur. J. Immunol. (1993) 23,

1456-1461)及 Cox 等人(Nat. Genetics (1994) 7, 162-168))。可從分類為 7 個次群之 V_{κ} 、分類為 10 個次群之 V_{λ} 、分類為 7 個次群之 VH 適當選擇理想的生殖細胞系列之序列。

【0185】 完全人類型之 VH 序列不僅限定於下列，但可舉例如 VH1 次群 (例如:VH1-2、VH1-3、VH1-8、VH1-18、VH1-24、VH1-45、VH1-46、VH1-58、VH1-69)、VH2 次群(例如:VH2-5、VH2-26、VH2-70)、VH3 次群(VH3-7、VH3-9、VH3-11、VH3-13、VH3-15、VH3-16、VH3-20、VH3-21、VH3-23、VH3-30、VH3-33、VH3-35、VH3-38、VH3-43、VH3-48、VH3-49、VH3-53、VH3-64、VH3-66、VH3-72、VH3-73、VH3-74)、VH4 次群(VH4-4、VH4-28、VH4-31、VH4-34、VH4-39、VH4-59、VH4-61)、VH5 次群(VH5-51)、VH6 次群(VH6-1)、VH7 次群(VH7-4、VH7-81)之 VH 序列等為理想例。該等在公知文獻(Matsuda 等人(J. Exp. Med. (1998) 188, 1973-1975))等也有記載，該技術領域中具有通常知識者可依據該等序列資訊適當設計本發明之抗原結合分子。該等以外之完全人類型之框架或框架之準區也可理想地使用。

【0186】 完全人類型之 V_{κ} 序列，不僅限定於下列，例如可舉分類於 $V_{\kappa}1$ 次群之 A20、A30、L1、L4、L5、L8、L9、L11、L12、L14、L15、L18、L19、L22、L23、L24、O2、O4、O8、O12、O14、O18、分類於 $V_{\kappa}2$ 次群之 A1、A2、A3、A5、A7、A17、A18、A19、A23、O1、O11、分類於 $V_{\kappa}3$ 次群之 A11、A27、L2、L6、L10、L16、L20、L25、分類於 $V_{\kappa}4$ 次群之 B3、分類於 $V_{\kappa}5$ 次群之 B2(本說明書中，也稱為 $V_{\kappa}5-2$)、分類於

Vk6 次群之 A10、A14、A26 等(Kawasaki 等人, (Eur. J. Immunol. (2001) 31, 1017-1028)、Schable 及 Zachau(Biol. Chem. Hoppe Seyler (1993) 374, 1001-1022)及 Brensing-Kuppers 等人(Gene (1997) 191, 173-181))為理想例。

【0187】 完全人類型之 V λ 序列不僅限定於下列，例如可舉分類於 VL1 次群之 V1-2、V1-3、V1-4、V1-5、V1-7、V1-9、V1-11、V1-13、V1-16、V1-17、V1-18、V1-19、V1-20、V1-22、分類於 VL1 次群之 V2-1、V2-6、V2-7、V2-8、V2-11、V2-13、V2-14、V2-15、V2-17、V2-19、分類於 VL3 次群之 V3-2、V3-3、V3-4、分類於 VL4 次群之 V4-1、V4-2、V4-3、V4-4、V4-6、分類於 VL5 次群之 V5-1、V5-2、V5-4、V5-6 等(Kawasaki 等人(Genome Res. (1997) 7, 250-261))為理想例。

【0188】 通常該等框架序列由於一個或更多胺基酸殘基的不同而彼此互異。該等框架序列可以與本發明之「依腺苷及/或 ATP 存在或不存在使抗原結合分域對抗原之結合活性變化之至少一個胺基酸殘基」一起使用。與本發明之「依腺苷及/或 ATP 存在或不存在使抗原結合分域對抗原之結合活性變化之至少一個胺基酸殘基」一起使用之完全人類型之框架之例，不僅限定於此，其他也有比如 KOL、NEWM、REI、EU、TUR、TEI、LAY、POM 等(例如前述 Kabat 等人(1991)及 Wu 等人(J. Exp. Med. (1970) 132, 211-250))。

【0189】 本發明不拘於特定理論，在使用生殖細胞系序列能期待排除幾乎於個人類的有害免疫反應之理由之一，據認為係如下所述。由於在通常之免疫反應中發生之親和性成熟步

驟，會在免疫球蛋白之可變區頻繁地發生體細胞之突變。該等突變主要產生在其該序列為超可變的 CDR 的周邊，但也會影響到框架區的殘基。該等框架的突變在生殖細胞系之基因不存在，成為患者之免疫原性的可能性少。據推論此係通常之人類族群係已暴露於由生殖細胞系之基因表現的框架序列中的大多數，而有免疫寬容，可預測該等生殖細胞系之框架在患者為低免疫原性或非免疫原性。為了使免疫寬容之可能性最大，可從普通存在之機能性生殖細胞系基因之集合選擇編碼為可變區之基因。

【0190】 為了製作本發明之依腺苷及/或 ATP 存在或不存在使抗原結合分域對抗原之結合活性變化之胺基酸包含於可變區序列之序列、重鏈可變區或輕鏈可變區之序列、或 CDR 序列或框架序列之抗原結合分子，可適當採用部位專一性的變異誘發法(Kunkel 等人(Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82, 488-492))或 Overlap extension PCR 等公知方法。

【0191】 例如，可藉由將選擇預先含有依腺苷及/或 ATP 存在或不存在使抗原結合分域對抗原之結合活性變化之至少一個胺基酸殘基之作為 CDR 序列及/或框架序列之輕鏈可變區、及製作為隨機化可變區序列庫之重鏈可變區予以組合，而製作本發明之含有多數序列彼此互異之抗原結合分子之庫。

【0192】 又，在選擇預先含有前述依腺苷或 ATP 存在或不存在使抗原結合分域對抗原之結合活性變化之至少一個胺基酸殘基之作為 CDR 序列及/或框架序列之重鏈及/或輕鏈可變區之序列中，也可設計使得含有多樣的胺基酸作為該胺基酸殘

基以外之殘基。本發明中，如此之殘基稱為柔性殘基。本發明之抗原結合分子對抗原之結合活性，只要會依組織專一的化合物之濃度之條件改變即可，該柔性殘基之數目及位置不限定於特定態樣。亦即重鏈及/或輕鏈之 CDR 序列及/或 FR 序列可包括一個或更多柔性殘基。是否能將柔性殘基及其殘基取代為其他某一胺基酸而庫化，可藉由進行腺苷及/或 ATP 與抗體之複合體之結晶結構解析或變異導入以鑑定。例如：可從腺苷及/或 ATP 與抗體之複合體之結晶結構解析，鑑定未涉及腺苷及/或 ATP 之結合之抗體之殘基。可選擇鑑定為即使將未涉及腺苷及/或 ATP 之結合鑑定之殘基取代為其他胺基酸仍能維持對化合物之適度結合之胺基酸。藉此，能設計在選擇之殘基出現經選擇之胺基酸之庫。於此情形，可設計由多數抗原結合分子為主而成之庫，以使得成為鑑定為未涉及腺苷及/或 ATP 之結合之殘基取代為彼此不同之胺基酸而得之抗原結合分子之集合。亦即，藉由組合取代為彼此互異之胺基酸之各個柔性殘基，可帶來含有該柔性殘基之抗原結合分子之序列之多樣性。

【0193】 又，可設計含有該等殘基之抗原結合分子，使得鑑定為涉及腺苷及/或 ATP 之結合之殘基中至少一個成為選自該殘基及與該殘基不同之殘基之任意殘基。作為鑑定為涉及腺苷及/或 ATP 之結合之胺基酸之一非限定態樣，可列舉重鏈可變區所含之 52 位、52a 位、53 位、96 位、100a 位、或 100c 位之胺基酸中之任一者以上之胺基酸等。又，作為如此之胺基酸之一非限定態樣，可列舉重鏈可變區所含之 52 位之 Ser、52a 位之 Ser、53 位之 Arg、96 位之 Gly、100a 位之 Leu、100c 位

之 Trp 等胺基酸中之任一者以上之胺基酸。例如：前述 100a 位之 Leu 鑑定為涉及腺苷及/或 ATP 之結合之情形，庫中包含之抗原結合分子之 100a 位之胺基酸殘基，除了 Leu 以外，也可為選自 His、Met、Leu、Arg、Trp、或 Tyr 中之任一者之柔性殘基之胺基酸殘基。

【0194】 作為前述柔性殘基之一非限定態樣，可列舉重鏈可變區所含之 31 位、32 位、33 位、35 位、50 位、55 位、56 位、57 位、58 位、59 位、95 位、96 位、97 位、98 位、99 位、100 位、100a 位、及 100b 位之胺基酸。作為如此之胺基酸之另一非限定態樣，可列舉輕鏈可變區所含之 26 位、27 位、27a 位、27b 位、27c 位、28 位、29 位、31 位、32 位、50 位、51 位、52 位、53 位、54 位、55 位、89 位、90 位、91 位、92 位、93 位、94 位、95a 位、96 位、及 97 位之胺基酸。

【0195】 作為前述柔性殘基之一非限定態樣，可列舉係重鏈可變區所含之胺基酸；且

31 位之胺基酸為 Asp、Gly、Asn、Ser、Arg、或 Thr 中之任一者、

32 位之胺基酸為 Ala、Phe、His、Asn、Ser、或 Tyr 中之任一者、

33 位之胺基酸為 Ala、Glu、Asp、Gly、Phe、Ile、His、Lys、Met、Leu、Asn、Gln、Pro、Ser、Arg、Trp、Val、Tyr、或 Thr 中之任一者、

35 位之胺基酸為 His、Ser、Thr、Tyr、或 Asn 中之任一者、

50 位之胺基酸為 Ala、Glu、Asp、Gly、Phe、Ile、His、

Lys、Met、Leu、Asn、Gln、Pro、Arg、Thr、Trp、Val、Tyr、
或 Ser 中之任一者、

55 位之胺基酸為 Ala、Glu、Asp、Gly、Leu、Thr、Ser、
Arg、或 Asn 中之任一者、

56 位之胺基酸為 Ala、Glu、Asp、Gly、Phe、Ile、His、
Lys、Met、Leu、Gln、Pro、Ser、Thr、Trp、Val、或 Tyr 中之
任一者、

57 位之胺基酸為 Ala、Lys、Arg、Thr、或 Ile 中之任一者、

58 位之胺基酸為 Asp、Gly、Phe、His、Ser、Thr、Tyr、
或 Asn 中之任一者、

59 位之胺基酸為 Leu、或 Tyr 中之任一者、

95 位之胺基酸為 Ala、Ile、Lys、Met、Leu、Arg、Trp、
Val、Tyr、或 Phe 中之任一者、

96 位之胺基酸為 Ala、Asp、Asn、或 Ser 中之任一者、

97 位之胺基酸為 Ala、Asp、Gly、Ile、His、Lys、Met、
Leu、Asn、Ser、Val、Tyr、或 Arg 中之任一者、

98 位之胺基酸為 Ala、Glu、Asp、Gly、Phe、Ile、His、
Met、Leu、Asn、Gln、Pro、Ser、Arg、Thr、Trp、Val、Tyr、
或 Lys 中之任一者、

99 位之胺基酸為 Ala、Glu、Asp、Phe、His、Lys、Asn、
Gln、Ser、Arg、Trp、Val、Tyr、或 Gly 中之任一者、

100 位之胺基酸為 Ala、Glu、Gly、Phe、Ile、His、Lys、
Met、Leu、Asn、Gln、Pro、Ser、Arg、Thr、Trp、Val、Tyr、
或 Asp 中之任一者、

100a 位之胺基酸為 Ala、Phe、Ile、His、Lys、Met、Arg、Trp、Val、或 Tyr 中之任一者、或

100b 位之胺基酸為 Ala、Glu、Asp、Gly、Phe、Ile、His、Lys、Met、Leu、Gln、Pro、Ser、Arg、Thr、Trp、Val、Tyr、或 Asn 中之任一者之胺基酸。

【0196】 作為前述柔性殘基之一非限定態樣，可列舉係輕鏈可變區所含之胺基酸；且

26 位之胺基酸為 Ala、Ser、或 Thr 中之任一者、

27 位之胺基酸為 Thr、或 Ser 中之任一者、

27a 位之胺基酸為 Gly、Asn、Thr、或 Ser 中之任一者、

27b 位之胺基酸為 Asn、或 Asp 中之任一者、

27c 位之胺基酸為 Ile、或 Val 中之任一者、

28 位之胺基酸為 Asp、或 Gly 中之任一者、

29 位之胺基酸為 Ala、Asp、Phe、Ser、Arg、Thr、Tyr、或 Gly 中之任一者、

31 位之胺基酸為 Glu、Asp、Lys、或 Asn 中之任一者、

32 位之胺基酸為 Ala、Asp、Ser、Thr、或 Tyr 中之任一者、

50 位之胺基酸為 Asp、Gly、Lys、Asn、Gln、Ser、Arg、Tyr、或 Glu 中之任一者、

51 位之胺基酸為 Asp、Gly、Lys、Asn、Thr、或 Val 中之任一者、

52 位之胺基酸為 Ala、Asp、Asn、Thr、或 Ser 中之任一者、

53 位之胺基酸為 Glu、Asp、His、Asn、Gln、Ser、Tyr、

或 Lys 中之任一者、

54 位之胺基酸為 Lys、或 Arg 中之任一者、

55 位之胺基酸為 Leu、或 Pro 中之任一者、

89 位之胺基酸為 Ala、Gly、Phe、Leu、Asn、Gln、Thr、Val、Tyr、或 Ser 中之任一者、

90 位之胺基酸為 Ala、Leu、Thr、Val、或 Ser 中之任一者、

91 位之胺基酸為 Ala、Asp、Phe、His、Lys、Asn、Ser、Arg、Thr、Trp、Val、或 Tyr 中之任一者、

92 位之胺基酸為 Glu、Asp、Ser、Arg、Thr、Val、Tyr、或 Ala 中之任一者、

93 位之胺基酸為 Ala、Asp、Ile、Asn、Ser、Arg、Thr、Val、Tyr、或 Gly 中之任一者、

94 位之胺基酸為 Ala、Asp、Gly、Ile、Asn、Arg、Thr、或 Ser 中之任一者、

95 位之胺基酸為 Ala、Glu、Asp、Gly、Phe、Ile、His、Lys、Met、Leu、Gln、Pro、Ser、Arg、Thr、Trp、Val、Tyr、或 Asn 中之任一者、

95a 位之胺基酸為 Ala、Glu、Asp、Gly、Ile、His、Lys、Leu、Gln、Pro、Ser、Arg、Thr、Tyr、或 Asn 中之任一者、

96 位之胺基酸為 Ala、Asp、Gly、Phe、His、Lys、Leu、Asn、Gln、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、或 Val 中之任一者、或

97 位之胺基酸為 Ala、Gly、Ile、Met、Leu、Ser、或 Val 中之任一者之胺基酸。

【0197】 本說明書中，柔性殘基係指當比較公知之及/或天

然抗體或抗原結合分域之胺基酸序列時，在該位置提示之幾個具有不同胺基酸之輕鏈及重鏈可變區上之胺基酸為非常多樣的位置所存在胺基酸殘基的變化(variation)。非常多樣的位置一般存在於 CDR 區。於一態樣中，當決定公知之及/或天然抗體之非常多樣的位置時，Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institute of Health Bethesda Md.) (1987 年及 1991 年)提供之資料係為有效。又，在網路上的許多資料庫 (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>、<http://www.bioinf.org.uk/abs/index.html>)，提供收集的多數人類輕鏈及重鏈序列及其配置，該等序列及其配置的資訊在決定本發明中之非常多樣的位置時有用。依本發明，當胺基酸位在的位置較佳有約 2 至約 20，更佳為約 3 至約 19，較佳為約 4 至約 18、較佳為 5 至 17、較佳為 6 至 16、較佳為 7 至 15、較佳為 8 至 14、較佳為 9 至 13、較佳為 10 至 12 個可能的不同胺基酸殘基的多樣性時，其位置可稱為非常多樣。在一些實施形態中，有些胺基酸位置，可具有較佳為至少約 2、較佳為至少約 4、較佳為至少約 6、較佳為至少約 8、較佳為約 10、較佳為約 12 之可能的相異胺基酸殘基的多樣性。

【0198】 又，藉由組合導入有前述依腺苷及/或 ATP 存在或不存在使抗原結合分域對抗原之結合活性變化之至少一個胺基酸殘基而得之輕鏈可變區及製作為作為隨機化可變區序列庫之重鏈可變區，也能製作本發明之含有多數序列彼此互異之抗原結合分子之庫。同樣地，藉由導入前述依腺苷及/或 ATP 存在或不存在使抗原結合分域對抗原之結合活性變化之至少

一個胺基酸殘基，且組合設計其他胺基酸殘基作為柔性殘基之重鏈可變區，也可製作含有本發明之多數彼此序列互異抗原結合分子之庫。

【0199】 將前述導入有依標的組織專一性化合物之濃度條件使抗原結合分子對抗原之結合活性變化之至少一個胺基酸殘基之輕鏈可變區及製作為無規化可變區序列庫之重鏈可變區予以組合之情形，亦與前述同樣，可設計成使柔性殘基含於該輕鏈可變區之序列。本發明之抗原結合分子對抗原之結合活性，只要依腺苷及/或 ATP 存在或不存在變化即可，該柔性殘基之數目及位置不限定於特定態樣。亦即，可於重鏈及/或輕鏈之 CDR 序列及/或 FR 序列含有一個或更多柔性殘基。

【0200】 作為組合之重鏈可變區之例，可列舉無規化可變區庫為理想例。無規化可變區庫之製作方法可適當組合公眾所知之方法。於本發明之一非限定態樣中，依以特定之抗原免疫之動物、傳染病患者或接種疫苗而使血中抗體價上昇之人類、癌患者、自體免疫疾病之淋巴球來源之抗體基因為依據構建之免疫庫，可理想地作為無規化可變區庫使用。

【0201】 又，本發明之一非限定態樣中，基因體 DNA 中之 V 基因或再構建且有功能的 V 基因之 CDR 序列取代為含有編碼為適當長度之密碼組之序列之合成寡核苷酸組而得之合成庫，也可理想地作為隨機化可變區庫。於該等情形，由觀察重鏈之 CDR3 之基因序列之多樣性，也可僅取代 CDR3 序列。於抗原結合分子之可變區生出胺基酸之多樣性的基準，係使露出於抗原結合分子表面之位置之胺基酸殘基帶有多樣性。露出於

表面之位置，係指可基於抗原結合分子之構造、構造整體、及/或模式化的構造而判斷可露出表面，及/或可與抗原接觸之位置，一般為其 CDR。較佳為露出表面之位置，係使用來自如 InsightII 程式(Accelrys)之電腦程式，使用來自抗原結合分子之三維模型的座標決定。露出表面之位置，可使用在該技術領域公知之演算法(例如，Lee 及 Richards(J.Mol.Biol. (1971) 55, 379-400)、Connolly(J.Appl.Cryst. (1983) 16, 548-558))決定。露出表面之位置之決定，可使用適於蛋白質模型化之軟體及從抗體獲得之三維構造資訊實施。為了如此的目的可利用之軟體，可列舉 SYBYL 活體高分子模組軟體(Tripos Associates)。一般而言，又較佳為當演算法需要使用者輸入的大小參數時，將計算使用之探針的「大小」設為半徑約 1.4 埃以下。再者，使用個人類電腦用軟體決定露出於表面之區及面積之方法，記載於 Pacios(Comput.Chem. (1994) 18 (4), 377-386 及 J.Mol.Model. (1995) 1, 46-53)。

【0202】 又，本發明之一非限定態樣中，為了提高抗體之安定性，也可適當改變包含 CDR 區及/或框架區之可變區之胺基酸。如此之胺基酸一非限定態樣，可列舉 1 位、5 位、10 位、30 位、48 位、58 位之胺基酸。更具體而言，可列舉 1 位之 Gln、5 位之 Gln、10 位之 Asp、30 位之 Asn、48 位之 Leu、58 位之 Asn。為了提高抗體之安定性，可將該等胺基酸取代為生殖細胞系列之序列所含之對應之胺基酸。作為如此之生殖細胞系列一非限定態樣之序列，可列舉 VH3-21 之序列。於此情形中，可取代為 1 位之 Gln 為 Glu、5 位之 Gln 為 Val、10 位之 Asp

為 Gly、30 位之 Asn 為 Ser、48 位之 Leu 為 Val、58 位之 Asn 為 Tyr。

【0203】 又，本發明之一非限定態樣中，尤佳為使用從健康正常人類之淋巴球來源的抗體基因所構建，在其曲目不含偏差(bias)之抗體序列即未改變序列構成之未改變庫作為隨機化可變區庫(Gejima 等人(Human Antibodies (2002) 11,121-129)及 Cardoso 等人(Scand. J. Immunol. (2000) 51, 337-344))。本發明記載之含有未改變序列之胺基酸序列，係指從如此之未改變庫取得的胺基酸序列。

【0204】 Fc 區

Fc 區包含從抗體重鏈之不變區而來之胺基酸序列。Fc 區，係 EU 編號表示之約 216 位之胺基酸中，自木瓜酶切斷部位之鉸鏈區之 N 末端起包含該鉸鏈、CH2 及 CH3 分域之抗體之重鏈不變區之部分。Fc 區可從人類 IgG1 得到，但也可限定為 IgG 之特定之次類別。如此之 Fc 區之理想例，可列舉如後述在 pH 酸性域對 FcRn 有結合活性之 Fc 區。又，該 Fc 區之理想例，可列舉如後述對 Fc γ 受體有結合活性之 Fc 區。作為如此之 Fc 區之一非限定態樣，可列舉人類 IgG1(序列編號：5)、IgG2(序列編號：6)、IgG3(序列編號：7)、或 IgG4(序列編號：8)表示之 Fc 區。

【0205】 Fc γ 受體(Fc γ R)

Fc γ 受體(也記載為 Fc γ R)，係指能與 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 單株抗體之 Fc 區結合的受體，實質上意指由 Fc γ 受體基因編碼之蛋白質之家族的任一成員。人類中，該家族包括合同

型異構物 Fc γ RIa、Fc γ RIb 及 Fc γ RIc 之 Fc γ RI(CD64)；含同型異構物 Fc γ RIIa(包括副型 H131 及 R131。亦即，包括 Fc γ RIIa (H) 及 Fc γ RIIa (R))、Fc γ RIIb(包括 Fc γ RIIb-1 及 Fc γ RIIb-2)及 Fc γ RIIc 之 Fc γ RII(CD32)；及含構造同型 Fc γ RIIIa(包括副型 V158 及 F158。亦即，包括 Fc γ RIIIa (V)及 Fc γ RIIIa (F))及 Fc γ RIIIb(包括副型 Fc γ RIIIb-NA1 及 Fc γ RIIIb-NA2)之 Fc γ RIII(CD16)、及任意未曾發現的人類 Fc γ R 類或 Fc γ R 構造同型或副型，但不限定於此等。Fc γ R，包括人類、小鼠、大鼠、兔及猴來源者，但不限定於此等，可為任意生物來源。小鼠 Fc γ R 類，包括 Fc γ RI(CD64)、Fc γ RII(CD32)、Fc γ RIII(CD16) 及 Fc γ RIII-2(Fc γ RIV、CD16-2)、及任意未曾發現的小鼠 Fc γ R 類或 Fc γ R 同型異構物或副型，但不限定於該等。如此的 Fc γ 受體之理想例，可舉人類 Fc γ RI(CD64)、Fc γ RIIa(CD32)、Fc γ RIIb(CD32)、Fc γ RIIIa(CD16)及/或 Fc γ RIIIb(CD16)。人類 Fc γ RI 之聚核苷酸序列及胺基酸序列各記載於序列編號：9 (NM_000566.3)及 10 (NP_000557.1)，Fc γ RIIa(副型 H131)之聚核苷酸序列及胺基酸序列各記載於序列編號：11 (BC020823.1) 及 12 (AAH20823.1)、(副型 R131，係序列編號：12 之 166 號胺基酸取代為 Arg 之序列)、Fc γ RIIb 之聚核苷酸序列及胺基酸序列各記載於序列編號：13(BC146678.1)及 14(AAI46679.1)，Fc γ RIIIa 之聚核苷酸序列及胺基酸序列各記載於序列編號：15(BC033678.1)及 16(AAH33678.1)，及 Fc γ RIIIb 之聚核苷酸序列及胺基酸序列各記載於序列編號：17(BC128562.1)及 18(AAI28563.1) (括弧內代表 RefSeq 等資料庫登錄編號)。Fc γ

受體是否有與 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 單株抗體之 Fc 區結合之活性，除了上述記載之 FACS 或 ELISA 格式以外，也可利用 ALPHA 篩選(Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay)或利用表面電漿子共振(SPR)現象之 BIACORE 法等確認(Proc.Natl.Acad.Sci.USA (2006) 103 (11), 4005-4010)。

【0206】 包括 Fc γ RIa、Fc γ RIb 及 Fc γ RIc 之 Fc γ RI(CD64)及包括同型異構物 Fc γ RIIIa(包括副型 V158 及 F158)及 Fc γ RIIIb(包括副型 Fc γ RIIIb-NA1 及 Fc γ RIIIb-NA2)之 Fc γ RIII(CD16)，會與 IgG 之 Fc 部分結合之 α 鏈及在細胞內傳遞活化信號之有 ITAM 之共通 γ 鏈組合。另一方面，含有同型異構物 Fc γ RIIa(包括副型 H131 及 R131)及 Fc γ RIIc 之 Fc γ RII(CD32)本身的細胞質分域，包括 ITAM。該等受體在巨噬細胞或肥大細胞(mast cell)、抗原提示細胞等許多免疫細胞表現。該等受體藉由與 IgG 之 Fc 部分結合而傳遞的活化信號，促進巨噬細胞之吞噬能力或發炎性細胞激素產生、肥大細胞之脫顆粒、抗原提示細胞之機能亢進。如上述，具有傳遞活化信號之能力之 Fc γ 受體，在本發明也稱為活性型 Fc γ 受體。

【0207】 另一方面，Fc γ RIIb(包括 Fc γ RIIb-1 及 Fc γ RIIb-2)本身的細胞質內分域包括傳遞抑制型信號之 ITIM。B 細胞中，由於 Fc γ RIIb 與 B 細胞受體(BCR)的交聯，抑制來自 BCR 之活化信號。結果使 BCR 之抗體產生受抑制。巨噬細胞中，由於 Fc γ RIII 與 Fc γ RIIb 之交聯使吞噬能力或發炎性細胞激素的產生能力受抑制。如上述有傳遞抑制化信號之能力之 Fc γ 受體，在本發明也稱為抑制型 Fc γ 受體。

【0208】 Fc 區對 Fc γ 受體之結合活性

如前述，作為本發明之抗原結合分子含有之 Fc 區，可列舉對 Fc γ 受體有結合活性之 Fc 區。作為如此之 Fc 區之一非限定態樣，可列舉人類 IgG1(序列編號：5)、IgG2(序列編號：6)、IgG3(序列編號：7)、或 IgG4(序列編號：8)表示之 Fc 區。Fc γ 受體是否對 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 單株抗體之 Fc 區有結合活性，可利用如上記載之 FACS 或 ELISA 格式確認，此外也可利用 ALPHA 篩選 (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay) 或利用表面電漿子共振 (SPR) 現象之 BIACORE 法等確認 (Proc.Natl.Acad.Sci.USA (2006) 103 (11), 4005-4010)。

【0209】 ALPHA 篩選，係利用使用提供者與接受者的 2 種珠之 ALPHA 技術，依下列之原理實施。接近於提供者珠之分子會與結合於接受者珠之分子以生物學交互作用，僅在 2 珠接近的狀態檢測出發光信號。由雷射激發的提供者珠內的光敏劑將周邊的氧變換為激發狀態的單態氧。單態氧擴散到提供者珠周邊，到達接近的接受者珠時會引起珠內之化學發光反應，最終發出光。與提供者珠結合之分子及結合於接受者珠之分子彼此未交互作用時，提供者珠產生之單態氧未到達接受者珠，故不起化學發光反應。

【0210】 例如於提供者珠結合有包括經生物素標記之 Fc 區之抗原結合分子，於接受者珠結合有以麩胱甘肽 S 轉移酶 (GST) 標籤化的 Fc γ 受體。競爭的含 Fc 區改變體之抗原結合分子不存在時，有天然型 Fc 區之抗原結合分子與 Fc γ 受體會交互作

用並產生 520-620 nm 的信號。含有未標籤化的 Fc 區改變體之抗原結合分子，會與有天然型 Fc 區之抗原結合分子在與 Fc γ 受體間之交互作用競爭。將競爭結果表示之螢光減少予以定量，可決定相對的結合親和性。抗體等抗原結合分子使用 Sulfo-NHS-生物素等予以生物素化係為公知。將 Fc γ 受體以 GST 予以標籤化之方法，可適當採用將編碼為 Fc γ 受體之聚核苷酸與編碼為 GST 之聚核苷酸於同一讀框融合而得之融合基因連結於保持有可作用之載體的細胞等中表現，並使用麩胱甘肽管柱精製之方法等。獲得之信號可藉由使用例如 GRAPHPAD PRISM(GraphPad 公司、San Diego)等的軟體以非線性回歸解析之一部位競爭(one-site competition)模型擬合(fitting)而理想地解析。

【0211】 將觀察交互作用之物質的其中之一(配體)固定在感應晶片之金薄膜上，並從感應晶片的背側照射光使在金薄膜與玻璃的交界面發生全反射，則反射光的一部分會形成反射強度下降的部分(SPR 信號)。將觀察交互作用之物質的其中另一者(分析物)流過感應晶片的表面並使配體與分析物結合，則經固定化之配體分子的質量增加，感應晶片表面之溶劑之折射率會改變。藉由該折射率的變化，SPR 信號的位置會偏移(反之，結合若解離，則回到信號位置)。Biacore 系統取上述偏移量，亦即感應晶片表面之質量變化作為縱軸，將質量之時間變化作為測定資料表示(感測圖)。從感測圖的曲線，求出動力學：結合速度常數(k_a)與解離速度常數(k_d)，由該常數之比求出親和性(KD)。BIACORE 法也可理想地使用於抑制測定法。抑制測

定法，例如 Proc.Natl.Acad.Sci.USA (2006) 103 (11), 4005-4010。

【0212】 Fc γ 受體(Fc γ R)結合改變 Fc 區

作為本發明含有之 Fc 區，除了人類 IgG1(序列編號：5)、IgG2(序列編號：6)、IgG3(序列編號：7)、或 IgG4(序列編號：8)表示之 Fc 區以外，也可適當使用比起天然型人類 IgG 之 Fc 區對 Fc γ 受體之結合活性，對 Fc γ 受體之結合活性較高之 Fc γ R 結合改變 Fc 區。本說明書中，「天然型人類 IgG 之 Fc 區」，係指序列編號：5、6、7 或 8 例示之人類 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 之 Fc 區之 EU 編號 297 位所結合之糖鏈係含岩藻醣之糖鏈之 Fc 區。如此之 Fc γ R 結合改變 Fc 區，可藉由改變天然型人類 IgG 之 Fc 區之胺基酸以製作。Fc γ R 結合改變 Fc 區對 Fc γ R 之結合活性，是否比天然型人類 IgG 之 Fc 區對 Fc γ R 之結合活性高，可使用前述結合活性之項目記載之方法適當實施。

【0213】 本發明中，Fc 區之「胺基酸之改變」或「胺基酸改變」，包含改變為與初始 Fc 區之胺基酸序列不同之胺基酸序列。只要初始 Fc 區之修飾改變體在 pH 中性域會與人類 Fc γ 受體結合，可使用任一 Fc 區作為初始 Fc 區。又，將已施有改變之 Fc 區作為初始 Fc 區再進一步施加改變之 Fc 區也可理想地作為本發明之 Fc 區。初始 Fc 區，可指多胜肽本身、含有初始 Fc 區之組成物、或編碼為初始 Fc 區之胺基酸序列。初始 Fc 區，可包含利用在抗體項目大概說明的重組而產生之公眾所知之 Fc 區。初始 Fc 區之起源不限定，但可從非人類動物之任意生物或人類取得。較佳為任意生物，可列舉小鼠、大鼠、豚

鼠、倉鼠、沙鼠、貓、兔、狗、羊、山羊、牛、馬、駱駝、及非人類靈長類選出的生物。於其他態樣中，初始 Fc 區可也從食蟹猴、狨猴、恒河猴、黑猩猩、或人類取得。較佳為初始 Fc 區從人類 IgG1 取得，但不限於 IgG 之特定類別。此代表可適當使用人類 IgG1、IgG2、IgG3、或 IgG4 之 Fc 區作為初始 Fc 區。同樣地，本說明書中，意指前述任意生物來源的 IgG 之任意類別或次類之 Fc 區，可較佳地作為初始 Fc 區。天然存在之 IgG 之變異體或操作型，例如記載於公眾所知之文獻(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、國際公開 WO2009/086320、WO2008/092117、WO2007/041635、及 WO2006/105338)，但不限定於此等。

【0214】 改變例如包括：一個以上之變異，例如，取代為與初始 Fc 區之胺基酸相異之胺基酸殘基之變異、或對初始 Fc 區之胺基酸插入一個以上之胺基酸殘基或使初始 Fc 區之胺基酸有一個以上胺基酸缺失等。較佳為，改變後之 Fc 區之胺基酸序列中包括至少一部分非天然之 Fc 區之胺基酸序列。如此的變種必然與初始 Fc 區有少於 100%之序列同一性或類似性。理想之實施形態中，變種與初始 Fc 區之胺基酸序列有約 75%~少於 100%之胺基酸序列同一性或類似性，更佳為約 80%~少於 100%，又更佳為約 85%~少於 100%，再更佳為約 90%~少於 100%，最佳為約 95%~少於 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，初始 Fc 區及本發明之經改變之 Fc 區之間，有至少 1 個胺基酸之差異。初始 Fc 區與本

發明之 Fc γ R 結合改變 Fc 區之胺基酸之不同，尤其以前述 EU 編號指定之胺基酸殘基之位置之經指定之胺基酸之差異也可理想地指定。如此之變種之製作方法，例示於「胺基酸之改變」之項目。

【0215】 本發明之抗原結合分子所含之比起天然型人類 IgG 之 Fc 區對 Fc γ 受體之結合活性對 Fc γ 受體之結合活性較高之 Fc γ R 結合改變 Fc 區(Fc γ R 結合改變 Fc 區)，可利用任意方法取得，具體而言，藉由改變作為初始 Fc 區使用之人類 IgG 型免疫球蛋白之胺基酸，可取得該 Fc γ R 結合改變 Fc 區。用於改變之理想 IgG 型免疫球蛋白之 Fc 區，例如：序列編號：5、6、7 或 8 例示之人類 IgG(IgG1、IgG2、IgG3、或 IgG4、及此等之改變體)之 Fc 區。

【0216】 改變為其他胺基酸，只要比起天然型人類 IgG 之 Fc 區對 Fc γ 受體之結合活性，對 Fc γ 受體之結合活性較高即可，可改變任意位置之胺基酸。抗原結合分子含有人類 IgG1 之 Fc 區作為人類 Fc 區的情形，宜包含 EU 編號 297 位結合之糖鏈為含岩藻糖之糖鏈即帶來使比起天然型人類 IgG 之 Fc 區對 Fc γ 受體之結合活性，對 Fc γ 受體之結合活性較高之效果之改變較佳。如此之胺基酸之改變，例如國際公開 WO2007/024249、WO2007/021841、WO2006/031370、WO2000/042072、WO2004/029207、WO2004/099249、WO2006/105338、WO2007/041635、WO2008/092117、WO2005/070963、WO2006/020114、WO2006/116260 及 WO2006/023403 等已有報告。

【0217】 可為如此改變之胺基酸，例如從 EU 編號表示之 221 位、222 位、223 位、224 位、225 位、227 位、228 位、230 位、231 位、232 位、233 位、234 位、235 位、236 位、237 位、238 位、239 位、240 位、241 位、243 位、244 位、245 位、246 位、247 位、249 位、250 位、251 位、254 位、255 位、256 位、258 位、260 位、262 位、263 位、264 位、265 位、266 位、267 位、268 位、269 位、270 位、271 位、272 位、273 位、274 位、275 位、276 位、278 位、279 位、280 位、281 位、282 位、283 位、284 位、285 位、286 位、288 位、290 位、291 位、292 位、293 位、294 位、295 位、296 位、297 位、298 位、299 位、300 位、301 位、302 位、303 位、304 位、305 位、311 位、313 位、315 位、317 位、318 位、320 位、322 位、323 位、324 位、325 位、326 位、327 位、328 位、329 位、330 位、331 位、332 位、333 位、334 位、335 位、336 位、337 位、339 位、376 位、377 位、378 位、379 位、380 位、382 位、385 位、392 位、396 位、421 位、427 位、428 位、429 位、434 位、436 位及 440 位之群中選出之至少一個以上之胺基酸。藉由該等胺基酸之改變，可取得比起天然型人類 IgG 之 Fc 區對 Fc γ 受體之結合活性，對 Fc γ 受體之結合活性較高之 Fc 區(Fc γ R 結合改變 Fc 區)。

【0218】 為了於本發明使用，特別理想的改變，例如從 Fc 區之 EU 編號表示之；

221 位之胺基酸為 Lys 或 Tyr 中之任一者、

222 位之胺基酸為 Phe、Trp、Glu 或 Tyr 中之任一者、

223 位之胺基酸為 Phe、Trp、Glu 或 Lys 中之任一者、

224 位之胺基酸為 Phe、Trp、Glu 或 Tyr 中之任一者、

225 位之胺基酸為 Glu、Lys 或 Trp 中之任一者、

227 位之胺基酸為 Glu、Gly、Lys 或 Tyr 中之任一者、

228 位之胺基酸為 Glu、Gly、Lys 或 Tyr 中之任一者、

230 位之胺基酸為 Ala、Glu、Gly 或 Tyr 中之任一者、

231 位之胺基酸為 Glu、Gly、Lys、Pro 或 Tyr 中之任一者、

232 位之胺基酸為 Glu、Gly、Lys 或 Tyr 中之任一者、

233 位之胺基酸為 Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

234 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

235 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

236 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

237 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

238 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、

Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

239 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

240 位之胺基酸為 Ala、Ile、Met 或 Thr 中之任一者、

241 位之胺基酸為 Asp、Glu、Leu、Arg、Trp 或 Tyr 中之任一者、

243 位之胺基酸為 Leu、Glu、Leu、Gln、Arg、Trp 或 Tyr 中之任一者、

244 位之胺基酸為 His、

245 位之胺基酸為 Ala、

246 位之胺基酸為 Asp、Glu、His 或 Tyr 中之任一者、

247 位之胺基酸為 Ala、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Thr、Val 或 Tyr 中之任一者、

249 位之胺基酸為 Glu、His、Gln 或 Tyr 中之任一者、

250 位之胺基酸為 Glu 或 Gln 中之任一者、

251 位之胺基酸為 Phe、

254 位之胺基酸為 Phe、Met 或 Tyr 中之任一者、

255 位之胺基酸為 Glu、Leu 或 Tyr 中之任一者、

256 位之胺基酸為 Ala、Met 或 Pro 中之任一者、

258 位之胺基酸為 Asp、Glu、His、Ser 或 Tyr 中之任一者、

260 位之胺基酸為 Asp、Glu、His 或 Tyr 中之任一者、

262 位之胺基酸為 Ala、Glu、Phe、Ile 或 Thr 中之任一者、

263 位之胺基酸為 Ala、Ile、Met 或 Thr 中之任一者、

264 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Trp 或 Tyr 中之任一者、

265 位之胺基酸為 Ala、Leu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

266 位之胺基酸為 Ala、Ile、Met 或 Thr 中之任一者、

267 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

268 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、Gly、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Thr、Val 或 Trp 中之任一者、

269 位之胺基酸為 Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

270 位之胺基酸為 Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Trp 或 Tyr 中之任一者、

271 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

272 位之胺基酸為 Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

273 位之胺基酸為 Phe 或 Ile 中之任一者、

274 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

275 位之胺基酸為 Leu 或 Trp 中之任一者、

276 位之胺基酸為、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

278 位之胺基酸為 Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val 或 Trp 中之任一者、

279 位之胺基酸為 Ala、

280 位之胺基酸為 Ala、Gly、His、Lys、Leu、Pro、Gln、Trp 或 Tyr 中之任一者、

281 位之胺基酸為 Asp、Lys、Pro 或 Tyr 中之任一者、

282 位之胺基酸為 Glu、Gly、Lys、Pro 或 Tyr 中之任一者、

283 位之胺基酸為 Ala、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Arg 或 Tyr 中之任一者、

284 位之胺基酸為 Asp、Glu、Leu、Asn、Thr 或 Tyr 中之任一者、

285 位之胺基酸為 Asp、Glu、Lys、Gln、Trp 或 Tyr 中之任一者、

286 位之胺基酸為 Glu、Gly、Pro 或 Tyr 中之任一者、

288 位之胺基酸為 Asn、Asp、Glu 或 Tyr 中之任一者、

290 位之胺基酸為 Asp、Gly、His、Leu、Asn、Ser、Thr、Trp 或 Tyr 中之任一者、

291 位之胺基酸為 Asp、Glu、Gly、His、Ile、Gln 或 Thr 中之任一者、

292 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Pro、Thr 或 Tyr 中之任一者、

293 位之胺基酸為 Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

294 位之胺基酸為 Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

295 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

296 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr 或 Val 中之任一者、

297 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

298 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

299 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

300 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val 或 Trp 中之任一者、

301 位之胺基酸為 Asp、Glu、His 或 Tyr 中之任一者、

302 位之胺基酸為 Ile、

303 位之胺基酸為 Asp、Gly 或 Tyr 中之任一者、

304 位之胺基酸為 Asp、His、Leu、Asn 或 Thr 中之任一者、

305 位之胺基酸為 Glu、Ile、Thr 或 Tyr 中之任一者、

311 位之胺基酸為 Ala、Asp、Asn、Thr、Val 或 Tyr 中之任一者、

313 位之胺基酸為 Phe、

315 位之胺基酸為 Leu、

317 位之胺基酸為 Glu 或 Gln、

318 位之胺基酸為 His、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val 或 Tyr 中之任一者、

320 位之胺基酸為 Asp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Asn、Pro、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

322 位之胺基酸為 Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Pro、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

323 位之胺基酸為 Ile、

324 位之胺基酸為 Asp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

325 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

326 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

327 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

328 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、

Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

329 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

330 位之胺基酸為 Cys、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

331 位之胺基酸為 Asp、Phe、His、Ile、Leu、Met、Gln、Arg、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

332 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

333 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Ser、Thr、Val 或 Tyr 中之任一者、

334 位之胺基酸為 Ala、Glu、Phe、Ile、Leu、Pro 或 Thr 中之任一者、

335 位之胺基酸為 Asp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

336 位之胺基酸為 Glu、Lys 或 Tyr 中之任一者、

337 位之胺基酸為 Glu、His 或 Asn 中之任一者、

339 位之胺基酸為 Asp、Phe、Gly、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、Ser 或 Thr 中之任一者、

376 位之胺基酸為 Ala 或 Val 中之任一者、

- 377 位之胺基酸為 Gly 或 Lys 中之任一者、
- 378 位之胺基酸為 Asp、
- 379 位之胺基酸為 Asn、
- 380 位之胺基酸為 Ala、Asn 或 Ser 中之任一者、
- 382 位之胺基酸為 Ala 或 Ile 中之任一者、
- 385 位之胺基酸為 Glu、
- 392 位之胺基酸為 Thr、
- 396 位之胺基酸為 Leu、
- 421 位之胺基酸為 Lys、
- 427 位之胺基酸為 Asn、
- 428 位之胺基酸為 Phe 或 Leu 中之任一者、
- 429 位之胺基酸為 Met、
- 434 位之胺基酸為 Trp、
- 436 位之胺基酸為 Ile、或
- 440 位之胺基酸為 Gly、His、Ile、Leu 或 Tyr 中之任一者、

之群中選出之至少一個以上之胺基酸之改變。又，改變之胺基酸之數目不特別限定，可僅有一處胺基酸改變，也可有二處以上之胺基酸改變。二處以上之胺基酸之改變之組合，例如表 1(表 1-1~表 1-3)記載之組合。

【0219】

【表 1-1】

胺基酸的組合	胺基酸的組合
K370E/P396L/D270E	S239Q/I332Q
Q419H/P396L/D270E	S267D/I332E
V240A/P396L/D270E	S267E/I332E
R255L/P396L/D270E	S267L/A327S
R255L/P396L/D270E	S267Q/A327S
R255L/P396L/D270E/R292G	S298A/I332E
R255L/P396L/D270E	S304T/I332E
R255L/P396L/D270E/Y300L	S324G/I332D
F243L/D270E/K392N/P396L	S324G/I332E
F243L/R255L/D270E/P396L	S324I/I332D
F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L	S324I/I332E
F243L/R292P/Y300L/P396L	T260H/I332E
F243L/R292P/Y300L	T335D/I332E
F243L/R292P/P396L	V240I/V266I
F243L/R292P/V305I	V264I/I332E
F243L/R292P	D265F/N297E/I332E
S298A/E333A/K334A	D265Y/N297D/I332E
E380A/T307A	F243L/V262I/V264W
K326M/E333S	N297D/A330Y/I332E
K326A/E333A	N297D/T299E/I332E
S317A/K353A	N297D/T299F/I332E
A327D/I332E	N297D/T299H/I332E
A330L/I332E	N297D/T299I/I332E
A330Y/I332E	N297D/T299L/I332E
E258H/I332E	N297D/T299V/I332E
E272H/I332E	P230A/E233D/I332E
E272I/N276D	P244H/P245A/P247V
E272R/I332E	S239D/A330L/I332E
E283H/I332E	S239D/A330Y/I332E
E293R/I332E	S239D/H268E/A330Y
F241L/V262I	S239D/I332E/A327A
F241W/F243W	S239D/I332E/A330I

【0220】 表 1-2 係接續表 1-1 之表。

【表 1-2】

F243L/V264I	S239D/N297D/I332E
H268D/A330Y	S239D/S298A/I332E
H268E/A330Y	S239D/V264I/I332E
K246H/I332E	S239E/N297D/I332E
L234D/I332E	S239E/V264I/I332E
L234E/I332E	S239N/A330L/I332E
L234G/I332E	S239N/A330Y/I332E
L234I/I332E	S239N/S298A/I332E
L234I/L235D	S239Q/V264I/I332E
L234Y/I332E	V264E/N297D/I332E
L235D/I332E	V264I/A330L/I332E
L235E/I332E	V264I/A330Y/I332E
L235I/I332E	V264I/S298A/I332E
L235S/I332E	Y296D/N297D/I332E
L328A/I332D	Y296E/N297D/I332E
L328D/I332D	Y296H/N297D/I332E
L328D/I332E	Y296N/N297D/I332E
L328E/I332D	Y296Q/N297D/I332E
L328E/I332E	Y296T/N297D/I332E
L328F/I332D	D265Y/N297D/T299L/I332E
L328F/I332E	F241E/F243Q/V262T/V264E
L328H/I332E	F241E/F243R/V262E/V264R
L328I/I332D	F241E/F243Y/V262T/V264R
L328I/I332E	F241L/F243L/V262I/V264I
L328M/I332D	F241R/F243Q/V262T/V264R
L328M/I332E	F241S/F243H/V262T/V264T
L328N/I332D	F241W/F243W/V262A/V264A
L328N/I332E	F241Y/F243Y/V262T/V264T
L328Q/I332D	I332E/A330Y/H268E/A327A
L328Q/I332E	N297D/I332E/S239D/A330L
L328T/I332D	N297D/S298A/A330Y/I332E
L328T/I332E	S239D/A330Y/I332E/K326E
L328V/I332D	S239D/A330Y/I332E/K326T
L328V/I332E	S239D/A330Y/I332E/L234I
L328Y/I332D	S239D/A330Y/I332E/L235D

【0221】 表 1-3 係接續表 1-2 之表。

【表 1-3】

L328Y/I332E	S239D/A330Y/I332E/V240I
N297D/I332E	S239D/A330Y/I332E/V264T
N297E/I332E	S239D/A330Y/I332E/V266I
N297S/I332E	S239D/D265F/N297D/I332E
P227G/I332E	S239D/D265H/N297D/I332E
P230A/E233D	S239D/D265I/N297D/I332E
Q295E/I332E	S239D/D265L/N297D/I332E
R255Y/I332E	S239D/D265T/N297D/I332E
S239D/I332D	S239D/D265V/N297D/I332E
S239D/I332E	S239D/D265Y/N297D/I332E
S239D/I332N	S239D/I332E/A330Y/A327A
S239D/I332Q	S239D/I332E/H268E/A327A
S239E/D265G	S239D/I332E/H268E/A330Y
S239E/D265N	S239D/N297D/I332E/A330Y
S239E/D265Q	S239D/N297D/I332E/K326E
S239E/I332D	S239D/N297D/I332E/L235D
S239E/I332E	S239D/V264I/A330L/I332E
S239E/I332N	S239D/V264I/S298A/I332E
S239E/I332Q	S239E/V264I/A330Y/I332E
S239N/I332D	F241E/F243Q/V262T/V264E/I332E
S239N/I332E	F241E/F243R/V262E/V264R/I332E
S239N/I332N	F241E/F243Y/V262T/V264R/I332E
S239N/I332Q	F241R/F243Q/V262T/V264R/I332E
S239Q/I332D	S239D/I332E/H268E/A330Y/A327A
S239Q/I332E	S239E/V264I/S298A/A330Y/I332E
S239Q/I332N	F241Y/F243Y/V262T/V264T/N297D/I332E
S267E/L328F	G236D/S267E
S239D/S267E	

【0222】 測定本發明之抗原結合分子所含之 Fc γ 受體結合域與 Fc γ 受體間之結合活性之 pH 之條件，可適當使用 pH 酸性域至 pH 中性域之條件。作為測定本發明之抗原結合分子所含之 Fc γ 受體結合域與 Fc γ 受體間之結合活性之條件的 pH 酸性域至 pH 中性域，通常指 pH5.8~pH8.0。較佳為 pH6.0~pH7.4 之任意 pH 值代表之範圍，較佳為從 pH6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、及 7.4 選擇，尤佳為接近癌組織之 pH 之 pH6.15~7.4(Vaupel 等人(Cancer

Res. (1989) 49, 6449-6665))。就測定條件使用之溫度而言，Fc γ 受體結合域與人類 Fc γ 受體間之結合親和性可於 10°C ~50°C 之任意溫度評價。較佳為為了決定人類 Fc γ 受體結合域與 Fc γ 受體間之結合親和性，使用 15°C ~40°C 之溫度。更佳為將 20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、及 35°C 中之任一者之 20°C 至 35°C 的任意溫度也同樣使用在決定 Fc γ 受體結合域與 Fc γ 受體間之結合親和性。25°C 之溫度，為本發明之態樣一非限定例。

【0223】 本說明書中，Fc γ R 結合改變 Fc 區對 Fc γ 受體之結合活性高於天然型 Fc 區對 Fc γ 受體之結合活性者，係指 Fc γ R 結合改變 Fc 區對 Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIa 及/或 Fc γ RIIIb 中之任一者之人類 Fc γ 受體之結合活性高於天然型 Fc 區對該等人類 Fc γ 受體之結合活性。例如：依據上述解析方法，相較於作為對照之含人類 IgG 之天然型 Fc 區之抗原結合分子之結合活性，含 Fc γ R 結合改變 Fc 區之抗原結合分子之結合活性顯示 105%以上，較佳為 110%以上、115%以上、120%以上、125%以上，尤佳為 130%以上、135%以上、140%以上、145%以上、150%以上、155%以上、160%以上、165%以上、170%以上、175%以上、180%以上、185%以上、190%以上、195%以上、2 倍以上、2.5 倍以上、3 倍以上、3.5 倍以上、4 倍以上、4.5 倍以上、5 倍以上、7.5 倍以上、10 倍以上、20 倍以上、30 倍以上、40 倍以上、50 倍以上、60 倍以上、70 倍以上、80 倍以上、90 倍以上、100 倍以上之結合活性。作為天然型 Fc 區，也可使用初始 Fc 區，也可使用相同次類之抗體之天然

型 Fc 區。

【0224】 本發明中，作為對照之人類 IgG 之天然型 Fc 區，宜使用 EU 編號表示之 297 位之胺基酸所結合之糖鏈為含岩藻醣之糖鏈者即天然型人類 IgG 之 Fc 區。是否 EU 編號表示之 297 位之胺基酸所結合之糖鏈為含岩藻醣之糖鏈，可使用非專利文獻 6 記載之方法。例如：可依如下方法判定天然型人類 IgG 之 Fc 區所結合之糖鏈是否為含岩藻醣之糖鏈。藉由使待驗天然型人類 IgG 與 N-Glycosidase F(Roche diagnostics)反應，可從待驗天然型人類 IgG 使糖鏈游離 (Weitzhandler 等人(J. Pharma. Sciences (1994) 83, 12, 1670-1675)。然後，使乙醇反應，並將已去除蛋白質之反應液(Schenk 等(J. Clin. Investigation (2001) 108 (11) 1687-1695)之濃縮乾固物以 2-胺基吡啶進行螢光標記(Bigge 等人(Anal. Biochem. (1995) 230 (2) 229-238)。利用使用纖維素匣之固相萃取進行脫試藥、並已螢光標記之 2-AB 化糖鏈，以順相層析解析。藉由觀察檢測到的層析圖的峰部，可判定人類 IgG 之天然型 Fc 區所結合之糖鏈是否為含岩藻醣之糖鏈。

【0225】 作為對照之含有相同次類之抗體之天然型 Fc 區之抗原結合分子，可適當使用具有 IgG 單株抗體之 Fc 區之抗原結合分子。該 Fc 區之結構，記載於序列編號：5(資料庫註冊編號 AAC82527.1 之 N 末端有 A 加成)、6(資料庫註冊編號 AAB59393.1 之 N 末端有 A 加成)、7(資料庫註冊編號 CAA27268.1)、及 8(資料庫註冊編號 AAB59394.1 之 N 末端有 A 加成)。又，當將含有某特定之構造同型之抗體之 Fc 區之抗

原結合分子作為待驗物質的情形，藉由將具有該特定之構造原型之 IgG 單株抗體之 Fc 區的抗原結合分子作為對照使用，可驗證含有待驗 Fc 區之抗原結合分子對 Fc γ 受體之結合活性之效果。如上述，可適當選擇含有已驗證對 Fc γ 受體之結合活性高之 Fc 區之抗原結合分子。

【0226】 對 Fc γ 受體有選擇性結合活性之 Fc 區

又，本發明中可理想地使用之 Fc γ 受體結合域，例如有對特定之 Fc γ 受體之結合活性高於對其他 Fc γ 受體之結合活性之性質之 Fc γ 受體結合域(對 Fc γ 受體有選擇性結合活性之 Fc γ 受體結合域)亦為理想。抗原結合分子使用抗體 (作為 Fc γ 受體結合域之 Fc 區)的情形，一分子之抗體僅能與一分子之 Fc γ 受體結合，所以在一分子之抗原結合分子結合於抑制型 Fc γ 受體之狀態無法與其他活性型 Fc γ R 結合，在與活性型 Fc γ 受體結合之狀態無法與其他活性型 Fc γ 受體或抑制型 Fc γ 受體結合。

【0227】 對活性型 Fc γ 受體之結合活性高於對抑制型 Fc γ 受體之結合活性的 Fc 區

如前述，作為活性型 Fc γ 受體，含有 Fc γ RIa、Fc γ RIb 及 Fc γ RIc 之 Fc γ RI(CD64)、Fc γ RIIa、含有 Fc γ RIIIa(包括副型 V158 及 F158)及 Fc γ RIIIb(包括副型 Fc γ RIIIb-NA1 及 Fc γ RIIIb-NA2)之 Fc γ RIII(CD16)亦為理想例。又，Fc γ RIIb(包括 Fc γ RIIb-1 及 Fc γ RIIb-2)為抑制型 Fc γ 受體之理想例。

【0228】 本說明書中，作為對特定之 Fc γ 受體之結合活性高於對其他 Fc γ 受體之結合活性之例，例如：對活性型 Fc γ 受體

之結合活性高於對抑制型 Fc γ 受體之結合活性之情形。於此情形，係指 Fc 區對於 Fc γ RIa、Fc γ RIIa、Fc γ RIIIa 及/或 Fc γ RIIIb 中之任一者之人類 Fc γ 受體之結合活性，高於對於 Fc γ RIIb 之結合活性。例如：代表依上述解析方法，含 Fc 區之抗原結合分子對於 Fc γ RIa、Fc γ RIIa、Fc γ RIIIa 及/或 Fc γ RIIIb 中之任一者之人類 Fc γ 受體之結合活性，為對 Fc γ RIIb 之結合活性之 105% 以上，較佳為 110% 以上、120% 以上、130% 以上、140% 以上，尤佳為 150% 以上、160% 以上、170% 以上、180% 以上、190% 以上、200% 以上、250% 以上、300% 以上、350% 以上、400% 以上、450% 以上、500% 以上、750% 以上、10 倍以上、20 倍以上、30 倍以上、40 倍以上、50 倍、60 倍、70 倍、80 倍、90 倍、100 倍以上之結合活性。對活性型 Fc γ 受體之結合活性高於對抑制型 Fc γ 受體之結合活性之 Fc 區，可理想地含有於抗原結合分域係結合於膜型分子之本發明之抗原結合分子。含有如此之 Fc 區之 IgG1 抗體，已知後述 ADCC 活性增強，所以含有該 Fc 區之抗原結合分子，作為本發明之醫藥組合物所含之抗原結合分子亦有用。

【0229】 本發明之一非限定態樣中，對活性型 Fc γ 受體之結合活性高於對抑制型 Fc γ 受體之結合活性（對抑制型 Fc γ 受體有選擇性結合活性）之 Fc 區之例，可列舉從前述 EU 編號表示之 221 位、222 位、223 位、224 位、225 位、227 位、228 位、230 位、231 位、232 位、233 位、234 位、235 位、236 位、237 位、238 位、239 位、240 位、241 位、243 位、244 位、245 位、246 位、247 位、249 位、250 位、251 位、254

位、255 位、256 位、258 位、260 位、262 位、263 位、264 位、265 位、266 位、267 位、268 位、269 位、270 位、271 位、272 位、273 位、274 位、275 位、276 位、278 位、279 位、280 位、281 位、282 位、283 位、284 位、285 位、286 位、288 位、290 位、291 位、292 位、293 位、294 位、295 位、296 位、297 位、298 位、299 位、300 位、301 位、302 位、303 位、304 位、305 位、311 位、313 位、315 位、317 位、318 位、320 位、322 位、323 位、324 位、325 位、326 位、327 位、328 位、329 位、330 位、331 位、332 位、333 位、334 位、335 位、336 位、337 位、339 位、376 位、377 位、378 位、379 位、380 位、382 位、385 位、392 位、396 位、421 位、427 位、428 位、429 位、434 位、436 位及 440 位之群選出之至少一個以上之胺基酸係改變為與天然型 Fc 區不同之胺基酸的 Fc 區為理想例。

【0230】 本發明之一非限定態樣中，對活性型 Fc γ 受體之結合活性高於對抑制型 Fc γ 受體之結合活性（對抑制型 Fc γ 受體有選擇性的結合活性）之 Fc 區，例如表 1-1 至 1-3 記載之多數胺基酸改變為與天然型 Fc 區相異之胺基酸之 Fc 區為理想例。

【0231】 對抑制型 Fc γ 受體之結合活性高於對活性型 Fc γ 受體之結合活性之 Fc 區

本說明書中，對特定之 Fc γ 受體之結合活性高於對其他 Fc γ 受體之結合活性之例，例如：對抑制型 Fc γ 受體之結合活性高於對活性型 Fc γ 受體之結合活性之情形。於此情形，指 Fc

區對 Fc γ RIIb 之結合活性，高於對 Fc γ RIa、Fc γ RIIa、Fc γ RIIIa 及/或 Fc γ RIIIb 中之任一者之人類 Fc γ 受體之結合活性。例如：依上述解析方法，含 Fc 區之抗原結合分子對 Fc γ RIIb 之結合活性顯示對 Fc γ RIa、Fc γ RIIa、Fc γ RIIIa 及/或 Fc γ RIIIb 中之任一者之人類 Fc γ 受體之結合活性之 105%以上，較佳為 110%以上、120%以上、130%以上、140%以上，尤佳為 150%以上、160%以上、170%以上、180%以上、190%以上、200%以上、250%以上、300%以上、350%以上、400%以上、450%以上、500%以上、750%以上、10 倍以上、20 倍以上、30 倍以上、40 倍以上、50 倍、60 倍、70 倍、80 倍、90 倍、100 倍以上之結合活性。對抑制型 Fc γ 受體之結合活性高於對活性型 Fc γ 受體之結合活性之 Fc 區，可適當地含於抗原結合分域係結合於可溶型分子之本發明之抗原結合分子。

【0232】 本發明之一非限定態樣中、對抑制型 Fc γ 受體之結合活性高於對活性型 Fc γ 受體之結合活性之(對抑制型 Fc γ 受體有選擇性的結合活性)之 Fc 區之例，可列舉前述 Fc 區之胺基酸中之 EU 編號表示之 238 或 328 之胺基酸改變為與天然型 Fc 區相異之胺基酸之 Fc 區為理想例。

【0233】 又，本發明之一非限定態樣中，對抑制型 Fc γ 受體之結合活性高於對活性型 Fc γ 受體之結合活性之(對抑制型 Fc γ 受體有選擇性的結合活性之)Fc 區之例，可列舉為前述 Fc 區之 EU 編號表示之胺基酸且 EU 編號表示之 238 之胺基酸改變為 Asp、或 328 之胺基酸改變為 Glu 中之任一者以上之 Fc 區為理想例。又，對抑制型 Fc γ 受體有選擇性結合活性之 Fc

區，可適當選擇 US2009/0136485 記載之 Fc 區或改變。

【0234】 又，本發明之一非限定態樣中，為前述 Fc 區之 EU 編號表示之胺基酸且 EU 編號表示之 238 之胺基酸改變為 Asp、或 328 之胺基酸改變為 Glu 中之任一者以上之 Fc 區為理想例。

【0235】 又，本發明之一非限定態樣中，有以下任一者以上的改變的 Fc 為理想例：PCT/JP2012/054624 例示之 EU 編號表示之 238 位之 Pro 為 Asp 之取代、及 EU 編號表示之 237 位之胺基酸為 Trp、EU 編號表示之 237 位之胺基酸為 Phe、EU 編號表示之 267 位之胺基酸為 Val、EU 編號表示之 267 位之胺基酸為 Gln、EU 編號表示之 268 位之胺基酸為 Asn、EU 編號表示之 271 位之胺基酸為 Gly、EU 編號表示之 326 位之胺基酸為 Leu、EU 編號表示之 326 位之胺基酸為 Gln、EU 編號表示之 326 位之胺基酸為 Glu、EU 編號表示之 326 位之胺基酸為 Met、EU 編號表示之 239 位之胺基酸為 Asp、EU 編號表示之 267 位之胺基酸為 Ala、EU 編號表示之 234 位之胺基酸為 Trp、EU 編號表示之 234 位之胺基酸為 Tyr、EU 編號表示之 237 位之胺基酸為 Ala、EU 編號表示之 237 位之胺基酸為 Asp、EU 編號表示之 237 位之胺基酸為 Glu、EU 編號表示之 237 位之胺基酸為 Leu、EU 編號表示之 237 位之胺基酸為 Met、EU 編號表示之 237 位之胺基酸為 Tyr、EU 編號表示之 330 位之胺基酸為 Lys、EU 編號表示之 330 位之胺基酸為 Arg、EU 編號表示之 233 位之胺基酸為 Asp、EU 編號表示之 268 位之胺基酸為 Asp、EU 編號表示之 268 位之胺基酸為 Glu、EU 編號表示之 326 位

之胺基酸為 Asp、EU 編號表示之 326 位之胺基酸為 Ser、EU 編號表示之 326 位之胺基酸為 Thr、EU 編號表示之 323 位之胺基酸為 Ile、EU 編號表示之 323 位之胺基酸為 Leu、EU 編號表示之 323 位之胺基酸為 Met、EU 編號表示之 296 位之胺基酸為 Asp、EU 編號表示之 326 位之胺基酸為 Ala、EU 編號表示之 326 位之胺基酸為 Asn、EU 編號表示之 330 位之胺基酸為 Met。

【0236】 糖鏈經修飾之 Fc 區

作為本發明提供之抗原結合分子所含之 Fc 區，可包含經修飾之 Fc 區，使得 Fc 區所結合之糖鏈之組成成為結合有岩藻醣缺損糖鏈之 Fc 區之比例提高、或加成有二分化 N-乙醯基葡萄糖胺之 Fc 區之比例提高。已知若從抗體 Fc 區所結合之 N-糖苷鍵複合型糖鏈還原末端之 N-乙醯基葡萄糖胺去除岩藻醣殘基，對 Fc γ RIIIa 之親和性會增強(非專利文獻 6)。如此之含有 Fc 區之 IgG1 抗體，已知後述 ADCC 活性會增強，所以含有該 Fc 區之抗原結合分子，作為本發明之醫藥組合物含有之抗原結合分子亦為有用。從抗體 Fc 區所結合之 N-糖苷鍵複合型糖鏈還原末端之 N-乙醯基葡萄糖胺去除岩藻醣殘基而得之抗體，例如：如以下之抗體；

經糖苷化修飾之抗體(國際公開 WO1999/054342 等)、

於糖鏈加成之岩藻醣已缺損之抗體(國際公開 WO2000/061739、WO2002/031140、WO2006/067913 等)、

【0237】 更具體而言，作為從抗體 Fc 區所結合之 N-糖苷鍵複合型糖鏈還原末端之 N-乙醯基葡萄糖胺去除岩藻醣殘基而

得之抗體之不同之一非限定態樣，為了製作於糖鏈加成之岩藻醣已缺損之抗體(國際公開 WO2000/061739、WO2002/031140、WO2006/067913 等)，而改變形成接受糖鏈修飾之多胜肽之糖鏈結構之活性，結果可製作於糖鏈加成岩藻醣之能力低之寄主細胞。藉由在該寄主細胞表現所望之抗體基因，可從該寄主細胞之培養液回收在此糖鏈中之岩藻醣已缺損之該抗體。作為形成多胜肽之糖鏈結構之活性，可列舉從岩藻糖基轉移酶(EC 2.4.1.152)、岩藻糖轉運蛋白(SLC35C1)、GMD(GDP-甘露糖 4,6-脫水酶)(EC 4.2.1.47)、Fx(GDP-酮-6-去氧甘露糖 3,5-差向異構酶，4-還原酶)(EC 1.1.1.271)、及 GFPP(GDP-β-L-岩藻糖焦磷酸化酶)(EC 2.7.7.30)構成之群組中選出之酵素或轉運蛋白之活性為非限定之理想例。該等酵素或轉運蛋白只要能發揮活性即可，不指定其結構。本說明書中，將能發揮該等活性之蛋白質稱為機能性蛋白質。作為改變該等活性之方法之一非限定態樣，可列舉該等活性之缺失。為了製作該等活性缺失之寄主細胞，可適當採用破壞該等機能性蛋白質之基因使不能作用之方法等公知方法 (WO2000/061739、WO2002/031140、WO2006/067913 等)。如此之活性缺失之寄主細胞，可以利用將 CHO 細胞、BHK 細胞、NS0 細胞、SP2/0 細胞、YO 骨髓瘤細胞、P3X63 小鼠骨髓瘤細胞、PER 細胞、PER.C6 細胞、HEK293 細胞、或融合瘤細胞等的內在性該等機能性蛋白質之基因破壞使無法作用之方法等以製作。

【0238】 具有含二分化 GlcNAc 結構之糖鏈的抗體 (WO2002/079255 等)為公知。一非限定態樣中，為了製作含二

分化 GlcNAc 之糖鏈的抗體，係製作表現編碼為具有 GnTIII(β -1,4-甘露糖基-糖蛋白，4- β -N-乙醯基葡萄糖胺基轉移酶)(EC 2.4.1.144)活性或 GalT(β -1,4-半乳糖基轉移酶)(EC 2.4.1.38)活性之機能性蛋白質的基因的寄主細胞。另一非限定之理想態樣中，係製作除了前述機能性蛋白質以外，尚共同表現編碼為具有人類 ManII(甘露糖苷酶 II)(3.2.1.114)活性之機能性蛋白質之基因、編碼為具有 GnTI(β -1,2-乙醯基葡萄糖胺基轉移酶 I)(EC 2.4.1.94)活性之機能性蛋白質之基因、編碼為具有 GnTII(β -1,2-乙醯基葡萄糖胺基轉移酶 II)(EC 2.4.1.143)活性之機能性蛋白質之基因、編碼為具有 ManI(甘露糖苷酶)(EC 3.2.1.113)活性之機能性蛋白質之基因、及 α -1,6-岩藻糖基轉移酶(EC 2.4.1.68)之寄主細胞 (WO2004/065540)。

【0239】 藉由對如前述糖鏈加成岩藻醣之能力低之寄主細胞、及具有形成含二分化 GlcNAc 結構之糖鏈之活性的寄主細胞轉形導入含有抗體基因之表現載體，可分別製作從抗體 Fc 區所結合之 N-糖苷鍵複合型糖鏈還原末端之 N-乙醯基葡萄糖胺去除岩藻醣殘基而得之抗體、及具有具二分化 GlcNAc 之糖鏈之抗體。該等抗體之製造方法，也可應用以提高本發明之 Fc 區所結合之糖鏈之組成係提高已結合岩藻醣缺損糖鏈之 Fc 區之比例之方式、或以提高已加成二分化 N-乙醯基葡萄糖胺之 Fc 區之比例之方式修飾之含改變 Fc 區之抗原結合分子之製造方法。利用如此之製造方法製作之本發明之抗原結合分子所含之 Fc 區結合之糖鏈之組成，可利用在前述「Fc γ 受體(Fc γ R)結合改變 Fc 區」記載之方法確認。

【0240】 多重專一性抗原結合分子或多重抗原結合位之抗原結合分子

特徵為其至少一個抗原結合分域係與抗原分子中之第 1 抗原決定部位結合且其至少一個其他之抗原結合分域係與抗原分子中之第 2 抗原決定部位結合的至少包含二個抗原結合分域之抗原結合分子，從其反應之專一性之觀點，稱為多重專一性抗原結合分子。當利用一分子之抗原結合分子所含之二種類之抗原結合分域使該抗原結合分子結合於二個不同之抗原決定部位的情形，該抗原結合分子稱為雙專一性抗原結合分子。又，當利用一分子之抗原結合分子所含之三種類之抗原結合分域使該抗原結合分子結合於三個不同之抗原決定部位的情形，該抗原結合分子稱為三重專一性抗原結合分子。

【0241】 與抗原分子中之第 1 抗原決定部位結合之抗原結合分域中之抗原結合位、及與第 1 抗原決定部位在結構方面相異之第 2 抗原決定部位結合之抗原結合分域中之抗原結合位，其結構係彼此互異。所以，特徵為其至少一個抗原結合分域係與抗原分子中之第 1 抗原決定部位結合且其至少一個其他之抗原結合分域係與抗原分子中之第 2 抗原決定部位結合的至少包含二個抗原結合分域之抗原結合分子，從其結構之專一性之觀點，稱為多重抗原結合位抗原結合分子。利用一分子之抗原結合分子含有之二種類之抗原結合分域使該抗原結合分子結合於二個相異之抗原決定部位的情形，該抗原結合分子稱為二重抗原結合位抗原結合分子。又，利用一分子之抗原結合分子含有之三種類之抗原結合分域使該抗原結合分子結合於三個相

異之抗原決定部位的情形，該抗原結合分子稱為三重抗原結合位抗原結合分子。

【0242】 包含一或多數抗原結合分域之多價之多重專一性或多重抗原結合位抗原結合分子及其製備方法，也記載於 Conrath 等人 (J.Biol.Chem. (2001) 276 (10) 7346-7350)、Muyldermans (Rev. Mol. Biotech. (2001) 74, 277-302) 及 Kontermann R.E. (2011) Bispecific Antibodies (Springer-Verlag) 等非專利文獻、以及國際公開 WO1996/034103 或 WO1999/023221 等專利文獻等。藉由在此等文獻記載之多重專一性或多重抗原結合位抗原結合分子及其製備方法，可製作本發明之抗原結合分子

【0243】 雙專一性抗體及其製作方法

作為製備如前述多重專一性或多重抗原結合位抗原結合分子及其製備方法之一態樣，可採用下列例示之雙專一性抗體及其製作方法。雙專一性抗體，係指包含對不同抗原決定部位專一性結合之二種可變區的抗體。IgG 型之雙專一性抗體，可藉由從將 2 種產生 IgG 抗體之融合瘤融合而產生的混成融合瘤 (hybrid hybridoma (quadroma) 分泌 (Milstein 等人 (Nature (1983) 305, 537-540)。

【0244】 當使用前述抗體之項目記載之重組方法製造雙專一性抗體的情形，可採用將編碼為含目的之二種可變區之重鏈的基因導入細胞並使此等共同表現的方法。但是如此的共同表現方法中，僅考慮重鏈之組合，會成為如下的組合成為 2 : 1 : 1 之分子數之比例存在的混合物，即 (i) 含有與第 1 抗原決定

部位結合之可變區的重鏈及含有與第 2 抗原決定部位結合之可變區的重鏈成為一對的重鏈的組合、(ii) 僅成為含有與第 1 抗原決定部位結合之可變區之重鏈成為一對之重鏈之組合、(iii) 僅含有與第 2 抗原決定部位結合之可變區的重鏈成為一對的重鏈的組合。從此等三種重鏈之組合之混合物難以將含目的之重鏈組合之抗原結合分子精製。

【0245】 當使用如此的重組方法製造雙專一性抗體時，可藉由對構成重鏈之 CH3 分域施以適當胺基酸取代之改變，而優先分泌含有異質組合之重鏈的雙專一性抗體。具體而言，將存在於其中一重鏈之 CH3 分域的胺基酸側鏈取代為較大側鏈(knob(「突起」之意))，並將存在於另一重鏈之 CH3 分域的胺基酸側鏈取代為較小側鏈(hole(「空隙」之意))，藉此使突起能配置於空隙內，而引起異種重鏈形成之促進及同種重鏈形成之妨害的方法(WO1996/027011、Ridgway 等人(Protein Engineering (1996) 9, 617-621)、Merchant 等人(Nat. Biotech. (1998) 16, 677-681))。

【0246】 又，也已知將利用多胜肽之組合、或多胜肽構成之異種多聚物之組合之控制方法用在重鏈之組合而製作雙專一性抗體之技術。亦即，可採用藉由改變形成重鏈內界面之胺基酸殘基以控制使具相同序列之重鏈之組合受抑制且形成序列相異之二條重鏈的方法於雙專一性抗體之製作(WO2006/106905)。如此的方法也可採用於製造雙專一性抗體。

【0247】 本發明之一非限定態樣中，作為抗原結合分子含有的 Fc 區，可適當使用上述雙專一性抗體作為起源之形成 Fc

區之二條多胜肽。更具體而言，宜使用二條多胜肽，其係形成 Fc 區之二條多胜肽，特徵為：其中一多胜肽之胺基酸序列當中 EU 編號表示之 349 之胺基酸為 Cys、366 之胺基酸為 Trp 且另一多胜肽之胺基酸序列當中 EU 編號表示之 356 之胺基酸為 Cys、366 之胺基酸為 Ser、368 之胺基酸為 Ala、407 之胺基酸為 Val。

【0248】此外，在本發明之一非限定態樣中，作為 Fc 區可採用二條多胜肽，其係形成 Fc 區之二條多胜肽，特徵為：其中一多胜肽之胺基酸序列當中 EU 編號表示之 409 之胺基酸為 Asp，另一多胜肽之胺基酸序列當中 EU 編號表示之 399 之胺基酸為 Lys。上述態樣中，也可理想地將 409 之胺基酸從 Asp 換為 Glu、399 之胺基酸從 Lys 換為 Arg。又，也可除了 399 之胺基酸之 Lys 以外，尚追加使 360 之胺基酸為 Asp 或 392 之胺基酸為 Asp。

【0249】本發明之其他非限定態樣中，作為 Fc 區可理想地採用二條多胜肽，其係形成 Fc 區之二條多胜肽，特徵為：其中一多胜肽之胺基酸序列當中 EU 編號表示之 370 之胺基酸為 Glu，另一多胜肽之胺基酸序列當中 EU 編號表示之 357 之胺基酸為 Lys。

【0250】本發明之又另一非限定態樣中，作為 Fc 區宜使用二條多胜肽，其係形成 Fc 區之二條多胜肽，特徵為：其中一多胜肽之胺基酸序列當中 EU 編號表示之 439 之胺基酸為 Glu，另一多胜肽之胺基酸序列當中 EU 編號表示之 356 之胺基酸為 Lys。

【0251】 本發明之另一非限定態樣中，作為 Fc 區，可適當採用此等組合之以下態樣中之任一者；

(i) 二條多胜肽，為形成 Fc 區之二條多胜肽，其特徵為：其中一多胜肽之胺基酸序列當中 EU 編號表示之 409 之胺基酸為 Asp、370 之胺基酸為 Glu，另一多胜肽之胺基酸序列當中 EU 編號表示之 399 之胺基酸為 Lys、357 之胺基酸為 Lys (本態樣中，EU 編號表示之 370 之胺基酸之 Glu 也可換為 Asp，EU 編號表示之 370 之胺基酸之 Glu 也可換為 392 之胺基酸之 Asp)、

(ii) 二條多胜肽，為形成 Fc 區之二條多胜肽，其特徵為：其中一多胜肽之胺基酸序列當中 EU 編號表示之 409 之胺基酸為 Asp、439 之胺基酸為 Glu，且另一多胜肽之胺基酸序列當中 EU 編號表示之 399 之胺基酸為 Lys、356 之胺基酸為 Lys (本態樣中，EU 編號表示之 439 之胺基酸之 Glu 也可換為 360 之胺基酸之 Asp、EU 編號表示之 392 之胺基酸之 Asp 或 439 之胺基酸之 Asp)、

(iii) 二條多胜肽，為形成 Fc 區之二條多胜肽，其特徵為：其中一多胜肽之胺基酸序列當中 EU 編號表示之 370 之胺基酸為 Glu、439 之胺基酸為 Glu，且另一多胜肽之胺基酸序列當中 EU 編號表示之 357 之胺基酸為 Lys、356 之胺基酸為 Lys、或

為形成 Fc 區之二條多胜肽，其特徵為：其中一多胜肽之胺基酸序列當中 EU 編號表示之 409 之胺基酸為 Asp、370 之胺基酸為 Glu、439 之胺基酸為 Glu，且另一多胜肽之胺基酸序列當中 EU 編號表示之 399 之胺基酸為 Lys、357 之胺基酸為 Lys、

356 之胺基酸為 Lys (本態樣中，EU 編號表示之 370 之胺基酸也可不取代為 Glu，而且 370 之胺基酸不取代為 Glu 的前提，可將 439 之胺基酸之 Glu 換為 Asp 或將 439 之胺基酸之 Glu 換為 392 之胺基酸之 Asp)。

【0252】再者，本發明之另一非限定態樣中，可理想採用二條多胜肽，其為形成 Fc 區之二條多胜肽，特徵為：其中多胜肽之胺基酸序列當中 EU 編號表示之 356 之胺基酸為 Lys，另一多胜肽之胺基酸序列當中 EU 編號表示之 435 之胺基酸為 Arg、439 之胺基酸為 Glu。

【0253】再者，本發明之其他非限定態樣可理想採用二條多胜肽，其為形成 Fc 區之二條多胜肽，特徵為：其中一多胜肽之胺基酸序列當中 EU 編號表示之 356 之胺基酸為 Lys、357 之胺基酸為 Lys，另一多胜肽之胺基酸序列當中 EU 編號表示之 370 之胺基酸為 Glu、435 之胺基酸為 Arg、439 之胺基酸為 Glu。

【0254】又，上述異種重鏈之組合技術以外，可以將作為將形成與第 1 抗原決定部位結合之可變區之輕鏈、及形成與第 2 抗原決定部位結合之可變區之輕鏈各和形成與第 1 抗原決定部位結合之可變區的重鏈、及形成與第 2 抗原決定部位結合之可變區的重鏈組合的已知異種輕鏈的組合技術即 CrossMab 技術 (Scafer 等人 (Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. (2011) 108, 11187-11192))用在製作本發明提供之多重專一性或多重抗原結合位抗原結合分子。又，作為利用引起相異 IgG4 之重鏈彼此之交換，使形成與第 1 抗原決定部位結合之可變區之重鏈、

及形成與第 2 抗原決定部位結合之可變區之重鏈組合之異種重鏈之組合技術為已知之 Fab-Arm Exchange(Labrijn 等人(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2013) 110, 5145-5150) 、 WO2008119353) , 也可在製作本發明提供之多重專一性或多重抗原結合位抗原結合分子使用。

【0255】 效應子細胞

本發明中,「效應子細胞」,可於包含 T 細胞(CD4⁺(幫助者淋巴球)T 細胞及/或 CD8⁺(細胞傷害性)T 細胞)、多核白血球(嗜中球、嗜酸球、嗜鹼球、肥胖細胞)、單球、巨噬體、組織球或天然殺手細胞(NK 細胞)、NK 樣 T 細胞、Kupffer 細胞、Langerhans 細胞、或淋巴素活化殺手細胞(LAK 細胞)等白血球、B 淋巴球、或樹狀細胞或巨噬體等抗原提示細胞之最廣義的含意使用,但理想之效應子細胞,例如 CD8⁺(細胞傷害性)T 細胞、NK 細胞、或巨噬體。若為於效應子細胞之細胞膜表現之膜型分子,則可作為本發明之抗原結合分子含有之至少 1 個抗原結合分域所結合之抗原使用,但理想的膜型分子,可列舉構成 TCR 之多胜肽、CD3、CD2、CD28、CD44、CD16、CD32、CD64、或 NKG2D 或 NK 細胞活化配體作為非限定例。

【0256】 細胞傷害性物質

為了使本發明之抗原結合分子與癌細胞結合並發揮細胞傷害活性,也可使抗原結合分子有細胞傷害性物質結合。作為細胞傷害性物質,可為以下例示之化學療法劑,也可為 Curr Opin Chem Biol (2010) 14, 529-37、國際公開 2009/140242 揭示之化合物,該等化合物利用適當的連結子等與抗原結合分子

結合。本發明之抗原結合分子係作為醫藥組合物使用時，在對於對象(受試者、患者等)投予該抗原結合分子前也可能使該等細胞傷害性物質結合，也可在投予之前後或同時投予。

【0257】 又，結合了後述化學療法劑、毒性胜肽或放射性化學物質等細胞傷害性物質之修飾抗原結合分子修飾物，也可理想地作為本發明之具細胞傷害活性之抗原結合分子使用。如此之修飾抗原結合分子(以下稱為抗原結合分子藥物接合物)，可藉由對於獲得之抗原結合分子進行化學性修飾以取得。又，作為抗原結合分子之修飾方法，可適當使用在抗體藥物接合物等領域已經確立的方法。又，已有毒性胜肽結合之修飾抗原結合分子，可藉由將編碼為該毒性胜肽之基因與編碼為本發明之抗原結合分子之基因於讀框內連結而得之融合基因於適當寄主細胞中表現後，從該細胞之培養液單離以取得。

【0258】 本發明之抗原結合分子所結合之化學療法劑可列舉如下：阿扎立平(azaribine)、阿那曲唑(anastrozole)、阿扎胞苷(azacytidine)、博萊黴素(bleomycin)、硼替佐米(bortezomib)、苔蘚抑素-1(bryostatin-1)、白消安(busulfan)、喜樹鹼(camptothecin)、10-羥基喜樹鹼(10-hydroxycamptothecin)、卡莫司汀(carmustine)、西樂葆(celebrex)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、順鉑(cisplatin)、伊立替康(irinotecan)、卡鉑(carboplatin)、克拉屈濱(cladribine)、環磷醯胺(cyclophosphamide)、阿糖胞苷(cytarabine)、達卡巴嗪(dacarbazine)、多西他賽(docetaxel)、放線菌素D(dactinomycin)、柔紅黴素葡萄糖醛酸(daunomycin)

glucuronide)、柔紅黴素(daunorubicin)、地塞米松(dexamethasone)、二乙基己烯雌酚(diethylstilbestrol)、多柔比星(doxorubicin)、多柔比星葡萄糖醛酸苷(doxorubicin glucuronide)、表柔比星(epirubicin)、乙炔基雌二醇(ethinyl estradiol)、

雌莫司汀(estramustine)、足葉乙甙(etoposide)、足葉乙甙葡萄糖苷酸(etoposide glucuronide)、脫氧氟尿苷(floxuridine)、氟達拉濱(fludarabine)、氟他胺(flutamide)、氟脲嘧啶(flourouracil)、氟甲甞酮(fluoxymersterone)、吉西他濱(gemcitabine)、羥基孕酮己酸(hydroxyprogesterone caproate)、羥基脲(hydroxyurea)、去甲氧柔紅黴素(idarubicin)、異環磷醯胺(ifosfamide)、亞葉酸鈣(leucovorin)、洛莫司汀(lomustine)、美登素(maytansinoid)、氮芥(mechlorethamine)、甲羥孕酮乙酸酯(medroxyprogesterone acetate)、醋酸甲地孕酮(megestrol acetate)、美法崙(melphalan)、巯基嘌呤(mercaptopurine)、甲氮蝶呤(methotrexate)、米托蒽醌(mitoxantrone)、光輝黴素(mithramycin)、絲裂黴素(mitomycin)、米托坦(mitotane)、苯基丁酸(phenylbutyrate)、潑尼松(prednisone)、甲基苄肼(procarbazine)、紫杉醇(paclitaxel)、噴司他丁(pentostatin)、司莫司汀(semustine)、鏈脲佐菌素(streptozocin)、他莫昔芬(tamoxifen)、紫杉烷類(taxanes)、紫杉醇(taxol)、丙酸甞酮(testosterone propionate)、沙利度胺(thalidomide)、硫鳥嘌呤(thioguanine)、塞替派(thiotepa)、替尼泊苷(teniposide)、托泊替康(topotecan)、尿嘧啶芥末(uracil mustard)、長春鹼

(vinblastine)、長春瑞濱(vinorelbine)、長春新鹼(vincristine)。

【0259】 本發明中，理想之化學療法劑為低分子之化學療法劑。低分子之化學療法劑，在本發明之抗原結合分子結合後，干涉抗原結合分子之功能之可能性仍低。本發明中，低分子之化學療法劑通常具有 100~2000，較佳為 200~1000 之分子量。在此例示之化學療法劑均為低分子之化學療法劑。該等本發明之化學療法劑，包括於活體內變換為活性之化學療法劑之前驅藥。前驅藥之活化可利用酵素性變換，也可為非酵素性的變換。

【0260】 又，本發明之抗原結合分子結合之細胞傷害物質，可列舉 *Pseudomonas* exotoxin A、Saporin-s6、Diphtheria toxin、Cnidarian toxin 等毒性胜肽(毒素)、Radioiodine、Photosensitizer。毒性胜肽，例如：以下為理想例。

- 白喉毒素 A 鏈(Diphtheria toxin A Chain)(Langone 等人 (Methods in Enzymology (1993) 93, 307-308)

- 假單胞菌外毒素(*Pseudomonas* Exotoxin)(Pai 等人 (Nat. Med. (1996) 2 (3), 350-353)

- 蓖麻蛋白鏈(Ricin A Chain) (Fulton 等人 (J. Biol. Chem. (1986) 261, 5314-5319)、Sivam 等人 (Cancer Res. (1987) 47, 3169-3173)、Cumber 等人 (J. Immunol. Methods (1990) 135, 15-24)、Wawrzynczak 等人 (Cancer Res. (1990) 50, 7519-7562)、Gheete 等人 (J. Immunol. Methods (1991) 142, 223-230))

- 無糖鏈蓖麻蛋白 A 鏈 (Deglycosylated Ricin A Chain)(Thorpe 等人 (Cancer Res. (1987) 47, 5924-5931)

-相思豆毒素A鏈(Abrin A Chain)(Wawrzynczak等人(Br. J. Cancer (1992) 66, 361-366)、;Wawrzynczak等人(Cancer Res (1990) 50, 7519-7562)、Sivam等人(Cancer Res. (1987) 47, 3169-3173)、Thorpe等人(Cancer Res. (1987) 47, 5924-5931)

-白樹種子儲藏蛋白(Gelonin)(Sivam等人(Cancer Res. (1987) 47, 3169-3173)、Cumber等人(J. Immunol. Methods (1990) 135, 15-24)、Wawrzynczak等人(Cancer Res. (1990) 50, 7519-7562)、Bolognesi等人(Clin. Exp. Immunol. (1992) 89, 341-346))

-商陸抗病毒蛋白(PAP-s或Pokeweed anti-viral protein from seeds)(Bolognesi等人(Clin. Exp. Immunol. (1992), 89, 341-346))

-Briodin (Briodin)(Bolognesi等人(Clin. Exp. Immunol. (1992) 89, 341-346))

-皂草毒蛋白(Saporin)(Bolognesi等人(Clin. Exp. Immunol. (1992), 89, 341-346))

-苦瓜毒蛋白(Momordin)(Cumber等人(J. Immunol. Methods (1990) 135, 15-24)、(Wawrzynczak等人(Cancer Res. (1990) 50, 7519-7562))(Bolognesi等人(Clin. Exp. Immunol. (1992) 89, 341-346))

-木鱉毒蛋白(Momorcochin)(Bolognesi等人(Clin. Exp. Immunol. (1992) 89, 341-346))

-香石竹毒蛋白32(Dianthin 32)(Bolognesi等人(Clin. Exp. Immunol. (1992) 89, 341-346))

- 香石竹毒蛋白 30(Dianthin 30)(Stirpe 等人 (FEBS Let. (1986) 195, 1-8)

- 葫蘆根毒蛋白 (Modeccin)(Stirpe 等人 (FEBS Let. (1986) 195, 1-8)

- 懈寄生素 (Viscumin)(Stirpe 等人 (FEBS Let. (1986) 195, 1-8)

- Volkesin (Volkesin)(Stirpe 等人 (FEBS Let. (1986) 195, 1-8)

- 商陸毒蛋白 (Dodecandrin)(Stirpe 等人 (FEBS Let. (1986) 195, 1-8)

- Tritin (Tritin)(Stirpe 等人 (FEBS Let. (1986) 195, 1-8)

- 絲瓜籽毒蛋白 (Luffin)(Stirpe 等人 (FEBS Let. (1986) 195, 1-8)

- 括樓種子毒蛋白 (Trichokirin)(Casellas 等人 (Eur. J. Biochem. (1988) 176, 581-588)、Bolognesi 等人 (Clin. Exp. Immunol. (1992) 89, 341-346)

【0261】 抗原結合分子

本發明中，抗原結合分子係以代表包含標的組織專一性的化合物存在時對抗原之結合活性高於該化合物不存在時對抗原之結合活性之抗原結合分域的最廣含意使用，具體而言，此等只要顯示對抗原之結合活性即可，包括各種分子型。例如：抗原結合分域與 Fc 區結合之分子，例如抗體。抗體包括單一單株抗體(包含致效劑及拮抗劑抗體)、人類抗體、人類化抗體、嵌合抗體等。又，當作抗體之片段使用時，抗原結合分域及抗

原結合片段(例如，Fab、F(ab')₂、scFv及Fv)為理想例。將既有之安定的 α/β 筒狀蛋白質構造等立體構造作為支架(scaffold)，僅將其一部分構造用於建構抗原結合分域而庫化之支架分子，也包括在本發明之抗原結合分子。

【0262】 本發明之抗原結合分子，可包含媒介對Fc γ 受體之結合及/或對FcRn之結合之Fc區之至少一部分。例如，於非限定之一態樣中，抗原結合分子可為抗體或Fc融合蛋白質。融合蛋白質，係指含有與在天然在具有其自然不連結之第二胺基酸序列之多胜肽連結之第一胺基酸序列之多胜肽的嵌合多胜肽。例如，融合蛋白質可包括編碼為Fc區之至少部分(例如賦予對Fc γ 受體之結合之Fc區之部分及/或賦予對FcRn之結合之Fc區之部分)之胺基酸序列之多胜肽。胺基酸序列也可存在於一起運到融合蛋白質之其他蛋白質，或此等通常存在於相同蛋白質但會重新再編入融合多胜肽中。融合蛋白質例如可依化學合成，或製作以所望關係編碼為胜肽區之聚核苷酸並以表現其之基因重組的方法製作。

【0263】 本發明之各分域可利用多胜肽鏈直接連結，並可經由連結子連結。連結子，可使用能依基因工程導入之任意胜肽連結子、或合成化合物連結子(例如Protein Engineering (1996) 9 (3), 299-305)揭示之連結子等，但本發明以胜肽連結子較理想。胜肽連結子之長度不特別限定，可視目的由該技術領域中具有通常知識者適當選擇，但理想長度為5個胺基酸以上(上限不特別限定，通常為30個胺基酸以下，較佳為20個胺基酸以下)，尤佳為15個胺基酸。

【0264】 例如：胜肽連結子之情形：

Ser

Gly · Ser

Gly · Gly · Ser

Ser · Gly · Gly

Gly · Gly · Gly · Ser(序列編號：19)

Ser · Gly · Gly · Gly(序列編號：20)

Gly · Gly · Gly · Gly · Ser(序列編號：21)

Ser · Gly · Gly · Gly · Gly(序列編號：22)

Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Ser(序列編號：23)

Ser · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly(序列編號：24)

Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Ser(序列編號：25)

Ser · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly(序列編號：26)

(Gly · Gly · Gly · Gly · Ser(序列編號：21))_n

(Ser · Gly · Gly · Gly · Gly(序列編號：22))_n

[_n 為 1 以上之整數]等為理想例。惟，胜肽連結子之長度或序列可視目的由該技術領域中具有通常知識者適當選擇。

【0265】 合成化學物連結子(化學交聯劑)，為胜肽交聯通常使用之交聯劑，例如 N-羥基琥珀醯亞胺(NHS)、辛二酸二琥珀醯亞胺酯(DSS)、辛二酸二(硫琥珀醯亞胺基)酯(BS 3)、二硫雙(琥珀醯亞胺基丙酸酯)(DSP)、二硫雙(硫琥珀醯亞胺基丙酸酯)(DTSSP)、乙二醇雙(琥珀醯亞胺基琥珀酸酯)(EGS)、乙二醇雙(硫琥珀醯亞胺基琥珀酸酯)(硫-EGS)、二琥珀醯亞胺基酒石酸鹽(DST)、二硫琥珀醯亞胺基酒石酸鹽(硫-DST)、雙[2-(琥

珀醯亞胺氧羰基氧)乙基]砒(BSOCOES)、雙[2-(硫琥珀醯亞胺氧羰基氧)乙基]砒(硫-BSOCOES)等，該等交聯劑在市面上可購得。

【0266】 連結各分域之連結子使用多個時，可均使用同種連結子，也可使用異種連結子。又，上述記載例示之連結子以外，也可適當使用有例如 His 標籤、HA 標籤、myc 標籤、FLAG 標籤等胜肽標籤之連結子。又，氫鍵、雙硫鍵、共價鍵、離子性交互作用或該等結合之組合而彼此結合之性質也可適當利用。例如利用抗體之 CH1 與 CL 間之親和性、利用與異 Fc 區組合時以前述雙專一性抗體為起源之 Fc 區。再者，在分域間形成之雙硫鍵也可適當地利用。

【0267】 為了將各分域以胜肽鍵連結，將編碼為該分域之聚核苷酸於同一讀框連結。聚核苷酸於同一讀框連結之方法，以限制片段之接合或融合 PCR、重疊 PCR 等方法為公知，本發明之抗原結合分子之製作也可適當單獨或組合使用該等方法。本發明中，用語「經連結」、「經融合」、「連結」或「融合」可相互交換的使用。該等用語，指利用包含上述化學結合手段或重組方法之所有方法將二個以上之多胜肽等的要素或成分形成為單一構造的方式進行連結。於同一讀框融合，當二以上之要素或成分為多胜肽時，係指以維持該多胜肽之正確讀取框之方式，為了形成連續的較長的讀取框之二個以上讀取框單位之連結。當二分子之 Fab 作為抗原結合分域使用時，該抗原結合分域與含 Fc 區之不變區未經連結子而以胜肽鍵於同一讀框連結而得之本發明之抗原結合分子抗體，可作為本發明之理想

抗原結合分子使用。

【0268】 低分子化抗體

本發明使用之抗體，不限於抗體之全長分子，也可為低分子化抗體或其修飾物。低分子化抗體，包括全長抗體(whole antibody、例如 whole IgG 等)有部分缺損之抗體片段。只要有對抗原之結合活性，則不特別限定。本發明中的低分子化抗體只要是全長抗體之一部分即不特別限定，宜包含重鏈可變區(VH) 或/及輕鏈可變區(VL)較佳。VH 或 VL 之胺基酸序列可包含取代、缺失、加成及/或插入。又，只要具有對抗原之結合活性，則 VH 或/及 VL 中部分缺損亦可。又，可變區可嵌合化或人型化。抗體片段之具體例，例如:Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 等。又，低分子化抗體之具體例，例如:Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv(single chain Fv)、雙體抗體(Diabody)、sc(Fv)₂(single chain (Fv)₂)等。該等抗體之多量體(例如:二聚體、三聚體、四聚體、聚合物)也包括在本發明之低分子抗體。

【0269】 抗體片段，可藉由將抗體以木瓜酶、胃蛋白酶處理而獲得，或，可藉由建構編碼為該等抗體片段之基因，將其導入到表現載體後，於適當寄主細胞使其表現而取得(例如參考(例如:Co 等(J. Immunol.(1994)152, 2968-2976)、Better 及 Horwitz(Methods in Enzymology(1989)178, 476-496)、Plueckthun 及 Skerra 等(Methods in Enzymology(1989)178, 476-496)、Lamoyi(Methods in Enzymology(1989)121, 652-663)、Rousseaux 等(Methods in Enzymology(1989)121, 663-669)及 Bird 等(TIBTECH(1991)9, 132-137))。

【0270】 雙體抗體(Diabody)係指利用基因融合而建構之二價(bivalent)之低分子化抗體(Holliger 等人(Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90, 6444-6448、EP404,097、WO1993/11161等)。雙體抗體，係由二條多胜肽鏈構成之二聚體。通常，多胜肽鏈分別在相同鏈中以 VL 及 VH 之無法彼此結合之程度之短之約 5 個殘基連結子結合。所以，在同一多胜肽鏈上編碼之 VL 與 VH，因為其之間的連結子短，無法形成單鏈可變區片段，而會形成二聚體。其結果，雙體抗體成為有二個抗原結合部位。

【0271】 scFv 可藉由將抗體之 H 鏈 V 區域與 L 鏈 V 區域連結以取得。具體而言，scFv 可藉由將 H 鏈 V 區域與 L 鏈 V 區域經由連結子，較佳為胜肽連結子予以連結而製作 (Huston 等人(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, (1988) 85, 5879-5883)。scFv 中，H 鏈 V 區域及 L 鏈 V 區域，也可為在本說明書作為抗體記載之任意抗體來源。將 V 區域連結之胜肽連結子，無特別的限制，例如可使用由 3 各至 25 個殘基左右構成的任意單鏈胜肽、或後述胜肽連結子等作為連結子。作為 V 區域之連結方法，可利用如上述 PCR 法。將編碼為前述抗體之 H 鏈或 H 鏈 V 區域之 DNA 序列、及編碼為 L 鏈或 L 鏈 V 區域之 DNA 序列當中編碼為全部或所望胺基酸序列之 DNA 部分當作模板，並使用具有對應於其兩端之序列之序列的一對引子的 PCR 法，可將編碼為 scFv 之 DNA 放大。其次藉由將編碼為胜肽連結子部分之 DNA、及設計為其兩端與各 H 鏈、L 鏈能連結之序列之一對引子組合並進行 PCR 反應，可取得具所望序列之

DNA。又，若先製作編碼為 scFv 之 DNA，可依常法取得含有此等之表現載體、及利用該表現載體轉形之重組細胞，又，培養其結果獲得之重組細胞，並使編碼為該 scFv 之 DNA 表現，可取得該 scFv。

【0272】 sc(Fv)₂，係將 2 條 VH 及 2 條 VL 以連結子等結合成單鏈之低分子化抗體(Hudson 等(J. Immunol. Methods (1999) 231, 177-189)。sc(Fv)₂ 可藉由例如將 scFv 以連結子連結以製作。

【0273】 又，宜為特徵係 2 條 VH 及 2 條 VL 以單鏈多胜肽之 N 末端側作為基點，依 VH、VL、VH、VL([VH]連結子[VL]連結子[VH]連結子[VL])之順序排列之抗體為較佳。2 條 VH 與 2 條 VL 之順序不特別限於上述配置，任意順序排列均可。例如可依以下方式配置。

-[VL]連結子[VH]連結子[VH]連結子[VL]

-[VH]連結子[VL]連結子[VL]連結子[VH]

-[VH]連結子[VH]連結子[VL]連結子[VL]

-[VL]連結子[VL]連結子[VH]連結子[VH]

-[VL]連結子[VH]連結子[VL]連結子[VH]

【0274】 作為將抗體可變區結合之連結子，可使用與前述抗原結合分子之項目記載連結子為同樣之連結子。例如：本發明中特好的 sc(Fv)₂ 之態樣，可列舉例如以下之 sc(Fv)₂。

-[VH]胜肽連結子(15 胺基酸)[VL]胜肽連結子(15 胺基酸)[VH]胜肽連結子(15 胺基酸)[VL]

【0275】 結合 4 個抗體可變區時，通常需要 3 個連結子，

但可全部使用相同連結子也可使用不同的連結子。本發明非限定之低分子化抗體態樣，可列舉係彼此互異之抗原結合位且其中一抗原結合位結合到在與癌細胞細胞膜結合之膜型分子存在之抗原決定部位，另一抗原結合位結合於在效應子細胞之細胞膜表現之膜型分子中存在之抗原決定部位的 **Diabody** 或 **sc(Fv)2**。上述 **Diabody** 或 **sc(Fv)2** 中，其中一抗原結合位對與癌細胞之細胞膜結合之膜型分子存在之抗原決定部位之結合活性可依存於癌組織專一性化合物，其中一抗原結合位對在效應子細胞之細胞膜結合之膜型分子存在之抗原決定部位的結合活性，可依存於癌組織專一性化合物，又，兩抗原結合位之結合活性可依存於癌組織專一性化合物。

【0276】 本發明一非限定低分子化抗體之態樣，可列舉係彼此互異之抗原結合位，且其中一抗原結合位係與癌細胞之細胞膜結合之膜型分子存在之抗原決定部位結合，另一抗原結合位係與細胞傷害性物質存在之抗原決定部位結合之 **Diabody** 或 **sc(Fv)2**。上述 **Diabody** 或 **sc(Fv)2** 中，其中一抗原結合位對癌細胞之細胞膜結合之膜型分子存在之抗原決定部位之結合活性，可依存於癌組織專一性化合物，且其中一抗原結合位對細胞傷害性物質存在之抗原決定部位之結合活性可依存於癌組織專一性化合物，又，兩抗原結合位之結合活性可依存於癌組織專一性化合物。

【0277】 為了獲得如此之低分子化抗體，可將抗體以酵素例如：木瓜酶、胃蛋白等處理，使生成抗體片段、或建構編碼為該等抗體片段或低分子化抗體之 **DNA**，將其導入表現載體

後，使適當寄主細胞表現（例如參照：Co, M. S. et al., *J. Immunol.* (1994) 152, 2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., *Methods Enzymol.* (1989) 178, 476-496 ; Pluckthun, A. and Skerra, A., *Methods Enzymol.* (1989) 178, 497-515 ; Lamoyi, E., *Methods Enzymol.* (1986) 121, 652-663 ; Rousseaux, J. et al., *Methods Enzymol.* (1986) 121, 663-669 ; Bird, R. E. and Walker, B. W., *Trends Biotechnol.* (1991) 9, 132-137)。

【0278】 FcRn

與屬於免疫球蛋白超級家族之 $Fc\gamma$ 受體不同，人類 FcRn 在構造上與主要組織不適合性複合體(MHC)第 I 類之多胜肽在構造相類似，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($\beta 2$ 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 個細胞外分域($\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$)構成，且短的細胞質分域係將蛋白質留在細胞表面。 $\alpha 1$ 及 $\alpha 2$ 域會與抗體之 Fc 區中之 FcRn 結合分域交互作用 (Raghavan 等人 (*Immunity* (1994) 1, 303-315)。

【0279】 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。其在人類成人類血管內皮、肌肉血管系、及肝臟洞狀毛細血管也有表現。FcRn 會與 IgG 結合，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 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。

【0280】 以含序列編號：28 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：29 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 Fc 區對與如此的與 $\beta 2$ -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 Fc 區結合之形態者，例如人類 FcRn 與人類 $\beta 2$ -微球蛋白之複合體。

【0281】 Fc 區對 FcRn 尤其是人類 FcRn 之結合活性

本發明提供之 Fc 區對 FcRn 尤其對人類 FcRn 之結合活性，如前述結合活性之項目中所述，可依照該技術領域之人類士所公知之方法測定，針對 pH 以外之條件，可由該技術領域中具有通常知識者適當決定。抗原結合分子之抗原結合活性與人類 FcRn 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中具有通常知識者公眾所知之方法測定，例如可使用 Biacore (GE healthcare)、Scatchard 作圖法、流式細胞計數器等。

【0282】 測定本發明 Fc 區對 FcRn 之結合活性時之 pH 以外之條件，可由該技術領域中具有通常知識者適當選擇，不特別

限定。例如可如 WO2009/125825 記載，於 MES 緩衝液、37°C 之條件測定。又，本發明之 Fc 區對 FcRn 之結合活性之測定，可依該技術領域中具有通常知識者公知之方法進行，例如可使用 Biacore(GE Healthcare)等測定。本發明之 Fc 區與人類 FcRn 之結合活性之測定，可藉由分別以人類 FcRn 或 Fc 區或含 Fc 區之本發明之抗原結合分子作為分析物流過固定有 Fc 區或含 Fc 區之本發明之抗原結合分子或人類 FcRn 的晶片而評價。

【0283】 作為本發明之抗原結合分子含有之 Fc 區與 FcRn 有結合活性之條件的 pH 中性域，通常指 pH6.7~pH10.0。pH 中性域較佳為 pH7.0~pH8.0 之任意 pH 值所示之範圍，較佳為從 pH7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、及 8.0 選擇，尤佳為接近活體內之血漿中(血中)之 pH 之 pH7.4。由於在 pH7.4 時人類 FcRn 結合域與人類 FcRn 之結合親和性低，當難評價其結合親和性時，可將 pH7.4 替換為使用 pH7.0。作為本發明之抗原結合分子含有之 Fc 區與 FcRn 有結合活性之條件的 pH 中性域，通常指 pH4.0~pH6.5。較佳指 pH5.5~pH6.5，尤佳為接近活體內之早期內體內之 pH 的 pH5.8~pH6.0。就測定條件使用之溫度而言，人類 FcRn 結合域與人類 FcRn 之結合親和性可於 10°C~50°C 之任意溫度評價。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。更佳為與從 20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、及 35°C 中之任一者之 20°C 至 35°C 的任意溫度，也同樣用於決定人類 FcRn 結合域與人類 FcRn 之結合親和性而可使用。25°C 的溫度為本發明之態樣之

一非限定例。

【0284】 依 The Journal of Immunology (2009) 182: 7663-7671，天然型人類 IgG1 對人類 FcRn 之結合活性，在 pH 酸性域 (pH6.0) KD 為 $1.7\mu\text{M}$ ，但於 pH 中性域幾乎未能檢測到活性。是以良好態樣中，可篩選包括在 pH 酸性域之條件下對人類 FcRn 之結合活性為 KD $20\mu\text{M}$ 或更強之抗原結合分子。更佳之態樣中，可篩選包括在 pH 酸性域之條件下對人類 FcRn 結合活性為 KD $2.0\mu\text{M}$ 或更強之 Fc 區的抗原結合分子。又更佳之態樣中，可篩選包括在 pH 酸性域之條件下對人類 FcRn 結合活性為 KD $0.5\mu\text{M}$ 或更強之 Fc 區之抗原結合分子。上述 KD 值，可依 The Journal of Immunology (2009) 182: 7663-7671 記載之方法(將抗原結合分子固定在晶片，並流過作為分析物之人類 FcRn)決定。

【0285】 於 pH 酸性域之條件下對 FcRn 有結合活性之 Fc 區

本發明提供之抗原結合分子含有之 Fc 區，可理想地使用於 pH 酸性域條件下對 FcRn 有結合活性之 Fc 區。一般而言，IgG 抗體已知藉由與 FcRn 結合，具有長血漿中滯留性。IgG 與 FcRn 之結合，僅於酸性條件下 (pH6.0) 被觀測到，於中性條件下 (pH7.4) 幾乎未認為有結合。IgG 抗體係非專一性地攝入細胞，但於內體內之酸性條件下藉由與內體內之 FcRn 結合，回到細胞表面上，於血漿中之中性條件下，從 FcRn 解離。若對 IgG 之 Fc 區導入變異，並使於 pH 酸性域條件下對 FcRn 之結合喪失，不能從內體內再循環回血漿中，所以抗體之血漿中滯

留性會顯著受損。改善 IgG 抗體之血漿中滯留性之方法，據報告有使在 pH 酸性域之條件下對 FcRn 之結合提高之方法。對 IgG 抗體之 Fc 區導入胺基酸取代並使在 pH 酸性域之條件下對 FcRn 之結合提高，據認為從內體內往血漿中之再循環效率上升，其結果，該 IgG 抗體之血漿中滯留性改善。

【0286】 本發明不拘於特定理論，例如：本發明提供之抗原結合分子係與在癌組織含有之癌細胞表現之膜型抗原結合時等，也可認為如以下所示，能持續抑制癌細胞增殖。癌組織專一性的化合物高濃度存在下，表現本發明之抗原結合分子結合之膜型分子的癌細胞，當利用由該抗原結合分子中介之細胞傷害活性受傷害後，據認為係此抗原結合在該抗原結合分子所含之抗原結合分域之狀態。從非專一性的被攝入細胞之該抗原結合分子，於癌組織專一性的化合物低濃度存在下將抗原游離而得之該抗原結合分子，在內體內之酸性條件下會與內體內之 FcRn 結合而回到細胞表面上，於血漿中之中性條件下從 FcRn 解離。以此方式，據認為已再循環之本發明之抗原結合分子，在癌組織專一性的化合物高濃度存在下能與此抗原癌細胞中表現之膜型分子再度結合。

【0287】 本發明不拘於特定理論，例如：本發明提供之抗原結合分子結合之可溶型抗原係將標的組織含有之標的細胞之增殖或發炎細胞之活化向正調節之配體之情形等，據認為如以下可抑制標的細胞之增殖或發炎細胞之活化。該等標的組織專一性的化合物高濃度存在下與此抗原可溶型分子結合之本發明之抗原結合分子被非專一性的攝入細胞後，於標的組織專一

性的化合物低濃度存在下已將抗原游離之該抗原結合分子，會於內體內之酸性條件下與內體內之 FcRn 結合，以回到細胞表面上，於血漿中之中性條件下從 FcRn 解離。以此方式，已再循環之本發明之抗原結合分子，能於標的組織專一性的化合物高濃度存在下，與此抗原可溶型分子再度結合。另一方面，標的組織專一性的化合物低濃度存在下從抗原結合分子游離之抗原，會於溶體中被分解。其結果，可溶型抗原濃度會隨經過上述再循環階段而減少，因此據認為能夠抑制癌細胞之增殖或發炎細胞之活化。

【0288】 本發明中，宜為於 pH 酸性域條件下對 FcRn 有結合活性之 Fc 區為較佳。該分域若於預先在 pH 酸性域條件下對 FcRn 有結合活性之 Fc 區，則可直接使用。該分域於 pH 酸性域條件下對 FcRn 無結合活性或弱結合活性時，可藉由改變抗原結合分子中之胺基酸以取得所望之對 FcRn 有結合活性之 Fc 區，但是，藉由改變 Fc 區中之胺基酸，也可理想地取得於 pH 酸性域條件下具有所望之對 FcRn 之結合活性、或增強之 Fc 區。帶來如此之所望結合活性之 Fc 區之胺基酸改變，可藉由比較胺基酸改變前與改變後於 pH 酸性域條件下對 FcRn 之結合活性以找出。可使用與用以改變對前述 Fc γ 受體之結合活性可使用之方法為同樣之公眾所知之方法，由該技術領域中具有通常知識者實施適當胺基酸之改變。

【0289】 本發明之抗原結合分子含有之於 pH 酸性域條件下對 FcRn 有結合活性之 Fc 區，可依各種方法取得，具體而言，可藉由改變作為初始 Fc 區之人類 IgG 型免疫球蛋白之胺基

酸，以取得於 pH 酸性域條件下對 FcRn 有結合活性、或增強之 FcRn 結合域。用以改變之理想 IgG 型免疫球蛋白之 Fc 區，例如人類 IgG(IgG1、IgG2、IgG3、或 IgG4、及此等之改變體)之 Fc 區。改變為其他胺基酸之改變，只要使於 pH 酸性域條件下對 FcRn 有結合活性、或於酸性域條件下對人類 FcRn 之結合活性提高即可，可改變任意位置之胺基酸。抗原結合分子係包括作為 Fc 區之人類 IgG1 之 Fc 區時，於 pH 酸性域之條件下對 FcRn 之結合，宜包括帶來人類 IgG1 之初始 Fc 區之結合活性更增強之效果的改變較佳。可為如此改變之胺基酸，例如：國際公開 WO1997/034631 所記載，EU 編號表示之 252 位、254 位、256 位、309 位、311 位、315 位、433 位、及/或 434 位以及與該等胺基酸組合之 253 位、310 位、435 位、及/或 426 位之胺基酸。如國際公開 WO2000/042072 記載，EU 編號表示之 238 位、252 位、253 位、254 位、255 位、256 位、265 位、272 位、286 位、288 位、303 位、305 位、307 位、309 位、311 位、312 位、317 位、340 位、356 位、360 位、362 位、376 位、378 位、380 位、382 位、386 位、388 位、400 位、413 位、415 位、424 位、433 位、434 位、435 位、436 位、439 位及/或 447 位之胺基酸為理想例。同樣，可為如此改變之胺基酸，例如國際公開 WO2002/060919 所記載，EU 編號表示之 251 位、252 位、254 位、255 位、256 位、308 位、309 位、311 位、312 位、385 位、386 位、387 位、389 位、428 位、433 位、434 位及/或 436 位之胺基酸亦理想。再者，可為如此改變之胺基酸，如國際公開 WO2004/092219 所記載，可列舉 EU 編

號表示之 250 位、314 位及 428 位之胺基酸。此外，可為如此改變之胺基酸，例如國際公開 WO2006/020114 所記載，238 位、244 位、245 位、249 位、252 位、256 位、257 位、258 位、260 位、262 位、270 位、272 位、279 位、283 位、285 位、286 位、288 位、293 位、307 位、311 位、312 位、316 位、317 位、318 位、332 位、339 位、341 位、343 位、375 位、376 位、377 位、378 位、380 位、382 位、423 位、427 位、430 位、431 位、434 位、436 位、438 位、440 位、及/或 442 位之胺基酸亦理想。又，可為如此改變之胺基酸，例如國際公開 WO2010/045193 所記載，EU 編號表示之 251 位、252 位、307 位、308 位、378 位、428 位、430 位、434 位及/或 436 位之胺基酸亦為理想。藉由該等胺基酸之改變，IgG 型免疫球蛋白之 Fc 區於 pH 酸性域條件下對 FcRn 之結合增強。

【0290】 Fc 區係包括人類 IgG1 之 Fc 區時，作為帶來於 pH 酸性域條件下對 FcRn 之結合，比起人類 IgG1 之初始 Fc 區之結合活性更增強之效果之改變之一非限定態樣中，可列舉選自於 EU 編號表示之

251 位之胺基酸為 Arg 或 Leu 中之任一者、

252 位之胺基酸為 Phe、Ser、Thr、或 Tyr 中之任一者、

254 位之胺基酸為 Ser 或 Thr 中之任一者、

255 位之胺基酸為 Arg、Gly、Ile、或 Leu 中之任一者、

256 位之胺基酸為 Ala、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、或 Thr 中之任一者、

308 位之胺基酸為 Ile 或 Thr 中之任一者、

309 位之胺基酸為 Pro、

311 位之胺基酸為 Glu、Leu、或 Ser 中之任一者、

312 位之胺基酸為 Ala 或 Asp 中之任一者、

314 位之胺基酸為 Ala 或 Leu 中之任一者、

385 位之胺基酸為 Ala、Arg、Asp、Gly、His、Lys、Ser、
或 Thr 中之任一者、

386 位之胺基酸為 Arg、Asp、Ile、Lys、Met、Pro、Ser、
或 Thr 中之任一者、

387 位之胺基酸為 Ala、Arg、His、Pro、Ser、或 Thr 中之
任一者、

389 位之胺基酸為 Asn、Pro、或 Ser 中之任一者、

428 位之胺基酸為 Leu、Met、Phe、Ser、或 Thr 中之任一
者

433 位之胺基酸為 Arg、Gln、His、Ile、Lys、Pro、或 Ser
中之任一者、

434 位之胺基酸為 His、Phe、或 Tyr 中之任一者、或

436 位之胺基酸為 Arg、Asn、His、Lys、Met、或 Thr 中
之任一者、

之群組中之至少一個以上胺基酸之改變。又，改變之胺基
酸之數不特別限定，可僅改變一處胺基酸，也可改變二處以上
之胺基酸。

【0291】 Fc 區係包括人類 IgG1 之 Fc 區時，作為帶來於 pH
酸性域條件下對 FcRn 之結合比起人類 IgG1 之初始 Fc 區之結
合活性更增強之效果之改變之一非限定態樣，可列舉包括 EU

編號表示之 308 位之胺基酸為 Ile、309 位之胺基酸為 Pro、及/或 311 位之胺基酸為 Glu 之改變。又，該改變之另一非限定態樣，可包括 308 位之胺基酸為 Thr、309 位之胺基酸為 Pro、311 位之胺基酸為 Leu、312 位之胺基酸為 Ala、及/或 314 位之胺基酸為 Ala 之改變。又，該改變之又另一非限定態樣，可包括 308 位之胺基酸為 Ile 或 Thr、309 位之胺基酸為 Pro、311 位之胺基酸為 Glu、Leu、或 Ser、312 位之胺基酸為 Ala、及/或 314 位之胺基酸為 Ala 或 Leu 之改變。該改變之不同非限定態樣，可包括 308 位之胺基酸為 Thr、309 位之胺基酸為 Pro、311 位之胺基酸為 Ser、312 位之胺基酸為 Asp、及/或 314 位之胺基酸為 Leu 之改變。

【0292】 Fc 區包括人類 IgG1 之 Fc 區時，作為帶來於 pH 酸性域條件下對 FcRn 之結合比起人類 IgG1 之初始 Fc 區之結合活性更增強之效果之改變之一非限定態樣，可列舉包括 EU 編號表示之、251 位之胺基酸為 Leu、252 位之胺基酸為 Tyr、254 位之胺基酸為 Ser、或 Thr、255 位之胺基酸為 Arg、及/或 256 位之胺基酸為 Glu 之改變。

【0293】 Fc 區包括人類 IgG1 之 Fc 區時，作為帶來於 pH 酸性域條件下對 FcRn 之結合比起人類 IgG1 之初始 Fc 區之結合活性更增強之效果之改變之一非限定態樣，可列舉包括 EU 編號表示之 428 位之胺基酸為 Leu、Met、Phe、Ser、或 Thr 中之任一者、433 位之胺基酸為 Arg、Gln、His、Ile、Lys、Pro、或 Ser 中之任一者、434 位之胺基酸為 His、Phe、或 Tyr 中之任一者、及/或 436 位之胺基酸為 Arg、Asn、His、Lys、Met、

或 Thr 中之任一者之改變。又，該改變之另一非限定態樣，可包括 428 位之胺基酸為 His 或 Met、及/或 434 位之胺基酸為 His 或 Met 之改變。

【0294】 Fc 區包括人類 IgG1 之 Fc 區時，作為帶來於 pH 酸性域條件下對 FcRn 之結合比起人類 IgG1 之初始 Fc 區之結合活性更增強之效果之改變之一非限定態樣，可列舉包括 EU 編號表示之 385 位之胺基酸為 Arg、386 位之胺基酸為 Thr、387 位之胺基酸為 Arg、及/或 389 位之胺基酸為 Pro 之改變。又，該改變之另一非限定態樣，可為包括 385 位之胺基酸為 Asp、386 位之胺基酸為 Pro 及/或 389 位之胺基酸為 Ser 之改變。

【0295】 Fc 區包括人類 IgG1 之 Fc 區時，作為帶來於 pH 酸性域條件下對 FcRn 之結合比起人類 IgG1 之初始 Fc 區之結合活性更增強之效果之改變之一非限定態樣，可列舉從 EU 編號表示之

250 位之胺基酸為 Gln 或 Glu 中之任一者、或

428 位之胺基酸為 Leu 或 Phe 中之任一者、

之群組選擇之至少一個以上之胺基酸之改變。又，改變之胺基酸數不特別限定，可僅改變一處胺基酸，也可改變二處胺基酸。

【0296】 Fc 區包括人類 IgG1 之 Fc 區時，作為帶來於 pH 酸性域條件下對 FcRn 之結合比起人類 IgG1 之初始 Fc 區之結合活性更增強之效果之改變之一非限定態樣，可列舉包括 EU 編號表示之 250 位之胺基酸為 Gln、及/或 428 位之胺基酸為 Leu 或 Phe 中之任一者之改變。又，該改變之另一非限定態樣，

可包括 250 位之胺基酸為 Glu、及/或 428 位之胺基酸為 Leu 或 Phe 中之任一者之改變。

【0297】 Fc 區包括人類 IgG1 之 Fc 區時，作為帶來於 pH 酸性域條件下對 FcRn 之結合比起人類 IgG1 之初始 Fc 區之結合活性更增強之效果之改變之一非限定態樣，可列舉從 EU 編號表示之

251 位之胺基酸為 Asp 或 Glu 中之任一者、

252 位之胺基酸為 Tyr、

307 位之胺基酸為 Gln、

308 位之胺基酸為 Pro、

378 位之胺基酸為 Val、

380 位之胺基酸為 Ala、

428 位之胺基酸為 Leu、

430 位之胺基酸為 Ala、或 Lys 中之任一者、

434 位之胺基酸為 Ala、His、Ser、或 Tyr 中之任一者、或

436 位之胺基酸為 Ile、

之群組選擇之至少二個以上之胺基酸之改變。又，改變之胺基酸數不特別限定，可僅改變二處胺基酸，也可改變三處以上之胺基酸。

【0298】 Fc 區包括人類 IgG1 之 Fc 區時，作為帶來於 pH 酸性域條件下對 FcRn 之結合比起人類 IgG1 之初始 Fc 區之結合活性更增強之效果之改變之一非限定態樣，可包括 EU 編號表示之、307 位之胺基酸為 Gln、及 434 位之胺基酸為 Ala 或 Ser 中之任一者之改變。又，該改變之另一非限定態樣，可為

包括 308 位之胺基酸為 Pro、及 434 位之胺基酸為 Ala 之改變。又，該改變之又另一非限定態樣，可為包括 252 位之胺基酸為 Tyr、及 434 位之胺基酸為 Ala 之改變。該改變之一不同之非限定態樣，可為包括 378 位之胺基酸為 Val、及 434 位之胺基酸為 Ala 之改變。該改變之其他不同之非限定態樣，可為包括 428 位之胺基酸為 Leu、及 434 位之胺基酸為 Ala 之改變。又，該改變之又另一不同之非限定態樣，可為包括 434 位之胺基酸為 Ala、及 436 位之胺基酸為 Ile 之改變。再者，該改變之又另一非限定態樣，可包括 308 位之胺基酸為 Pro、及 434 位之胺基酸為 Tyr 之改變。再者，該改變之又另一非限定態樣，可為包括 307 位之胺基酸為 Gln、及 436 位之胺基酸為 Ile 之改變。

【0299】 Fc 區包括人類 IgG1 之 Fc 區時，作為帶來於 pH 酸性域條件下對 FcRn 之結合比起人類 IgG1 之初始 Fc 區之結合活性更增強之效果之改變之一非限定態樣，可包括 EU 編號表示之 307 位之胺基酸為 Gln、380 位之胺基酸為 Ala、及 434 位之胺基酸為 Ser 中之任一者之改變。又，該改變之另一非限定態樣，可為包括 307 位之胺基酸為 Gln、380 位之胺基酸為 Ala、及 434 位之胺基酸為 Ala 之改變。又，該改變之又另一非限定態樣，可為包括 252 位之胺基酸為 Tyr、308 位之胺基酸為 Pro、及 434 位之胺基酸為 Tyr 之改變。該改變之不同非限定態樣，可為包括 251 位之胺基酸為 Asp、307 位之胺基酸為 Gln、及 434 位之胺基酸為 His 之改變。

【0300】 Fc 區包括人類 IgG1 之 Fc 區時，作為帶來於 pH

酸性域條件下對 FcRn 之結合比起人類 IgG1 之初始 Fc 區之結合活性更增強之效果之改變之一非限定態樣，可為選自 EU 編號表示之、

238 位之胺基酸為 Leu、

244 位之胺基酸為 Leu、

245 位之胺基酸為 Arg、

249 位之胺基酸為 Pro、

252 位之胺基酸為 Tyr、

256 位之胺基酸為 Pro、

257 位之胺基酸為 Ala、Ile、Met、Asn、Ser、或 Val 中之任一者、

258 位之胺基酸為 Asp、

260 位之胺基酸為 Ser、

262 位之胺基酸為 Leu、

270 位之胺基酸為 Lys、

272 位之胺基酸為 Leu、或 Arg 中之任一者、

279 位之胺基酸為 Ala、Asp、Gly、His、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Trp、或 Tyr 中之任一者、

283 位之胺基酸為 Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Trp、或 Tyr 中之任一者、

285 位之胺基酸為 Asn、

286 位之胺基酸為 Phe、

288 位之胺基酸為 Asn、或 Pro 中之任一者、

293 位之胺基酸為 Val、

307 位之胺基酸為 Ala、Glu、或 Met 中之任一者、

311 位之胺基酸為 Ala、Ile、Lys、Leu、Met、Val、或 Trp 中之任一者、

312 位之胺基酸為 Pro、

316 位之胺基酸為 Lys、

317 位之胺基酸為 Pro、

318 位之胺基酸為 Asn、或 Thr 中之任一者、

332 位之胺基酸為 Phe、His、Lys、Leu、Met、Arg、Ser、或 Trp 中之任一者、

339 位之胺基酸為 Asn、Thr、或 Trp 中之任一者、

341 位之胺基酸為 Pro、

343 位之胺基酸為 Glu、His、Lys、Gln、Arg、Thr、或 Tyr 中之任一者、

375 位之胺基酸為 Arg、

376 位之胺基酸為 Gly、Ile、Met、Pro、Thr、或 Val 中之任一者、

377 位之胺基酸為 Lys、

378 位之胺基酸為 Asp、或 Asn 中之任一者、

380 位之胺基酸為 Asn、Ser、或 Thr 中之任一者、

382 位之胺基酸為 Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、或 Tyr 中之任一者、

423 位之胺基酸為 Asn、

427 位之胺基酸為 Asn、

430 位之胺基酸為 Ala、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、或 Tyr 中之任一者、

431 位之胺基酸為 His、或 Asn 中之任一者、

434 位之胺基酸為 Phe、Gly、His、Trp、或 Tyr 中之任一者、

436 位之胺基酸為 Ile、Leu、或 Thr 中之任一者、

438 位之胺基酸為 Lys、Leu、Thr、或 Trp 中之任一者、

440 位之胺基酸為 Lys、或、

442 位之胺基酸為 Lys、

之群組中之至少二個以上之胺基酸之改變。又，改變之胺基酸數不特別限定，可以僅改變二處胺基酸，也可改變三處以上之胺基酸。

【0301】 作為 Fc 區包括人類 IgG1 之 Fc 區時，帶來於 pH 酸性域條件下對 FcRn 之結合比起人類 IgG1 之初始 Fc 區之結合活性更增強之效果之改變之一非限定態樣，可為包括 EU 編號表示之 257 位之胺基酸為 Ile、及 311 位之胺基酸為 Ile 之改變。又，該改變之另一非限定態樣，可為包括 257 位之胺基酸為 Ile、及 434 位之胺基酸為 His 之改變。又，該改變之又另一非限定態樣，可為包括 376 位之胺基酸為 Val、及 434 位之胺基酸為 His 之改變。

【0302】 pH 中性域條件下對 FcRn 有結合活性之 Fc 區

又，另一非限定態樣中，可篩選包含具有將上述記載之於 pH 酸性域對人類 FcRn 之結合活性特徵替換為於 pH 中性域對人類 FcRn 之結合活性之特徵的 Fc 區的抗原結合分子。更理想

態樣中，可篩選包括於 pH 中性域之人類 FcRn 結合活性為 KD 40 μ M 或更強之 Fc 區之抗原結合分子。更理想態樣中，可篩選包括於 pH 中性域對人類 FcRn 之結合活性為 KD 15 μ M 或更強之 Fc 區之抗原結合分子。

【0303】 又，另一非限定態樣中，可篩選包含具有將上述記載之於 pH 酸性域對人類 FcRn 之結合活性特徵以外更具有於 pH 中性域對人類 FcRn 之結合活性之特徵的 Fc 區的抗原結合分子。更理想態樣中，可篩選包括於 pH 中性域之人類 FcRn 結合活性為 KD 40 μ M 或更強之 Fc 區之抗原結合分子。更理想態樣中，可篩選包括於 pH 中性域對人類 FcRn 之結合活性為 KD 15 μ M 或更強之 Fc 區之抗原結合分子。

【0304】 本發明中，宜為於 pH 酸性域及/或 pH 中性域對人類 FcRn 有結合活性之 Fc 區為較佳。該 Fc 區，若為已於 pH 酸性域及/或 pH 中性域對人類 FcRn 有結合活性之 Fc 區，則可直接使用。該 Fc 區於 pH 酸性域及/或 pH 中性域無人類 FcRn 結合活性或弱時，可藉由改變抗原結合分子含有之 Fc 區中之胺基酸，以取得所望之包括對人類 FcRn 有結合活性之 Fc 區之抗原結合分子，但也可理想地藉由改變人類 Fc 區中之胺基酸，以取得於 pH 酸性域及/或 pH 中性域具有所望之對人類 FcRn 有結合活性之 Fc 區。又，藉由改變已於 pH 酸性域及/或 pH 中性域具有人類 FcRn 結合活性之 Fc 區中之胺基酸，也可取得包括所望之對人類 FcRn 有結合活性之 Fc 區的抗原結合分子。帶來如此之所望結合活性之人類 Fc 區之胺基酸改變，可藉由比較胺基酸改變前與改變後於 pH 酸性域及/或 pH 中性域之對人

類 FcRn 之結合活性以找出。可由該技術領域中具有通常知識者使用公眾所知之方法實施適當胺基酸之改變。

【0305】 本發明中，Fc 區之「胺基酸之改變」或「胺基酸改變」，包括改變為與初始 Fc 區之胺基酸序列相異之胺基酸序列。初始 Fc 區之修飾改變體只要於 pH 酸性域能與人類 FcRn 結合，(初始 Fc 區於 pH 中性域條件下對人類 FcRn 之結合活性不一定必要)，任一 Fc 區均可作為初始分域。初始 Fc 區之例，可列舉 IgG 抗體之 Fc 區、亦即天然型之 Fc 區為理想例。又，已施加改變之 Fc 區作為初始 Fc 區並進一步改變而得之改變 Fc 區，也可作為本發明之改變 Fc 區。初始 Fc 區，可指多胜肽本身、含初始 Fc 區之組成物、或編碼為初始 Fc 區之胺基酸序列。初始 Fc 區，可包括於抗體項目概說之利用重組產生之公眾所知之 IgG 抗體之 Fc 區。初始 Fc 區之起源不限定，可從非人類動物之任意生物或人類取得。較佳之任意生物，可理想地列舉從小鼠、大鼠、豚鼠、倉鼠、沙鼠、貓、兔、狗、羊、牛、馬、駱駝、及非人類靈長類選擇之生物。其他態樣中，初始 Fc 區也可從食蟹猴、狨猴、恆河猴、黑猩猩、或人類取得。較佳為初始 Fc 區係從人類 IgG1 取得，但不限於 IgG 之特定次類。此代表可將人類 IgG1(序列編號：5)、IgG2(序列編號：6)、IgG3(序列編號：7)、或 IgG4(序列編號：8)表示之 Fc 區適當作為初始 Fc 區。同樣，本說明書中，意指從前述任意生物得到之 IgG 之任意類或次類之 Fc 區，較佳作為初始 Fc 區使用。天然存在之 IgG 之變異體或經操作之類型，例如公眾所知文獻 (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、國際公開 WO2009/086320、WO2008/092117、WO2007/041635、及 WO2006/105338)記載者，但不限於此等。

【0306】 作為改變之例，包括一個以上之變異，例如取代為與初始 Fc 區之胺基酸相異之胺基酸殘基之變異、或對初始 Fc 區之胺基酸插入一個以上胺基酸殘基或從初始 Fc 區之胺基酸使一個以上之胺基酸缺失等。較佳為改變後之 Fc 區之胺基酸序列中，包括非天然之 Fc 區之至少部分的胺基酸序列。如此之變種必然與初始 Fc 區具有低於 100%之序列相同性或類似性。理想之實施形態中，變種與初始 Fc 區之胺基酸序列有約 75%~低於 100%之胺基酸序列相同性或類似性，更佳為有約 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%之相同性或類似性之胺基酸序列。本發明之一非限定態樣中，初始 Fc 區及本發明之經改變之 Fc 區之間，至少有 1 個胺基酸之差異。初始 Fc 區與改變 Fc 區之胺基酸之差異，特別可由前述 EU 編號表示之胺基酸殘基之位置之指定胺基酸之差異來指定。如此之變種之製作方法，列舉於「胺基酸之改變」之項目。

【0307】 本發明之抗原結合分子含有之於 pH 中性域對人類 FcRn 有結合活性之 Fc 區，可利用任意方法取得，但具體而言，可藉由改變作為初始 Fc 區使用之人類 IgG 型免疫球蛋白之胺基酸，來篩選包括於 pH 中性域對人類 FcRn 之結合活性為 KD 20 μ M 或更強之 Fc 區，更佳態樣中，為於 pH 中性域對人類 FcRn 之結合活性為 KD 2.0 μ M 或更強之 Fc 區，又更佳態樣，係於

pH 中性域對人類 FcRn 之結合活性為 KD 0.5 μ M 或更強之 Fc 區的抗原結合分子。為了改變的理想 IgG 型免疫球蛋白之 Fc 區，例如：序列編號：5、序列編號：6、序列編號：7、或序列編號：8 分別表示 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 等人類 IgG、及此等之改變體之 Fc 區。

【0308】 抗原結合分子包括人類 IgG1 之 Fc 區作為 Fc 區時，帶來於 pH 中性域條件下對 FcRn 之結合，可藉由改變作為初始 Fc 區之 IgG 型免疫球蛋白而帶來效果之胺基酸，例如：如國際公開 WO2000/042072 記載之 EU 編號表示之 238 位、252 位、253 位、254 位、255 位、256 位、265 位、272 位、286 位、288 位、303 位、305 位、307 位、309 位、311 位、312 位、317 位、340 位、356 位、360 位、362 位、376 位、378 位、380 位、382 位、386 位、388 位、400 位、413 位、415 位、424 位、433 位、434 位、435 位、436 位、439 位及/或 447 位之胺基酸為理想例。同樣，可為如此改變之胺基酸，例如國際公開 WO2002/060919 所記載，EU 編號表示之 251 位、252 位、254 位、255 位、256 位、308 位、309 位、311 位、312 位、385 位、386 位、387 位、389 位、428 位、433 位、434 位及/或 436 位之胺基酸為理想例。再者，可為如此改變之胺基酸，例如國際公開 WO2004/092219 記載，EU 編號表示之 250 位、314 位及 428 位之胺基酸。又，可為如此改變之胺基酸，例如國際公開 WO2010/045193 所記載，EU 編號表示之 251 位、252 位、307 位、308 位、378 位、428 位、430 位、434 位及/或 436 位之胺基酸為理想例。藉由該等胺基酸之改變，IgG 型

免疫球蛋白之 Fc 區於 pH 中性域條件下對 FcRn 之結合增強。

【0309】 藉由改變作為初始 Fc 區之人類 IgG 型免疫球蛋白之胺基酸，也可取得於 pH 中性域對人類 FcRn 有結合活性之 Fc 區。用以改變之理想 IgG 型免疫球蛋白之 Fc 區，例如：序列編號：5、序列編號：6、序列編號：7、或序列編號：8 分別表示之 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 等人類 IgG、及此等之改變體之 Fc 區。改變為其他胺基酸之改變，只要於 pH 中性域對人類 FcRn 有結合活性、或於中性域對人類 FcRn 之結合活性提高，則任意位置之胺基酸都可改變。抗原結合分子係包括人類 IgG1 之 Fc 區作為人類 Fc 區時，於 pH 中性域對人類 FcRn 之結合，宜為帶來使人類 IgG1 之初始 Fc 區之結合活性更增強之效果的改變較佳。作為可如此改變之胺基酸，例如：EU 編號 221 位~225 位、227 位、228 位、230 位、232 位、233 位~241 位、243 位~252 位、254 位~260 位、262 位~272 位、274 位、276 位、278 位~289 位、291 位~312 位、315 位~320 位、324 位、325 位、327 位~339 位、341 位、343 位、345 位、360 位、362 位、370 位、375 位~378 位、380 位、382 位、385 位~387 位、389 位、396 位、414 位、416 位、423 位、424 位、426 位~438 位、440 位及 442 位之位置之胺基酸。藉由該等胺基酸之改變，IgG 型免疫球蛋白之 Fc 區於 pH 中性域對人類 FcRn 之結合增強。

【0310】 為了於本發明使用，可適當選擇該等改變中於 pH 中性域也會增強對人類 FcRn 之結合之改變。特別理想之 Fc 區改變體之胺基酸，例如 EU 編號表示之 237 位、248 位、250 位、252 位、254 位、255 位、256 位、257 位、258 位、265

位、286 位、289 位、297 位、298 位、303 位、305 位、307 位、308 位、309 位、311 位、312 位、314 位、315 位、317 位、332 位、334 位、360 位、376 位、380 位、382 位、384 位、385 位、386 位、387 位、389 位、424 位、428 位、433 位、434 位及 436 位之胺基酸。藉由將從該等胺基酸選擇之至少 1 個胺基酸取代為其他胺基酸，抗原結合分子含有之 Fc 區於 pH 中性域對人類 FcRn 之結合活性能增強。

【0311】 特好之改變，例如：Fc 區之 EU 編號表示之

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 中之任一者、

252 位之胺基酸為 Phe、Trp、或 Tyr 中之任一者、

254 位之胺基酸為 Thr、

255 位之胺基酸為 Glu、

256 位之胺基酸為 Asp、Asn、Glu、或 Gln 中之任一者、

257 位之胺基酸為 Ala、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr、或 Val 中之任一者、

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 中之任一者、

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 中之任一者、

308 位之胺基酸為 Ala、Phe、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、或 Thr 中之任一者、

309 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Pro、或 Arg 中之任一者、

311 位之胺基酸為 Ala、His、或 Ile 中之任一者、

312 位之胺基酸為 Ala 或 His 中之任一者、

314 位之胺基酸為 Lys 或 Arg 中之任一者、

315 位之胺基酸為 Ala、Asp 或 His 中之任一者、

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 中之任一者、

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 中之任一者、

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 中之任一者、

433 位之胺基酸為 Lys、

434 位之胺基酸為 Ala、Phe、His、Ser、Trp、或 Tyr 中之任一者、或

436 位之胺基酸為 His、Ile、Leu、Phe、Thr、或 Val。

又，改變之胺基酸數不特別限定，可以僅改變一處胺基酸，也可改變二處以上之胺基酸。該等胺基酸之改變之組合，例如表 2-1~2-33 所示之胺基酸之改變。

【0312】

【表 2-1】

改變體	KD (M)	胺基酸改變部位
F1	8.10E-07	N434W
F2	3.20E-06	M252Y/S254T/T256E
F3	2.50E-06	N434Y
F4	5.80E-06	N434S
F5	6.80E-06	N434A
F7	5.60E-06	M252Y
F8	4.20E-06	M252W
F9	1.40E-07	M252Y/S254T/T256E/N434Y
F10	6.90E-08	M252Y/S254T/T256E/N434W
F11	3.10E-07	M252Y/N434Y
F12	1.70E-07	M252Y/N434W
F13	3.20E-07	M252W/N434Y
F14	1.80E-07	M252W/N434W
F19	4.60E-07	P257L/N434Y
F20	4.60E-07	V308F/N434Y
F21	3.00E-08	M252Y/V308P/N434Y
F22	2.00E-06	M428L/N434S
F25	9.20E-09	M252Y/S254T/T256E/V308P/N434W
F26	1.00E-06	I332V
F27	7.40E-06	G237M
F29	1.40E-06	I332V/N434Y
F31	2.80E-06	G237M/V308F
F32	8.00E-07	S254T/N434W
F33	2.30E-06	S254T/N434Y
F34	2.80E-07	T256E/N434W
F35	8.40E-07	T256E/N434Y
F36	3.60E-07	S254T/T256E/N434W
F37	1.10E-06	S254T/T256E/N434Y
F38	1.00E-07	M252Y/S254T/N434W
F39	3.00E-07	M252Y/S254T/N434Y
F40	8.20E-08	M252Y/T256E/N434W
F41	1.50E-07	M252Y/T256E/N434Y

【0313】 表 2-2 係接續表 2-1 之表。

【表 2-2】

F42	1.00E-06	M252Y/S254T/T256E/N434A
F43	1.70E-06	M252Y/N434A
F44	1.10E-06	M252W/N434A
F47	2.40E-07	M252Y/T256Q/N434W
F48	3.20E-07	M252Y/T256Q/N434Y
F49	5.10E-07	M252F/T256D/N434W
F50	1.20E-06	M252F/T256D/N434Y
F51	8.10E-06	N434F/Y436H
F52	3.10E-06	H433K/N434F/Y436H
F53	1.00E-06	I332V/N434W
F54	8.40E-08	V308P/N434W
F56	9.40E-07	I332V/M428L/N434Y
F57	1.10E-05	G385D/Q386P/N389S
F58	7.70E-07	G385D/Q386P/N389S/N434W
F59	2.40E-06	G385D/Q386P/N389S/N434Y
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

【0314】 表 2-3 係接續表 2-2 之表。

【表 2-3】

F79	5.90E-06	S254T/T256E/N434A
F80	2.70E-06	M252Y/T256Q/N434A
F81	1.60E-06	M252Y/T256E/N434A
F82	1.10E-06	T256Q/N434W
F83	2.60E-06	T256Q/N434Y
F84	2.80E-07	M252W/T256Q/N434W
F85	5.50E-07	M252W/T256Q/N434Y
F86	1.50E-06	S254T/T256Q/N434W
F87	4.30E-06	S254T/T256Q/N434Y
F88	1.90E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434W
F89	3.60E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434Y
F90	1.90E-08	M252Y/T256E/V308P/N434W
F91	4.80E-08	M252Y/V308P/M428L/N434Y
F92	1.10E-08	M252Y/S254T/T256E/V308P/M428L/N434W
F93	7.40E-07	M252W/M428L/N434W
F94	3.70E-07	P257L/M428L/N434Y
F95	2.60E-07	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434F
F99	6.20E-07	M252Y/T256E/N434H
F101	1.10E-07	M252W/T256Q/P257L/N434Y
F103	4.40E-08	P238A/M252Y/V308P/N434Y
F104	3.70E-08	M252Y/D265A/V308P/N434Y
F105	7.50E-08	M252Y/T307A/V308P/N434Y
F106	3.70E-08	M252Y/V303A/V308P/N434Y
F107	3.40E-08	M252Y/V308P/D376A/N434Y
F108	4.10E-08	M252Y/V305A/V308P/N434Y
F109	3.20E-08	M252Y/V308P/Q311A/N434Y
F111	3.20E-08	M252Y/V308P/K317A/N434Y
F112	6.40E-08	M252Y/V308P/E380A/N434Y
F113	3.20E-08	M252Y/V308P/E382A/N434Y
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

【0315】 表 2-4 係接續表 2-3 之表。

【表 2-4】

F120	6.30E-08	P257L/V308P/M428L/N434Y
F121	1.50E-08	M252Y/T256E/V308P/M428L/N434W
F122	1.20E-07	M252Y/T256E/M428L/N434W
F123	3.00E-08	M252Y/T256E/V308P/N434Y
F124	2.90E-07	M252Y/T256E/M428L/N434Y
F125	2.40E-08	M252Y/S254T/T256E/V308P/M428L/N434Y
F128	1.70E-07	P257L/M428L/N434W
F129	2.20E-07	P257A/M428L/N434Y
F131	3.00E-06	P257G/M428L/N434Y
F132	2.10E-07	P257I/M428L/N434Y
F133	4.10E-07	P257M/M428L/N434Y
F134	2.70E-07	P257N/M428L/N434Y
F135	7.50E-07	P257S/M428L/N434Y
F136	3.80E-07	P257T/M428L/N434Y
F137	4.60E-07	P257V/M428L/N434Y
F139	1.50E-08	M252W/V308P/N434W
F140	3.60E-08	S239K/M252Y/V308P/N434Y
F141	3.50E-08	M252Y/S298G/V308P/N434Y
F142	3.70E-08	M252Y/D270F/V308P/N434Y
F143	2.00E-07	M252Y/V308A/N434Y
F145	5.30E-08	M252Y/V308F/N434Y
F147	2.40E-07	M252Y/V308I/N434Y
F149	1.90E-07	M252Y/V308L/N434Y
F150	2.00E-07	M252Y/V308M/N434Y
F152	2.70E-07	M252Y/V308Q/N434Y
F154	1.80E-07	M252Y/V308T/N434Y
F157	1.50E-07	P257A/V308P/M428L/N434Y
F158	5.90E-08	P257T/V308P/M428L/N434Y
F159	4.40E-08	P257V/V308P/M428L/N434Y
F160	8.50E-07	M252W/M428I/N434Y
F162	1.60E-07	M252W/M428Y/N434Y
F163	4.20E-07	M252W/M428F/N434Y
F164	3.70E-07	P238A/M252W/N434Y
F165	2.90E-07	M252W/D265A/N434Y

【0316】 表 2-5 係接續表 2-4 之表。

【表 2-5】

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
F205	2.00E-07	M252Y/T307H/N434Y
F206	2.30E-07	M252Y/T307I/N434Y

【0317】 表 2-6 係接續表 2-5 之表。

【表 2-6】

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

【0318】 表 2-7 係接續表 2-6 之表。

【表 2-7】

F249	6.40E-07	M252Y/M428S/N434Y
F250	2.90E-07	M252Y/M428T/N434Y
F251	1.90E-07	M252Y/M428V/N434Y
F252	1.00E-06	M252Y/M428W/N434Y
F253	7.10E-07	M252Y/M428Y/N434Y
F254	7.50E-08	M252W/T307Q/M428Y/N434Y
F255	1.10E-07	M252W/Q311A/M428Y/N434Y
F256	5.40E-08	M252W/T307Q/Q311A/M428Y/N434Y
F257	5.00E-07	M252Y/T307A/M428Y/N434Y
F258	3.20E-07	M252Y/T307Q/M428Y/N434Y
F259	2.80E-07	M252Y/D270F/N434Y
F260	1.30E-07	M252Y/T307A/Q311A/N434Y
F261	8.40E-08	M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F262	1.90E-07	M252Y/T307A/Q311H/N434Y
F263	1.10E-07	M252Y/T307Q/Q311H/N434Y
F264	2.80E-07	M252Y/E382A/N434Y
F265	6.80E-07	M252Y/E382A/M428Y/N434Y
F266	4.70E-07	M252Y/T307A/E382A/M428Y/N434Y
F267	3.20E-07	M252Y/T307Q/E382A/M428Y/N434Y
F268	6.30E-07	P238A/M252Y/M428F/N434Y
F269	5.20E-07	M252Y/V308A/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

【0319】 表 2-8 係接續表 2-7 之表。

【表 2-8】

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
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	6.60E-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

【0320】 表 2-9 係接續表 2-8 之表。

【表 2-9】

F320	2.00E-08	S239K/M252Y/V308P/N325G/D382A/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
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

【0321】 表 2-10 係接續表 2-9 之表。

【表 2-10】

F365	5.10E-08	P257V/V305A/T307Q/M428L/N434Y
F367	1.50E-08	S239K/M252Y/E258H/D270F/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F368	2.00E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/N325G/E382A/M428I/N434Y
F369	7.50E-08	M252Y/P257V/T307Q/M428I/N434Y
F372	1.30E-08	S239K/M252W/V308P/M428Y/N434Y
F373	1.10E-08	S239K/M252W/V308P/Q311A/M428Y/N434Y
F374	1.20E-08	S239K/M252W/T256E/V308P/M428Y/N434Y
F375	5.50E-09	S239K/M252W/N286E/V308P/M428Y/N434Y
F376	9.60E-09	S239K/M252Y/T256E/D270F/N286E/V308P/N434Y
F377	1.30E-07	S239K/M252W/T307P/M428Y/N434Y
F379	9.00E-09	S239K/M252W/T256E/V308P/Q311A/M428Y/N434Y
F380	5.60E-09	S239K/M252W/T256E/N286E/V308P/M428Y/N434Y
F381	1.10E-07	P257V/T307A/Q311A/M428L/N434Y
F382	8.70E-08	P257V/V305A/T307A/M428L/N434Y
F386	3.20E-08	M252Y/V308P/L309E/N434Y
F387	1.50E-07	M252Y/V308P/L309D/N434Y
F388	7.00E-08	M252Y/V308P/L309A/N434Y
F389	1.70E-08	M252W/V308P/L309E/M428Y/N434Y
F390	6.80E-08	M252W/V308P/L309D/M428Y/N434Y
F391	3.60E-08	M252W/V308P/L309A/M428Y/N434Y
F392	6.90E-09	S239K/M252Y/N286E/V308P/M428I/N434Y
F393	1.20E-08	S239K/M252Y/N286E/V308P/N434Y
F394	5.30E-08	S239K/M252Y/T307Q/Q311A/M428I/N434Y
F395	2.40E-08	S239K/M252Y/T256E/V308P/N434Y
F396	2.00E-08	S239K/M252Y/D270F/N286E/T307Q/Q311A/M428I/N434Y
F397	4.50E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/Q311A/P387E/M428I/N434Y
F398	4.40E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y
F399	6.50E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/T307Q/V308P/M428I/N434Y
F400	6.10E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/Q311A/M428I/N434Y
F401	6.90E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/P387E/M428I/N434Y
F402	2.30E-08	P257V/T307Q/M428L/N434W
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

【0322】 表 2-11 係接續表 2-10 之表。

【表 2-11】

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

【0323】 表 2-12 係接續表 2-11 之表。

【表 2-12】

F441	1.50E-07	P257A/Q311A/M428L/N434Y
F442	2.00E-07	P257A/Q311H/M428L/N434Y
F443	5.50E-08	P257A/T307Q/Q311A/M428L/N434Y
F444	1.40E-07	P257A/T307A/Q311A/M428L/N434Y
F445	6.30E-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

【0324】 表 2-13 係接續表 2-12 之表。

【表 2-13】

F476	5.50E-08	P257V/T307Q/E382A/M428L/N434Y
F477	4.30E-08	P257V/T307Q/P387E/M428L/N434Y
F480	3.90E-08	P257L/V308P/N434Y
F481	5.60E-08	P257T/T307Q/N434Y
F482	7.00E-08	P257V/T307Q/N325G/N434Y
F483	5.70E-08	P257V/T307Q/Q311A/N434Y
F484	6.20E-08	P257V/V305A/T307Q/N434Y
F485	9.70E-08	P257V/N286E/T307A/N434Y
F486	3.40E-07	P257V/T307Q/L309R/Q311H/M428L/N434Y
F488	3.50E-08	P257V/V308P/N325G/M428L/N434Y
F490	7.50E-08	S239K/P257V/V308P/Q311H/M428L/N434Y
F492	9.80E-08	P257V/V305A/T307A/N325G/M428L/N434Y
F493	4.90E-07	S239K/D270F/T307P/N325G/M428Y/N434Y
F497	3.10E-06	P257T/T307A/M428V/N434Y
F498	1.30E-06	P257A/M428V/N434Y
F499	5.20E-07	P257A/T307A/M428V/N434Y
F500	4.30E-08	P257S/T307Q/M428L/N434Y
F505	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

【0325】 表 2-14 係接續表 2-13 之表。

【表 2-14】

F535	3.90E-08	T250A/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F538	9.90E-08	T250F/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F541	6.00E-08	T250I/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F544	3.10E-08	T250M/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F549	5.40E-08	T250S/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F550	5.90E-08	T250V/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F551	1.20E-07	T250W/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F552	1.10E-07	T250Y/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F553	1.70E-07	M252Y/Q311A/N434Y
F554	2.80E-08	S239K/M252Y/S254T/V308P/N434Y
F556	1.50E-06	M252Y/T307Q/Q311A
F559	8.00E-08	M252Y/S254T/N286E/N434Y
F560	2.80E-08	M252Y/S254T/V308P/N434Y
F561	1.40E-07	M252Y/S254T/T307A/N434Y
F562	8.30E-08	M252Y/S254T/T307Q/N434Y
F563	1.30E-07	M252Y/S254T/Q311A/N434Y
F564	1.90E-07	M252Y/S254T/Q311H/N434Y
F565	9.20E-08	M252Y/S254T/T307A/Q311A/N434Y
F566	6.10E-08	M252Y/S254T/T307Q/Q311A/N434Y
F567	2.20E-07	M252Y/S254T/M428L/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/M428L/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

【0326】 表 2-15 係接續表 2-14 之表。

【表 2-15】

F586	1.40E-07	S239K/M252Y/N286E/V308P/M428I
F587	1.90E-07	M252Y/N286E/M428I/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/M428I/N434Y
F625	7.60E-08	S239K/P257A/T307Q/M428I/N434Y
F626	1.30E-06	V308P
F629	3.90E-08	M252Y/V279L/V308P/N434Y
F630	3.70E-08	S239K/M252Y/V279L/V308P/N434Y
F633	2.40E-08	M252Y/V282D/V308P/N434Y
F634	3.20E-08	S239K/M252Y/V282D/V308P/N434Y
F635	4.50E-08	M252Y/V284K/V308P/N434Y
F636	4.80E-08	S239K/M252Y/V284K/V308P/N434Y
F637	1.50E-07	M252Y/K288S/V308P/N434Y

【0327】 表 2-16 係接續表 2-15 之表。

【表 2-16】

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

【0328】 表 2-17 係接續表 2-16 之表。

【表 2-17】

F674	3.20E-08	M252Y/N286Q/V308P/N434Y
F675	5.10E-08	M252Y/N286R/V308P/N434Y
F676	3.20E-08	M252Y/N286S/V308P/N434Y
F677	4.70E-08	M252Y/N286T/V308P/N434Y
F678	3.30E-08	M252Y/N286V/V308P/N434Y
F679	1.70E-08	M252Y/N286W/V308P/N434Y
F680	1.50E-08	M252Y/N286Y/V308P/N434Y
F681	4.90E-08	M252Y/K288A/V308P/N434Y
F682	8.20E-08	M252Y/K288D/V308P/N434Y
F683	5.00E-08	M252Y/K288E/V308P/N434Y
F684	5.10E-08	M252Y/K288F/V308P/N434Y
F685	5.30E-08	M252Y/K288G/V308P/N434Y
F686	4.60E-08	M252Y/K288H/V308P/N434Y
F687	4.90E-08	M252Y/K288I/V308P/N434Y
F688	2.80E-08	M252Y/K288L/V308P/N434Y
F689	4.10E-08	M252Y/K288M/V308P/N434Y
F690	1.00E-07	M252Y/K288N/V308P/N434Y
F691	3.20E-07	M252Y/K288P/V308P/N434Y
F692	3.90E-08	M252Y/K288Q/V308P/N434Y
F693	3.60E-08	M252Y/K288R/V308P/N434Y
F694	4.70E-08	M252Y/K288V/V308P/N434Y
F695	4.00E-08	M252Y/K288W/V308P/N434Y
F696	4.40E-08	M252Y/K288Y/V308P/N434Y
F697	3.10E-08	S239K/M252Y/V308P/N325G/N434Y
F698	2.20E-08	M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y
F699	2.30E-08	S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y
F700	5.20E-08	M252Y/V308P/L328E/N434Y
F705	7.10E-09	M252Y/N286E/V308P/M428I/N434Y
F706	1.80E-08	M252Y/N286E/T307Q/Q311A/M428I/N434Y
F707	5.90E-09	M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F708	4.10E-09	M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y
F709	2.00E-08	S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/M428I/N434Y
F710	1.50E-08	P238D/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/M428I/N434Y
F711	6.50E-08	S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y

【0329】 表 2-18 係接續表 2-17 之表。

【表 2-18】

F712	6.00E-08	P238D/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F713	2.00E-08	P238D/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y
F714	2.30E-07	P238D/M252Y/N325S/N434Y
F715	2.30E-07	P238D/M252Y/N325M/N434Y
F716	2.70E-07	P238D/M252Y/N325L/N434Y
F717	2.60E-07	P238D/M252Y/N325I/N434Y
F718	2.80E-07	P238D/M252Y/Q295M/N434Y
F719	7.40E-08	P238D/M252Y/N325G/N434Y
F720	2.40E-08	M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F721	1.50E-08	M252Y/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y
F722	2.70E-07	P238D/M252Y/A327G/N434Y
F723	2.80E-07	P238D/M252Y/L328D/N434Y
F724	2.50E-07	P238D/M252Y/L328E/N434Y
F725	4.20E-08	L235K/G237R/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F726	3.70E-08	L235K/P238K/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F729	9.20E-07	T307A/Q311A/N434Y
F730	6.00E-07	T307Q/Q311A/N434Y
F731	8.50E-07	T307A/Q311H/N434Y
F732	6.80E-07	T307Q/Q311H/N434Y
F733	3.20E-07	M252Y/L328E/N434Y
F734	3.10E-07	Q236D/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

【0330】 表 2-19 係接續表 2-18 之表。

【表 2-19】

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
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	5.20E-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

【0331】 表 2-20 係接續表 2-19 之表。

【表 2-20】

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/N315H/N434Y
F794	4.10E-07	M252Y/N315K/N434Y
F795	3.10E-07	M252Y/N315L/N434Y
F796	3.40E-07	M252Y/N315M/N434Y
F798	3.50E-07	M252Y/N315Q/N434Y
F799	4.10E-07	M252Y/N315R/N434Y
F800	3.80E-07	M252Y/N315S/N434Y
F801	4.40E-07	M252Y/N315T/N434Y
F802	3.30E-07	M252Y/N315V/N434Y
F803	3.60E-07	M252Y/N315W/N434Y
F804	4.00E-07	M252Y/N315Y/N434Y
F805	3.00E-07	M252Y/N325A/N434Y
F806	3.10E-07	M252Y/N384A/N434Y
F807	3.20E-07	M252Y/N389A/N434Y
F808	3.20E-07	M252Y/N389A/N390A/N434Y
F809	2.20E-07	M252Y/S254T/T256S/N434Y
F810	2.20E-07	M252Y/A378V/N434Y
F811	4.90E-07	M252Y/E380S/N434Y
F812	2.70E-07	M252Y/E382V/N434Y
F813	2.80E-07	M252Y/S424E/N434Y
F814	1.20E-07	M252Y/N434Y/Y436I
F815	5.50E-07	M252Y/N434Y/T437R
F816	3.60E-07	P238D/T250V/M252Y/T307P/N434Y
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

【0332】 表 2-21 係接續表 2-20 之表。

【表 2-21】

F831	1.60E-06	P238D/T250V/M252Y/R255A/N434Y
F832	2.60E-06	P238D/T250V/M252Y/R255D/N434Y
F833	8.00E-07	P238D/T250V/M252Y/R255E/N434Y
F834	8.10E-07	P238D/T250V/M252Y/R255F/N434Y
F836	5.00E-07	P238D/T250V/M252Y/R255H/N434Y
F837	5.60E-07	P238D/T250V/M252Y/R255I/N434Y
F838	4.30E-07	P238D/T250V/M252Y/R255K/N434Y
F839	3.40E-07	P238D/T250V/M252Y/R255L/N434Y
F840	4.20E-07	P238D/T250V/M252Y/R255M/N434Y
F841	1.10E-06	P238D/T250V/M252Y/R255N/N434Y
F843	6.60E-07	P238D/T250V/M252Y/R255Q/N434Y
F844	1.30E-06	P238D/T250V/M252Y/R255S/N434Y
F847	3.40E-07	P238D/T250V/M252Y/R255W/N434Y
F848	8.30E-07	P238D/T250V/M252Y/R255Y/N434Y
F849	3.30E-07	M252Y/D280A/N434Y
F850	2.90E-07	M252Y/D280E/N434Y
F852	3.30E-07	M252Y/D280G/N434Y
F853	3.20E-07	M252Y/D280H/N434Y
F855	3.20E-07	M252Y/D280K/N434Y
F858	3.20E-07	M252Y/D280N/N434Y
F860	3.30E-07	M252Y/D280Q/N434Y
F861	3.20E-07	M252Y/D280R/N434Y
F862	3.00E-07	M252Y/D280S/N434Y
F863	2.70E-07	M252Y/D280T/N434Y
F867	2.80E-07	M252Y/N384A/N389A/N434Y
F868	2.00E-08	G236A/S239D/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y
F869		G236A/S239D
F870	7.30E-08	L235K/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F871	7.10E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F872	1.30E-07	L235K/S239K/M252Y/N286E/N434Y
F873	1.20E-07	L235R/S239K/M252Y/N286E/N434Y
F875	4.80E-07	M252Y/N434Y/Y436A
F877	8.30E-07	M252Y/N434Y/Y436E
F878	1.90E-07	M252Y/N434Y/Y436F

【0333】 表 2-22 係接續表 2-21 之表。

【表 2-22】

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

【0334】 表 2-23 係接續表 2-22 之表。

【表 2-23】

F917	2.50E-07	M252Y/N286S/N434Y
F918	2.80E-07	M252Y/D280E/N384A/N389A/N434Y
F919	3.30E-07	M252Y/D280G/N384A/N389A/N434Y
F920	2.50E-07	M252Y/N286S/N384A/N389A/N434Y
F921	1.20E-07	M252Y/N286E/N384A/N389A/N434Y
F922	5.90E-08	L235K/S239K/M252Y/N286E/N434Y/Y436I
F923	6.00E-08	L235R/S239K/M252Y/N286E/N434Y/Y436I
F924	3.40E-08	L235K/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436I
F925	3.20E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436I
F926	1.10E-07	L235K/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436I
F927	1.00E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436I
F928	2.90E-08	M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436I
F929	2.90E-08	M252Y/S254T/T307Q/Q311A/N434Y/Y436I
F930	1.40E-07	P238D/T250V/M252Y/N286E/N434Y
F931	1.20E-07	P238D/T250V/M252Y/N434Y/Y436I
F932	3.20E-07	T250V/M252Y/N434Y
F933	3.00E-07	L234R/P238D/T250V/M252Y/N434Y
F934	3.10E-07	G236K/P238D/T250V/M252Y/N434Y
F935	3.20E-07	G237K/P238D/T250V/M252Y/N434Y
F936	3.20E-07	G237R/P238D/T250V/M252Y/N434Y
F937	3.10E-07	P238D/S239K/T250V/M252Y/N434Y
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

【0335】 表 2-24 係接續表 2-23 之表。

【表 2-24】

F966	3.10E-07	M252Y/S254A/N434Y
F970	2.50E-06	M252Y/S254G/N434Y
F971	2.60E-06	M252Y/S254H/N434Y
F972	2.60E-07	M252Y/S254I/N434Y
F978	1.30E-06	M252Y/S254Q/N434Y
F980	1.80E-07	M252Y/S254V/N434Y
F987	4.00E-08	P238D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F988	6.90E-08	P238D/T250V/M252Y/N286E/N434Y/Y436V
F989	1.40E-08	L235R/S239K/M252Y/V308P/N434Y/Y436V
F990	9.40E-09	L235R/S239K/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F991	1.30E-08	L235R/S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F992	5.10E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/M428I/N434Y/Y436V
F993	3.80E-08	M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F994	2.80E-07	M252Y/N325G/N434Y
F995	2.90E-07	L235R/P238D/S239K/M252Y/N434Y
F996	1.30E-07	L235R/P238D/S239K/M252Y/N434Y/Y436V
F997	3.80E-07	K248I/T250V/M252Y/N434Y/Y436V
F998	8.50E-07	K248Y/T250V/M252Y/N434Y/Y436V
F999	2.10E-07	T250V/M252Y/E258H/N434Y/Y436V
F1005		N325G
F1008	1.70E-07	L235R/S239K/T250V/M252Y/N434Y/Y436V
F1009	1.20E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1010	1.90E-07	L235R/S239K/M252Y/T307A/Q311H/N434Y
F1011	4.50E-08	T250V/M252Y/V308P/N434Y
F1012	4.70E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/V308P/N434Y
F1013	3.00E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F1014	3.20E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F1015	2.20E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F1016	3.80E-09	T250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1017	4.20E-09	L235R/S239K/T250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1018	3.20E-09	L235R/S239K/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1019	3.40E-07	P238D/T250V/M252Y/N325G/N434Y
F1020	8.50E-08	P238D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N325G/N434Y

【0336】 表 2-25 係接續表 2-24 之表。

【表 2-25】

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
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

【0337】 表 2-26 係接續表 2-25 之表。

【表 2-26】

FI053	4.23E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
FI058	1.31E-07	M252Y/Q386E/N434Y/Y436V
FI059	1.39E-07	M252Y/Q386R/N434Y/Y436V
FI060	1.43E-07	M252Y/Q386S/N434Y/Y436V
FI061	1.19E-07	M252Y/P387E/N434Y/Y436V
FI062	1.2E-07	M252Y/P387R/N434Y/Y436V
FI063	1.43E-07	M252Y/P387S/N434Y/Y436V
FI064	1.32E-07	M252Y/V422E/N434Y/Y436V
FI065	1.38E-07	M252Y/V422R/N434Y/Y436V
FI066	1.45E-07	M252Y/V422S/N434Y/Y436V
FI067	1.26E-07	M252Y/S424E/N434Y/Y436V
FI068	1.69E-07	M252Y/S424R/N434Y/Y436V
FI069	1.39E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438E
FI070	1.73E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438R
FI071	1.24E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438S
FI072	1.35E-07	M252Y/N434Y/Y436V/S440E
FI073	1.34E-07	M252Y/N434Y/Y436V/S440R
FI074	1.32E-07	S239D/M252Y/N434Y/Y436V
FI075	1.4E-07	M252Y/K326D/L328Y/N434Y/Y436V
FI076	1.27E-07	S239D/M252Y/K326D/L328Y/N434Y/Y436V
FI077	2.03E-06	K248N/M252Y/N434Y
FI078	4.7E-07	M252Y/E380N/E382S/N434Y
FI079	3.44E-07	M252Y/E382N/N384S/N434Y
FI080	3.19E-07	M252Y/S424N/N434Y
FI081	6.2E-07	M252Y/N434Y/Y436N/Q438T
FI082	2.76E-07	M252Y/N434Y/Q438N
FI083	3.45E-07	M252Y/N434Y/S440N
FI094	2.6E-07	M252Y/N434Y/S442N
FI095	2.86E-07	M252Y/S383N/G385S/N434Y
FI096	2.72E-07	M252Y/Q386T/N434Y
FI097	2.82E-07	M252Y/G385N/P387S/N434Y
FI098	2.58E-07	S239D/M252Y/N434Y
FI099	2.57E-07	M252Y/K326D/L328Y/N434Y
FI100	2.41E-07	S239D/M252Y/K326D/L328Y/N434Y
FI101	6.59E-08	S239D/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
FI102	6.46E-08	M252Y/T307Q/Q311A/K326D/L328Y/N434Y
FI103	6.11E-08	S239D/M252Y/T307Q/Q311A/K326D/L328Y/N434Y
FI104	1.77E-07	M252Y/V422E/S424R/N434Y/Y436V
FI105	1.54E-07	M252Y/V422S/S424R/N434Y/Y436V
FI106	1.42E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
FI107	1.23E-07	M252Y/V422D/N434Y/Y436V

【0338】 表 2-27 係接續表 2-26 之表。

【表 2-27】

F1108	1.26E-07	M252Y/V422K/N434Y/Y436V
F1109	1.27E-07	M252Y/V422T/N434Y/Y436V
F1110	1.33E-07	M252Y/V422Q/N434Y/Y436V
F1111	1.65E-07	M252Y/S424K/N434Y/Y436V
F1112	1.23E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438K
F1113	1.18E-07	M252Y/N434Y/Y436V/S440D
F1114	1.31E-07	M252Y/N434Y/Y436V/S440Q
F1115	1.35E-07	M252Y/S424N/N434Y/Y436V
F1116	7.44E-08	M252Y/T307Q/Q311A/S424N/N434Y
F1117	4.87E-08	T250V/M252Y/T307Q/Q311A/S424N/N434Y/Y436V
F1118	1.32E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/S424N/N434Y/Y436V
F1119	1.03E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/V422E/N434Y/Y436V
F1120	1.04E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/S424R/N434Y/Y436V
F1121	1.04E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/V422E/S424R/N434Y/Y436V
F1122	1.37E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R
F1123	9.55E-09	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V/S440E
F1124	1.22E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1125	5.18E-08	M252Y/T307Q/N434Y/Y436V
F1126	8.95E-08	M252Y/T307A/N434Y/Y436V
F1127	7.94E-08	M252Y/Q311A/N434Y/Y436V
F1128	1.17E-07	M252Y/Q311H/N434Y/Y436V
F1129	4.48E-08	M252Y/T307Q/Q311H/N434Y/Y436V
F1130	5.54E-08	M252Y/T307A/Q311A/N434Y/Y436V
F1131	1.29E-07	L235R/S239K/M252Y/V422E/N434Y/Y436V
F1132	1.4E-07	L235R/S239K/M252Y/V422S/N434Y/Y436V
F1133	1.56E-07	L235R/S239K/M252Y/S424R/N434Y/Y436V
F1134	1.66E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438R
F1135	1.26E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/S440E
F1136	1.63E-07	L235R/S239K/M252Y/V422E/S424R/N434Y/Y436V
F1137	1.58E-07	L235R/S239K/M252Y/V422S/S424R/N434Y/Y436V
F1138	1.65E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1139	1.52E-07	L235R/S239K/M252Y/S424R/N434Y/Y436V
F1140	1.62E-07	M252Y/V422E/S424R/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1141	1.77E-07	M252Y/V422S/S424R/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1142	1.87E-07	L235R/S239K/M252Y/V422E/S424R/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1143	1.98E-07	L235R/S239K/M252Y/V422S/S424R/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1144	1.44E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1145	5.23E-08	T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1146	6.24E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1147	7.19E-08	M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Q438R/S440E

【0339】 表 2-28 係接續表 2-27 之表

【表 2-28】

FI148	7.63E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Q438R/S440E
FI151	2.51E-07	L235R/S239K/M252Y/S424N/N434Y
FI152	7.36E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/S424N/N434Y
FI153	4.85E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/S424N/N434Y/Y436V
FI154	1.34E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/S424N/N434Y/Y436V
FI157	2.09E-07	M252Y/N434Y/Q438R/S440E
FI158	2.44E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Q438R/S440E
FI159	4.79E-07	S424N/N434W
FI160	2.88E-07	V308F/S424N/N434Y
FI161	1.07E-06	I332V/S424N/N434Y
FI162	3.43E-07	P238D/T250V/M252Y/N434Y/Y436V
FI163	1.54E-07	P238D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
FI164	6.96E-08	P238D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
FI165	1.63E-08	P238D/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
FI174	4.9E-07	P257I/N434H
FI176	1.98E-06	V308F
FI178	8.72E-07	V259I/V308F/M428L
FI183	1.28E-06	E380A/M428L/N434S
FI184	1E-06	T307A/M428L/N434S
FI185	9.17E-07	T307A/E380A/M428L/N434S
FI188	1.72E-06	T307A/E380A/N434H
FI189	1.57E-07	M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
FI190	2.4E-07	M252Y/H433E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
FI191	2.11E-07	M252Y/N434Y/Y436V/T437A/Q438R/S440E
FI192	1.27E-07	M252Y/N434Y/Y436V/T437G/Q438R/S440E
FI194	1.55E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/K439D/S440E
FI195	1.76E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440E/L441A
FI196	1.51E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440E/L441E
FI197	9.46E-08	M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
FI198	7.83E-08	M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
FI199	6.25E-08	M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
FI200	1.26E-07	T250V/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
FI201	1.07E-07	T250V/M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
FI202	8.81E-08	T250V/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
FI203	1.52E-07	M252Y/T256Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
FI204	1.18E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
FI205	1.98E-07	T250V/M252Y/T256Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
FI206	1.69E-07	T250V/M252Y/S254T/T256Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
FI207	1.11E-06	I332E/M428L/N434S
FI208	5.71E-07	L251A/M252Y/N434Y/Y436V
FI211	1.23E-06	L251H/M252Y/N434Y/Y436V

【0340】 表 2-29 係接續表 2-28 之表。

【表 2-29】

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

【0341】 表 2-30 係接續表 2-29 之表。

【表 2-30】

F1276	1.02E-07	L235R/S239K/M252Y/T256A/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1277	1.69E-07	L235R/S239K/M252Y/T256A/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1278	1.4E-07	L235R/S239K/M252Y/T256A/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1279	1.23E-07	L235R/S239K/M252Y/T256G/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1280	2.09E-07	L235R/S239K/M252Y/T256G/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1281	1.74E-07	L235R/S239K/M252Y/T256G/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1282	7.69E-08	L235R/S239K/M252Y/T256N/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1283	1.34E-07	L235R/S239K/M252Y/T256N/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1284	1.12E-07	L235R/S239K/M252Y/T256N/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1285	9.36E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1286	1.57E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1287	1.5E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1288	7.95E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1289	1.33E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1290	1.11E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1291	1.51E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V
F1292	4.24E-07	L235R/S239K/H433D/N434W/Y436V/Q438R/S440E
F1293	1.61E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Q438R/S440E
F1294	2E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1295	9.84E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1296	2.27E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Q438R/S440E
F1297	2.5E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1298	1.47E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1299	1.5E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Q438K/S440D
F1300	1.63E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436T/Q438K/S440D
F1301	8.3E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436F/Q438K/S440D
F1302	2.15E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Q438K/S440D
F1303	2.1E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440D
F1304	1.24E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436F/Q438K/S440D
F1305	2.05E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1306	1.92E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1307	1.44E-07	L235R/S239K/M252Y/V422A/S424A/N434Y/Y436V
F1308	2.06E-07	L235R/S239K/M252Y/V422L/S424L/N434Y/Y436V
F1309	1.26E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438A/S440A
F1310	2.28E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438L/S440L
F1311	1.69E-07	L235R/S239K/M252Y/V422A/S424A/H433D/N434Y/Y436V
F1312	1.79E-07	L235R/S239K/M252Y/V422L/S424L/H433D/N434Y/Y436V
F1313	1.77E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438A/S440A
F1314	2.27E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438L/S440L
F1315	1.52E-07	G237K/S239K/M252Y/N434Y/Y436V
F1316	1.49E-07	G237R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V

【0342】 表 2-31 係接續表 2-30 之表。

【表 2-31】

F1317	1.38E-07	S239K/M252Y/P329K/N434Y/Y436V
F1318	1.43E-07	S239K/M252Y/P329R/N434Y/Y436V
F1319	2.57E-07	M252Y/L328Y/N434Y
F1320	1.22E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1321	1.03E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1322	1.6E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1323	1.49E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1324	1.32E-07	L234A/L235A/M252Y/N434Y/Y436V
F1325	2.13E-07	L234A/L235A/M252Y/N297A/N434Y/Y436V
F1326	1.09E-08	L234A/L235A/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1327	1.41E-08	L234A/L235A/T250V/M252Y/N297A/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1328	1.52E-07	L235R/Q236R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1329	1.29E-07	L235R/Q236R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1330	1.03E-07	L235R/Q236R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1331	7.75E-08	L235R/Q236R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1333	1.23E-07	L235R/Q236R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V
F1334	1.04E-07	L235R/Q236R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1335	8.78E-08	L235R/Q236R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1336	7.18E-08	L235R/Q236R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1337	7.41E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1338	1.04E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1339	2.51E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1340	5.58E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1341	3.22E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1342	2.51E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1343	2.01E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1344	3.96E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1345	1.05E-07	L235R/Q236R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1346	8.59E-08	L235R/Q236R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1347	7.14E-08	L235R/Q236R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1348	5.52E-08	L235R/Q236R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1349	3.36E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1350	1.18E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1351	1.62E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1352	3.93E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1353	4.33E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1354	2.29E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1355	2.47E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1356	1.58E-07	G236R/M252Y/L328R/N434Y/Y436V
F1357	2.81E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1358	9.07E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436F/Q438K/S440E

【0343】 表 2-32 係接續表 2-31 之表。

【表 2-32】

F1359	1.28E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1360	3.12E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1361	3.52E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1362	1.41E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1363	1.9E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1364	7.49E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1365	3.14E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1366	1.17E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1367	1.79E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1368	5.49E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1369	7.6E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1370	9.14E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1371	1.09E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1372	2.28E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1373	8.67E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1374	1.2E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1375	1.03E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V
F1376	9.09E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V
F1377	8.27E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436V
F1378	3.61E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436T
F1379	2.85E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436F
F1410	1.90E-06	V308P/I332V
F1411	1.70E-07	V308P/I332V/M428L/N434S
F1413	3.70E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/T307Q/Q311A/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1414	5.60E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/T307Q/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1415	5.90E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/Q311A/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1416	1.30E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1417	5.90E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434W/Y436V/Q438K/S440E
F1418	7.50E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434W/Y436V/Q438R/S440E
F1419	1.50E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434W/Y436V/Q438R/S440E
F1420	1.30E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434W/Y436V/Q438K/S440E
F1421	3.20E-08	V308P/M428L/N434W
F1422	1.90E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1423	1.60E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/V302D/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1424	1.60E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/V302E/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E

【0344】 表 2-33 係接續表 2-32 之表。

【表 2-33】

F1425	1.90E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/V303D/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1426	1.80E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/V303E/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1428	1.50E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/S304E/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1430	3.10E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/V305E/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1433	4.50E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/T307D/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1434	3.60E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/T307E/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E

【0345】 包含二分子之 FcRn 及一分子之活性型 Fc γ 受體四者之異複合體

依 FcRn 與 IgG 抗體間的結晶學的研究，FcRn-IgG 複合體，係由二分子之 FcRn 對一分子之 IgG 構成，且據認為位於 IgG 之 Fc 區兩側之 CH2 及 CH3 分域之接觸面附近發生二分子之結合 (Burmeister 等 (Nature (1994) 372, 336-343)。另一方面，如 PCT/JP2012/058603 之實施例 3 已確認，抗體之 Fc 區能形成含有二分子之 FcRn 及一分子之活性型 Fc γ 受體四者的複合體 (PCT/JP2012/058603)。此異複合體之形成，係針對於含有 pH 中性域之條件下對 FcRn 有結合活性之 Fc 區之抗原結合分子之性質進行解析之結果而明白的現象。

【0346】 本發明不受特定理論所拘束，但也認為抗原結合分子含有之 Fc 區與含二分子之 FcRn 及一分子之活性型 Fc γ 受體四者之異複合體之形成，會對於抗原結合分子投予到活體內時之抗原結合分子在該活體內之藥物動態(血漿中滯留性)、及對於所投予之抗原結合分子之免疫回應(免疫原性)帶來如以下之影響。免疫細胞上除了表現各種活性型 Fc γ 受體也表現 FcRn，抗原結合分子在免疫細胞上形成如此之四者複合體，使

對於免疫細胞之親和性提高，而且藉由進一步將細胞內分域組合化，使內在化信號增強，啟示會促進攝入免疫細胞。抗原提示細胞中也同樣，藉由在抗原提示細胞之細胞膜上形成四者複合體，啟示可能使抗原結合分子容易攝入抗原提示細胞。一般而言，被攝入抗原提示細胞之抗原結合分子，係在抗原提示細胞內之溶體被分解，並且對 T 細胞提示。結果，藉由在抗原提示細胞之細胞膜上形成上述四者複合體，使攝入針對抗原結合分子之抗原提示細胞被促進，可能造成抗原結合分子之血漿中滯留性惡化。又，同樣，可能引發免疫回應(惡化)。

【0347】 所以，當將如此之形成四者複合體之能力下降的抗原結合分子對活體投予時，可認為該抗原結合分子之血漿中滯留性提高，由於該活體引起之免疫回應誘發受抑制。在如此之包括抗原提示細胞之免疫細胞上抑制該複合體形成之抗原結合分子之理想態樣，可列舉以下三種。

【0348】 抑制異複合體形成之抗原結合分子

(態樣 1) 含有於 pH 中性域條件下對 FcRn 有結合活性，且對活性型 Fc γ R 之結合活性低於對天然型 Fc 區之活性型 Fc γ R 之結合活性之 Fc 區之抗原結合分子

【0349】 態樣 1 之抗原結合分子，係藉由與二分子之 FcRn 結合而形成三者複合體，但不形成含有活性型 Fc γ R 之複合體。對活性型 Fc γ R 之結合活性低於天然型 Fc 區對活性型 Fc γ R 之結合活性的 Fc 區，可如前述藉由改變天然型 Fc 區之胺基酸而製作。改變 Fc 區對活性型 Fc γ R 之結合活性，是否比起天然型 Fc 區對活性型 Fc γ R 之結合活性，可使用前述結合活性之項

目記載之方法適當實施。

【0350】 作為活性型 Fc γ 受體，可列舉包括 Fc γ RIa、Fc γ RIb 及 Fc γ RIc 之 Fc γ RI(CD64)、Fc γ RIIa(包括副型 R131 及 H131) 以及包括構造同型 Fc γ RIIIa(包括副型 V158 及 F158)及 Fc γ RIIIb(包括副型 Fc γ RIIIb-NA1 及 Fc γ RIIIb-NA2) 之 Fc γ RIII(CD16)為理想例。

【0351】 本說明書中，Fc 區改變體對活性型 Fc γ 受體之結合活性低於天然型 Fc 區對活性型 Fc γ 受體之結合活性，係指 Fc 區改變體對 Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIIa 及/或 Fc γ RIIIb 中之任一者之人類 Fc γ 受體的結合活性，低於天然型 Fc 區對該等人類 Fc γ 受體之結合活性。例如：係指依據上述解析方法，相較於作為對照之含天然型 Fc 區之抗原結合分子之結合活性，含 Fc 區改變體之抗原結合分子之結合活性顯示 95%以下，較佳為 90%以下、85%以下、80%以下、75%以下，尤佳為 70%以下、65%以下、60%以下、55%以下、50%以下、45%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下、9%以下、8%以下、7%以下、6%以下、5%以下、4%以下、3%以下、2%以下、1%以下之結合活性。作為天然型 Fc 區，可使用初始 Fc 區，也可使用野生型抗體之不同構造同型之 Fc 區。

【0352】 又，天然型對活性型 Fc γ R 之結合活性，係指人類 IgG1 對 Fc γ 受體之結合活性較佳，使對 Fc γ 受體之結合活性減低，可藉由上述改變，除此以外癘可藉由改變為人類 IgG2、人類 IgG3、人類 IgG4 之構造同型以達成。又，使對 Fc γ 受體

之結合活性下降，除了上述改變以外，也可藉由使含 Fc 區之抗原結合分子於大腸菌等未加成糖鏈之寄主表現以獲得。

【0353】 作為對照之含 Fc 區之抗原結合分子，可適當使用具有 IgG 單株抗體之 Fc 區之抗原結合分子。該 Fc 區之結構，記載於序列編號：5(RefSeq 註冊編號 AAC82527.1 之 N 末端有 A 加成)、6(RefSeq 註冊編號 AAB59393.1 之 N 末端有 A 加成)、7(RefSeq 註冊編號 CAA27268.1)、8(RefSeq 註冊編號 AAB59394.1 之 N 末端有 A 加成)。又，當將含有某特定構造同型之抗體之 Fc 區之抗原結合分子作為待測物質的情形，藉由將具有該特定構造同型之 IgG 單株抗體之 Fc 區的抗原結合分子當作對照，可驗證含該 Fc 區之抗原結合分子所致之對 Fc γ 受體之結合活性之效果。如上述，可適當選擇已驗證含有對 Fc γ 受體之結合活性為高之 Fc 區之抗原結合分子。

【0354】 本發明之一非限定態樣中，作為對活性型 Fc γ R 之結合活性低於天然型 Fc 區對活性型 Fc γ R 之結合活性的 Fc 區之例，

可列舉前述 Fc 區之胺基酸中之 EU 編號表示之 234、235、236、237、238、239、270、297、298、325、328、及 329 中之任一者以上之胺基酸改變為與天然型 Fc 區相異之胺基酸的 Fc 區為理想例，但 Fc 區之改變不限於上述改變，例如也可為 Cur. Opin. in Biotech. (2009) 20 (6), 685-691 記載之脫糖鏈 (N297A, N297Q)、IgG1-L234A/L235A、IgG1-A325A/A330S/P331S、IgG1-C226S/C229S、IgG1-C226S/C229S/E233P/L234V/L235A

IgG1-L234F/L235E/P331S 、 IgG1-S267E/L328F 、
 IgG2-V234A/G237A 、 IgG2-H268Q/V309L/A330S/A331S 、
 IgG4-L235A/G237A/E318A、IgG4-L236E 等改變、及國際公開
 WO2008/092117 記載之 G236R/L328R、L235G/G236R、
 N325A/L328R、N325L/L328R 等改變、及 EU 編號 233 位、234
 位、235 位、237 位之胺基酸之插入、國際公開 WO2000/042072
 記載之部位之改變。

【0355】 又，本發明之一非限定態樣中，係前述 Fc 區之 EU
 編號表示之胺基酸；且

234 位之胺基酸為 Ala、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、
 His、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr 或 Trp 中之任一者、

235 位之胺基酸為 Ala、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、
 Ile、Lys、Met、Pro、Ser、Thr、Val 或 Arg 中之任一者、

236 位之胺基酸為 Arg、Asn、Gln、His、Leu、Lys、Met、
 Phe、Pro 或 Tyr 中之任一者、

237 位之胺基酸為 Ala、Asn、Asp、Gln、Glu、His、Ile、
 Leu、Lys、Met、Pro、Ser、Thr、Val、Tyr 或 Arg 中之任一者、

238 位之胺基酸為 Ala、Asn、Gln、Glu、Gly、His、Ile、
 Lys、Thr、Trp 或 Arg 中之任一者、

239 位之胺基酸為 Gln、His、Lys、Phe、Pro、Trp、Tyr
 或 Arg 中之任一者、

265 位之胺基酸為 Ala、Arg、Asn、Gln、Gly、His、Ile、
 Leu、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr 或 Val 中之任一者、

266 位之胺基酸為 Ala、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、

His、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp 或 Tyr 中之任一者、

267 位之胺基酸為 Arg、His、Lys、Phe、Pro、Trp 或 Tyr 中之任一者、

269 位之胺基酸為 Ala、Arg、Asn、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr 或 Val 中之任一者、

270 位之胺基酸為 Ala、Arg、Asn、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr 或 Val 中之任一者、

271 位之胺基酸為 Arg、His、Phe、Ser、Thr、Trp 或 Tyr 中之任一者、

295 位之胺基酸為 Arg、Asn、Asp、Gly、His、Phe、Ser、Trp 或 Tyr 中之任一者、

296 位之胺基酸為 Arg、Gly、Lys 或 Pro 中之任一者、

297 位之胺基酸為 Ala、

298 位之胺基酸為 Arg、Gly、Lys、Pro、Trp 或 Tyr 中之任一者、

300 位之胺基酸為 Arg、Lys 或 Pro 中之任一者、

324 位之胺基酸為 Lys 或 Pro 中之任一者、

325 位之胺基酸為 Ala、Arg、Gly、His、Ile、Lys、Phe、Pro、Thr、Trp、Tyr、或 Val 中之任一者、

327 位之胺基酸為 Arg、Gln、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr 或 Val 中之任一者、

328 位之胺基酸為 Arg、Asn、Gly、His、Lys 或 Pro 中之

任一者、

329 位之胺基酸為 Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、Val 或 Arg 中之任一者、

330 位之胺基酸為 Pro 或 Ser 中之任一者、

331 位之胺基酸為 Arg、Gly 或 Lys 中之任一者、或

332 位之胺基酸為 Arg、Lys 或 Pro 中之任一者、

中之任一者以上之經改變之 Fc 區為理想例。

【0356】 (態樣 2) 含有於 pH 中性域條件下對 FcRn 有結合活性，且對抑制型 Fc γ R 之結合活性高於對活性型 Fc γ 受體之結合活性之 Fc 區的抗原結合分子

【0357】 態樣 2 之抗原結合分子，可藉由結合於二分子之 FcRn 與一分子之抑制型 Fc γ R 而形成包含此等四者的複合體。但是一分子之抗原結合分子僅可與一分子之 Fc γ R 結合，所以，一分子之抗原結合分子在已與抑制型 Fc γ R 結合之狀態無法與其他活性型 Fc γ R 結合。再者，據報告已與抑制型 Fc γ R 結合之狀態攝入細胞內之抗原結合分子會再循環到細胞膜上，並避免在細胞內分解 (Immunity (2005) 23, 503-514)。亦即，對於抑制型 Fc γ R 有選擇性的結合活性的抗原結合分子，據認為無法形成成為免疫回應之原因的含活性型 Fc γ R 及二分子之 FcRn 之異複合體。

【0358】 作為活性型 Fc γ 受體，含 Fc γ RIa、Fc γ RIb 及 Fc γ RIc 之 Fc γ RI(CD64)、Fc γ RIIa(包括副型 R131 及 H131)以及含構造同型 Fc γ RIIIa(包括副型 V158 及 F158)及 Fc γ RIIIb(包括副型

Fc γ RIIIb-NA1 及 Fc γ RIIIb-NA2)之 Fc γ RIII(CD16)為理想例。又，Fc γ RIIb(包括 Fc γ RIIb-1 及 Fc γ RIIb-2)為抑制型 Fc γ 受體之理想例。

【0359】 本說明書中，對抑制型 Fc γ R 之結合活性高於對活性型 Fc γ 受體之結合活性，係指 Fc 區改變體對 Fc γ RIIb 之結合活性，高於對 Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIIa 及/或 Fc γ RIIIb 中之任一者之人類 Fc γ 受體之結合活性。例如：依據上述解析方法，含 Fc 區改變體之抗原結合分子對 Fc γ RIIb 之結合活性，顯示對 Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIIa 及/或 Fc γ RIIIb 中之任一者之人類 Fc γ 受體之結合活性之 105%以上，較佳為 110%以上、120%以上、130%以上、140%以上，尤佳為 150%以上、160%以上、170%以上、180%以上、190%以上、200%以上、250%以上、300%以上、350%以上、400%以上、450%以上、500%以上、750%以上、10 倍以上、20 倍以上、30 倍以上、40 倍以上、50 倍以上之結合活性。

【0360】 對 Fc γ RIIb 之結合活性高於 Fc γ RIa、Fc γ RIIa(包括副型 R131 及 H131)及 Fc γ RIIIa(包括副型 V158 及 F158)最佳。Fc γ RIa 對天然型 IgG1 之親和性極高，所以，據認為在活體內由於大量內因性 IgG1 使結合飽和，因此，即使對 Fc γ RIIb 之結合活性高於 Fc γ RIIa 及 Fc γ RIIIa、低於 Fc γ RIa，仍會抑制該複合體形成。

【0361】 作為對照之含 Fc 區之抗原結合分子，可適當使用具有 IgG 單株抗體之 Fc 區之抗原結合分子。該 Fc 區之結構，記載於序列編號：5(RefSeq 註冊編號 AAC82527.1 之 N 末端有

A 加成)、6(RefSeq 註冊編號 AAB59393.1 之 N 末端有 A 加成)、7(RefSeq 註冊編號 CAA27268.1)、8(RefSeq 註冊編號 AAB59394.1 之 N 末端有 A 加成)。又，當使用含特定之構造同型之抗體之 Fc 區之抗原結合分子作為待測物質使用的情形，藉由將具有該特定構造同型之 IgG 單株抗體之 Fc 區之抗原結合分子作為對照，可驗證由於該含 Fc 區之抗原結合分子所致之對 Fc γ 受體之結合活性之效果。以上述方式，可適當選擇含有已驗證對 Fc γ 受體之結合活性為高之 Fc 區之抗原結合分子。

【0362】 本發明之一非限定態樣中，作為對抑制型 Fc γ R 有選擇性結合活性之 Fc 區之例，可列舉前述 Fc 區之胺基酸中之 EU 編號表示之 238 或 328 之胺基酸改變為與天然型 Fc 區相異之胺基酸之 Fc 區為理想例。又，作為對抑制型 Fc γ 受體有選擇性結合活性之 Fc 區，US2009/0136485 記載之 Fc 區或改變也可適當選擇。

【0363】 又，本發明之一非限定態樣中，係前述 Fc 區之 EU 編號表示之胺基酸且 EU 編號表示之 238 之胺基酸改變為 Asp、或 328 之胺基酸改變為 Glu 中之任一者以上之 Fc 區為理想例。

【0364】 又，本發明之一非限定態樣中，EU 編號表示之 238 位之 Pro 取代為 Asp、及 EU 編號表示之 237 位之胺基酸為 Trp、EU 編號表示之 237 位之胺基酸為 Phe、EU 編號表示之 267 位之胺基酸為 Val、EU 編號表示之 267 位之胺基酸為 Gln、EU 編號表示之 268 位之胺基酸為 Asn、EU 編號表示之 271 位之胺基酸為 Gly、EU 編號表示之 326 位之胺基酸為 Leu、EU 編

號表示之 326 位之胺基酸為 Gln、EU 編號表示之 326 位之胺基酸為 Glu、EU 編號表示之 326 位之胺基酸為 Met、EU 編號表示之 239 位之胺基酸為 Asp、EU 編號表示之 267 位之胺基酸為 Ala、EU 編號表示之 234 位之胺基酸為 Trp、EU 編號表示之 234 位之胺基酸為 Tyr、EU 編號表示之 237 位之胺基酸為 Ala、EU 編號表示之 237 位之胺基酸為 Asp、EU 編號表示之 237 位之胺基酸為 Glu、EU 編號表示之 237 位之胺基酸為 Leu、EU 編號表示之 237 位之胺基酸為 Met、EU 編號表示之 237 位之胺基酸為 Tyr、EU 編號表示之 330 位之胺基酸為 Lys、EU 編號表示之 330 位之胺基酸為 Arg、EU 編號表示之 233 位之胺基酸為 Asp、EU 編號表示之 268 位之胺基酸為 Asp、EU 編號表示之 268 位之胺基酸為 Glu、EU 編號表示之 326 位之胺基酸為 Asp、EU 編號表示之 326 位之胺基酸為 Ser、EU 編號表示之 326 位之胺基酸為 Thr、EU 編號表示之 323 位之胺基酸為 Ile、EU 編號表示之 323 位之胺基酸為 Leu、EU 編號表示之 323 位之胺基酸為 Met、EU 編號表示之 296 位之胺基酸為 Asp、EU 編號表示之 326 位之胺基酸為 Ala、EU 編號表示之 326 位之胺基酸為 Asn、EU 編號表示之 330 位之胺基酸為 Met 中之任一者以上之經改變的 Fc 區為理想例。

【0365】 (態樣 3) 含有構成 Fc 區之二條多胜肽其中之一在 pH 中性域之條件下對 FcRn 有結合活性且另一在 pH 中性域之條件下對 FcRn 無結合能力活性之 Fc 區的抗原結合分子

【0366】 態樣 3 之抗原結合分子，能藉由一分子之 FcRn 與一分子之 Fc γ R 結合而形成三者複合體，但是不形成包含二分

子之 FcRn 與一分子之 FcγR 之四者異複合體。本態樣 3 之抗原結合分子含有之構成 Fc 區之二條多胜肽其中之一在 pH 中性域之條件下對 FcRn 有結合活性且另一在 pH 中性域之條件下對 FcRn 無結合能力活性之 Fc 區，可適當使用將雙專一性抗體 (bispecific 抗體) 作為起源之 Fc 區。雙專一性抗體，係對相異抗原具有專一性之二種類之抗體。IgG 型之雙專一性抗體，可藉由使將 2 種產生 IgG 抗體之融合瘤融合而產生之混成融合瘤 (hybrid hybridoma)(quadroma) 分泌 (Milstein 等人 (Nature (1983) 305, 537-540)。

【0367】 當上述態樣 3 之抗原結合分子係使用前述抗體項目記載之重組方法製造的情形，可採用將編碼為構成目的之二種 Fc 區之多胜肽之基因導入細胞並使此等共同表現的方法。但是製造的 Fc 區，會成為以 2 : 1 : 1 之分子數比例存在以下分子之混合物，即：構成 Fc 區之二條多胜肽其中之一在 pH 中性域之條件下對 FcRn 有結合活性且另一多胜肽於 pH 中性域之條件下對 FcRn 無結合能力活性之 Fc 區、構成 Fc 區之二條多胜肽均在 pH 中性域之條件下對 FcRn 有結合活性之 Fc 區、構成 Fc 區之二條多胜肽均在 pH 中性域之條件下對 FcRn 無結合活性之 Fc 區。難以從 3 種 IgG 精製出含有目的組合之 Fc 區之抗原結合分子。

【0368】 當使用如此的重組方法製造態樣 3 之抗原結合分子時，可藉由對構成 Fc 區之 CH3 分域施以適當胺基酸取代之改變，而優先分泌含有異質組合之 Fc 區的抗原結合分子。具體而言，將存在於其中一重鏈之 CH3 分域的胺基酸側鏈取代

為較大側鏈(knob(「突起」之意))，並將存在於另一重鏈之 CH3 分域的胺基酸側鏈取代為較小側鏈(hole(「空隙」之意))，藉此使突起能配置於空隙內，而引起異種重鏈形成之促進及同種重鏈形成之妨害的方法(WO1996/027011、Ridgway 等人(Protein Engineering (1996) 9, 617-621)、Merchant 等人(Nat. Biotech. (1998) 16, 677-681))。

【0369】 又，也已知將利用多胜肽之組合、或多胜肽構成之異種多聚物之組合之控制方法用在構成 Fc 區之二條多胜肽之組合而製作雙專一性抗體之技術。亦即，可採用藉由改變形成構成 Fc 區之二條多胜肽內之界面之胺基酸殘基以控制使具相同序列之構成 Fc 區之多胜肽之組合受抑制且形成序列相異之二條構成 Fc 區之多胜肽之組合體的方法於雙專一性抗體之製作 (WO2006/106905)。具體而言，在前述雙專一性抗體及其製作方法之項目記載之方法，於製造本發明之態樣 3 之抗原結合分子時可作為一非限定態樣。

【0370】 此等態樣 1~3 之抗原結合分子，相較於能形成四者複合體之抗原結合分子，均可期待使免疫原性下降、及血漿中滯留性提高。

【0371】 抗原結合分域之製造方法

本發明提供於標的組織專一性的化合物存在時對抗原之結合活性高於該化合物不存在時對抗原之結合活性之抗原結合分域之製造方法。

【0372】 亦即，本發明提供一種抗原結合分域之製造方法，包含以下(a)~(e)之步驟；

(a) 獲得標的組織專一性的化合物不存在時抗原結合分域之抗原結合活性

(b) 獲得標的組織專一性的化合物存在時抗原結合分域之抗原結合活性

(c) 選擇標的組織專一性的化合物不存在時之抗原結合活性低於該化合物存在時之抗原結合活性之抗原結合分域

(d) 培養導入有將編碼為(c)選擇之抗原結合分域之聚核苷酸以可作用地連結之載體的細胞，及

(e) 從(d)培養之細胞之培養液回收抗原結合分域。

【0373】 又，本發明提供一種抗原結合分域之製造方法，包含(a)~(e)之步驟；

(a) 獲得存在低濃度標的組織專一性的化合物時抗原結合分域之抗原結合活性

(b) 獲得存在高濃度標的組織專一性的化合物時抗原結合分域之抗原結合活性

(c) 選擇存在低濃度標的組織專一性的化合物時之抗原結合活性低於該化合物以高濃度存在時之抗原結合活性之抗原結合分域

(d) 培養導入有將編碼為(c)選擇之抗原結合分域之聚核苷酸以可作用地連結之載體的細胞，及

(e) 從(d)培養之細胞之培養液回收抗原結合分域。

【0374】 再者，本發明提供一種抗原結合分域之製造方法，包含以下(a)~(e)之步驟；

(a) 於標的組織專一性的化合物存在時使抗原結合分域

或此等之庫與抗原接觸、

(b) 將前述步驟(a)與抗原結合之抗原結合分域放置於該化合物不存在下

(c) 單離於前述步驟(b)解離之抗原結合分域

(d) 培養導入有將編碼為(c)選擇之抗原結合分域之聚核苷酸以可作用地連結之載體的細胞，及

(e) 從(d)培養之細胞之培養液回收抗原結合分域。

【0375】 再者，本發明提供一種抗原結合分域之製造方法，包含以下(a)~(e)之步驟；

(a) 於存在高濃度標的組織專一性的化合物時使抗原結合分域或此等之庫與抗原接觸、

(b) 將於前述步驟(a)與抗原結合之抗原結合分域放置於該化合物低濃度存在下

(c) 單離於前述步驟(b)解離之抗原結合分域

(d) 培養導入有將編碼為(c)選擇之抗原結合分域之聚核苷酸以可作用地連結之載體的細胞，及

(e) 從(d)培養之細胞之培養液回收抗原結合分域。

【0376】 又，本發明提供一種抗原結合分域之製造方法，包含以下(a)~(f)之步驟；

(a) 於標的組織專一性的化合物不存在下使抗原結合分域之庫與抗原接觸

(b) 選擇於前述步驟(a)未與抗原結合之抗原結合分域

(c) 使於前述步驟(b)選擇之抗原結合分域於該化合物存在下與抗原結合

(d) 單離於前述步驟(c)與抗原結合之抗原結合分域

(d) 培養導入有將編碼為(c)選擇之抗原結合分域之聚核苷酸以可作用地連結之載體的細胞，及

(e) 從(d)培養之細胞之培養液回收抗原結合分域。

【0377】 又，本發明提供一種抗原結合分域之製造方法，包含以下(a)~(f)之步驟；

(a) 於標的組織專一性的化合物低濃度存在下使抗原結合分域之庫與抗原接觸

(b) 選擇於前述步驟(a)未與抗原結合之抗原結合分域

(c) 使於前述步驟(b)選擇之抗原結合分域於該化合物高濃度存在下與抗原結合

(d) 單離於前述步驟(c)與抗原結合之抗原結合分域

(e) 培養導入有將編碼為(d)選擇之抗原結合分域之聚核苷酸以可作用地連結之載體的細胞，及

(f) 從(e)培養之細胞之培養液回收抗原結合分域。

【0378】 再者，本發明提供一種抗原結合分域之製造方法，包含以下(a)~(e)之步驟；

(a) 於標的組織專一性的化合物存在下使抗原結合分域之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域於該化合物不存在下從管柱溶出

(c) 單離於前述步驟(b)溶出之抗原結合分域

(d) 培養導入有將編碼為(c)選擇之抗原結合分域之聚核苷酸以可作用地連結之載體的細胞，及

(e) 從(d)培養之細胞之培養液回收抗原結合分域。

【0379】 再者，本發明提供一種抗原結合分域之製造方法，包含以下(a)~(e)之步驟；

(a) 於標的組織專一性的化合物高濃度存在下使抗原結合分域之庫接觸固定有抗原之管柱

(b) 使於前述步驟(a)已與管柱結合之抗原結合分域於該化合物低濃度存在下從管柱溶出

(c) 單離於前述步驟(b)溶出之抗原結合分域

(d) 培養導入有將編碼為(c)選擇之抗原結合分域之聚核苷酸以可作用地連結之載體的細胞，及

(e) 從(d)培養之細胞之培養液回收抗原結合分域。

【0380】 再者，本發明提供一種抗原結合分域之製造方法，包含以下(a)~(f)之步驟；

(a) 於標的組織專一性的化合物不存在下使抗原結合分域之庫通過固定有抗原之管柱

(b) 回收於前述步驟(a)未與管柱結合而是溶出之抗原結合分域

(c) 使於前述步驟(b)回收之抗原結合分域於該化合物存在下與抗原結合

(d) 單離於前述步驟(c)與抗原結合之抗原結合分域

(e) 培養導入有將編碼為(d)選擇之抗原結合分域之聚核苷酸以可作用地連結之載體的細胞，及

(f) 從(e)培養之細胞之培養液回收抗原結合分域。

【0381】 再者，本發明提供一種抗原結合分域之製造方

法，包含以下(a)~(f)之步驟；

(a) 於標的組織專一性的化合物低濃度存在下使抗原結合分域之庫通過固定有抗原之管柱

(b) 回收於前述步驟(a)未與管柱結合而是溶出之抗原結合分域

(c) 使於前述步驟(b)回收之抗原結合分域於該化合物高濃度存在下與抗原結合

(d) 單離於前述步驟(c)與抗原結合之抗原結合分域

(e) 培養導入有將編碼為(d)選擇之抗原結合分域之聚核苷酸以可作用地連結之載體的細胞，及

(f) 從(e)培養之細胞之培養液回收抗原結合分域。

【0382】 再者，本發明提供一種抗原結合分域之製造方法，包含以下(a)~(f)之步驟；

(a) 於標的組織專一性的化合物存在下使抗原結合分域之庫與抗原接觸

(b) 取得於前述步驟(a)已與抗原結合之抗原結合分域

(c) 將於前述步驟(b)取得之抗原結合分域放置於化合物不存在下

(d) 單離於前述步驟(c)之抗原結合活性弱於在前述步驟(b)選擇之基準之抗原結合分域

(e) 培養導入有將編碼為(d)選擇之抗原結合分域之聚核苷酸以可作用地連結之載體的細胞，及

(f) 從(e)培養之細胞之培養液回收抗原結合分域。

【0383】 再者，本發明提供一種抗原結合分域之製造方

法，包含以下(a)~(f)之步驟；

(a) 於標的組織專一性的化合物高濃度存在下使抗原結合分域之庫與抗原接觸

(b) 取得於前述步驟(a)已與抗原結合之抗原結合分域

(c) 將於前述步驟(b)取得之抗原結合分域放置於化合物低濃度存在下

(d) 單離於前述步驟(c)之抗原結合活性弱於在前述步驟(b)選擇之基準之抗原結合分域

(e) 培養導入有將編碼為(d)選擇之抗原結合分域之聚核苷酸以可作用地連結之載體的細胞，及

(f) 從(e)培養之細胞之培養液回收抗原結合分域。

【0384】 「細胞」、「細胞系」及「細胞培養」在本說明書係以相同含意使用，如此的稱呼可包括細胞或細胞系的所有後代。如此，例如：「轉形體」及「轉形細胞」之類的用語，無論繼代數，包括由此而來的一次對象細胞及培養物。又，也可理解為因為故意或偶發性的突異使得所有的後代的DNA的內容並非精確地相同。也包括於起初之轉形細胞篩選出的具有實質相同機能或生物學的活性的變異體的後代。當意圖記載相異稱呼時，從該記載之前後關係應可明白其意圖。使用之細胞，可適當選擇在前述「抗體」項目記載之細胞中之適當者。

【0385】 提及編碼序列之表現時，控制序列係指為了於特定寄主生物以可作用地連結之編碼序列之表現所必要之DNA鹼基序列。例如原核生物的理想控制序列，包括啟動子，視情形有操縱組序列、核糖體結合部位、及不是十分理解之其他之

序列。真核細胞，為了表現編碼序列，利用啟動子、Poly A 化信號及增強子已為公眾所知。

【0386】 關於核酸「可作用地連結」，係指該核酸與其他核酸序列在機能方面有關係。例如，前驅序列(*presequence*)或分泌前導的 DNA，當就某多胜肽之分泌以前驅體蛋白質的形式表現的情形，與該多胜肽之 DNA 以可作用地結合。啟動子或增強子，在其影響某編碼序列之轉錄的情形，與其序列以可作用地連結。或核糖體結合部，在位於其容易轉譯的位置的情形，以可作用地與編碼序列連結。通常，「可作用地連結」，係指結合之 DNA 序列連續，且為分泌前導的情形，連續且位於讀取框內。但增強子不需連續。連結可藉由以適當的限制部位接合而達成。不存在如此之部位之情形，合成寡核苷酸適應子(*adaptor*)或連結子可依習知的慣用方式使用。又，依前述 *Overlap Extension PCR* 之方法也可製作連結的核酸。

【0387】 「接合」係在 2 個核酸片段之間形成磷酸二酯鍵之方法。為了將 2 個片段接合，必需使片段的末端彼此搭配。視情形，該末端在核酸內切酶消化之後立即可有搭配性。但為了適於接合，首先在核酸內切酶消化之後需將一般形成之附著末端改為平滑末端。為了成為平滑末端，將 DNA 於適當緩衝液中於 15°C、於 4 種去氧核糖核苷酸三磷酸之存在下，以 DNA 聚合酶 I 或 T4DNA 聚合酶之 *Klenow* 片段的約 10 單位處理至少 15 分鐘。其次將 DNA 以酚氯仿萃取與乙醇沉澱、或二氧化矽精製精製。待連結之 DNA 片段係以等莫耳量加到溶液中。在該溶液中，加入 ATP、接合酶緩衝液，以外，如 T4DNA 接

合酶之接合酶係就 DNA 0.5 μg 含有約 10 單位。將 DNA 連結到載體的情形，載體首先由適當的限制核酸內切酶以消化作用使成線狀。成為線狀之片段其次以細菌之鹼性磷解酶或小牛腸管之磷解酶處理，而預防在接合之步驟之間之該片段自行接合。

【0388】 本發明之製造方法中，將由上述「標的組織專一性化合物依存性的抗原結合分域」之項目說明之方法選擇之標的組織專一性的化合物存在時對抗原之結合活性高於該化合物不存在時對抗原之結合活性之抗原結合分域予以單離。例如以此方式單離之抗原結合分域係從庫選出的情形，係依後述實施例所記載，將編碼為該抗原結合分域之聚核苷酸利用從噬菌體等病毒依通常之基因放大而單離。又，當如此之經單離之抗原結合分域或抗體係從融合瘤等細胞之培養液選出的情形，如前述抗體之項目所示，係從該細胞將抗體基因等依通常之基因放大單離。

【0389】 抗原結合分子之製造方法

本發明提供標的組織專一性的化合物存在時對抗原之結合活性高於該化合物不存在時對抗原之結合活性之抗原結合分子之製造方法。

【0390】 亦即，本發明提供一種抗原結合分子之製造方法，包含以下(a)~(f)之步驟；

(a) 獲得標的組織專一性的化合物不存在時抗原結合分域之抗原結合活性

(b) 獲得標的組織專一性的化合物存在時抗原結合分域之抗原結合活性

(c) 選擇標的組織專一性的化合物不存在時之抗原結合活性低於該化合物存在時之抗原結合活性之抗原結合分域

(d) 將編碼為(c)選擇之抗原結合分域之聚核苷酸與編碼為含Fc區之多胜肽之聚核苷酸連結

(e) 培養導入有將(d)獲得之聚核苷酸以可作用地連結之載體的細胞，及

(f) 從(e)培養之細胞之培養液回收抗原結合分子。

【0391】 又，本發明提供一種抗原結合分子之製造方法，包含以下(a)~(f)之步驟；

(a) 獲得存在低濃度標的組織專一性的化合物時抗原結合分域之抗原結合活性 (b) 獲得存在高濃度標的組織專一性的化合物時抗原結合分域之抗原結合活性 (c) 選擇存在低濃度標的組織專一性的化合物時之抗原結合活性低於該化合物以高濃度存在時抗原結合活性之抗原結合分域

(d) 將編碼為(c)選擇之抗原結合分域之聚核苷酸與編碼為含Fc區之多胜肽之聚核苷酸連結

(e) 培養導入有將(d)獲得之聚核苷酸以可作用地連結之載體的細胞，及

(f) 從(e)培養之細胞之培養液回收抗原結合分子。

【0392】 再者，本發明提供一種抗原結合分子之製造方法，包含以下(a)~(f)之步驟；

(a) 於標的組織專一性的化合物存在時使抗原結合分域或此等之庫與抗原接觸、

(b) 將前述步驟(a)與抗原結合之抗原結合分域放置於該

化合物不存在下

(c) 單離於前述步驟(b)解離之抗原結合分域

(d) 將編碼為(c)選擇之抗原結合分域之聚核苷酸與編碼為含Fc區之多胜肽之聚核苷酸連結

(e) 培養導入有將(d)獲得之聚核苷酸以可作用地連結之載體的細胞，及

(f) 從(e)培養之細胞之培養液回收抗原結合分子。

【0393】 再者，本發明提供一種抗原結合分子之製造方法，包含以下(a)~(f)之步驟；

(a) 於存在高濃度標的組織專一性的化合物時使抗原結合分域或此等之庫與抗原接觸

(b) 將於前述步驟(a)與抗原結合之抗原結合分域放置於該化合物低濃度存在下

(c) 單離於前述步驟(b)解離之抗原結合分域

(d) 將編碼為(c)選擇之抗原結合分域之聚核苷酸與編碼為含Fc區之多胜肽之聚核苷酸連結

(e) 培養導入有將(d)獲得之聚核苷酸以可作用地連結之載體的細胞，及

(f) 從(e)培養之細胞之培養液回收抗原結合分子。

【0394】 又，本發明提供一種抗原結合分子之製造方法，包含以下(a)~(g)之步驟；

(a) 於標的組織專一性的化合物不存在下使抗原結合分域之庫與抗原接觸

(b) 選擇於前述步驟(a)未與抗原結合之抗原結合分域

(c) 使於前述步驟(b)選擇之抗原結合分域於該化合物存在下與抗原結合

(d) 單離於前述步驟(c)與抗原結合之抗原結合分域

(e) 將編碼為(d)選擇之抗原結合分域之聚核苷酸與編碼為含Fc區之多胜肽之聚核苷酸連結

(f) 培養導入有將(e)獲得之聚核苷酸以可作用地連結之載體的細胞，及

(g) 從(f)培養之細胞之培養液回收抗原結合分子。

【0395】 又，本發明提供一種抗原結合分子之製造方法，包含以下(a)~(g)之步驟；

(a) 於標的組織專一性的化合物低濃度存在下使抗原結合分域之庫與抗原接觸

(b) 選擇於前述步驟(a)未與抗原結合之抗原結合分域

(c) 使於前述步驟(b)選擇之抗原結合分域於該化合物高濃度存在下與抗原結合

(d) 單離於前述步驟(c)與抗原結合之抗原結合分域

(e) 將編碼為(d)選擇之抗原結合分域之聚核苷酸與編碼為含Fc區之多胜肽之聚核苷酸連結

(f) 培養導入有將(e)獲得之聚核苷酸以可作用地連結之載體的細胞，及

(g) 從(f)培養之細胞之培養液回收抗原結合分子。

【0396】 再者，本發明提供一種抗原結合分子之製造方法，包含以下(a)~(f)之步驟；

(a) 於標的組織專一性的化合物存在下使抗原結合分域

之庫接觸固定有抗原之管柱

(b) 將於前述步驟(a)已與管柱結合之抗原結合分域於該化合物不存在下從管柱溶出

(c) 單離於前述步驟(b)溶出之抗原結合分域

(d) 將編碼為(c)選擇之抗原結合分域之聚核苷酸與編碼為含Fc區之多胜肽之聚核苷酸連結

(e) 培養導入有將(d)獲得之聚核苷酸以可作用地連結之載體的細胞，及

(f) 從(e)培養之細胞之培養液回收抗原結合分子。

【0397】 再者，本發明提供一種抗原結合分子之製造方法，包含以下(a)~(f)之步驟；

(a) 於標的組織專一性的化合物高濃度存在下使抗原結合分域之庫接觸固定有抗原之管柱

(b) 將於前述步驟(a)與管柱結合之抗原結合分域於該化合物低濃度存在下從管柱溶出

(c) 單離於前述步驟(b)溶出之抗原結合分域

(d) 將編碼為(c)選擇之抗原結合分域之聚核苷酸與編碼為含Fc區之多胜肽之聚核苷酸連結

(e) 培養導入有將(d)獲得之聚核苷酸以可作用地連結之載體的細胞，及

(f) 從(e)培養之細胞之培養液回收抗原結合分子。

【0398】 再者，本發明提供一種抗原結合分子之製造方法，包含以下(a)~(g)之步驟；

(a) 於標的組織專一性的化合物不存在下使抗原結合分

域之庫通過固定有抗原之管柱

(b) 回收於前述步驟(a)未與管柱結合而是溶出之抗原結合分域

(c) 使於前述步驟(b)回收之抗原結合分域於該化合物存在下與抗原結合

(d) 單離於前述步驟(c)與抗原結合之抗原結合分域

(e) 將編碼為(d)選擇之抗原結合分域之聚核苷酸與編碼為含Fc區之多胜肽之聚核苷酸連結

(f) 培養導入有將(e)獲得之聚核苷酸以可作用地連結之載體的細胞，及

(g) 從(f)培養之細胞之培養液回收抗原結合分子。

【0399】 再者，本發明提供一種抗原結合分子之製造方法，包含以下(a)~(g)之步驟：

(a) 於標的組織專一性的化合物低濃度存在下使抗原結合分域之庫通過固定有抗原之管柱

(b) 回收於前述步驟(a)未與管柱結合而是溶出之抗原結合分域

(c) 將於前述步驟(b)回收之抗原結合分域於該化合物高濃度存在下與抗原結合

(d) 單離於前述步驟(c)與抗原結合之抗原結合分域

(e) 將編碼為(d)選擇之抗原結合分域之聚核苷酸與編碼為含Fc區之多胜肽之聚核苷酸連結

(f) 培養導入有將(e)獲得之聚核苷酸以可作用地連結之載體的細胞，及

(g) 從(f)培養之細胞之培養液回收抗原結合分子。

【0400】 再者，本發明提供一種抗原結合分子之製造方法，包含以下(a)~(g)之步驟：

(a) 於標的組織專一性的化合物存在下使抗原結合分域之庫與抗原接觸

(b) 取得於前述步驟(a)與抗原結合之抗原結合分域

(c) 將前述步驟(b)取得之抗原結合分域放置於化合物不存在下

(d) 單離前述步驟(c)之抗原結合活性弱於前述步驟(b)選擇之基準之抗原結合分域

(e) 將編碼為(d)選擇之抗原結合分域之聚核苷酸與編碼為含Fc區之多胜肽之聚核苷酸連結

(f) 培養導入有將(e)獲得之聚核苷酸以可作用地連結之載體的細胞，及

(g) 從(f)培養之細胞之培養液回收抗原結合分子。

【0401】 再者，本發明提供一種抗原結合分子之製造方法，包含以下(a)~(g)之步驟：

(a) 於標的組織專一性的化合物高濃度存在下使抗原結合分域之庫與抗原接觸

(b) 取得於前述步驟(a)與抗原結合之抗原結合分域

(c) 將於前述步驟(b)取得之抗原結合分域放置於化合物低濃度存在下

(d) 單離於前述步驟(c)之抗原結合活性弱於前述步驟(b)選擇之基準之抗原結合分域

(e) 將編碼為(d)選擇之抗原結合分域之聚核苷酸與編碼為含Fc區之多胜肽之聚核苷酸連結

(f) 培養導入有將(e)獲得之聚核苷酸以可作用地連結之載體的細胞，及

(g) 從(f)培養之細胞之培養液回收抗原結合分子。

【0402】 作為對編碼為抗原結合分域之聚核苷酸連結其聚核苷酸序列之Fc區之一非限定態樣，可列舉人類IgG1(序列編號：5)、IgG2(序列編號：6)、IgG3(序列編號：7)、或IgG4(序列編號：8)表示之抗體之不變區含有之Fc區。Fc區，係EU編號表示之約216位之胺基酸之木瓜酶切斷部位之鉸鍊區之N末端起、包含該鉸鍊、CH2及CH3分域之抗體之重鏈不變區之部分。Fc區，可從人類IgG1取得，但不限於IgG之特定次類。

【0403】 又，作為對編碼為抗原結合分域之聚核苷酸連結其聚核苷酸序列之Fc區之一非限定態樣，也可列舉比起天然型人類IgG之Fc區對Fc γ 受體之結合活性，對Fc γ 受體之結合活性較高之Fc區。如此之Fc區，可列舉選自EU編號表示之221位、222位、223位、224位、225位、227位、228位、230位、231位、232位、233位、234位、235位、236位、237位、238位、239位、240位、241位、243位、244位、245位、246位、247位、249位、250位、251位、254位、255位、256位、258位、260位、262位、263位、264位、265位、266位、267位、268位、269位、270位、271位、272位、273位、274位、275位、276位、278位、279位、280

位、281 位、282 位、283 位、284 位、285 位、286 位、288 位、290 位、291 位、292 位、293 位、294 位、295 位、296 位、297 位、298 位、299 位、300 位、301 位、302 位、303 位、304 位、305 位、311 位、313 位、315 位、317 位、318 位、320 位、322 位、323 位、324 位、325 位、326 位、327 位、328 位、329 位、330 位、331 位、332 位、333 位、334 位、335 位、336 位、337 位、339 位、376 位、377 位、378 位、379 位、380 位、382 位、385 位、392 位、396 位、421 位、427 位、428 位、429 位、434 位、436 位及 440 位之群組中之至少一個以上之胺基酸係與序列編號：5、6、7、或 8 表示之抗體之不變區含有之 Fc 區之對應 EU 編號之胺基酸殘基相異之 Fc 區。

【0404】 又，作為前述 Fc 區之一非限定態樣，例如含有序列編號：5、6、7、或 8 表示之抗體之不變區含有之 Fc 區之胺基酸殘基當中，EU 編號表示之：

221 位之胺基酸為 Lys 或 Tyr 中之任一者、

222 位之胺基酸為 Phe、Trp、Glu 或 Tyr 中之任一者、

223 位之胺基酸為 Phe、Trp、Glu 或 Lys 中之任一者、

224 位之胺基酸為 Phe、Trp、Glu 或 Tyr 中之任一者、

225 位之胺基酸為 Glu、Lys 或 Trp 中之任一者、

227 位之胺基酸為 Glu、Gly、Lys 或 Tyr 中之任一者、

228 位之胺基酸為 Glu、Gly、Lys 或 Tyr 中之任一者、

230 位之胺基酸為 Ala、Glu、Gly 或 Tyr 中之任一者、

231 位之胺基酸為 Glu、Gly、Lys、Pro 或 Tyr 中之任一者、

232 位之胺基酸為 Glu、Gly、Lys 或 Tyr 中之任一者、

233 位之胺基酸為 Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

234 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

235 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

236 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

237 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

238 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

239 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

240 位之胺基酸為 Ala、Ile、Met 或 Thr 中之任一者、

241 位之胺基酸為 Asp、Glu、Leu、Arg、Trp 或 Tyr 中之

任一者、

243 位之胺基酸為 Leu、Glu、Leu、Gln、Arg、Trp 或 Tyr 中之任一者、

244 位之胺基酸為 His、

245 位之胺基酸為 Ala、

246 位之胺基酸為 Asp、Glu、His 或 Tyr 中之任一者、

247 位之胺基酸為 Ala、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Thr、Val 或 Tyr 中之任一者、

249 位之胺基酸為 Glu、His、Gln 或 Tyr 中之任一者、

250 位之胺基酸為 Glu 或 Gln 中之任一者、

251 位之胺基酸為 Phe、

254 位之胺基酸為 Phe、Met 或 Tyr 中之任一者、

255 位之胺基酸為 Glu、Leu 或 Tyr 中之任一者、

256 位之胺基酸為 Ala、Met 或 Pro 中之任一者、

258 位之胺基酸為 Asp、Glu、His、Ser 或 Tyr 中之任一者、

260 位之胺基酸為 Asp、Glu、His 或 Tyr 中之任一者、

262 位之胺基酸為 Ala、Glu、Phe、Ile 或 Thr 中之任一者、

263 位之胺基酸為 Ala、Ile、Met 或 Thr 中之任一者、

264 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Trp 或 Tyr 中之任一者、

265 位之胺基酸為 Ala、Leu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

266 位之胺基酸為 Ala、Ile、Met 或 Thr 中之任一者、

267 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

268 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、Gly、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Thr、Val 或 Trp 中之任一者、

269 位之胺基酸為 Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

270 位之胺基酸為 Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Trp 或 Tyr 中之任一者、

271 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

272 位之胺基酸為 Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

273 位之胺基酸為 Phe 或 Ile 中之任一者、

274 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

275 位之胺基酸為 Leu 或 Trp 中之任一者、

276 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

278 位之胺基酸為 Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val 或 Trp 中之任一者、

279 位之胺基酸為 Ala、

280 位之胺基酸為 Ala、Gly、His、Lys、Leu、Pro、Gln、

Trp 或 Tyr 中之任一者、

281 位之胺基酸為 Asp、Lys、Pro 或 Tyr 中之任一者、

282 位之胺基酸為 Glu、Gly、Lys、Pro 或 Tyr 中之任一者、

283 位之胺基酸為 Ala、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Arg 或 Tyr 中之任一者、

284 位之胺基酸為 Asp、Glu、Leu、Asn、Thr 或 Tyr 中之任一者、

285 位之胺基酸為 Asp、Glu、Lys、Gln、Trp 或 Tyr 中之任一者、

286 位之胺基酸為 Glu、Gly、Pro 或 Tyr 中之任一者、

288 位之胺基酸為 Asn、Asp、Glu 或 Tyr 中之任一者、

290 位之胺基酸為 Asp、Gly、His、Leu、Asn、Ser、Thr、Trp 或 Tyr 中之任一者、

291 位之胺基酸為 Asp、Glu、Gly、His、Ile、Gln 或 Thr 中之任一者、

292 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Pro、Thr 或 Tyr 中之任一者、

293 位之胺基酸為 Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

294 位之胺基酸為 Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

295 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

296 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、

Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr 或 Val 中之任一者、

297 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

298 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

299 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

300 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val 或 Trp 中之任一者、

301 位之胺基酸為 Asp、Glu、His 或 Tyr 中之任一者、

302 位之胺基酸為 Ile、

303 位之胺基酸為 Asp、Gly 或 Tyr 中之任一者、

304 位之胺基酸為 Asp、His、Leu、Asn 或 Thr 中之任一者、

305 位之胺基酸為 Glu、Ile、Thr 或 Tyr 中之任一者、

311 位之胺基酸為 Ala、Asp、Asn、Thr、Val 或 Tyr 中之任一者、

313 位之胺基酸為 Phe、

315 位之胺基酸為 Leu、

317 位之胺基酸為 Glu 或 Gln、

318 位之胺基酸為 His、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、

Val 或 Tyr 中之任一者、

320 位之胺基酸為 Asp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Asn、Pro、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

322 位之胺基酸為 Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Pro、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

323 位之胺基酸為 Ile、

324 位之胺基酸為 Asp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

325 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

326 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

327 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

328 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

329 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

330 位之胺基酸為 Cys、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之

任一者、

331 位之胺基酸為 Asp、Phe、His、Ile、Leu、Met、Gln、Arg、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

332 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

333 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Ser、Thr、Val 或 Tyr 中之任一者、

334 位之胺基酸為 Ala、Glu、Phe、Ile、Leu、Pro 或 Thr 中之任一者、

335 位之胺基酸為 Asp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

336 位之胺基酸為 Glu、Lys 或 Tyr 中之任一者、

337 位之胺基酸為 Glu、His 或 Asn 中之任一者、

339 位之胺基酸為 Asp、Phe、Gly、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、Ser 或 Thr 中之任一者、

376 位之胺基酸為 Ala 或 Val 中之任一者、

377 位之胺基酸為 Gly 或 Lys 中之任一者、

378 位之胺基酸為 Asp、

379 位之胺基酸為 Asn、

380 位之胺基酸為 Ala、Asn 或 Ser 中之任一者、

382 位之胺基酸為 Ala 或 Ile 中之任一者、

385 位之胺基酸為 Glu、

392 位之胺基酸為 Thr、

396 位之胺基酸為 Leu、

421 位之胺基酸為 Lys、

427 位之胺基酸為 Asn、

428 位之胺基酸為 Phe 或 Leu 中之任一者、

429 位之胺基酸為 Met、

434 位之胺基酸為 Trp、

436 位之胺基酸為 Ile、或

440 位之胺基酸為 Gly、His、Ile、Leu 或 Tyr 中之任一者之群中選出之至少一個以上之胺基酸之改變的 Fc 區。又，改變之胺基酸數不特別限定，可僅有一處胺基酸改變，也可改變二處以上之胺基酸。二處以上之胺基酸之改變之組合，例如表 1(表 1-1~表 1-3)記載之組合。

【0405】 作為對編碼為抗原結合分域之聚核苷酸連結其聚核苷酸序列之 Fc 區之一非限定態樣，可列舉對抑制型 Fc γ 受體之結合活性高於對活性型 Fc γ 受體之結合活性之 Fc 區。具體而言，作為如此之 Fc 區之一非限定態樣，可列舉對 Fc γ RIIb 之結合活性高於對 Fc γ RIa、Fc γ RIIa、Fc γ RIIIa 及/或 Fc γ RIIIb 中之任一者之人類 Fc γ 受體之結合活性的 Fc 區。

【0406】 又，作為前述 Fc 區之一非限定態樣，例如：序列編號：5、6、7、或 8 表示之抗體之不變區含有之 Fc 區之胺基酸殘基當中，EU 編號表示之 238 或 328 之胺基酸改變為與天然型 Fc 區相異之胺基酸之 Fc 區為理想例。如此之 Fc 區之例，宜為係前述 Fc 區之 EU 編號表示之胺基酸之 EU 編號表示之 238 之胺基酸為 Asp、或 328 之胺基酸為 Glu 中之任一者以上

之 Fc 區為理想例。

【0407】又，前述 Fc 區之一非限定態樣中，PCT/JP2012/054624 例示之 EU 編號表示之 238 位之 Pro 取代為 Asp、及 EU 編號表示之 237 位之胺基酸為 Trp、EU 編號表示之 237 位之胺基酸為 Phe、EU 編號表示之 267 位之胺基酸為 Val、EU 編號表示之 267 位之胺基酸為 Gln、EU 編號表示之 268 位之胺基酸為 Asn、EU 編號表示之 271 位之胺基酸為 Gly、EU 編號表示之 326 位之胺基酸為 Leu、EU 編號表示之 326 位之胺基酸為 Gln、EU 編號表示之 326 位之胺基酸為 Glu、EU 編號表示之 326 位之胺基酸為 Met、EU 編號表示之 239 位之胺基酸為 Asp、EU 編號表示之 267 位之胺基酸為 Ala、EU 編號表示之 234 位之胺基酸為 Trp、EU 編號表示之 234 位之胺基酸為 Tyr、EU 編號表示之 237 位之胺基酸為 Ala、EU 編號表示之 237 位之胺基酸為 Asp、EU 編號表示之 237 位之胺基酸為 Glu、EU 編號表示之 237 位之胺基酸為 Leu、EU 編號表示之 237 位之胺基酸為 Met、EU 編號表示之 237 位之胺基酸為 Tyr、EU 編號表示之 330 位之胺基酸為 Lys、EU 編號表示之 330 位之胺基酸為 Arg、EU 編號表示之 233 位之胺基酸為 Asp、EU 編號表示之 268 位之胺基酸為 Asp、EU 編號表示之 268 位之胺基酸為 Glu、EU 編號表示之 326 位之胺基酸為 Asp、EU 編號表示之 326 位之胺基酸為 Ser、EU 編號表示之 326 位之胺基酸為 Thr、EU 編號表示之 323 位之胺基酸為 Ile、EU 編號表示之 323 位之胺基酸為 Leu、EU 編號表示之 323 位之胺基酸為 Met、EU 編號表示之 296 位之胺基酸為 Asp、EU 編號表示

之 326 位之胺基酸為 Ala、EU 編號表示之 326 位之胺基酸為 Asn、EU 編號表示之 330 位之胺基酸為 Met 中之任一者以上之改變之 Fc 區為理想例。

【0408】 作為對編碼為抗原結合分域之聚核苷酸連結其聚核苷酸序列之 Fc 區之一非限定態樣，可列舉於 pH 酸性域之條件下對 FcRn 有結合活性之 Fc 區。可為如此之改變之胺基酸，例如：國際公開 WO1997/034631 記載之 EU 編號表示之 252 位、254 位、256 位、309 位、311 位、315 位、433 位、及/或 434 位以及與該等胺基酸組合之 253 位、310 位、435 位、及/或 426 位之胺基酸。國際公開 WO2000/042072 所記載，EU 編號表示之 238 位、252 位、253 位、254 位、255 位、256 位、265 位、272 位、286 位、288 位、303 位、305 位、307 位、309 位、311 位、312 位、317 位、340 位、356 位、360 位、362 位、376 位、378 位、380 位、382 位、386 位、388 位、400 位、413 位、415 位、424 位、433 位、434 位、435 位、436 位、439 位及/或 447 位之胺基酸為理想。同樣，作為可如此改變之胺基酸，例如國際公開 WO2002/060919 所記載，EU 編號表示之 251 位、252 位、254 位、255 位、256 位、308 位、309 位、311 位、312 位、385 位、386 位、387 位、389 位、428 位、433 位、434 位及/或 436 位之胺基酸為理想。再者，作為可如此改變之胺基酸，可列舉如國際公開 WO2004/092219 記載，EU 編號表示之 250 位、314 位及 428 位之胺基酸。此外，可為如此改變之胺基酸，例如國際公開 WO2006/020114 所記載，238 位、244 位、245 位、249 位、252 位、256 位、257 位、258 位、260

位、262 位、270 位、272 位、279 位、283 位、285 位、286 位、288 位、293 位、307 位、311 位、312 位、316 位、317 位、318 位、332 位、339 位、341 位、343 位、375 位、376 位、377 位、378 位、380 位、382 位、423 位、427 位、430 位、431 位、434 位、436 位、438 位、440 位、及/或 442 位之胺基酸亦為理想。又，可為如此改變之胺基酸，例如國際公開 WO2010/045193 記載，EU 編號表示之 251 位、252 位、307 位、308 位、378 位、428 位、430 位、434 位及/或 436 位之胺基酸亦為理想。

【0409】 作為前述 Fc 區之一非限定態樣，例如：包含序列編號：5、6、7、或 8 表示之抗體之不變區含有之 Fc 區之胺基酸殘基之中，從 EU 編號表示之：

251 位之胺基酸為 Arg 或 Leu 中之任一者、

252 位之胺基酸為 Phe、Ser、Thr、或 Tyr 中之任一者、

254 位之胺基酸為 Ser 或 Thr 中之任一者、

255 位之胺基酸為 Arg、Gly、Ile、或 Leu 中之任一者、

256 位之胺基酸為 Ala、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、或 Thr 中之任一者、

308 位之胺基酸為 Ile 或 Thr 中之任一者、

309 位之胺基酸為 Pro、

311 位之胺基酸為 Glu、Leu、或 Ser 中之任一者、

312 位之胺基酸為 Ala 或 Asp 中之任一者、

314 位之胺基酸為 Ala 或 Leu 中之任一者、

385 位之胺基酸為 Ala、Arg、Asp、Gly、His、Lys、Ser、

或 Thr 中之任一者、

386 位之胺基酸為 Arg、Asp、Ile、Lys、Met、Pro、Ser、
或 Thr 中之任一者、

387 位之胺基酸為 Ala、Arg、His、Pro、Ser、或 Thr 中之
任一者、

389 位之胺基酸為 Asn、Pro、或 Ser 中之任一者、

428 位之胺基酸為 Leu、Met、Phe、Ser、或 Thr 中之任一
者

433 位之胺基酸為 Arg、Gln、His、Ile、Lys、Pro、或 Ser
中之任一者、

434 位之胺基酸為 His、Phe、或 Tyr 中之任一者、或

436 位之胺基酸為 Arg、Asn、His、Lys、Met、或 Thr 中
之任一者之群組中選出之至少一個以上胺基酸之改變之 Fc
區。上述改變之胺基酸之數不特別限定，可以僅改變一處之胺
基酸，也可改變二處以上之胺基酸。

【0410】 前述於 pH 酸性域之條件下對 FcRn 之結合活性強
於人類 IgG1 之初始 Fc 區之結合活性之 Fc 區之另一非限定態
樣，例如：序列編號：5、6、7、或 8 表示之抗體之不變區含有
之 Fc 區之胺基酸殘基之中 EU 編號表示之 308 位之胺基酸為
Ile、309 位之胺基酸為 Pro、及/或 311 位之胺基酸為 Glu 之 Fc
區。又，該 Fc 區之另一非限定態樣，可列舉包含 308 位之胺
基酸為 Thr、309 位之胺基酸為 Pro、311 位之胺基酸為 Leu、
312 位之胺基酸為 Ala、及/或 314 位之胺基酸為 Ala 之 Fc 區。
又，該改變之又另一非限定態樣，可列舉包含 308 位之胺基酸

為 Ile 或 Thr、309 位之胺基酸為 Pro、311 位之胺基酸為 Glu、Leu、或 Ser、312 位之胺基酸為 Ala、及/或 314 位之胺基酸為 Ala 或 Leu 之 Fc 區。該改變之不同非限定態樣，可列舉包含 308 位之胺基酸為 Thr、309 位之胺基酸為 Pro、311 位之胺基酸為 Ser、312 位之胺基酸為 Asp、及/或 314 位之胺基酸為 Leu 之 Fc 區。

【0411】 前述於 pH 酸性域之條件下對 FcRn 之結合活性強於人類 IgG1 之初始 Fc 區之結合活性之 Fc 區之另一非限定態樣，例如包含序列編號：5、6、7、或 8 表示之抗體之不變區含有之 Fc 區之胺基酸殘基之中 EU 編號表示之 251 位之胺基酸為 Leu、252 位之胺基酸為 Tyr、254 位之胺基酸為 Ser、或 Thr、255 位之胺基酸為 Arg、及/或 256 位之胺基酸為 Glu 之 Fc 區。

【0412】 前述於 pH 酸性域之條件下對 FcRn 之結合活性強於人類 IgG1 之初始 Fc 區之結合活性之 Fc 區之一非限定的不同態樣，包含例如：序列編號：5、6、7、或 8 表示之抗體之不變區含有之 Fc 區之胺基酸殘基之中 EU 編號表示之 428 位之胺基酸為 Leu、Met、Phe、Ser、或 Thr 中之任一者、433 位之胺基酸為 Arg、Gln、His、Ile、Lys、Pro、或 Ser 中之任一者、434 位之胺基酸為 His、Phe、或 Tyr 中之任一者、及/或 436 位之胺基酸為 Arg、Asn、His、Lys、Met、或 Thr 中之任一者之 Fc 區。又，該改變之另一非限定態樣，可列舉包含 428 位之胺基酸為 His 或 Met、及/或 434 位之胺基酸為 His 或 Met 之 Fc 區。

【0413】 前述於 pH 酸性域之條件下對 FcRn 之結合活性強

於人類 IgG1 之初始 Fc 區之結合活性之 Fc 區之非限定之其他不同態樣，例如包含序列編號：5、6、7、或 8 表示之抗體之不變區含有之 Fc 區之胺基酸殘基之中 EU 編號表示之 385 位之胺基酸為 Arg、386 位之胺基酸為 Thr、387 位之胺基酸為 Arg、及/或 389 位之胺基酸為 Pro 之改變。又，該改變之另一非限定態樣，例如包含 385 位之胺基酸為 Asp、386 位之胺基酸為 Pro 及/或 389 位之胺基酸為 Ser 之 Fc 區。

【0414】 前述於 pH 酸性域之條件下對 FcRn 之結合活性強於人類 IgG1 之初始 Fc 區之結合活性之 Fc 區之另一非限定態樣，例如包含從序列編號：5、6、7、或 8 表示之抗體之不變區含有之 Fc 區之胺基酸殘基之中 EU 編號表示之

250 位之胺基酸為 Gln 或 Glu 中之任一者、或

428 位之胺基酸為 Leu 或 Phe 中之任一者、

之群組中選出之至少一個以上之胺基酸之 Fc 區。

【0415】 前述於 pH 酸性域之條件下對 FcRn 之結合活性強於人類 IgG1 之初始 Fc 區之結合活性之 Fc 區之另一非限定態樣，例如包含序列編號：5、6、7、或 8 表示之抗體之不變區含有之 Fc 區之胺基酸殘基之中 EU 編號表示之 250 位之胺基酸為 Gln、及/或 428 位之胺基酸為 Leu 或 Phe 中之任一者之 Fc 區。又，作為該改變之另一非限定態樣，可列舉包含 250 位之胺基酸為 Glu、及/或 428 位之胺基酸為 Leu 或 Phe 中之任一者之 Fc 區。

【0416】 前述於 pH 酸性域之條件下對 FcRn 之結合活性強於人類 IgG1 之初始 Fc 區之結合活性之 Fc 區之另一非限定態

樣，例如包含從序列編號：5、6、7、或 8 表示之抗體之不變區含有之 Fc 區之胺基酸殘基之中 EU 編號表示之

251 位之胺基酸為 Asp 或 Glu 中之任一者、

252 位之胺基酸為 Tyr、

307 位之胺基酸為 Gln、

308 位之胺基酸為 Pro、

378 位之胺基酸為 Val、

380 位之胺基酸為 Ala、

428 位之胺基酸為 Leu、

430 位之胺基酸為 Ala、或 Lys 中之任一者、

434 位之胺基酸為 Ala、His、Ser、或 Tyr 中之任一者、或

436 位之胺基酸為 Ile、

之群組中選出之至少二個以上之胺基酸之 Fc 區。

【0417】 前述於 pH 酸性域之條件下對 FcRn 之結合活性強於人類 IgG1 之初始 Fc 區之結合活性之 Fc 區之另一非限定態樣，例如包含序列編號：5、6、7、或 8 表示之抗體之不變區含有之 Fc 區之胺基酸殘基之中 EU 編號表示之 307 位之胺基酸為 Gln、及 434 位之胺基酸為 Ala 或 Ser 中之任一者之 Fc 區。又，作為該 Fc 區之另一非限定態樣，可列舉包含 308 位之胺基酸為 Pro、及 434 位之胺基酸為 Ala 之 Fc 區。又，該 Fc 區之又另一非限定態樣，可列舉包含 252 位之胺基酸為 Tyr、及 434 位之胺基酸為 Ala 之 Fc 區。作為該 Fc 區之一不同的非限定態樣，可列舉包含 378 位之胺基酸為 Val、及 434 位之胺基酸為 Ala 之 Fc 區。作為該 Fc 區之又另一不同的非限定態樣，

可列舉包含 428 位之胺基酸為 Leu、及 434 位之胺基酸為 Ala 之改變。又，作為該 Fc 區之又另一不同的非限定態樣，可列舉包含 434 位之胺基酸為 Ala、及 436 位之胺基酸為 Ile 之 Fc 區。再者，作為該改變之又另一非限定態樣，可列舉包含 308 位之胺基酸為 Pro、及 434 位之胺基酸為 Tyr 之 Fc 區。再者，該改變之又另一非限定態樣，可列舉包含 307 位之胺基酸為 Gln、及 436 位之胺基酸為 Ile 之 Fc 區。

【0418】 前述於 pH 酸性域之條件下對 FcRn 之結合活性強於人類 IgG1 之初始 Fc 區之結合活性之 Fc 區之另一非限定態樣，例如包含序列編號：5、6、7、或 8 表示之抗體之不變區含有之 Fc 區之胺基酸殘基之中 EU 編號表示之 307 位之胺基酸為 Gln、380 位之胺基酸為 Ala、及 434 位之胺基酸為 Ser 中之任一者之 Fc 區。又，作為該 Fc 區之另一非限定態樣，例如包含 307 位之胺基酸為 Gln、380 位之胺基酸為 Ala、及 434 位之胺基酸為 Ala 之 Fc 區。又，作為該 Fc 區之又另一非限定態樣，例如包含 252 位之胺基酸為 Tyr、308 位之胺基酸為 Pro、及 434 位之胺基酸為 Tyr 之 Fc 區。作為該 Fc 區之一不同非限定態樣，例如包含 251 位之胺基酸為 Asp、307 位之胺基酸為 Gln、及 434 位之胺基酸為 His 之 Fc 區。

【0419】 前述於 pH 酸性域之條件下對 FcRn 之結合活性強於人類 IgG1 之初始 Fc 區之結合活性之 Fc 區之另一非限定態樣，例如包含從序列編號：5、6、7、或 8 表示之抗體之不變區含有之 Fc 區之胺基酸殘基之中、EU 編號表示之、EU 編號表示之、

238 位之胺基酸為 Leu、

244 位之胺基酸為 Leu、

245 位之胺基酸為 Arg、

249 位之胺基酸為 Pro、

252 位之胺基酸為 Tyr、

256 位之胺基酸為 Pro、

257 位之胺基酸為 Ala、Ile、Met、Asn、Ser、或 Val 中之任一者、

258 位之胺基酸為 Asp、

260 位之胺基酸為 Ser、

262 位之胺基酸為 Leu、

270 位之胺基酸為 Lys、

272 位之胺基酸為 Leu、或 Arg 中之任一者、

279 位之胺基酸為 Ala、Asp、Gly、His、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Trp、或 Tyr 中之任一者、

283 位之胺基酸為 Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Trp、或 Tyr 中之任一者、

285 位之胺基酸為 Asn、

286 位之胺基酸為 Phe、

288 位之胺基酸為 Asn、或 Pro 中之任一者、

293 位之胺基酸為 Val、

307 位之胺基酸為 Ala、Glu、或 Met 中之任一者、

311 位之胺基酸為 Ala、Ile、Lys、Leu、Met、Val、或 Trp

中之任一者、

312 位之胺基酸為 Pro、

316 位之胺基酸為 Lys、

317 位之胺基酸為 Pro、

318 位之胺基酸為 Asn、或 Thr 中之任一者、

332 位之胺基酸為 Phe、His、Lys、Leu、Met、Arg、Ser、

或 Trp 中之任一者、

339 位之胺基酸為 Asn、Thr、或 Trp 中之任一者、

341 位之胺基酸為 Pro、

343 位之胺基酸為 Glu、His、Lys、Gln、Arg、Thr、或 Tyr

中之任一者、

375 位之胺基酸為 Arg、

376 位之胺基酸為 Gly、Ile、Met、Pro、Thr、或 Val 中之任一者、

377 位之胺基酸為 Lys、

378 位之胺基酸為 Asp、或 Asn 中之任一者、

380 位之胺基酸為 Asn、Ser、或 Thr 中之任一者、

382 位之胺基酸為 Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、或 Tyr 中之任一者、

423 位之胺基酸為 Asn、

427 位之胺基酸為 Asn、

430 位之胺基酸為 Ala、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、或 Tyr 中之任一者、

431 位之胺基酸為 His、或 Asn 中之任一者、

434 位之胺基酸為 Phe、Gly、His、Trp、或 Tyr 中之任一者、

436 位之胺基酸為 Ile、Leu、或 Thr 中之任一者、

438 位之胺基酸為 Lys、Leu、Thr、或 Trp 中之任一者、

440 位之胺基酸為 Lys、或、

442 位之胺基酸為 Lys、

之群組中選出之至少一個以上之胺基酸之改變。又，改變之胺基酸之數不特別限定，可以僅改變二處胺基酸，也可改變三處以上之胺基酸。

【0420】 前述於 pH 酸性域之條件下對 FcRn 之結合活性強於人類 IgG1 之初始 Fc 區之結合活性之 Fc 區之另一非限定態樣，例如：包含序列編號：5、6、7、或 8 表示之抗體之不變區含有之 Fc 區之胺基酸殘基之中、EU 編號表示之、257 位之胺基酸為 Ile、及 311 位之胺基酸為 Ile 之 Fc 區。又，作為該 Fc 區之另一非限定態樣，例如包含 257 位之胺基酸為 Ile、及 434 位之胺基酸為 His 之 Fc 區。又，該 Fc 區之又另一非限定態樣，可列舉包含 376 位之胺基酸為 Val、及 434 位之胺基酸為 His 之 Fc 區。

【0421】 作為對編碼為抗原結合分域之聚核苷酸連結其聚核苷酸序列之 Fc 區之一非限定態樣，可列舉於 pH 中性域之條件下對人類 FcRn 有結合活性之 Fc 區。pH 中性域對人類 FcRn 有結合活性之 Fc 區，例如包含從序列編號：5、6、7、或 8 表示之抗體之不變區含有之 Fc 區之胺基酸殘基之中 EU 編號表示之 221 位~225 位、227 位、228 位、230 位、232 位、233 位~241

位、243 位~252 位、254 位~260 位、262 位~272 位、274 位、276 位、278 位~289 位、291 位~312 位、315 位~320 位、324 位、325 位、327 位~339 位、341 位、343 位、345 位、360 位、362 位、370 位、375 位~378 位、380 位、382 位、385 位~387 位、389 位、396 位、414 位、416 位、423 位、424 位、426 位~438 位、440 位及 442 位之群組中選出之至少一個以上之胺基酸經取代之 Fc 區。

【0422】 前述 pH 中性域之條件下對有 FcRn 結合活性之 Fc 區之另一非限定態樣，例如包含從序列編號：5、6、7、或 8 表示之抗體之不變區含有之 Fc 區之胺基酸殘基之中 EU 編號表示之 237 位、248 位、250 位、252 位、254 位、255 位、256 位、257 位、258 位、265 位、286 位、289 位、297 位、298 位、303 位、305 位、307 位、308 位、309 位、311 位、312 位、314 位、315 位、317 位、332 位、334 位、360 位、376 位、380 位、382 位、384 位、385 位、386 位、387 位、389 位、424 位、428 位、433 位、434 位及 436 位之胺基酸經取代之 Fc 區。藉由將從該等胺基酸選擇之至少 1 個胺基酸取代為其他胺基酸，能使抗原結合分子含有之 Fc 區在 pH 中性域對人類 FcRn 結合。

【0423】 前述 pH 中性域之條件下對 FcRn 有結合活性之 Fc 區之另一非限定態樣，例如包含從 EU 編號表示之：

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 中之任一者、

252 位之胺基酸為 Phe、Trp、或 Tyr 中之任一者、

254 位之胺基酸為 Thr、

255 位之胺基酸為 Glu、

256 位之胺基酸為 Asp、Asn、Glu、或 Gln 中之任一者、

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

Thr、或 Val 中之任一者、

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 中之任一者、

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 中之
任一者、

308 位之胺基酸為 Ala、Phe、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、
或 Thr 中之任一者、

309 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Pro、或 Arg 中之任一
者、

311 位之胺基酸為 Ala、His、或 Ile 中之任一者、

312 位之胺基酸為 Ala 或 His 中之任一者、

314 位之胺基酸為 Lys 或 Arg 中之任一者、

- 315 位之胺基酸為 Ala、Asp 或 His 中之任一者、
- 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 中之任一者、
- 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 中之任一者、
- 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 中之任一
者、
- 433 位之胺基酸為 Lys、
- 434 位之胺基酸為 Ala、Phe、His、Ser、Trp、或 Tyr 中之
任一者、或
- 436 位之胺基酸為 His、Ile、Leu、Phe、Thr、或 Val、
之群組中選出之至少一個以上之胺基酸之 Fc 區。又，改
變之胺基酸數不特別限定，可僅改變一處胺基酸，也可改變二
處以上之胺基酸。該等胺基酸之改變之組合，例如表 2-1~2-33

所示之胺基酸之改變。

【0424】 作為對編碼為抗原結合分域之聚核苷酸連結其聚核苷酸序列之 Fc 區之一非限定態樣，可列舉對活性型 Fc γ R 之結合活性低於天然型 Fc 區對活性型 Fc γ R 之結合活性的 Fc 區。作為該 Fc 區之另一非限定態樣，可列舉 EU 編號表示之、EU 編號表示之 234、235、236、237、238、239、270、297、298、325、328、及 329 中之任一者以上之胺基酸改變為與例如：序列編號：5、6、7、或 8 表示之天然型 Fc 區相異之胺基酸的 Fc 區為理想例，但 Fc 區之改變不限於上述改變，也可為例如 Cur. Opin. in Biotech. (2009) 20 (6), 685-691 記載之脫糖鏈 (N297A, N297Q) 、 IgG1-L234A/L235A 、 IgG1-A325A/A330S/P331S 、 IgG1-C226S/C229S 、 IgG1-C226S/C229S/E233P/L234V/L235A 、 IgG1-L234F/L235E/P331S 、 IgG1-S267E/L328F 、 IgG2-V234A/G237A 、 IgG2-H268Q/V309L/A330S/A331S 、 IgG4-L235A/G237A/E318A、IgG4-L236E 等改變、及國際公開 WO2008/092117 記載之 G236R/L328R、L235G/G236R、N325A/L328R、N325L/L328R 等改變、及 EU 編號 233 位、234 位、235 位、237 位中插入胺基酸、國際公開 WO2000/042072 記載之部位之改變。

【0425】 作為對前述活性型 Fc γ R 之結合活性低於天然型 Fc 區對活性型 Fc γ R 之結合活性之 Fc 區之另一非限定態樣，可列舉包含從 EU 編號表示之、

234 位之胺基酸為 Ala、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、

His、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr 或 Trp 中之任一者、

235 位之胺基酸為 Ala、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Met、Pro、Ser、Thr、Val 或 Arg 中之任一者、

236 位之胺基酸為 Arg、Asn、Gln、His、Leu、Lys、Met、Phe、Pro 或 Tyr 中之任一者、

237 位之胺基酸為 Ala、Asn、Asp、Gln、Glu、His、Ile、Leu、Lys、Met、Pro、Ser、Thr、Val、Tyr 或 Arg 中之任一者、

238 位之胺基酸為 Ala、Asn、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Thr、Trp 或 Arg 中之任一者、

239 位之胺基酸為 Gln、His、Lys、Phe、Pro、Trp、Tyr 或 Arg 中之任一者、

265 位之胺基酸為 Ala、Arg、Asn、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr 或 Val 中之任一者、

266 位之胺基酸為 Ala、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp 或 Tyr 中之任一者、

267 位之胺基酸為 Arg、His、Lys、Phe、Pro、Trp 或 Tyr 中之任一者、

269 位之胺基酸為 Ala、Arg、Asn、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr 或 Val 中之任一者、

270 位之胺基酸為 Ala、Arg、Asn、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr 或 Val 中之任一者、

271 位之胺基酸為 Arg、His、Phe、Ser、Thr、Trp 或 Tyr

中之任一者、

295 位之胺基酸為 Arg、Asn、Asp、Gly、His、Phe、Ser、Trp 或 Tyr 中之任一者、

296 位之胺基酸為 Arg、Gly、Lys 或 Pro 中之任一者、

297 位之胺基酸為 Ala、

298 位之胺基酸為 Arg、Gly、Lys、Pro、Trp 或 Tyr 中之任一者、

300 位之胺基酸為 Arg、Lys 或 Pro 中之任一者、

324 位之胺基酸為 Lys 或 Pro 中之任一者、

325 位之胺基酸為 Ala、Arg、Gly、His、Ile、Lys、Phe、Pro、Thr、TrpTyr、或 Val 中之任一者、

327 位之胺基酸為 Arg、Gln、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr 或 Val 中之任一者、

328 位之胺基酸為 Arg、Asn、Gly、His、Lys 或 Pro 中之任一者、

329 位之胺基酸為 Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、Val 或 Arg 中之任一者、

330 位之胺基酸為 Pro 或 Ser 中之任一者、

331 位之胺基酸為 Arg、Gly 或 Lys 中之任一者、或

332 位之胺基酸為 Arg、Lys 或 Pro 中之任一者

之群組中選出之至少一個以上之胺基酸之 Fc 區。又，改變之胺基酸數不特別限定，可僅有一處胺基酸改變，也可改變二處以上之胺基酸。

【0426】 本發明之非限定態樣中之抗原結合分子含有之 Fc 區，可適當使用形成將上述雙專一性抗體作為起源之 Fc 區之二條多胜肽。更具體而言可適當使用為形成 Fc 區之二條多胜肽，且特徵為其中一多胜肽之胺基酸序列中之 EU 編號表示之 349 之胺基酸為 Cys、366 之胺基酸為 Trp、且另一多胜肽之胺基酸序列之 EU 編號表示之 356 之胺基酸為 Cys、366 之胺基酸為 Ser、368 之胺基酸為 Ala、407 之胺基酸為 Val 的二條多胜肽。

【0427】 其他本發明之一非限定態樣之 Fc 區，可適當使用為形成 Fc 區之二條多胜肽，且特徵為其中一多胜肽之胺基酸序列中之 EU 編號表示之 409 之胺基酸為 Asp、且另一多胜肽之胺基酸序列中之 EU 編號表示之 399 之胺基酸為 Lys 的二條多胜肽。上述態樣中，也可將 409 之胺基酸從 Asp 替換為 Glu、399 之胺基酸從 Lys 替換為 Arg。又，也可除了 399 之胺基酸之 Lys 以外，追加作為 360 之胺基酸的 Asp 或追加作為 392 之胺基酸的 Asp 為理想。

【0428】 本發明之另一非限定態樣之 Fc 區，可理想地使用係形成 Fc 區之二條多胜肽，且特徵為其中一多胜肽之胺基酸序列中之 EU 編號表示之 370 之胺基酸為 Glu、另一多胜肽之胺基酸序列中之 EU 編號表示之 357 之胺基酸為 Lys 之二條多胜肽。

【0429】 本發明之另一非限定態樣之 Fc 區，可理想地使用係形成 Fc 區之二條多胜肽，且特徵為其中一多胜肽之胺基酸序列中之 EU 編號表示之 439 之胺基酸為 Glu、且另一多胜肽

之胺基酸序列中之 EU 編號表示之 356 之胺基酸為 Lys 之二條多胜肽。

【0430】 本發明之另一非限定態樣之 Fc 區，例如組合此等之以下態樣中之任一者為理想；

(i) 係形成 Fc 區之二條多胜肽，且特徵為其中一多胜肽之胺基酸序列中之 EU 編號表示之 409 之胺基酸為 Asp、370 之胺基酸為 Glu、且另一多胜肽之胺基酸序列中之 EU 編號表示之 399 之胺基酸為 Lys、357 之胺基酸為 Lys 之二條多胜肽(本態樣中，EU 編號表示之 370 之胺基酸之 Glu 也可替換為 Asp、EU 編號表示之 370 之胺基酸之 Glu 也可替換為 392 之胺基酸之 Asp)、

(ii) 係形成 Fc 區之二條多胜肽，且特徵為其中一多胜肽之胺基酸序列中之 EU 編號表示之 409 之胺基酸為 Asp、439 之胺基酸為 Glu、且另一多胜肽之胺基酸序列中之 EU 編號表示之 399 之胺基酸為 Lys、356 之胺基酸為 Lys 之二條多胜肽(本態樣中，EU 編號表示之 439 之胺基酸之 Glu 也可替換為 360 之胺基酸之 Asp、EU 編號表示之 392 之胺基酸之 Asp 或 439 之胺基酸之 Asp)、

(iii) 係形成 Fc 區之二條多胜肽，且特徵為其中一多胜肽之胺基酸序列中之 EU 編號表示之 370 之胺基酸為 Glu、439 之胺基酸為 Glu、且另一多胜肽之胺基酸序列中之 EU 編號表示之 357 之胺基酸為 Lys、356 之胺基酸為 Lys 之二條多胜肽、或

係形成 Fc 區之二條多胜肽，且特徵為其中一多胜肽之胺

基酸序列中之 EU 編號表示之 409 之胺基酸為 Asp、370 之胺基酸為 Glu、439 之胺基酸為 Glu、且另一多胜肽之胺基酸序列中之 EU 編號表示之 399 之胺基酸為 Lys、357 之胺基酸為 Lys、356 之胺基酸為 Lys 之二條多胜肽(本態樣中，EU 編號表示之 370 之胺基酸也可替換為 Glu，又，也可 370 之胺基酸不取代為 Glu，而將 439 之胺基酸之 Glu 替換為 Asp 或 439 之胺基酸之 Glu 替換為 392 之胺基酸之 Asp)。

【0431】 再者，本發明之另一非限定態樣中，也可理想地使用係形成 Fc 區之二條多胜肽且特徵為其中一多胜肽之胺基酸序列中之 EU 編號表示之 356 之胺基酸為 Lys、另一多胜肽之胺基酸序列中之 EU 編號表示之 435 之胺基酸為 Arg、439 之胺基酸為 Glu 的二條多胜肽。

【0432】 再者，本發明之另一非限定態樣中，也可理想地使用係形成 Fc 區之二條多胜肽且特徵為其中一多胜肽之胺基酸序列中之 EU 編號表示之 356 之胺基酸為 Lys、357 之胺基酸為 Lys、另一多胜肽之胺基酸序列中之 EU 編號表示之 370 之胺基酸為 Glu、435 之胺基酸為 Arg、439 之胺基酸為 Glu 之二條多胜肽。

【0433】 以如上述記載方式連結之編碼為抗原結合分域之聚核苷酸及編碼為包含 Fc 區之多胜肽的聚核苷酸利用可作用地連結之所望表現載體轉形而得之細胞之培養液中，可單離本發明之抗原結合分子。

【0434】 本發明之抗原結合分子含有之 Fc 區，係修飾成使該 Fc 區結合之糖鏈之組成係結合有岩藻醣缺損糖鏈之 Fc 區之

比例高、或加成有二分化 N-乙醯基葡糖胺之 Fc 區之比例高之 Fc 區時，作為前述經轉形之細胞，可適當使用接受糖鏈修飾之多胜肽形成糖鏈結構之活性改變使得對於糖鏈加成岩藻醣之能力低之寄主細胞（國際公開 WO2000/061739、WO2002/031140、WO2006/067913 等）。該寄主細胞之一非限定態樣，可適當使用從岩藻糖基轉移酶(EC 2.4.1.152)、岩藻糖轉運蛋白(SLC35C1)、GMD(GDP-甘露糖 4,6-脫水酶)(EC 4.2.1.47)、Fx(GDP-酮-6-去氧甘露糖 3,5-差向異構酶，4-還原酶)(EC 1.1.1.271)、及 GFPP(GDP-β-L-岩藻糖焦磷酸化酶)(EC 2.7.7.30)構成之群中選出之酵素或運送蛋白之活性係缺失之寄主細胞（國際公開 WO2000/061739、WO2002/031140、WO2006/067913 等）。如此之活性缺失之寄主細胞，可藉由將 CHO 細胞、BHK 細胞、NS0 細胞、SP2/0 細胞、YO 骨髓瘤細胞、P3X63 小鼠骨髓瘤細胞、PER 細胞、PER.C6 細胞、HEK293 細胞、或融合瘤細胞等的內在性的機能性蛋白質之基因破壞為無法作用的方法等製作。

【0435】 本發明之抗原結合分子含有之 Fc 區為具有二分化 GlcNAc 之糖鏈之 Fc 區時，作為前述經轉形之細胞，為了製作含二分化 GlcNAc 之糖鏈的抗體，係適當使用表現編碼為具有 GnTIII(β-1,4-甘露糖基-糖蛋白，4-β-N-乙醯基葡萄糖胺基轉移酶)(EC 2.4.1.144)活性或 GalT(β-1,4-半乳糖基轉移酶)(EC 2.4.1.38)活性之機能性蛋白質的基因的寄主細胞(國際公開 WO2002/079255 等)。另一非限定之理想態樣中，係適當使用除了前述機能性蛋白質以外，尚共同表現編碼為具有人類

ManII(甘露糖苷酶 II)(3.2.1.114)活性之機能性蛋白質之基因、編碼為具有 GnTI(β -1,2-乙醯基葡萄糖胺基轉移酶 I)(EC 2.4.1.94)活性之機能性蛋白質之基因、編碼為具有 GnTII(β -1,2-乙醯基葡萄糖胺基轉移酶 II)(EC 2.4.1.143)活性之機能性蛋白質之基因、編碼為具有 ManI(甘露糖苷酶)(EC 3.2.1.113)活性之機能性蛋白質之基因、及 α -1,6-岩藻糖基轉移酶(EC 2.4.1.68)之寄主細胞 (國際公開 WO2004/065540)。

【0436】 使用從上述細胞之培養液單離等依上述抗體之項目記載之抗體之製造方法的方法，可製造本發明之抗原結合分子。前述含 Fc 區之多胜肽之一非限定態樣，例如：序列編號：5、6、7、或 8 表示之抗體之不變區。又，本發明之抗原結合分子之一非限定態樣，例如全長抗體分子。

【0437】 醫藥組合物

依本發明提供一種醫藥組合物，其為了避免副作用且同時發揮藥效，包含於正常組織或血液中不全身性作用，而是於係病變部位之癌或發炎部位作用之抗原結合分子。本發明之醫藥組合物含有之抗原結合分子，由於會與於癌組織中之癌細胞、免疫細胞、基質細胞等表現之抗原、癌組織分泌之抗原、或發炎性組織中之免疫細胞等表現之抗原、發炎性組織分泌之抗原結合，且不與正常組織表現之抗原結合，所以可避免對於正常組織之細胞傷害作用或中和作用等造成副作用，對於癌發揮強大的細胞傷害作用或增殖抑制作用、免疫亢進作用等、或於發炎性組織發揮對發炎性細胞之免疫抑制效果等。例如：包含對癌組織專一性化合物依存性地在 T 細胞表現之 CD3 結合之抗

原結合分域、及與癌細胞表現之 EGFR 結合之抗原結合分域的雙專一性抗原結合分子或雙重抗原結合位之抗原結合分子，不會與正常組織表現之 EGFR 結合，而會與癌細胞表現之 EGFR 結合，所以會避免副作用且同時發揮強大的抗腫瘤效果。亦即，對癌細胞附近之 T 細胞表現的 CD3 會以癌組織專一性化合物依存性的結合，但是對癌細胞附近以外之 T 細胞表現之 CD3 不結合，所以會活化癌細胞附近存在的 T 細胞，且避免副作用，同時發揮強大的抗腫瘤效果。

【0438】 如上，於標的組織與抗原結合，且於其他正常組織或血液中不與抗原結合之抗原結合分子，會避免副作用且同時發揮藥效。本發明提供於活體內之標的組織以高濃度存在之低分子作為開關而與抗原結合之抗原結合分子，亦即，低分子開關抗原結合分子 (Small molecule switch antigen binding molecule)，於該低分子不存在之正常環境不與抗原結合，而於該低分子以高濃度存在之標的組織可與抗原結合。

【0439】 如此之低分子開關抗原結合分子之一非限定態樣，首先，可列舉於癌組織或發炎性組織以高濃度存在且能作為開關功能之癌組織或發炎性組織專一性化合物即腺苷 (adenosine)、腺苷 3 磷酸 (adenosine 5'-triphosphate; ATP)、肌苷 (inosine)、犬尿胺酸、前列腺素 E2 (prostaglandin E2; PGE2)、琥珀酸 (succinic acid)、乳酸 (lactic acid) 夾持於本發明之抗原結合分子 (含有之抗原結合位) 與抗原 (含有之抗原決定部位)，而發揮開關機能之癌組織或發炎性組織專一性的化合物依存性抗原結合分子。若該化合物不存在，本發明之抗

原結合分子所含之抗原結合位與抗原含有之抗原決定部位間之交互作用不夠，本發明之抗原結合分子無法與抗原結合，但若該化合物存在，藉由夾於本發明之抗原結合分子所含之抗原結合位與抗原含有之抗原決定部位之間，於該化合物以高濃度存在之癌組織或發炎性組織等標的組織中與抗原結合之該抗原結合分子能夠對於表現該抗原之細胞發揮藥效。又，成為此開關之化合物之結合係可逆的，故據認為該等化合物之開關所致之本發明之抗原結合分子對抗原之結合之控制係可逆的。如此，在癌組織或發炎性組織等病變部位之癌組織或發炎性組織，與癌細胞或免疫細胞等病態細胞結合或與於癌組織或發炎性組織分泌之抗原結合且可發揮藥效之本發明之抗原結合分子，作為醫藥組合物係有用。本發明之醫藥組合物可包含醫藥上可容許之擔體。

【0440】 本發明中，醫藥組合物係指通常用於疾病之治療或預防、或檢查、診斷用的藥劑。又，本發明中，「包含因應標的組織專一性化合物之濃度而對抗原之結合活性改變之抗原結合分子的醫藥組合物」之用語，也可代換為「包含對於治療對象投予因應標的組織專一性化合物之濃度而對抗原之結合活性改變之抗原結合分子之步驟的疾病之治療方法」，也可代換為「在製造用於治療疾病之醫藥時使用因應標的組織專一性化合物之濃度而對抗原之結合活性改變之抗原結合分子之用途」。又，「包含因應標的組織專一性化合物之濃度而對抗原之結合活性改變之抗原結合分子的醫藥組合物」之用語，也可代換為「為了治療疾病，使用因應標的組織專一性化合物之

濃度而對抗原之結合活性改變化之抗原結合分子」。

【0441】 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：藥理學上可容許之擔體或介質，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。

【0442】 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。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)。

【0443】 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。

【0444】 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、

皮下注射等對全身或局部投予。

【0445】 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。

【0446】 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。

【0447】 又，本說明書引用之所有先前技術文獻納入本說明書作為參考。

【0448】 以下對於本發明於實施例更具體說明，但是本發明不限於此等實施例。

【實施例】

【0449】 [實施例 1]以於標的組織以高濃度存在之低分子作為開關而與抗原結合之抗體之概念

為了避免副作用同時發揮藥效，尋求於正常組織或血液不全身性作用，而是在係病變部位之癌或發炎部位作用之新藥開發技術。投予後與癌細胞表現之抗原結合且無法與在正常組織表現之抗原結合之抗體分子，能避免對於正常組織因為細胞

傷害作用導致之副作用且同時對於癌發揮強大的細胞傷害作用。例如：前述 EGFR-BiTE(非專利文獻 9)係經改變之抗原結合分子，該不與正常組織表現之 EGFR 結合，而與癌細胞表現之 EGFR 結合之分子，能避免副作用且同時發揮強大抗腫瘤效果。又，BiTE 藉由 CD3 補充 T 細胞且活化，以發揮抗腫瘤效果(非專利文獻 8)，所以對於 EGFR-BiTE，若能賦予會與癌細胞附近存在的 T 細胞表現之 CD3 結合，而與癌細胞附近以外存在之 T 細胞表現之 CD3 不結合之性質，則賦予了如此之性質之改變 EGFR-BiTE，能夠將癌之 T 細胞活化，可避免副作用且同時發揮強大的抗腫瘤效果。

【0450】 抗體分子不限於作為對抗癌之抗體醫藥，抗體分子若能在類風濕關節炎中引起發炎之關節之滑膜液中與細胞激素結合並抑制其作用，且不會全身性地抑制，則據認為可避免由於全身性細胞激素之中和造成傳染病風險增大，且同時可對於類風濕關節炎等發炎性疾病，自體免疫疾病發揮高治療效果。

【0451】 如上，於癌組織與抗原結合，且於其他正常組織或血液中不與抗原結合之抗體，能避免副作用且發揮藥效。但是至今為止，尚無具有如此特性之理想抗體被報告。而，以活體內之癌組織中以高濃度存在之低分子作為開關而與抗原結合之抗體分子，亦即，低分子開關抗體(Small molecule switch antibody)，如圖 1，於不存在低分子之環境不與抗原結合，於低分子以高濃度存在之標的組織可與抗原結合。

【0452】 在開發如此之低分子開關抗體時，首先找尋於癌

組織以高濃度存在且據認為能作為開關使用之低分子。其結果，腺苷(adenosine)、腺苷 3 磷酸(adenosine 5'-triphosphate; ATP)、肌苷(inosine)、犬尿胺酸、前列腺素 E2(prostaglandin E2; PGE2)、琥珀酸(succinic acid)、乳酸(lactic acid)作為開關有希望。該等低分子均藉由從癌細胞自體產生、或從細胞死之癌細胞放出、或從於癌組織浸潤之免疫細胞等產生，而於癌組織以高濃度存在，且於正常組織或血液中相較於癌組織以較低濃度存在。該等低分子，如圖 2，若能夾於抗體與抗原之複合體，則該低分子可執行開關功能。亦即，若低分子不存在，抗體與抗原之交互作用不夠，抗體無法與抗原結合，但若低分子存在，藉由夾於抗體與抗原之間，抗體能與抗原結合。換言之，於低濃度低分子存在下，抗體與抗原之交互作用不足，抗體無法與抗原結合，但是於高濃度之低分子存在下藉由夾於抗體與抗原之間，抗體能與抗原結合。又，成為此開關之低分子之結合係可逆的，所以利用該等低分子開關控制抗原結合係可逆的。

【0453】 而，首先嘗試取得對於關於涉及癌細胞之增殖之 IL-6(Br. J. Haematol. (2011) 152 (5), 579-92)之低分子開關抗體。

【0454】 [實施例 2]從使用噬菌體展示技術之人類抗體庫取得於低分子存在下與人類 IL-6 結合之抗體

(2-1)未改變(naïve)人類抗體噬菌體展示庫之製作

將從人類 PBMC 製成之 Poly A RNA、或市售之人類 Poly A RNA 等作為模板，依該技術領域中具有通常知識者公知之方

法，建構由展示彼此互異之人類抗體序列之 Fab 分域之多數噬菌體構成的人類抗體噬菌體展示庫。

【0455】 (2-2) 利用珠粒淘選由庫取得於低分子存在下與人類 IL-6 結合之抗體

從(2-1)建構之未改變人類抗體噬菌體展示庫，進行低分子存在下對抗原顯示結合活性之抗體之篩選。亦即，收集提示對於捕捉在珠粒之抗原於低分子存在下顯示結合活性之抗體的噬菌體。從於低分子不存在之條件從珠粒溶出之噬菌體溶出液回收噬菌體。本取得方法，係使用經生物素標記之人類 IL-6 作為抗原。

【0456】 由保持已構建之噬菌體提示用噬粒之大腸菌產生之噬菌體，係依一般的方法精製。之後，獲得經 TBS 透析處理之噬菌體庫液。對噬菌體庫液添加 BSA，使終濃度為 4%。實施使用於磁珠固定化之抗原的淘選。磁珠使用 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) 或 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)。

【0457】 為了有效率地取得於癌組織能發揮開關作用之低分子依存性的低分子開關抗體，實施濃縮於該等低分子(腺苷(adenosine)、腺苷 3 磷酸(adenosine 5'-triphosphate; ATP)、肌苷(inosine)、犬尿胺酸、前列腺素 E2(prostaglandin E2; PGE2)、琥珀酸(succinic acid)、乳酸(lactic acid))之混合液(以下表示記載為 SC(small molecule cocktail))之存在下與抗原結合且於 SC 不存在下不與抗原結合之抗體的淘選。

【0458】 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，藉此使由各終濃度為 1 mM 之腺苷 3 磷酸鈉鹽(ATP-Na)、腺苷(Adenosine)、肌苷(Inosine)、琥珀酸(Succinic acid)、及乳酸(Lactic acid)、終濃度為 1 μ M 之前列腺素 E2(PGE2)、以及終濃度為 100 μ M 之犬尿胺酸構成且以 NaOH 調成 pH7.4 之 SC、與該噬菌體庫液於室溫接觸 60 分鐘。於噬菌體庫液添加以 BSA 阻斷的磁珠，將抗原與噬菌體之複合體於室溫結合於磁珠 15 分鐘。將珠以 SC/TBS(包括 SC 之 TBS)洗滌 1 次。之後，將添加有 0.5 mL 之 1 mg/mL 之胰蛋白酶之珠於室溫懸浮 15 分鐘後，立即使用磁座分離珠，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 0.4-0.7)之 10 mL 之大腸菌株 ER2738。於 37 $^{\circ}$ 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。

【0459】 第 1 次之淘選係回收於低分子存在下可結合之噬菌體，第 2 次後之淘選，係實施於 SC 存在下對抗原可結合之噬菌體之濃縮。具體而言，於製備的噬菌體庫液添加 40 pmol 之生物素標記抗原及 SC、NaOH，藉此使噬菌體庫於室溫與抗原及低分子接觸 60 分鐘。添加經 BSA 阻斷的磁珠，使抗原與噬菌體之複合體於室溫結合於磁珠 15 分鐘。珠以 1 mL 之 SC/TBST 與 SC/TBS 洗滌。之後，將添加有 0.5 mL 之 TBS 的珠於室溫懸浮 15 分鐘後，立即使用磁座分離珠，並回收噬菌體溶液。再次重複此作業後，將分 2 次溶出之噬菌體液混合。再對於殘留的珠粒加入 0.5 mL 之 TBS，將該珠粒於室溫進行 5

分鐘攪拌。從使用磁座分離之珠粒回收噬菌體溶液。於回收之噬菌體溶液添加 100 mg/mL 之胰蛋白酶 5 μ L，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 ER2738。於 37 $^{\circ}$ 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 之板。將第 2 次淘選獲得之 2 種感染大腸菌在此時點各等量混合，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。重複 3 次取得於 SC 存在下對抗原有結合活性之抗體的淘選。

【0460】 (2-3)利用負選擇法從庫取得於低分子存在下與人類 IL-6 結合之抗體

從建構之未改變人類抗體噬菌體展示庫，進行低分子存在下對抗原顯示結合活性之抗體之篩選。為了篩選，首先使未改變人類抗體噬菌體展示庫於低分子不存在下與生物素標記抗原-鏈黴親和素(streptavidin)接觸，去除提示即使於分子不存在下仍對抗原有結合活性之抗體的噬菌體。然後，於低分子存在下同樣進行淘選，以實施於低分子存在之條件下對抗原有結合活性之抗體之篩選。抗原使用經生物素標記之 IL-6。

【0461】 由保持已構建之噬菌體提示用噬粒之大腸菌產生噬菌體。依一般的方法精製產生之噬菌體後，獲得經 TBS 透析處理之噬菌體庫液。對噬菌體庫液添加 BSA，使終濃度為 4%。

磁珠使用 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) 或 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin), 並實施使用於磁珠固定化之抗原的淘選。

【0462】 於製備之噬菌體庫液加入 250 pmol 之生物素標記抗原、及由各終濃度為 1 mM 之 ATP-Na、Adenosine、Inosine、Succinic acid、及 Lactic acid、終濃度 1 μ M 之 PGE₂、以及終濃度 100 μ M 之犬尿胺酸構成且以 NaOH 調整 pH 為 7.4 之 SC, 使與該噬菌體庫液於室溫接觸 60 分鐘。於噬菌體庫液添加以 BSA 阻斷的磁珠, 將抗原與噬菌體之複合體於室溫結合於磁珠 15 分鐘。將珠以 SC/TBS 洗滌 1 次。之後, 將添加有 0.5 mL 之 1 mg/mL 之胰蛋白酶之珠於室溫懸浮 15 分鐘後, 立即使用磁座分離珠, 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 0.4-0.7)之 10 mL 之大腸菌株 ER2738。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。

【0463】 第 1 次之淘選係回收於 SC 存在下可結合之噬菌體, 第 2 次後之淘選, 係實施於 SC 存在下對抗原可結合之噬菌體之濃縮。具體而言, 具體而言, 於經 BSA 阻斷之 Sera-Mag NeutrAvidin 珠粒加入 250pmol 生物素化抗原, 於室溫使結合 15 分鐘。對以 TBS 洗滌 3 次的珠粒, 加入經 BSA 阻斷的噬菌體庫液, 於室溫使其進行 1 小時結合。使用磁座將珠粒分離, 以回收未與抗原及珠粒結合之噬菌體。對回收之噬菌體加入 40

pmol 之生物素標記抗原及 SC、NaOH，使噬菌體庫於室溫與抗原及含 SC 之低分子接觸 60 分鐘。然後，於標記抗原、SC 及噬菌體庫之混合液中加入以 BSA 阻斷之磁珠，於室溫使抗原與噬菌體之複合體與磁珠結合 15 分鐘。珠粒以 1 mL 之 SC/TBST 與 SC/TBS 洗滌。之後將 1 mg/mL 之 Trypsin 溶液 0.5mL 加到該混合液。將該混合液於室溫進行 20 分鐘攪拌後，從使用磁座分離之珠粒回收噬菌體。回收之噬菌體添加到成為對數增殖期(OD600 為 0.4-0.7)之 10 mL 之大腸菌株 ER2738。於 37°C 緩慢進行上述大腸菌之攪拌培養 1 小時，以使噬菌體感染到大腸菌。受感染之大腸菌接種到 225 mm x 225 mm 之板。取得於 SC 存在下對抗原有結合活性之抗體的淘選重複進行 3 次。

【0464】 (2-4)利用噬菌體 ELISA 評價於低分子存在下之結合活性

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

使用 NucleoFast 96(MACHEREY-NAGEL)，將回收之培養上清進行超過濾。將已將培養上清各 100 μ L 對各井塗用之 NucleoFast 96 進行離心分離(4,500g, 45 分鐘)，以去除通流物(flow through)。將 100 μ L 之 H₂O 已加到各井之該 NucleoFast 96 再度離心分離(4,500g, 30 分鐘離心)以洗滌。最後，加入 TBS 100 μ L，回收於室溫靜置 5 分鐘之該 NucleoFast 96 之各井之上清含有之噬菌體液。

【0465】 已加入 TBS、或 SC/TBS 之精製噬菌體依以下程序

供 ELISA。將 StreptaWell 96 微滴定板 (Roche) 以含生物素標記抗原之 PBS 100 μ L 塗覆一晚。以 TBST 洗滌該板之各井以去除抗原後，將該井以 250 μ L 之 2% 脫脂奶-TBS 阻斷 1 小時以上。去除 2% 脫脂奶-TBS，於各井添加製備的精製噬菌體，將該板於 37 $^{\circ}$ C 靜置 1 小時，使提示噬菌體之抗體於 SC 不存在/存在下結合於在各井存在的抗原。於以 TBST 或 SC/TBST 洗滌之各井添加經 TBS 或 SC/TBS 稀釋之 HRP 結合抗 M13 抗體 (Amersham Pharmacia Biotech)，將該板於溫育 1 小時。以 TBST 或 SC/TBST 洗滌後，將添加有 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反應停止後，測定 450 nm 之吸光度以測定該發色。

【0466】 使用經單離 96 種選殖體進行噬菌體 ELISA，獲得於低分子雞尾酒存在下對係抗原之人類 IL-6 有結合活性之選殖體「I6NMSC1-3_A11」。

【0467】 [實施例 3] 於低分子存在下與抗原結合之抗體之評價

(3-1) 與人類 IL-6 結合之抗體之表現與精製

解析從實施例 2 噬菌體 ELISA 顯示之判斷於 SC 存在下對抗原有結合活性之選殖體 I6NMSC1-3_A11 使用專一性的引子 (序列編號：110 及 112) 放大之基因之鹼基序列 (重鏈之序列為序列編號：30 及輕鏈之序列為序列編號：31)。將編碼為 I6NMSC1-3_A11 之可變區之基因插入人類 IgG1/Lambda 之動物表現用質體、既知之抗人類 IL-6 抗體 CLB8-F1 (重鏈為序列編號：32、輕鏈為序列編號：33)、及編碼為陰性對照即抗人

類 Glypican 3 抗體 GC413(重鏈為序列編號：34、輕鏈為序列編號：35)之可變區之基因各插入人類 IgG1/kappa 之動物表現用質體。使用以下方法表現抗體。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)而得之細胞懸浮液，以 1.33×10^6 個 /mL 之細胞密度對 6 井盤的各井各接種 3 mL。其次以脂轉染法將製備之質體導入細胞。將該細胞於 CO₂ 培養箱(37°C、8%CO₂，90 rpm)培養 4 日，從單離之培養上清使用 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。經精製之抗體溶液之吸光度(波長：280nm)使用分光光度計測定。從獲得之測定值使用依 PACE 法計算之吸光係數，計算抗體濃度(Protein Science 1995；4：2411-2423)。

【0468】 (3-2)取得之抗體對人類 IL-6 之結合為必要之低分子之鑑定

取得之 I6NMSC1-3_A11(以下簡稱 A11)與對照之 CLB8-F1 及 GC413 共 3 種之抗體，於表 3 所示之 9 種條件下供 ELISA。又，以表 4 所示之緩衝液以表 3 所示濃度適當製備各低分子。抗原使用經生物素標記之人類 IL-6。

【0469】

【表 3】

條件	低分子 (small molecule)	濃度
1	ATP-Na	1mM
2	Adenosine	1mM
3	Inosine	1mM
4	PGE2	1 μ M
5	Succinic acid	1mM
6	Lactic acid	1mM
7	Kynurenine	100 μ M
8	ATP 1mM, Adenosine 1mM, Inosine 1mM, PGE2 1 μ M, Succinic acid 1mM, Lactic acid 1mM, Kynurenine 100 μ M	
9	-	-

【0470】

【表 4】

Wash buffer	10 mM ACES, 150 mM NaCl, 0.05% Tween20, pH7.4
Blocking Buffer	10 mM ACES, 150 mM NaCl, 2%BSA, pH7.4
Sample Buffer	10 mM ACES, 150 mM NaCl, 各 Small molecule, pH7.4

【0471】 先將 StreptaWell 96 微滴定板 (Roche) 以含生物素標記抗原之 PBS 100 μ L 塗覆一晚。以 Wash buffer 洗滌該板之各井以去除抗原後，將該井以 Blocking Buffer 250 μ L 阻斷 1 小時以上。於已去除 Blocking Buffer 之各井添加為表 3 之終濃度且含有低分子之以 Sample Buffer 製備為 2.5 μ g/mL 之精製 IgG 各 100 μ L，將該板於室溫靜置 1 小時，使 IgG 結合於在各井存在的抗原。於表 3 之終濃度且含低分子之 Wash Buffer 洗滌後，將以含該低分子之 Sample Buffer 稀釋之 HRP 結合抗人類 IgG 抗體 (BIOSOURCE) 添加到各井之板於溫育 1 小時。以含各低分子之 Wash Buffer 洗滌後，將添加有 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反應停止後，測定 450 nm 之吸光度以測定該發色。

【0472】 測定結果如圖 3。CLB8-F1，不論低分子之種類及是否存在，吸光度為相同，相對於此，I6NMSC1-3_A11，比起於條件 8(全部低分子之雞尾酒溶液)之吸光度，於條件 9(無低分子)之吸光度顯著較低。從此結果，於噬菌體 ELISA 同樣可確認 I6NMSC1-3_A11 具有取決於低分子有無而改變與抗原之結合之性質。又，I6NMSC1-3_A11 在條件 7(犬尿胺酸 100 μ M 存在下)中，顯示與條件 8 為同等吸光度，在其他條件下則吸光度為顯著較低，顯示係於犬尿胺酸存在下會與抗原人類 IL-6 結合且於犬尿胺酸不存在下不與 IL-6 結合之抗體。

【0473】 [實施例 4]利用表面電漿共振評價犬尿胺酸對與人類 IL6 之結合之影響

(4-1) 犬尿胺酸之開關功能對與人類 IL-6 結合之評價

使用 Biacore T200 (GE Healthcare)，解析 A11 與人類 IL-6(KAMACURA TECHNOSCIENCE)間之抗原抗體反應之交互作用。使以胺偶聯法適量固定 protein A/G(Invitrogen)之 Sensor chip CM5(GE Healthcare)捕捉目的抗體，並與抗原 IL-6 交互作用。運行緩衝液使用 10 mmol/L ACES、150 mmol/L NaCl、0.05% (w/v) Tween20、100 μ mol/L 犬尿胺酸、pH7.4、或 10 mmol/L ACES、150 mmol/L NaCl、0.05% (w/v) Tween20、pH7.4 之 2 種。與抗原 IL-6 之交互作用係於 37 $^{\circ}$ C 測定，IL-6 之稀釋使用與運行緩衝液為相同之緩衝。

【0474】 將人類 IL-6 稀釋液與空白運行緩衝液以流速

5 μ L/min 注射 3 分鐘，使感測晶片上捕捉的 A11 與人類 IL-6 交互作用。之後，以流速 5 μ L/min 流通運行緩衝液 3 分鐘，觀察抗體從人類 IL-6 解離後，將 10 mmol/L Glycine-HCl、pH1.5 以流速 30 μ L/min 注射 30 秒，使感測晶片再生。從測定獲得之感測圖算出之動力學參數結合速度常數 $k_a(1/MS)$ 、及解離速度常數 $k_d(1/s)$ 為依據，計算 A11 對人類 IL-6 之解離常數 $K_D(M)$ 。各參數之計算，使用 Biacore T200 Evaluation Software(GE Healthcare)。

【0475】 於此測定取得之於 100 μ mol/L 犬尿胺酸存在下、或不存在下，A11 與 4 μ mol/L 之人類 IL-6 間之交互作用之感測圖如圖 4。如圖 4，A11 於 100 μ mol/L 之犬尿胺酸存在下會與 IL-6 結合，但於犬尿胺酸不存在下未觀察到對 IL-6 結合。因此，可確認 A11 具有以犬尿胺酸作為開關而與 IL-6 結合之性質。又，100 μ mol/L 犬尿胺酸存在下，A11 之解離常數 K_D 為 $1.0E^{-6}$ mol/L。

【0476】 (4-2) 犬尿胺酸濃度對於與人類 IL-6 結合造成之影響之評價

其次，使用 Biacore T200(GE Healthcare)，評價犬尿胺酸濃度對於 A11 與人類 IL-6 間之抗原抗體反應之影響。運行緩衝液使用 10 mmol/L ACES、150 mmol/L NaCl、0.05% (w/v) Tween20、pH7.4，A11 與人類 IL-6 之抗原抗體反應係於 25 $^{\circ}C$ 測定。在感測晶片 CM5 上利用胺偶聯固定 A11，將經含製成各種濃度之含犬尿胺酸之 10 mmol/L ACES、150 mmol/L NaCl、0.05% (w/v) Tween20、pH7.4 稀釋之 1 μ mol/L 之 IL-6 作

為分析物，進行 60 秒交互作用，觀察其結合量之變化。其結果如圖 5。從此結果可明白：成為開關之犬尿胺酸濃度愈高，IL-6 對 A11 結合更多。

【0477】 其次，為了評價犬尿胺酸濃度對於固定在感測晶片 CM5 上之 A11 之犬尿胺酸開關功能之對照即庫來源之人類 IL-6 所結合之 H01 抗體(重鏈為序列編號：36、輕鏈為序列編號：37)與人類 IL-6 間之抗原抗體反應之影響，實施與上述為同樣之實驗。其結果如圖 6。由此結果可知，庫來源之對照之抗 IL-6 抗體 H01，即使犬尿胺酸濃度變化，對 IL-6 之結合仍無變化。

【0478】 其次，使用 Biacore T200(GE Healthcare)，評價 A11 對 IL-6 為以二價結合時，開關犬尿胺酸之濃度對其結合造成影響。運行緩衝液使用 10 mmol/L ACES、150 mmol/L NaCl、0.05% (w/v) Tween20、pH7.4，A11 與人類 IL-6 之抗原抗體反應於 25 °C 測定。在感測晶片 CM5 上以胺偶聯將 IL-6 固定化，並將以包含製備為各種濃度之犬尿胺酸之 10 mmol/L ACES、150 mmol/L NaCl、0.05% (w/v) Tween20、pH7.4 稀釋之 0.1 μ mol/L 之 A11 作為分析物，進行 60 秒交互作用，觀察以二價結合時，A11 對 IL-6 之結合量之變化。其結果如圖 7。此評價系，由於 IL-6 係固定於感測晶片上，故可認為 A11 以二價結合。於此之 A11 以二價認識 IL-6 之評價系，也觀察到犬尿胺酸濃度愈高，A11 之 IL-6 之結合量愈增加。從此結果可知，以二價之結合，A11 具有對 IL-6 以犬尿胺酸作為開關結合之性質。

【0479】 (4-3) 犬尿胺酸開關對於抗體從人類 IL-6 解離之效果

使用 Biacore T200(GE Healthcare)，評價於犬尿胺酸存在下對 IL-6 結合之 A11，是否於犬尿胺酸不存在下會以犬尿胺酸濃度依存的解離。運行緩衝液使用 10 mmol/L ACES、150 mmol/L NaCl、0.05% (w/v) Tween20、pH7.4 及 10 mmol/L ACES、150 mmol/L NaCl、0.05% (w/v) Tween20、pH7.4、100 μ mol/L 犬尿胺酸，於 25 °C 測定。於利用胺偶聯固定 IL-6 之感測晶片 CM5，將以含 100 μ mol/L 之犬尿胺酸之 10 mmol/L ACES、150 mmol/L NaCl、0.05% (w/v) Tween20、pH7.4 稀釋之 0.1 μ mol/L 作為 A11 進行 60 秒交互作用後，觀察於各運行緩衝液條件下 IL-6 之解離狀態。為了比較各運行緩衝液條件下之解離程度，比較定於 100 μ mol/L 之犬尿胺酸存在下對 IL-6 之 A11 之結合量為 100 並標準化(normalize)之值。顯示該標準化之後之 A11 與 IL-6 之交互作用之狀態之感測圖，如圖 8。由圖 8 之結果，可知 A11 於犬尿胺酸存在下與 IL-6 結合後，若犬尿胺酸不存在，IL-6 會快速解離。亦即，可確認利用犬尿胺酸控制抗體對人類 IL-6 之結合係完全可逆的。

【0480】 從該等結果，可知 A11 係以犬尿胺酸作為開關，於犬尿胺酸存在下與 IL-6 結合，並於犬尿胺酸不存在下從 IL-6 解離之抗體。又，確認 A11 於犬尿胺酸不存在下，可進行對人類 IL-6 完全無結合活性之完全 ON/OFF 控制，如圖 2 所示態樣，推測發揮開關機能。

【0481】 (4-4) 犬尿胺酸對於人類 IL-6 之結合性之評價

使用 Biacore T200(GE Healthcare)，解析 IL-6(鎌倉 TECHNOSCIENCE)與犬尿胺酸之交互作用。於以胺偶聯法固定 IL-6 約 5000 RU 之 Sensor chip CM5(GE Healthcare)，使 800、400、200、100、50、25 nmol/L 之犬尿胺酸交互作用。作為運行緩衝液，使用 0 mmol/L ACES、150 mmol/L NaCl、0.05% (w/v) Tween20、pH7.4。前述交互作用均於 25 °C 測定。犬尿胺酸之稀釋使用運行緩衝液。取得之 IL-6 與犬尿胺酸之交互作用之感測圖如圖 9。

【0482】 前述實驗中，係固定 IL-6 約 5000 RU。IL-6 之分子量為約 20,000 g/mol，犬尿胺酸之分子量為約 200 g/mol，故期待犬尿胺酸最大以 50 RU 程度交互作用。但是本次之測定條件中，即使使最大濃度 800 nmol/L 之犬尿胺酸交互作用，也未能觀察到與 IL-6 之明確交互作用。

【0483】 由前述實施例之結果，推測包括 A11、IL-6 及犬尿胺酸之複合體形成時，犬尿胺酸之 KD 為數十 nM 至數 nM。由此可認為：假定犬尿胺酸與 IL-6 直接交互作用，則藉由以 800 nmol/L 與犬尿胺酸交互作用，能觀察到明確的交互作用。從此結果啟示，犬尿胺酸與 IL-6 並非直接交互作用，而是與 A11 交互作用、或對於 A11 與 IL-6 之複合體以數十 nM 交互作用。

【0484】 [實施例 5]利用兔 B 細胞選殖取得抗腺苷抗體

(5-1)用於腺苷結合庫製作之免疫原之設計

作為對兔免疫之免疫原，使用圖 10 所示之 2'-Adenosine-PEG-Tetanus toxin p30 helper peptide(2'-Adenosine-PEG-peptide)、及圖 11 に示した

5'-Adenosine-PEG- Tetanus toxin p30 helper peptide(5'-Adenosine-PEG-peptide)。Tetanus toxin p30 helper peptide 係由 FNNFTVSFWLRVPSASHLE(序列編號：4)之胺基酸序列構成，鑑定為在幫助者 T 細胞上表現之 T 細胞受體之抗原決定部位的胜肽(Eur. J. Immunol. (1989) 19, 2237-2242)。已知活化抗體產生 (J. Immunol. (1992) 149, 717-721)，藉由與腺苷連結，作用為佐劑，期待能增加對抗腺苷之抗體之產生。設計以使產生之抗體之抗原決定部位與腺苷不易含於 Tetanus toxin p30 helper peptide，腺苷與 Tetanus toxin p30 helper peptide 之連結係介由 PEG。腺苷為 ATP 之代謝物，ATP 之磷酸基係加成於腺苷之 5'位羥基，因此，據認為腺苷之 5'位羥基不是抗原決定部位之抗體，可與腺苷結合也可與 ATP 結合。即，5'-Adenosine-PEG- Tetanus toxin p30 helper peptide 藉由作為免疫原，可容易獲得能與腺苷與 ATP 兩者結合之抗體，推測藉由將 2'-Adenosine-PEG-Tetanus toxin p30 helper peptide 作為免疫原，容易獲得與腺苷結合且與 ATP 不結合之抗體，故依(5-2)記載製作與腺苷之 2'位或 5'位連結之包含 Tetanus toxin p30 helper peptide 之二種免疫原。

【0485】 此外，依以下方式製作將 Tetanus toxin p30 helper peptide 替換為使生物素接合物之 2'-Adenosine-PEG-biotin(圖 12)及 5'-Adenosine-PEG-biotin(圖 13)。藉由驗證對於此等二種 Adenosine-PEG-biotin 之結合，可判別不是包括 Tetanus toxin p30 helper peptide 作為抗原決定部位之抗體。

【0486】 (5-2)用於腺苷結合庫製作之免疫原之合成

將 2'-Adenosine-PEG-peptide(adenosine 2'-PEG-peptide conjugate 或 2'-(PEG-peptide)adenosine) 及 2'-Adenosine-PEG-biotin(adenosine 2'-PEG-biotin conjugate 或 2'-(PEG-biotin)adenosine) 以如下方式合成。又，合成之 2'-Adenosine-PEG-peptide 或 2'-Adenosine-PEG-biotin 依以下條件分析或分取。

【0487】 LCMS 之分析條件如下。

【表 5】

分析條件	裝置	管柱(長度 mm)	移動相	梯度(A/B)	流速 (ml/分)	管柱溫度 (°C)	波長
SQDAA05	Acquity UPLC/SQD	Aldrich Ascentis Express C18 (2.1 x 50)	A) 10mM AcONH ₄ , H ₂ O B) MeOH	95/5 => 0/100 (1.0分間) => 0/100(0.4分間)	1.0	35	210-400nm PDA total
SQDAA50	Acquity UPLC/SQD	Aldrich Ascentis Express C18 (2.1 x 50)	A) 10mM AcONH ₄ , H ₂ O B) MeOH	50/50 => 0/100 (0.7分間) => 0/100(0.7分間)	1.0	35	210-400nm PDA total
SQDFA05	Acquity UPLC/SQD	Aldrich Ascentis Express C18 (2.1 x 50)	A) 0.1% FA, H ₂ O B) 0.1% FA CH ₃ CN	95/5 => 0/100 (1.0分間) => 0/100(0.4分間)	1.0	35	210-400nm PDA total
SQDFA50	Acquity UPLC/SQD	Aldrich Ascentis Express C18 (2.1 x 50)	A) 0.1% FA, H ₂ O B) 0.1% FA CH ₃ CN	50/50 => 0/100 (0.7分間) => 0/100(0.7分間)	1.0	35	210-400nm PDA total

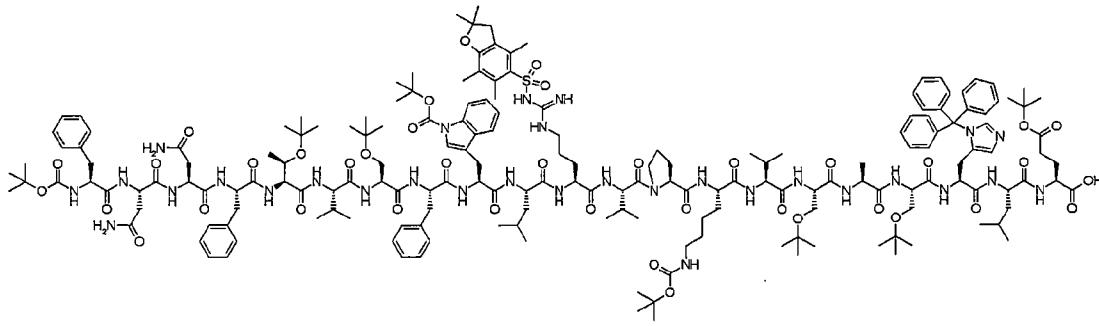
【0488】 HPLC 之分取條件如下。

【表 6】

分取條件	裝置	管柱(長度 mm)	移動相	梯度(A/B)	流速 (ml/分)	管柱溫度 (°C)	波長
A	Preparative HPLC system with injection/fractionation (Gilson, Inc.)	Aldrich Ascentis RP-Amide (21.2x150mm 5µm)	A) 0.1%FA H ₂ O B) 0.1%FA MeCN	isocratic(A/B):15/85	20.0	40	254, 258nm
B	Preparative HPLC system with injection/fractionation (Gilson, Inc.)	YMC Actus ODS-A (20x100mm 5µm)	A) 20mM AcONH ₄ H ₂ O B) 20mM AcONH ₄ MeOH/MeCN(1/1)	isocratic(A/B):47/53	20.0	40	254, 258nm

【0489】 (5-2-1) 化合物 006(Boc-Phe-Asn-Asn-Phe-Thr (tBu)-Val-Ser (tBu)-Phe-Trp (Boc)-Lue-Arg (Pbf)-Val-Pro-Lys (Boc)-Val-Ser (tBu)-Ala-Ser (tBu)-His (Trt)-Leu-Glu (tBu)-OH) 之合成

【0490】



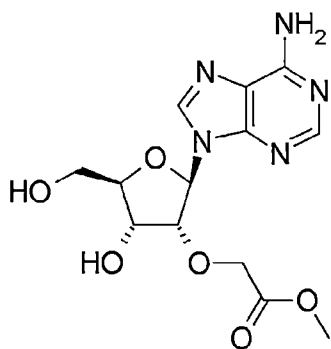
【0491】 使用胜肽合成機(Multi pep RS; Intavis)，依 Fmoc 法實施胜肽合成。所有之 Fmoc 胺基酸係從渡邊化學工業購買。又，操作之詳細程序依合成機附帶的手冊。

【0492】 於合成機中放置已鍵結 C 末端之 Fmoc-Glu(tBu)-OH 之 2-氯三苯甲基樹脂(每根管柱 250 mg、30 根管柱、11.7 mmol)、各種 Fmoc 胺基酸(0.6mol/L)與 1-羥基-7-氮雜苯并三唑(0.375mol/L)之 N,N-二甲基甲醯胺溶液、二異丙基碳二醯亞胺之 N,N-二甲基甲醯胺溶液(10%v/v)，並且使用含 5%(wt/v)之尿素之哌啶之 N,N-二甲基甲醯胺溶液(20%v/v)作為 Fmoc 脫保護溶液實施合成反應。樹脂以 N,N-二甲基甲醯胺洗滌後，進行 Fmoc 脫保護，再進行 Fmoc 胺基酸之縮合反應，作為 1 個循環，重複此循環，在樹脂表面上使胜肽伸長。伸長結束後，將樹脂以三氟乙醇洗滌，加入三氟乙醇/二氯甲烷(= 1/1)，從樹脂切出胜肽，獲得化合物 006(7.2 g)粗產物。

LCMS(ESI) m/z = 1185(M+3H)³⁺

保持時間：1.24 分(分析條件 SQDAA05)

【0493】 (5-2-2)化合物 007 之合成

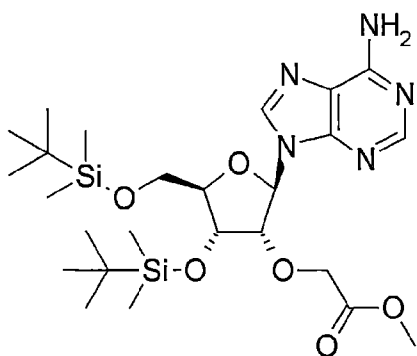


【0494】 將於冷卻至 0°C 之腺苷 (2.00 g、 7.48 mmol) 之 N,N-二甲基甲醯胺 (40 ml) 懸浮液中已加入 60% 氫化鈉 (0.42 g、 10.48 mol) 之反應液在 0°C 攪拌 1 小時。將已加入溴乙酸甲酯 (0.76 ml、 8.01 mmol) 之該反應液於室溫攪拌 5 小時。將已加入乙酸 (1ml) 及甲醇 (3ml) 之反應混合物減壓濃縮。將獲得之殘渣以順相矽膠管柱層析 (二氯甲烷 / 甲醇) 精製，獲得化合物 007 (0.93 g、 37%)。

LCMS(ESI) $m/z = 340 (M+H)^+$

保持時間：0.27 分 (分析條件 SQDFA05)

【0495】 (5-2-3) 化合物 008 之合成



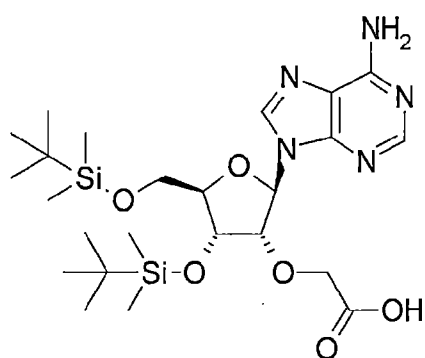
【0496】 將已加入第三丁基二甲基矽基氯 (999 mg、 6.63 mol) 及咪唑 (722 mg、 10.61 mol) 之化合物 007 (900 mg、 2.65 mmol) 之吡啶 (8 ml) 溶液於室溫攪拌 4 小時。將從反應混合物經乙酸乙酯 / 水萃取而得之有機層以飽和食鹽水洗滌。將以無水

硫酸鈉乾燥過的有機層過濾後減壓濃縮。將獲得之殘渣以順相矽膠管柱層析(二氯甲烷/甲醇)精製，獲得化合物 008(1.17 g、78%)。

LCMS(ESI) m/z = 568 (M+H)⁺

保持時間：1.10 分(分析條件 SQDFA05)

【0497】 (5-2-4)化合物 009 之合成

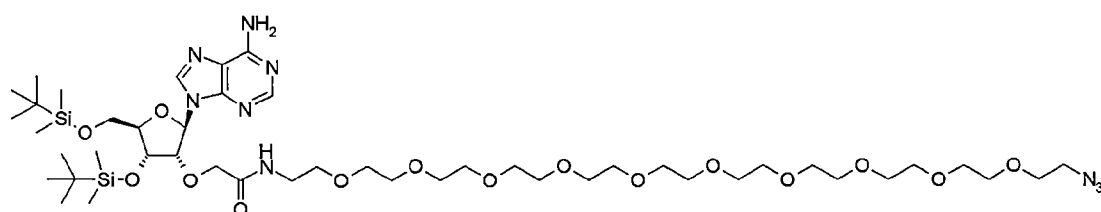


【0498】 將加入已溶於水(0.17 ml)之氫氧化鋰(61 mg、2.55 mol)之化合物 008(290 mg、0.511 mmol)之甲醇(0.34 ml)/四氫呋喃(0.34 ml)溶液於室溫攪拌 30 分鐘。將以 1M 鹽酸中和之反應混合物減壓濃縮。將從濃縮殘渣以乙酸乙酯/水萃取而得之有機層以飽和食鹽水洗滌。以無水硫酸鈉乾燥過的有機層經過過濾後減壓濃縮，獲得化合物 009(319 mg、90%)。

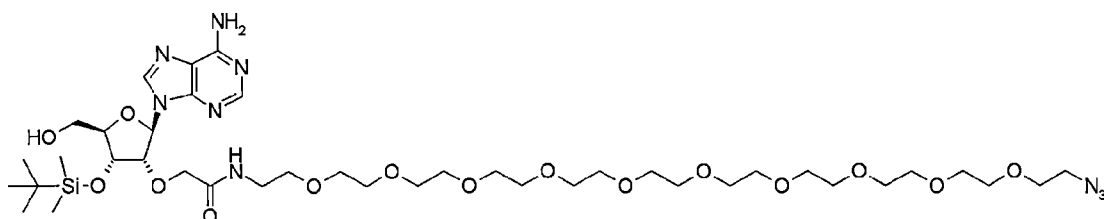
LCMS(ESI) m/z = 552(M-H)⁻

保持時間：0.97 分(分析條件 SQDFA05)

【0499】 (5-2-5)化合物 010 及化合物 011 之合成



【0500】



【0501】 將已加入 1-羥基苯并三唑 (75 mg、0.553 mol) 及 1-乙基-3-(3-二甲胺基丙基) 碳二醯亞胺鹽酸鹽 (106 mg、0.553 mol) 之化合物 009 (255 mg、0.460 mmol) 之 N,N-二甲基甲醯胺 (1.5 ml) 溶液於室溫攪拌 3 分鐘。將已加入 O-(2-胺基乙基)-O'-2-疊氮乙基) 九乙二醇 (291 mg、0.553 mmol) 的反應液於室溫攪拌 3 小時。將已減壓濃縮之反應混合物之殘渣以逆相矽膠管柱層析 (10 mM 乙酸銨水溶液/甲醇) 精製，獲得化合物 010 (177 mg、42%) 及 011 (72 mg、19%)。

【0502】 化合物 010

LCMS(ESI)m/z = 1063(M+H)⁺

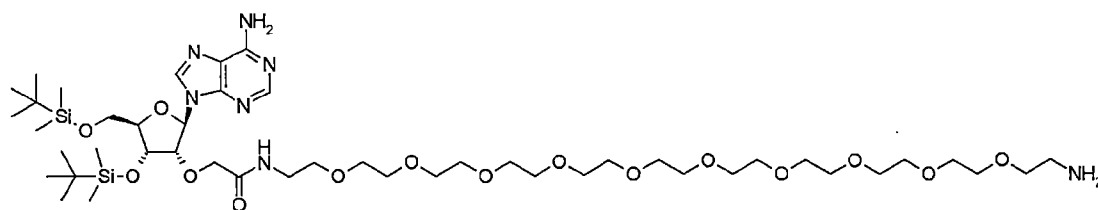
保持時間：0.98 分(分析條件 SQDFA05)

【0503】 化合物 011

LCMS(ESI)m/z = 949(M+H)⁺

保持時間：0.67 分(分析條件 SQDFA05)

【0504】 (5-2-6) 化合物 012 之合成

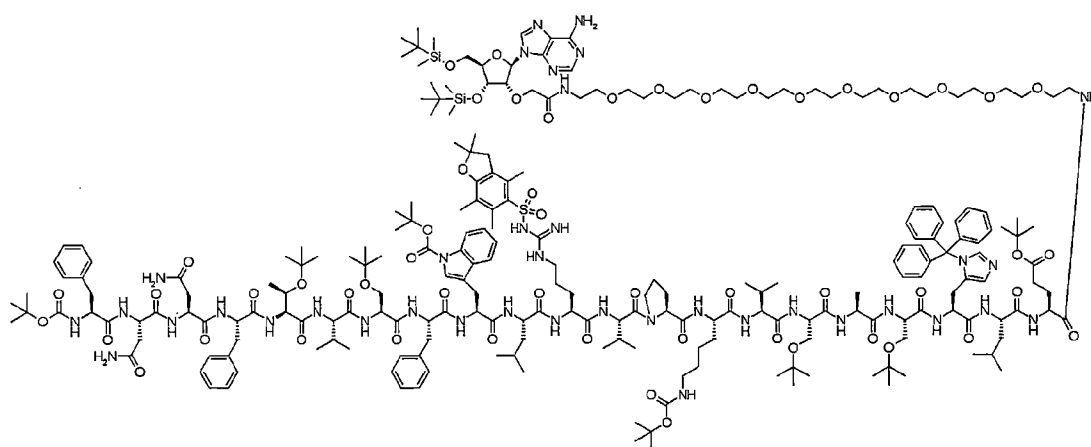


【0505】 將已加入 10%鈀碳(34 mg)之化合物 010(170 mg、0.160 mmol)之乙醇(1 ml)溶液於氫氣環境攪拌 2 小時。再加入 10%鈀碳(34 mg)，於氫氣環境攪拌 2 小時，使反應完結。將反應液之濾液減壓濃縮，獲得化合物 012(34 mg、95%)。

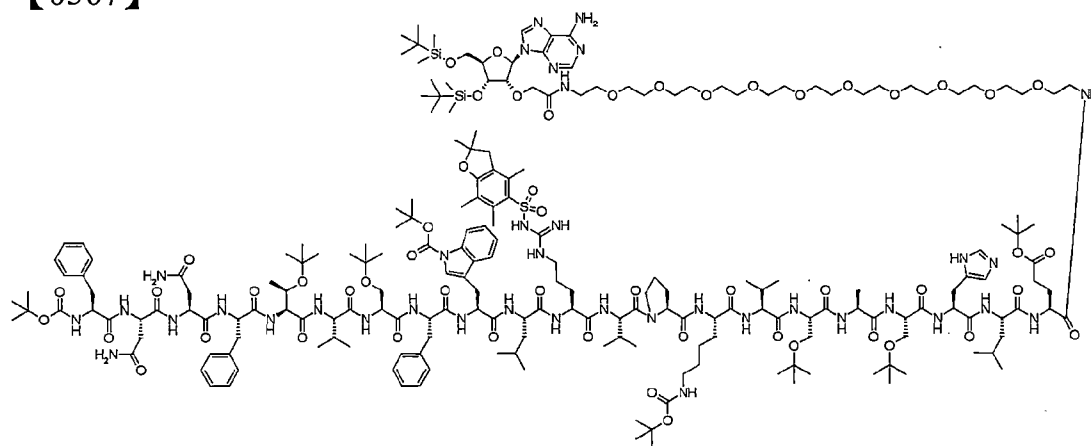
LCMS(ESI)m/z = 1037 (M+H)⁺

保持時間：0.70 分(分析條件 SQDFA05)

【0506】 (5-2-7)化合物 013 及化合物 014 之合成



【0507】



【0508】 將已加入化合物 006(354 mg、0.110 mmol)、1-羥基苯并三唑(13 mg、0.100 mol)及 1-乙基-3-(3-二甲胺基丙基)碳二醯亞胺鹽酸鹽(19 mg、0.100 mol)之化合物 012(86 mg、0.083 mmol)之 N,N-二甲基甲醯胺(1.5 ml)溶液於室溫攪拌 2 小

時。將反應混合物之濾液以表 6 記載之分取條件 A 精製，獲得化合物 013 及 014 之混合物(72 mg)。

【0509】 化合物 013

LCMS(ESI)m/z = 1525(M+3H)³⁺、1144(M+4H)⁴⁺

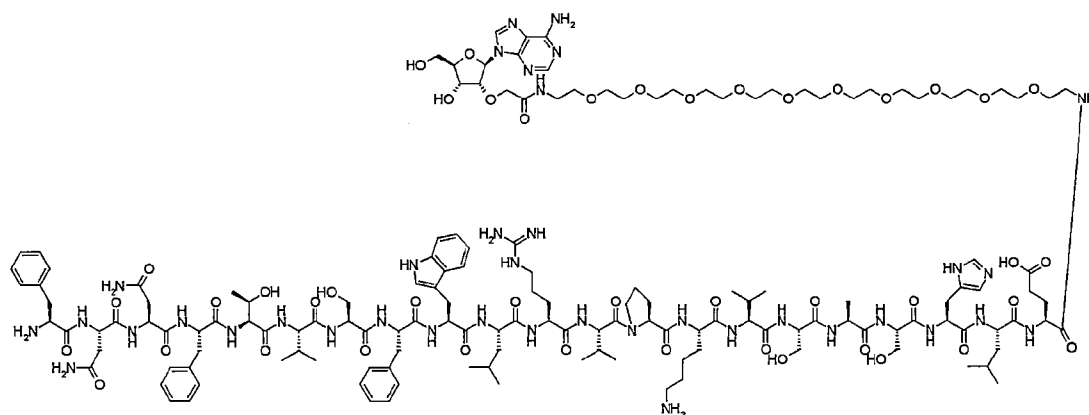
保持時間：1.13 分(分析條件 SQDAA50)

【0510】 化合物 014

LCMS(ESI)m/z = 1444(M+3H)³⁺、1083(M+4H)⁴⁺

保持時間：1.02 分(分析條件 SQDAA50)

【0511】 (5-2-8)2'-Adenosine-PEG-peptide(adenosine 2'-PEG-peptide conjugate 或 2'-(PEG-peptide)adenosine)(化合物 015)之合成

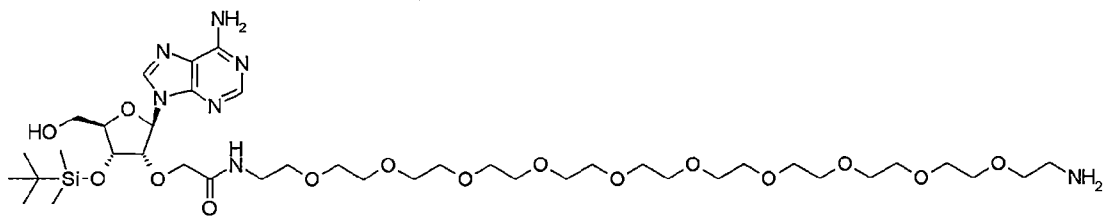


【0512】 將已加入三氟乙酸(16 ml)、二氯甲烷(8 ml)、水(1.3 ml)、及四異丙基矽烷(1.3 ml)之化合物 013 及 014 之混合物(42 mg)於室溫攪拌 6 小時。將已減壓濃縮之反應混合物之殘渣以表 6 記載之分取條件 B 精製，獲得化合物 015(10 mg)。

LCMS(ESI)m/z = 1090(M+3H)³⁺、818(M+4H)⁴⁺

保持時間：0.52 分(分析條件 SQDAA50)

【0513】 (5-2-9)化合物 016 之合成

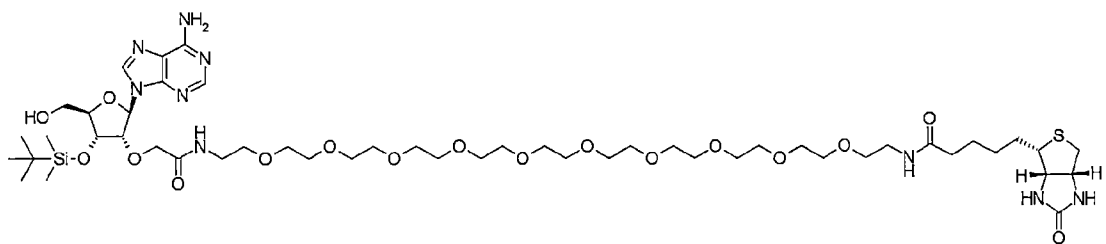


【0514】 將已加入 10%鈀碳(34 mg)之化合物 011(70 mg、0.074 mmol)之乙醇(1ml)溶液於氫氣環境攪拌 5 小時。將反應液之濾液減壓濃縮，獲得化合物 016(58 mg、85%)。

LCMS(ESI)m/z = 923(M+H)⁺

保持時間：0.50 分(分析條件 SQDFA05)

【0515】 (5-2-10)化合物 017 之合成



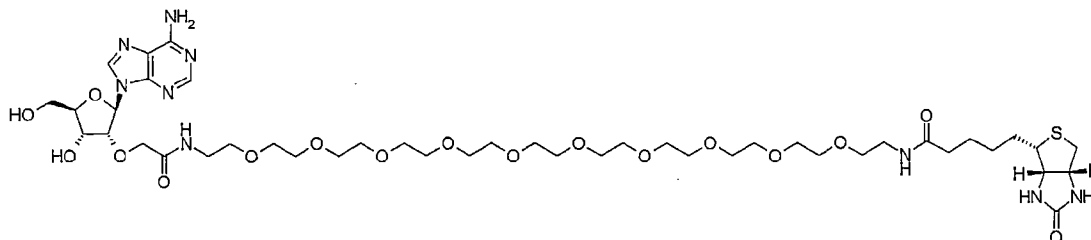
【0516】 將已加入 D-生物素 N-琥珀醯亞胺基 (24 mg、0.069 mmol)、及三乙胺(13μl、0.094 mol)之化合物 016(58 mg、0.063 mmol)之 N,N-二甲基甲醯胺 (1 ml)溶液於室溫攪拌 2 小時。再加入 D-生物素 N-琥珀醯亞胺基(5 mg、0.015 mmol)後，於室溫攪拌 1.5 小時，使反應完結。將反應混合物以逆相矽膠管柱層析(10 mM 乙酸銨水溶液/甲醇)精製，獲得化合物 017(50 mg、69%)。

LCMS(ESI)m/z = 1149(M+H)⁺

保持時間：1.04 分(分析條件 SQDFA05)

【0517】 (5-2-11)2'-Adenosine-PEG-biotin(adenosine

2'-PEG-biotin conjugate 或 2'-(PEG-biotin)adenosine)(化合物 018)之合成



【0518】 將已加入 1M 氟化四正丁基銨四氫呋喃溶液 (65 μ l、0.065 mmol)之化合物 017(62 mg、0.054 mmol)之四氫呋喃 (2 ml)溶液於室溫攪拌 1 小時。再加入 1M 氟化四正丁基銨四氫呋喃溶液 (20 μ l、0.020 mmol)，於室溫攪拌 1 小時使反應完結。將已減壓濃縮之反應液之殘渣以逆相矽膠管柱層析 (0.1%甲酸水溶液/0.1%甲酸乙腈)精製，獲得化合物 018(12 mg、21%)。

LCMS(ESI)m/z = 1035(M+H)⁺

保持時間：0.71 分(分析條件 SQDAA05)

【0519】 又，5'-Adenosine-PEG-peptide 及 5'-Adenosine-PEG-biotin 也使用同樣反應合成。

【0520】 (5-3)利用動物製作腺苷結合抗體及抗體之篩選

將兔以通常之方法利用 2'-Adenosine-PEG-peptide 及/或 5'-Adenosine-PEG-peptide 免疫。使用 autoMACS Pro Separator 與 FACS Aria(BD)之 Adenosine-PEG-biotin 結合性及兔 IgG 之表現為指標，從經免疫之兔血液採集之細胞懸浮液挑選出有腺苷結合活性之細胞之候選者。其次，篩選在挑選之細胞之培養上清中分泌之抗體。篩選，係利用 ELISA 法評價是否對於

Adenosine-PEG-biotin 有結合活性。又，將 Adenosine 與 Adenosine-PEG-biotin 一起加入 1000 倍以上，是否會抑制對於 Adenosine-PEG-biotin 之結合，也是以 ELISA 法評價。從具有對 Adenosine-PEG-biotin 之結合活性且將以 Adenosine-PEG-biotin 與 Adenosine 一起加入時會抑制對 Adenosine-PEG-biotin 之結合作為指標而挑選的細胞，使用 PCR 法取得 H 鏈可變區及 L 鏈可變區。將取得之可變區與人類 IgG1 重鏈不變區、及人類輕鏈不變區組合表現。

【0521】 (5-4)取得用以製作腺苷結合免疫庫之 B 細胞

從以 2'-Adenosine-PEG- Tetanus toxin peptide 及 5'-Adenosine-PEG- Tetanus toxin peptide 免疫之兔之脾臟採取之細胞懸浮液，使用 autoMACS Pro Separator 與 FACS Aria(BD)，將 Adenosine-PEG-biotin 結合性與兔 IgG 或 IgM 之表現作為指標，挑選有 Adenosine 結合活性之細胞之候選者。將從經 PBS(-)洗滌之前述挑選細胞製備的細胞圓粒，供免疫庫之製作。

【0522】 [實施例 6]從兔 B 細胞選殖獲得之選殖體之評價

(6-1) 從兔 B 細胞選殖獲得之選殖體對於 2'-Adenosine-PEG-Biotin 之結合活性之評價

使用 SPR 法評價利用兔 B 細胞選殖法獲得之選殖體對於腺苷之結合活性。使用 Biacore 4000(GE Healthcare)，以反應動力學解析上述選殖體與 2'-Adenosine-PEG-Biotin 之抗原抗體反應。使目的之抗體捕捉到經胺偶聯法固定有適量 protein A/G(Invitrogen)之 Sensor chip CM5(GE Healthcare)。其次，將

作為分析物之 100 nmol/L 之 2'-Adenosine-PEG-Biotin 交互作用 60 秒後，追蹤測定分析物之解離 60 秒。運行緩衝液使用 HBS-P+(GE Healthcare)。測定均於 25 °C 實施，分析物之稀釋使用運行緩衝液。

【0523】 將使 2'-Adenosine-PEG-Biotin 交互作用時之結合量除以各抗體之捕捉量(RU)得到之值(N_binding_100)、及 2'-Adenosine-PEG-Biotin 交互作用後從各抗體解離 2'-Adenosine-PEG-Biotin 60 秒後之值除以各抗體之捕捉量(RU)得到之值(N_stability_100)作為指標，比較各抗體對 2'-Adenosine-PEG-Biotin 之結合活性。惟，捕捉量為 1500 RU 以下之抗體未能充分觀察到結合，故排除在探討的對象以外。其結果如圖 14。從圖 14 之結果可知：利用 B 細胞選殖法可取對於腺苷以各種親和性結合之選殖體。

【0524】 (6-2)2'-Adenosine-PEG-Biotin 結合選殖體對於腺苷及 ATP 之結合活性之評價及其序列解析

已認定對 2'-Adenosine-PEG-Biotin 結合之選殖體對於腺苷或 ATP 之結合，以 SPR 法及競爭 ELISA 法進行評價。

【0525】 (6-2-1)2'-Adenosine-PEG-Biotin 結合選殖體利用 SPR 法所為之對於腺苷或 ATP 之結合之評價

使用 Biacore T200(GE Healthcare)，解析 B cell cloning 法獲得之抗體 SMB0002、SMB0089、SMB0104 與腺苷、ATP 之抗原抗體反應之交互作用。使目的之抗體捕捉到在 Sensor chip CM5(GE Healthcare)上經以胺偶聯法適量固定之 protein A/G(Invitrogen)，使抗原腺苷、或 ATP 交互作用。運行緩衝液

使用 10 mmol/L ACES、150 mmol/L NaCl、0.05% (w/v) Tween20、pH7.4。測定均於 25 °C 實施，抗原之稀釋使用運行緩衝液。

【0526】 針對 SMB0002、SMB0089、SMB0104，將抗原稀釋液與空白運行緩衝液以流速 20 μ L/min 注射 2 分鐘，使各抗原於捕捉在感測晶片上抗體交互作用。之後以流速 20 μ L/min 流通運行緩衝液 3 分鐘，觀察抗原從抗體之解離。之後，以流速 30 μ L/min 注射 30 秒 10 mmol/L Glycine-HCl, pH1.5，將感測晶片再生。從測定獲得之感測圖，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)。依該等常數計算解離常數 KD (M)。各參數之計算係使用 Biacore T200 Evaluation Software(GE Healthcare)。

【0527】 其結果發現:SMB0002、SMB0089、SMB0104 等多數選殖體對於腺苷與 ATP 兩者顯示結合。評價各選殖體與腺苷以 500、125、31.3、7.81 nM 及 ATP 5000、1250、313、78.1 nM 之濃度之結合時觀察到的感測圖整理於圖 15。如圖 15，認為 SMB0002、SMB0089、SMB0104 對於腺苷與 ATP 兩者有結合。SMB0002、SMB0089、SMB0104 對於腺苷之 KD 各為 $9.3E^{-9}$ 、 $6.9E^{-9}$ 、 $4.1E^{-8}$ (mol/L)及 $1.0E^{-5}$ (mol/L)，SMB0002、SMB0089、SMB0104 對於 ATP 之 KD 各為 $1.0E^{-5}$ 、 $8.8E^{-7}$ 、 $1.4E^{-7}$ (mol/L)。

【0528】 同樣地，使用 Biacore 4000(GE Healthcare)，解析依 B cell cloning 法得到之抗體 SMB0171 與腺苷、ATP 之抗原抗體反應之交互作用。使目的抗體捕捉到在 Sensor chip CM5(GE Healthcare)上經胺偶聯法適量固定之 protein

A/G(Invitrogen)，使抗原腺苷、或 ATP 交互作用。運行緩衝液使用 HBS-P+ (GE Healthcare)。測定均於 25 °C 實施，抗原之稀釋使用運行緩衝液。

針對 SMB0171，以流速 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 注射 1 分鐘抗原稀釋液與空白運行緩衝液，使各抗原與捕捉於感測晶片上之抗體交互作用。之後，以流速 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 流通 3 分鐘運行緩衝液，觀察抗原從抗體之解離。之後，以流速 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 注射 30 秒 10 mmol/L Glycine-HCl, pH1.5，將感測晶片再生。從測定獲得之感測圖，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)。依該等常數計算解離常數 K_D (M)。各參數之計算，使用 Biacore 4000 Evaluation Software(GE Healthcare)。

其結果，於 SMB0171 發現對 ATP 有結合。評價各選殖體與 ATP 以 50、5 μM 之濃度結合時觀察到的感測圖，如圖 16。如圖 16，認為 SMB0171 對 ATP 有結合。SMB0171 對 ATP 之 K_D 為 5.9E^{-6} (mol/L)。

【0529】 (6-2-2)2'-Adenosine-PEG-Biotin 結合選殖體利用競爭 ELISA 法進行之對腺苷及 ATP 之結合評價

將已認為對 2'-Adenosine-PEG-Biotin 結合之抗體以 PBS 稀釋成 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，加到 384 well 之 MAXISorp(Nunc)之各井，於室溫放置 1 小時以上，使與板結合。去除板之各井中經 PBS 稀釋之抗體後，將已加入含 1% BSA 之 TBS 之該板放置 1 小時以上。之後去除含 1% BSA 之 TBS pH7.4，將已加入經 PBS 稀釋之 50nM 之 2'-Adenosine-PEG-Biotin、經 PBS 稀釋之 50 nM

之 2'-Adenosine-PEG-Biotin 與 500 μ M 之 Adenosine 之混合物、經 PBS 稀釋之 50 nM 之 2'-Adenosine-PEG-Biotin 與 500 μ M 之 ATP 之混合物、或僅加入 PBS 中之任一者之該板，放置於室溫 1 小時。之後，將該板之各井以含 0.05% Tween-20 之 PBS 80 μ L 洗滌 3 次。之後，將經 PBS 稀釋為 20000 倍之 Streptavidine-HRP(Thermo fisher scientific)已加到各井之板，於室溫放置 1 小時以上。對於經含 0.05% Tween-20 之 PBS 80 μ L 洗滌 3 次之該板之各井，加入發色基質 (ABTS peroxidase substrate)。將該板溫育 1 小時後，將各井中之溶液之發色以 Molecular Device 公司製 SpectraMax 測定 405nm 之吸光度。

【0530】 其結果，如圖 17，由於過量添加腺苷與 ATP，使 SMB0002 對 2'-Adenosine-PEG-Biotin 之結合受抑制，故確認該等選殖體係不僅是 2'-Adenosine-PEG-Biotin，也結合與腺苷與 ATP 兩者之抗體。

【0531】 (6-2-3)利用 SPR 法進行腺苷及 ATP 結合選殖體之序列解析

已認定對於腺苷與 ATP 兩者有結合之選殖體之胺基酸序列如表 7。

【0532】

【表 7】

選殖體名	重鏈序列編號	輕鏈序列編號
SMB0002	序列編號:38	序列編號:39
SMB0089	序列編號:40	序列編號:41
SMB0104	序列編號:42	序列編號:43
SMB0171	序列編號:44	序列編號:45

[實施例 7]從使用噬菌體展示技術之人類抗體庫取得與腺苷及/或 ATP 結合之抗體

(7-1)未改變人類抗體噬菌體展示庫之製作

將從人類 PBMC 製成之 polyA RNA 或市售之人類 polyA RNA 等作為模板，依該技術領域中具有通常知識者公知的方法，建構提示彼此互異之人類抗體序列之 Fab 分域的由多數噬菌體構成之人類抗體噬菌體展示庫。

【0533】 (7-2)利用珠粒淘選從庫取得對腺苷及/或 ATP 結合之抗體

從(7-1)建構之未改變人類抗體噬菌體展示庫，篩選對抗原顯示結合活性之抗體之篩選。亦即，收集提示對於捕捉於珠粒之抗原顯示結合活性之抗體的噬菌體。抗原，使用生物素化 ATP、2'-Adenosine-PEG-Biotin、及 5'-Adenosine-PEG-Biotin。

【0534】 將從保持建構之噬菌體展示用噬粒的大腸菌產生的噬菌體，依一般方法精製。之後，獲得經 TBS 透析處理之噬菌體庫液。其次，於噬菌體庫液添加 BSA，使得終濃度成為 4%。實施使用固定於磁珠之抗原的淘選。磁珠，使用 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated)或 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)。

【0535】 之後，藉由添加製備之噬菌體庫液與 250 pmol 之生物素化 ATP、2'-Adenosine-PEG-Biotin、及 5'-Adenosine-PEG-Biotin，使該噬菌體庫液與腺苷及 ATP 於室溫接觸 60 分鐘。然後，於噬菌體庫液中加入經 BSA 阻斷的磁

珠，將腺苷及/或 ATP 與噬菌體之複合體於室溫結合於磁珠 15 分鐘。將珠粒以 TBS 洗滌 1 次。之後，將已加入 1 mg/mL 之胰蛋白酶溶液 0.5 mL 的珠粒於室溫懸浮 15 分鐘後，即時從以磁座分離之珠粒回收噬菌體溶液。回收之噬菌體溶液添加到成為對數增殖期 (OD600 為 0.4-0.7) 之 10 mL 之大腸菌株 ER2738。藉由於 37°C 進行上述大腸菌之緩慢攪拌培養 1 小時，使噬菌體感染大腸菌。被感染之大腸菌接種到 225 mm x 225 mm 之板。然後，從已接種之大腸菌之培養液回收噬菌體，製備噬菌體庫液。

【0536】 於第 2 次淘選，也進行可對腺苷及/或 ATP 結合之噬菌體之濃縮。對於獲得之噬菌體庫液各加入 50 pmol 之生物素化 ATP、2'-Adenosine-PEG-Biotin 及 5'-Adenosine-PEG-Biotin，將該噬菌體庫液與腺苷及 ATP 於室溫接觸 60 分鐘。然後，於噬菌體庫液加入經 BSA 阻斷的磁珠，將腺苷及/或 ATP 與噬菌體之複合體於室溫結合於磁珠 15 分鐘。以 TBST 洗滌珠粒 3 次、以 TBS 洗滌珠粒 2 次。之後，將已加入 1 mg/mL 之胰蛋白酶溶液 0.5 mL 的珠粒於室溫懸浮 15 分鐘後，即時從以磁座分離之珠粒回收噬菌體溶液。回收之噬菌體溶液添加到成為對數增殖期 (OD600 為 0.4-0.7) 之 10 mL 之大腸菌株 ER2738。藉由於 37°C 進行上述大腸菌之緩慢攪拌培養 1 小時，使噬菌體感染大腸菌。被感染之大腸菌接種到 225 mm x 225 mm 之板。然後，從已接種之大腸菌之培養液回收噬菌體，製備噬菌體庫液。

【0537】 以同樣程序重複 3 次取得對腺苷及/或 ATP 可結合

之抗體的淘選。第 4 次淘選，以 TBST、TBS 均洗滌 5 次。

【0538】 (7-3)利用噬菌體 ELISA 進行腺苷及 ATP 結合性之評價

從依上述實施例所示之淘選(Panning)法獲得之大腸菌之單一菌落依定法(Method Mol. Biol. (2002) 178, 133-145)回收含噬菌體之培養上清。針對此，將使用 NucleoFast 96 (MACHERY-NAGEL)回收之培養上清進行超過濾。將培養上清各 100 μ L 施用於 NucleoFast 96 之各井，以 4,500g 進行 45 分鐘離心分離，去除流過物。加入 H₂O 100 μ L，再度以 4,500g 進行 30 分鐘離心分離以洗滌。之後加入 TBS 100 μ L，於室溫靜置 5 分鐘後，回收上清含有之噬菌體液。

【0539】 將已加入 TBS 之精製噬菌體依以下程序供 ELISA。將 StreptaWell 96 微滴定板(Roche)以含生物素標記抗原 (2'-Adenosine-PEG-biotin、5'-Adenosine-PEG-biotin、及 ATP-PEG-biotin 各等量混合)之 100 μ L 之 TBS 於室溫塗覆 1 小時。將該板之各井以 TBST(含 0.1%Tween20 之 TBS)洗滌以去除抗原後，將該井以 250 μ L 之 2%脫脂奶-TBS 阻斷 1 小時以上。去除 2%脫脂奶-TBS，之後將各井中已加入已製備之精製噬菌體的該板於室溫靜置 1 小時，使提示噬菌體之抗體結合於各井存在之抗原。對於以 TBST 洗滌之各井，添加經 TBS 稀釋之 HRP 結合抗 M13 抗體(Amersham Pharmacia Biotech)，將此板溫育 1 小時。以 TBST 洗滌後，已添加 TMB single 溶液(ZYMED)之各井中之溶液之發色反應以硫酸之添加停止後，測定於 450 nm 之吸光度以測定其發色。

【0540】 從已實施噬菌體 ELISA 之 192 個選殖體中，獲得對 2'-Adenosine-PEG-biotin 、 5'-Adenosine-PEG-biotin 、 ATP-PEG-biotin 中之任一者、任二者、或三者均有結合能力之 106 個選殖體。

【0541】 然後，為了確認該等選殖體對 2'-Adenosine-PEG-biotin 、 5'-Adenosine-PEG-biotin 、 ATP-PEG-biotin 中之哪個抗原具有結合能力，將該精製噬菌體以 TBS 稀釋後，依以下程序供 ELISA。將 StreptaWell 96 微滴定板 (Roche) 以含生物素標記抗原 (2'-Adenosine-PEG-biotin, 5'-Adenosine-PEG-biotin, ATP-PEG-biotin) 中任一者的 100 μ L TBS 於室溫塗覆 1 小時。將該板之各井以 TBST 洗滌以去除抗原後，將該井以 250 μ L 之 2% 脫脂奶-TBS 阻斷 1 小時以上。去除 2% 脫脂奶-TBS，之後將已對各井加入製備之精製噬菌體的該板於室溫靜置 1 小時，以使提示噬菌體之抗體結合於各井存在之抗原。對於以 TBST 洗滌之各井，添加經 TBS 稀釋之 HRP 結合抗 M13 抗體 (Amersham Pharmacia Biotech)，將此板溫育 1 小時。以 TBST 洗滌後，已添加 MB single 溶液 (ZYMED) 之各井中之溶液之發色反應利用硫酸之添加使停止後利用 450 nm 之吸光度測定該發色。噬菌體 ELISA 之結果記載於以下表 8。

【0542】

【表 8】

濃縮指標		抗原結合能力 (S/N 比 > 1.5)
淘選次數		4
ELISA 實施選殖體		192
ELISA 陽性選 殖體數	2'-Adenosine-PEG-biotin, 5'-Adenosine-PEG-biotin, ATP-PEG-biotin 混合	106
	2'-Adenosine-PEG-biotin	0
	5'-Adenosine-PEG-biotin	6
	ATP-PEG-biotin	76
	結合於 2'-Adenosine-PEG-biotin, 5'-Adenosine-PEG-biotin, ATP-PEG-biotin 之中兩者以上	1

【0543】 已實施噬菌體 ELISA 之選殖體之中，確認結合 2 種以上抗原的有 1 個選殖體，以該抗體片段作為模板，進行依專一性的引子放大之基因之鹼基序列解析。本選殖體為對 5'-Adenosine-PEG-biotin、ATP-PEG-biotin 二者具結合能力之選殖體，命名為 ATNLSA1-4_D12。ATNLSA1-4_D12 抗體之重鏈可變區之序列記載於序列編號：46，輕鏈可變區之序列記載於序列編號：47 記載。

【0544】 (7-4)利用噬菌體競爭 ELISA 進行腺苷或 ATP 結合性之評價

噬菌體 ELISA 之結果，判斷對 5'-Adenosine-PEG-biotin 及 ATP-biotin 兩者有結合能力之選殖體、ATNLSA1-4_D12(重鏈可變區序列：46、輕鏈序列：47)，可能認識 5'-Adenosine-PEG-biotin, ATP-PEG-biotin 之結構上、生物素標籤或 PEG 區域。而，為了顯示非生物素標籤或 PEG 認識抗體，使用 ATNLSA1-4_D12 及準備作為負對照之 IL-6R 結合選殖體 PF1(重鏈序列：48、輕鏈序列：49)，利用噬菌體 ELISA 確認是否腺苷或 ATP 與抗原之結合受抑制。ATNLSA1-4_D12 及 PF1 分別以 TBS，並依以下程序供 ELISA。

【0545】 將 StreptaWell 96 微滴定板 (Roche) 以含生物素標

記抗原 (5'-Adenosine-PEG-biotin, ATP-PEG-biotin 之混合) 之 100 μ L 之 TBS 於室溫塗覆 1 小時。將該板之各井以 TBST 洗滌以去除抗原後，將該井以 250 μ L 之 2% 脫脂奶-TBS 阻斷 1 小時以上。去除 2% 脫脂奶-TBS，之後將於各井已添加製備之精製噬菌體之該板於室溫靜置 1 小時，使噬菌體提示之抗體與各井存在之抗原結合。其次將無抗原、以及含抗原及等量至 10,000 倍量之 ATP 之稀釋系列的 TBS 加到該井。於室溫將該板靜置 1 小時，使固定化之抗原與 ATP 競爭。之後，對於經 TBST 洗滌之各井，將已添加已經 TBS 稀釋之 HRP 結合抗 M13 抗體 (Amersham Pharmacia Biotech) 的板溫育 1 小時。以 TBST 洗滌後，使已添加 TMB single 溶液 (ZYMED) 之各井中之溶液之發色反應藉由硫酸之添加停止後，利用 450 nm 之吸光度測定該發色。

【0546】 測定結果如圖 18。ATNLSA1-4_D12 隨 ATP 濃度提高，確認於過量 ATP 存在下發色值減小，確認 ATP 濃度依存性的 ATNLSA1-4_D12 與抗原之結合受抑制。又，作為陰性對照進行比較實驗之 PF1，無論 ATP 濃度，未確認與抗原之結合。由此，可確認 ATNLSA1-4_D12 係有 ATP 結合能力之抗體，並非認識生物素標籤或 PEG 之抗體。

【0547】 (7-5) 與 ATP 及腺苷結合之抗體之表現與精製

解析從實施例 7 之噬菌體 ELISA 所示之判斷具有與 ATP 及腺苷結合之活性之選殖體 ATNLSA1-4_D12，使用專一性引子放大之基因之鹼基序列 (重鏈之序列以序列編號：46 表示，輕鏈之序列以序列編號：47 表示)。將編碼為 ATNLSA1-4_D12

之可變區之基因，插入到人類 IgG1/Lambda 之動物表現用質體。使用以下方法表現抗體。對於在 FreeStyle 293 Expression Medium 培養基(Invitrogen)，以 1.33×10^6 細胞/mL 之細胞密度懸浮，並對於 6well plate 之各井各接種 3 mL 之人類胎兒腎細胞來源 FreeStyle 293-F 株(Invitrogen)，利用脂轉染法導入製備之質體。從在 CO₂ 培養箱(37°C、8%CO₂，90 rpm)培養 4 日之培養上清，使用 rProtein A SepharoseTM Fast Flow(Amersham Biosciences)，利用該技術領域中具有通常知識者公知之方法將抗體精製。使用分光光度計，測定精製抗體溶液於 280 nm 之吸光度。使用從獲得之測定值以 PACE 法計算之吸光係數，計算精製抗體之濃度 (Protein Science (1995) 4, 2411-2423)。

【0548】 (7-6)使用表面電漿共振評價 ATP、腺苷結合抗體之 ATP、腺苷結合

使用 Biacore T200 (GE Healthcare)，解析對 ATP 及腺苷有結合活性之選殖體 ATNLSA1-4_D12 之可變區連結於 IgG 之不變區而得之 D12 之抗原抗體反應之交互作用。使目的抗體捕捉於經胺偶聯法適量固定 protein A(Life technologies)之 Sensor chip CM5 或 CM4(GE Healthcare)，使抗原 ATP (Wako)、腺苷 (Wako)、ADP (adenosine diphosphate) (Wako) 交互作用。運行緩衝液使用 50 mM Tris-HCl (Takara, T903), 500 mM NaCl, 0.01% (w/v) Tween20。使抗原以流速 30 μ L/min 交互作用 30 秒，並使其進行 30 秒解離。與抗原之交互作用，於 15°C 測定，抗原之稀釋使用與運行緩衝液為相同之緩衝液。

【0549】 依從測定獲得之感測圖算出之動力學參數結合速

度常數 $k_a(1/MS)$ 、及解離速度常數 $k_d(1/s)$ ，計算解離常數 $K_D(M)$ 。或，使用穩定狀態解析法 (Steady state analysis) 計算解離常數 $K_D(M)$ 。各參數之計算，係使用 Biacore T200 Evaluation Software(GE Healthcare)。

【0550】 為了計算對腺苷之 K_D ，取得於 $20\mu\text{mol/L}$ ADP 存在下及不存在下之各濃度之腺苷存在下之結合回應，又另取得於 $20\mu\text{mol/L}$ ADP 存在下之結合回應。藉由將推定為非專一性結合成分之 ADP 存在下對於各濃度腺苷之結合回應減去在 ADP 單獨存在下之回應而得之值，從 ADP 不存在下對於腺苷之結合回應之值減去，取得對腺苷之專一性結合回應(R)。對於以腺苷濃度為 X 軸、從式 2 算出之 R 為 Y 軸作圖之曲線，套用 Office Excel2007 (Microsoft) 之求解機能適用最小平方法，決定對於腺苷之 K_D 值。

【0551】 (式 2)

$$R = R_{\text{max}} \times \text{conc} / (K_D + \text{conc})$$

【0552】 式 2 中，conc 代表腺苷濃度(mol/L)， R_{max} 對於抗體，腺苷最多結合時期待之回應值。為了抽取實測之回應值，採用 Scrubber2(BioLogics. Inc)。

【0553】 在此測定取得之 D12 對於 ATP 之 K_D ，為 $8.5\mu\text{mol/L}$ 、對於 ADP 之 K_D 為 $0.25\mu\text{mol/L}$ 、對於腺苷之 K_D 為 $1100\mu\text{mol/L}$ 。由此可認為:D12 對 ATP、ADP、腺苷有結合活性，且對 AMP(adenosine monophosphate)及 cAMP(cyclinc adenosine monophosphate)也有結合活性。

【0554】 [實施例 8]利用抗 ATP/腺苷抗體之 ATP/腺苷開關

抗體取得用之庫之設計

癌組織及發炎性組織中，已知不僅腺苷，ATP 之濃度也高。所以，不僅是只將腺苷或 ATP 中之任一者當作開關之抗體，能將腺苷及 ATP 兩者(本實施例中，記載為 ATP/腺苷)利用為開關之抗體(亦即腺苷或 ATP 哪一個以高濃度存在，則會與抗原結合的抗體)也有用。實施例 7-4 所示之 ATNLSA1-4_D12，為與 ATP/腺苷結合之抗體，該抗體，如圖 19 所示，可認為包含 ATP/腺苷夾於抗體與標的抗原之間，且包含與標的抗原接觸之抗體可變區。而，藉由將能與標的抗原接觸，能保持對 ATP/腺苷之結合之抗體可變區部分予以庫化，據認為可製作能取得對於任意之抗原因為 ATP/腺苷之有無而使對於任意抗原之結合活性改變之 ATP/腺苷開關抗體的合成抗體庫。

【0555】 於實施例 7-4 由人類抗體庫取得之 ATP/腺苷抗體 ATNLSA1-4_D12 與 ATP 之複合體之結晶結構已經過解析。從結晶結構解析之結果，鑑別該抗體認識之腺苷(及 ATP)之認識樣式、及設定未與腺苷(及 ATP)之結合有大相關之抗體可變區之胺基酸殘基。經鑑別，主要涉及對腺苷(ATP)之結合之胺基酸殘基，係在重鏈之 Ser52、Ser52a、Arg53、Gly96、Leu100a、Trp100c(Kabat 編號)。

【0556】 在庫設計時，係選擇滿足以下條件至少其中之一之部位作為庫化可能部位。

條件 1)與對 ATP 之結合無大相關之部位、或即使涉及結合但不會使對 ATP 之結合下降之天然序列以外之胺基酸存在

之部位、

條件 2)在人類抗體之曲目有某程度胺基酸出現頻度多樣性之部位、

條件 3)對典型結構(Canonical structure)之形成不重要之部位。

【0557】 製作重鏈、輕鏈均滿足上述條件之部位且 ATNLSA1-4_D12 之序列含有之部位之中關於 CDR1 及 CDR2 之部位在生殖細胞系列之出現頻度為 2%以上之胺基酸、關於 CDR3 之部位在生殖細胞系列之出現頻度為 1%以上之胺基酸進行全面性取代，以製作組合該等取代之多個 ATNLSA1-4_D12 之改變體。

【0558】 重鏈之部位之中，經改變之部位(表中，記為「Kabat」之 Kabat 編號表示之部位)以及該部位之中，改變前之胺基酸(表中，記為「天然序列」之胺基酸)及改變後之胺基酸(表中記為「改變胺基酸」之胺基酸)，如表 9。

【0559】

【表 9】

	HCDR1			HCDR2			HCDR3				
Kabat	31	32	35	55	57	58	96	97	99	100	100a
天然序列	T	Y	N	N	I	N	G	R	G	D	L
改變 胺 基 酸	A	A		A	A		A	A	A	A	A
	C										
	E			E							
	D	D		D		D	D	D	D		
	G	G		G		G					
	F		F			F					F
	I										I
	H		H	H		H					
	K				K				K	K	K
	M										M
	L			L							
	N	N	N				N	N	N	N	
	Q										
	P										
	S	S	S	S		S	S	S	S	S	
	R	R		R	R						R
	T		T	T	T	T					
	W										W
	V							V	V	V	V
	Y		Y			Y		Y	Y	Y	Y

【0560】 輕鏈之部位之中，經改變之部位(表中，記載為「Kabat」之 Kabat 編號表示之部位)以及該部位中改變前之胺基酸(表中，記為「天然序列」之胺基酸)及改變後之胺基酸(表中記為「改變胺基酸」之胺基酸)，如表 10。

【0561】

【表 10】

Kabat	LCDR1								LCDR2							LCDR3								
	26	27	27a	27b	27c	28	29	31	32	50	51	52	53	54	55	89	90	91	92	93	94	95a	96	97
天然序列	T	S	S	D	V	G	G	N	Y	E	V	S	K	R	P	S	S	Y	A	G	S	N	V	V
A	A						A		A			A				A	A	A		A	A	A	A	A
C																								
E								E				E							E				E	
D						D	D	D	D	D	D	D						D	D	D	D	D	D	D
G			G							G	G					G					G	G	G	G
F							F								F		F						F	
I					I														I	I	I	I	I	I
H												H					H					H	H	
K							K		K	K			K				K					K	K	
M																								M
L														L	L	L						L	L	L
N			N	N						N	N	N	N			N		N		N	N		N	N
Q										Q		Q				Q						Q	Q	
P																						P	P	
S	S						S		S	S		S					S	S	S	S	S	S	S	S
R							R			R							R	R	R	R	R	R	R	
T		T	T				T		T		T	T				T	T	T	T	T	T	T	T	T
W																		W						W
V															V	V	V	V	V	V	V			
Y							Y			Y		Y			Y		Y	Y	Y	Y		Y	Y	

【0562】 以實施例 7-1 所示方法表現及精製之各改變體對 ATP 及腺苷之結合，依與實施例 7-6 所示之使用 Biacore 之測定方法為相同方法實施測定。測定結果，計算各改變體對 ATP 之親和性作為 KD 值。作為重鏈之部位，由於改變使 ATP 結合能力未下降 ATNLSA1-4_D12 之 1/5 之結合能力者（亦即 KD 值小於 42.5 $\mu\text{mol/L}$ 者）、及作為輕鏈之部位，ATNLSA1-4_D12 之結合能力提高者（亦即 KD 值小於 8.5 $\mu\text{mol/L}$ 者），判定為可改變部位，於該部位經取代之胺基酸，判定為可庫化之胺基酸（庫出現之柔性殘基）。

【0563】 從各改變體對 ATP 結合能力之評價結果，可預測藉由將各部位予以庫化，對 ATP 之結合能力下降。而，藉由將推測涉及與 ATP 之結合之部位之周邊部位取代，並組合該等取代而得之各種改變體予以全面性評價，來驗證是否可鑑別期待使對 ATP 之結合能力增強之效果的改變。如此之經改變之部位（表中，記為「Kabat」之 Kabat 編號表示之部位）以及該部位改變前之胺基酸（表中，記載為「天然序列」之胺基酸）及改變後

之胺基酸(表中，記為「改變胺基酸」之胺基酸)，如表 11。

【0564】

【表 11】

	HCDR1		HCDR2		HCDR3		LCDR3
Kabat	33	50	56	95	98	100b	95
天然序列	T	S	Y	F	K	N	N
改變 胺基 酸	A	A	A	A	A	A	A
	C						
	E	E	E		E	E	E
	D	D	D		D	D	D
	G	G	G		G	G	G
	F	F	F		F	F	F
	I	I	I	I	I	I	I
	H	H	H		H	H	H
	K	K	K	K		K	K
	M	M	M	M	M	M	M
	L	L	L	L	L	L	L
	N	N	N			N	
	Q	Q	Q	Q		Q	Q
	P	P	P	P		P	P
	S	S		S		S	S
	R	R	R		R	R	R
	T		T	T		T	T
	W	W	W	W	W	W	W
	V	V	V	V	V	V	V
	Y	Y	Y		Y	Y	Y

【0565】 將以實施例 7-1 所示方法表現及精製而得之各改變體對 ATP 及腺苷之結合，使用與實施例 7-6 所示之使用 Biacore 之測定方法為相同方法測定。測定結果，期待對 ATP 及腺苷之結合增強之改變為 Kabat 編號表示之 56 位、100 位等部位(例如 Tyr56His、Asn100bLeu 等胺基酸之改變)，於該部位取代之胺基酸判定為可庫化之胺基酸(庫出現之柔性殘基)。

【0566】 藉由設計 ATNLSA1-4_D12 之 CDR 之部位中，含

有從前述改變體之解析選出之可庫化胺基酸(庫出現之胺基酸柔性殘基)及該胺基酸改變前之胺基酸(亦即，ATNLSA1-4_D12之天然序列含有之胺基酸)之胺基酸曲目及含該曲目之部位，建構 ATP/腺苷開關抗體取得用之庫。以使胺基酸曲目含有之各胺基酸之出現頻度為相等的方式(例如:胺基酸曲目為 10 種之情形，使各胺基酸各出現 10%)，建構庫。

【0567】 重鏈中，含有胺基酸曲目之部位(表中，記為「Kabat」之 Kabat 編號表示之部位)以及該部位之胺基酸曲目，如表 12。輕鏈中，含胺基酸曲目之部位(表中，記為「Kabat」之 Kabat 編號表示之部位)以及該部位之胺基酸曲目，如表 13。

【0568】

【表 12】

Kabat 天然序列	HCDR1			HCDR2					HCDR3						
	31	32	35	55	56	57	58	59	95	97	98	99	100	100a	100b
	T	Y	N	N	Y	I	N	Y	F	R	K	G	D	L	N
A				17%		25%				11%			5%		
C															
E												9%	5%		
D							13%					9%	5%		
G	33%			17%			13%			11%		9%	5%		
F		33%					13%		50%			9%	5%		
I						25%				11%			5%		
H		33%	50%		50%		13%			11%		9%	5%	17%	
K						25%				11%	33%	9%	5%		
M										11%			5%	17%	
L								50%		11%	33%		5%	17%	50%
N			50%	17%			13%					9%	5%		50%
Q												9%	5%		
P													5%		
S	33%			17%			13%						5%		
R				17%		25%				11%	33%	9%	5%	17%	
T	33%			17%			13%						5%		
W												9%	5%	17%	
V										11%			5%		
Y		33%			50%		13%	50%	50%			9%	5%	17%	

【0569】

【表 13】

Kabat 天然序列	LCDR1		LCDR2			LCDR3								
	27a	29	50	51	54	90	91	92	93	94	95	95a	96	97
A	S	S	E	V	R	S	Y	A	G	S	N	N	V	V
C		17%						17%	14%	13%	6%			17%
E			14%					17%			6%			
D		17%	14%						14%	13%	6%	11%		
G		17%	14%	25%					14%	13%	6%	11%		17%
F		17%									6%			
I									14%	13%	6%	11%		
H											6%	11%		
K			14%		50%		14%				6%			
M											6%			17%
L						25%					6%	11%	33%	17%
N				25%			14%			13%	6%	11%		
Q			14%								6%	11%		
P											6%		33%	
S	50%	17%	14%			25%		17%	14%	13%	6%	11%		17%
R					50%		14%	17%		13%	6%			
T	50%	17%		25%		25%	14%	17%	14%	13%	6%			
W							14%				6%			
V				25%		25%	14%						33%	17%
Y			14%				14%	17%	14%		6%	11%		

【0570】 從序列解析之結果，推測 ATNLSA1-4_D12 之框架係從 VH3-21 生殖細胞系列而來。而，為了提高抗體之安定性，為了使 ATNLSA1-4_D12 之框架序列回到 VH3-21 生殖細胞序列，對 ATNLSA1-4_D12 之框架序列導入 Gln01Glu、Gln05Val、Asp10Gly、Asn30Ser、Leu48Val、Asn58Tyr(數字代表 Kabat 編號)之改變。以 DSC 測定實施例 7-1 所示之方法表現及精製之 ATNLSA1-4_D12 之改變體之 T_m。利用 DSC 之測定，係依該技術領域中具有通常知識者公眾所知之方法實施。施以該等改變之 ATNLSA1-4_D12 之改變體之 T_m，從 74.37°C 大幅上升為 81.44°C，可承認其結構安定化。有時抗體庫也宜使用高安定性之框架，所以施以前述改變之框架序列，作為庫框架序列使用。庫使用之框架，如表 14。

【0571】

【表 14】

框架	序列編號	序列
重鏈框架 1	56	EVQLVESGGGLVKPGGFLRLSCAASGFTFS
重鏈框架 2	57	WVRQAPGKGLEWVS
重鏈框架 3	58	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
重鏈框架 4	59	WGQGTLVTVSS
輕鏈框架 1	60	QSALTQPPSASGSPGQTVTISC
輕鏈框架 2	61	SWYQQHPGKAPKLMY
輕鏈框架 3	62	GVPDRFSGSKSGNTASLTVSGLQAEDEADYFC
輕鏈框架 4	63	FGGGTKLTVL

【0572】 合成以如此設計之庫含有之包含各個序列之基因 (DNA2.0)，將該等各個基因之集合體(庫)作為模板，利用可分別放大 VH 及 VL 之引子將基因庫放大。又，VL 放大用引子之序列，記載於序列編號：102 及 103，VH 放大用引子之序列記載於序列編號：104 及 105。將經放大之合理設計之人類抗體重鏈可變區之基因庫與人類抗體輕鏈可變區之基因庫對於具有人類 IgG 來源 CH1 序列及人類 IgG 來源輕鏈不變區序列兩者之適當噬粒載體導入。將此噬粒載體利用電穿孔法對大腸菌導入，以建構能取得提示由人類抗體可變區-不變區構成 Fab 分域且能將腺苷或 ATP 作為開關而與抗原結合之抗體的合理設計庫。如此，從具有多樣腺苷或 ATP 結合活性之 H 鏈及 L 鏈構成之合理設計庫，如圖 19 所示，據認為以良好效率取得作為含有腺苷或 ATP 夾於抗體與抗原之間且對抗任意抗原之 ATP/腺苷開關抗體的人類抗體的庫為有用。又，如上述，ATNLSA1-4_D12 不僅對腺苷與 ATP 結合，也會對 ADP 結合，故可預料對 ATP、ADP 及腺苷的結構類似之 AMP 及 cAMP 也有結合活性。所以，該庫舉認為對於取得因為對於 ATP、ADP、AMP、cAMP、或腺苷中之任一以上之低分子之有無而使對任意標的抗原之結合活性改變之開關抗體為有用。

【0573】 [實施例 9]含抗 ATP/腺苷抗體曲目之腺苷/ATP/腺苷開關抗體取得用之免疫庫之建構

將從在實施例 5-4 中使用 MACS 及 FACS 挑選到表現腺苷-PEG-生物素結合抗體之 B 細胞群回收之 mRNA 作為模板，建構提示由兔抗體序列構成之 Fab 分域之多數兔抗體噬菌體展示庫。作為建構方法，參照 Rader(Methods Mol. Biol. (2009) 525, 101-28)。

【0574】 更具體而言，利用將從 9 隻經免疫之兔挑選之 600,000 個細胞之上述 B 細胞回收之 mRNA 作為模板之反轉錄反應，製備 cDNA。將此 cDNA 作為模板，利用使用表 15 記載之引子之 PCR 反應，於適當條件下以 PCR 放大重鏈可變區、及輕鏈可變區-不變區序列。

【0575】

【表 15】

引子名	序列編號	序列
primer 1	64	TATTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCAGCCWTC GANWTGACCCAGACT
primer 2	65	TATTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCAGCCTAT GATNTGACCCAGACT
primer 3	66	TATTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCAGCBCAA GTGCTGACCCAGACT
primer 4	67	TATTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCAGCCMTY GTGATGACCCAGACT
primer 5	68	TATTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCAGCCGCC GTGCTGACCCAGACT
primer 6	69	TATTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCGGCTGAC ATTGTGATGACCCAG
primer 7	70	TATTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGCCGAY RTYGTGATGACCCAG
primer 8	71	CTCTTCTAGAACGGCTCTAAGCGTCACCCCTATTGA AGCTC
primer 9	72	TATTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCGCAGCYY GTGCTGACTCAGTCGCCCTC
primer 10	73	CTCTTCTAGAACGGCTCTAAGCTTCTGCAGGGGCCA GGCTCTTC
primer 11	74	TTCCGCCTCGGGGCTAGCCCAGGAGCAGSTGGWGG AGTCC
primer 12	75	TTCCGCCTCGGGGCTAGCCCAGTCNNTGGAGGAGT CCGGG
primer 13	76	TTCCGCCTCGGGGCTAGCCCAGTCGNNGGAGGAGT CCGGG
primer 14	77	TTCCGCCTCGGGGCTAGCCCAGCAGCAGCTGGWGG AGTCC

【0576】 將經放大之兔抗體重鏈可變區之基因庫與兔抗體輕鏈可變區-不變區之基因庫之組合，導入具有兔 IgG 來源 CH1 序列之適當噬粒載體。藉由將此噬粒載體以電穿孔法導入大腸菌，建構能取得提示由兔抗體可變區-不變區構成之 Fab 分域且以腺苷或 ATP 作為開關而與抗原結合之抗體的兔抗體噬菌體展示庫(以下稱為腺苷免疫兔抗體庫)。如此，由發揮多樣腺苷結合性之 H 鏈及 L 鏈構成之腺苷免疫庫，據認為作為如圖 20 所示，腺苷(或 ATP)夾持於抗體與抗原之間，且能取得對任意抗原之腺苷/ATP 開關抗體的免疫庫為有用。

【0577】 [實施例 10]從使用噬菌體展示技術抗體庫取得於腺苷、ATP 存在下與抗原結合之抗體

(10-1)利用腺苷及 ATP 之混合物從庫取得在低分子存在下與抗原結合之抗體

從建構之腺苷免疫兔抗體噬菌體展示庫、合理設計抗體噬菌體展示庫，取得於腺苷、及/或 ATP 存在條件下對抗原顯示結合活性之抗體。為了取得，回收提示於腺苷、及 ATP 存在下對於捕捉在珠粒之抗原顯示結合能力之抗體的噬菌體，之後從於腺苷、及 ATP 不存在條件下從珠粒溶出之溶出液中回收噬菌體。

【0578】 使保持建構之噬菌體展示用噬粒之大腸菌生產噬菌體。對於產生噬菌體之大腸菌之培養液添加 2.5M NaCl/10%PEG，將沉澱之噬菌體之集團以 TBS 稀釋，獲得噬菌體庫液。然後，於該噬菌體庫液添加 BSA 使終濃度成為 4%。使用固定於磁珠之抗原實施淘選。磁珠，使用 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) 或 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)。

【0579】 於製備之噬菌體庫液，加入 500 pmol 之生物素標記抗原、以及各終濃度 1 mM 之 ATP-Na 及腺苷，以使該噬菌體庫液於室溫與抗原及腺苷、及 ATP 接觸 60 分鐘。於該噬菌體庫液加入經 BSA 阻斷的磁珠，使抗原與噬菌體之複合體與磁珠在室溫進行 15 分鐘結合。將珠粒已溶有 ATP 及腺苷之 TBS 洗滌 1 次。之後，將已加入 1 mg/mL 胰蛋白酶 0.5 mL 之珠粒於室溫懸浮 15 分鐘後，即時使用磁座分離珠粒，從珠粒回收

噬菌體溶液。將回收之噬菌體溶液添加到對數增殖期(OD600 為 0.4-0.7)之 10 mL 大腸菌株 ER2738。於 37°C 緩慢進行 1 小時上述大腸菌之攪拌培養，使噬菌體感染大腸菌。感染之大腸菌，接種到 225 mm x 225 mm 之板。然後，從接種之大腸菌之培養液回收噬菌體，以製備噬菌體庫液。

【0580】 第 1 次淘選係回收於腺苷及 ATP 存在下可對抗原結合之噬菌體，但第 2 次以後之淘選，係濃縮僅在腺苷及 ATP 存在下可對抗原結合之噬菌體。具體而言，藉由在製備之噬菌體庫液加入 40 pmol 生物素標記抗原以及各終濃度 1 mM 之腺苷及 ATP，以使噬菌體庫於室溫與抗原以及腺苷及 ATP 接觸 60 分鐘。加入經 BSA 阻斷之磁珠，使抗原與噬菌體之複合體與磁珠在室溫結合 15 分鐘。將珠粒以溶有 1 mL 腺苷及 ATP 之 TBST(以下稱為(腺苷 + ATP)/TBST)及溶有腺苷、腺苷及 ATP 之 TBS(以下稱為(腺苷 + ATP)/TBS)洗滌。之後，將已加入 0.5 mL TBS 之珠粒於室溫懸浮後，即時使用磁座分離珠粒，從珠粒回收噬菌體溶液。在重複此作業後，將分 2 次溶出之噬菌體液混合。於回收之噬菌體溶液加入 100 mg/mL 之胰蛋白酶 5 μ L，使未提示 Fab 之噬菌體之 pIII 蛋白質(幫助者噬菌體來源之 pIII 蛋白質)被切斷，未提示 Fab 之噬菌體對大腸菌失去感染能力。從經胰蛋白酶處理之噬菌體溶液回收之噬菌體，對成為對數增殖期(OD600 為 0.4-0.7)之 10 mL 大腸菌株 ER2738 添加。於 37°C 緩慢進行 1 小時上述大腸菌之攪拌培養以使噬菌體感染大腸菌。將已感染之大腸菌接種於 225 mm x 225 mm 之板。然後從接種之大腸菌之培養液回收噬菌體，以回收噬菌體庫液。取得

於腺苷及 ATP 存在下對抗原有結合活性之抗體之淘選，重複 3 次。

【0581】 (10-2)利用負選擇法從抗體庫取得於腺苷、ATP 存在下與抗原結合之抗體

從已以腺苷免疫之兔建構之抗體噬菌體展示庫、或合理設計抗體噬菌體展示庫，篩選對於抗原於腺苷及/或 ATP 存在之條件下顯示對抗原之結合活性之抗體。為了篩選，首先使抗體噬菌體展示庫於腺苷及 ATP 不存在下與生物素標記抗原-鏈黴親和素接觸，去除提示即使腺苷及 ATP 不存在下也對抗原有結合活性之抗體之噬菌體。然後，於腺苷及 ATP 存在之條件下同樣淘選，實施於腺苷及 ATP 存在之條件下對抗原有結合活性之抗體之篩選。

【0582】 使保持建構之噬菌體展示用噬粒之大腸菌生產噬菌體。對於產生噬菌體之大腸菌之培養液添加 2.5M NaCl/10%PEG，將沉澱之噬菌體之集團以 TBS 稀釋，獲得噬菌體庫液。然後，於該噬菌體庫液添加 BSA 使終濃度成為 4%。使用固定於磁珠之抗原實施淘選。磁珠，使用 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) 或 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)，並使用固定於磁珠之抗原實施淘選。

【0583】 於製備之噬菌體庫液，加入 250pmol 之生物素標記抗原、以及各終濃度 1 mM 之腺苷及 ATP 之混合液，以使該噬菌體庫液於室溫與抗原及腺苷、及 ATP 接觸 60 分鐘。然後於該噬菌體庫液加入經 BSA 阻斷的磁珠，使抗原與噬菌體

之複合體與磁珠在室溫進行 15 分鐘結合。將珠粒以(腺苷 + ATP) /TBS 洗滌 1 次。之後，將已加入 1 mg/mL 胰蛋白酶 0.5 mL 之珠粒於室溫懸浮 15 分鐘後，即時使用磁座分離珠粒，從珠粒回收噬菌體溶液。將回收之噬菌體溶液添加到對數增殖期 (OD600 為 0.4-0.7)之 10 mL 大腸菌株 ER2738。於 37°C 緩慢進行 1 小時上述大腸菌之攪拌培養，使噬菌體感染大腸菌。感染之大腸菌，接種到 225 mm x 225 mm 之板。然後，從接種之大腸菌之培養液回收噬菌體，以製備噬菌體庫液。

【0584】 第 1 次淘選係回收於腺苷及 ATP 存在下可對抗原結合之噬菌體，但第 2 次以後之淘選，係濃縮僅在腺苷及 ATP 存在下可對抗原結合之噬菌體。具體而言，藉由在經 BSA 阻斷之 Sera-Mag NeutrAvidin 珠粒加入 250 pmol 生物素化抗原，於室溫使結合 15 分鐘。對於以 TBS 洗滌過 3 次珠粒，加入經 BSA 阻斷之噬菌體庫液，於室溫進行 1 小時結合。使用磁座分離珠粒，從珠粒回收未與抗原及珠粒結合之噬菌體。對於回收之噬菌體，加入 40 pmol 生物素標記抗原以及各終濃度 1 mM 之腺苷及 ATP，以使噬菌體庫於室溫與抗原以及腺苷及 ATP 接觸 60 分鐘。然後在該標記抗原以及腺苷及 ATP 與噬菌體庫之混合液中加入經 BSA 阻斷之磁珠，於室溫使抗原與噬菌體之複合體與磁珠結合 15 分鐘。珠粒以 1 mL 腺苷 + ATP) /TBST 與(腺苷 + ATP) /TBS 洗滌。之後將 1 mg/mL 之 Trypsin 溶液 0.5 mL 加到該混合液。該混合液於室溫進行 20 分鐘攪拌後，使用磁座分離珠粒，從珠粒回收噬菌體。回收之噬菌體加到對數增殖期 (OD600 為 0.4-0.7)之 10 mL 大腸菌株 ER2738。

於 37°C 緩慢進行 1 小時上述大腸菌之攪拌培養以使噬菌體感染大腸菌。將已感染之大腸菌接種於 225 mm x 225 mm 之板。取得於腺苷及 ATP 存在之條件下對抗原有結合活性之抗體之淘選係重複 3 次。

【0585】 (10-3)利用交互淘選法，從抗體庫取得於腺苷、ATP 存在下與抗原結合之抗體

從已以腺苷免疫之兔建構之抗體噬菌體展示庫、或合理設計抗體噬菌體展示庫，篩選對抗原於腺苷及/或 ATP 存在之條件下顯示對抗原之結合活性之抗體。為了篩選，首先使抗體噬菌體展示庫於非標記抗原存在之條件下與生物素化腺苷及 ATP-NeutrAvidin 接觸，回收於抗原存在下與腺苷及/或 ATP 結合之抗體噬菌體展示庫。然後，然後使該抗體噬菌體展示庫於腺苷及 ATP 存在之條件下，與生物素化抗原-鏈黴親和素接觸，回收於腺苷及 ATP 存在下與抗原結合之抗體。藉由交互進行如此的淘選，實施於腺苷及 ATP 存在之條件下對抗原有結合活性之抗體之篩選。

【0586】 使保持建構之噬菌體展示用噬粒之大腸菌生產噬菌體。對產生噬菌體之大腸菌之培養液添加 2.5M NaCl/10%PEG，將沉澱之噬菌體之集團以 TBS 稀釋，獲得噬菌體庫液。然後，於該噬菌體庫液添加 BSA 使終濃度成為 4%。使用固定於磁珠之抗原實施淘選。磁珠，使用 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) 或 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)，並使用固定於磁珠之抗原實施淘選。

【0587】 於製備之噬菌體庫液，加入 250pmol 之生物素化 ATP、2'-Adenosine-PEG-Biotin、及 5'-Adenosine-PEG-Biotin、及 1000 pmol 之非標記抗原，以使該噬菌體庫液於室溫與抗原及腺苷、及 ATP 接觸 60 分鐘。然後於該噬菌體庫液加入經 BSA 阻斷的磁珠，使抗原以及腺苷及/或 ATP 與噬菌體之複合體與磁珠在室溫進行 15 分鐘結合。將珠粒以含 1000 pmol 之抗原之 TBS 洗滌 1 次。之後，將已加入 1 mg/mL 胰蛋白酶 0.5 mL 之珠粒於室溫懸浮 15 分鐘後，即時使用磁座分離珠粒，從珠粒回收噬菌體溶液。將回收之噬菌體溶液添加到對數增殖期 (OD600 為 0.4-0.7) 之 10 mL 大腸菌株 ER2738。於 37°C 緩慢進行 1 小時上述大腸菌之攪拌培養，使噬菌體感染大腸菌。感染之大腸菌，接種到 225 mm x 225 mm 之板。然後，從接種之大腸菌之培養液回收噬菌體，以製備噬菌體庫液。

【0588】 於第 2 次淘選，進行於腺苷及 ATP 存在之條件下可對生物素化抗原結合之噬菌體之濃縮。具體而言，對製備之噬菌體庫液加入 40 pmol 生物素化抗原以及終濃度 1 mM 之腺苷及 ATP，以使該噬菌體庫液與抗原以及腺苷及 ATP 於室溫接觸 60 分鐘。然後，於噬菌體庫液加入經 BSA 阻斷的磁珠，將抗原以及腺苷及/或 ATP 與噬菌體之複合體於室溫結合於磁珠 15 分鐘。以含終濃度 1 mM 之腺苷及 ATP 之 TBST 洗滌珠粒 3 次、以含終濃度 1 mM 之腺苷及 ATP 之 TBS 洗滌珠粒 2 次。之後，將已加入 1 mg/mL 之胰蛋白酶溶液 0.5 mL 的珠粒於室溫懸浮 15 分鐘後，即時從以磁座分離之珠粒回收噬菌體溶液。回收之噬菌體溶液添加到成為對數增殖期 (OD600 為 0.4-0.7)

之 10 mL 之大腸菌株 ER2738。藉由於 37°C 進行上述大腸菌之緩慢攪拌培養 1 小時，使噬菌體感染大腸菌。被感染之大腸菌接種到 225 mm x 225 mm 之板。然後，從已接種之大腸菌之培養液回收噬菌體，製備噬菌體庫液。

【0589】 之後，於第偶數次淘選中，重複實施與第 2 次淘選為相同條件之淘選。惟，第 4 次以後的淘選，將利用(腺苷 + ATP)/TBST 及(腺苷 · ATP)/TBS 進行之珠粒之洗滌總共增為 5 次而實施。

【0590】 第 3 次淘選，再度進行於抗原存在下可對生物素化腺苷及 ATP 結合之噬菌體之濃縮。具體而言，於製備之噬菌體庫液加入 250 pmol 生物素化 ATP、2'-Adenosine-PEG-Biotin、及 5'-Adenosine-PEG-Biotin、及 1000 pmol 非標記抗原，以使該噬菌體庫液與抗原以及腺苷及 ATP 於室溫接觸 60 分鐘。然後，於噬菌體庫液中加入經 BSA 阻斷之磁珠，使抗原以及腺苷及/或 ATP 與噬菌體之複合體，與磁珠在室溫進行 15 分鐘結合。將珠粒以含 1000 pmol 之抗原之 TBST 洗 3 次，及以含 1000 pmol 之抗原之 TBS 洗 2 次。之後，將已加入 1 mg/mL 胰蛋白酶溶液 0.5 mL 之珠粒於室溫懸浮 15 分鐘後，即時使用磁座分離珠粒並從珠粒回收噬菌體溶液。回收之噬菌體溶液添加到成為對數增殖期(OD600 為 0.4-0.7)之 10 mL 之大腸菌株 ER2738。藉由於 37°C 進行上述大腸菌之緩慢攪拌培養 1 小時，使噬菌體感染大腸菌。被感染之大腸菌接種到 225 mm x 225 mm 之板。然後，從已接種之大腸菌之培養液回收噬菌體，製備噬菌體庫液。

【0591】 之後，在第奇數次淘選中，以與第 3 次淘選為相同條件反復實施淘選。惟，含抗原之 TBST 及含抗原之 TBS 進行之珠粒洗滌，於第 4 次後之淘選總共增為 5 次。或第 3 次後之淘選，無論第偶數次、第奇數次，以後以與第 3 次淘選為相同條件反復實施淘選。惟，含抗原之 TBST 及含抗原之 TBS 進行之珠粒洗滌，於第 4 次後之淘選總共增為 5 次。

【0592】 (10-4)利用噬菌體 ELISA 評價腺苷及/或 ATP 存在下及不存在下之結合活性

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

使用 NucleoFast 96(MACHERY-NAGEL)，將回收之培養上清進行超過濾。將已將培養上清各 100 μ L 對於各井塗用之 NucleoFast 96 進行離心分離(4,500g, 45 分鐘)，以去除通流物(flow through)。將 100 μ L 之 H₂O 已加到各井之該 NucleoFast 96 再度離心分離(4,500g, 30 分鐘離心)以洗滌。最後，加入 TBS 100 μ L，回收於室溫靜置 5 分鐘之該 NucleoFast 96 之各井之上清含有之噬菌體液。

【0593】 已加入 TBS、或(腺苷 + ATP)/TBS 之精製噬菌體依以下程序供 ELISA。將 StreptaWell 96 微滴定板(Roche)以含生物素標記抗原之 TBS 100 μ L 塗覆一晚。以 TBST 洗滌該板之各井以去除抗原後，將該井以 250 μ L 之 2%脫脂奶-TBS 阻斷 1 小時以上。去除 2%脫脂奶-TBS，於各井添加製備的精製噬菌體，將該板於 37 $^{\circ}$ C 靜置 1 小時，使提示抗體之噬菌體於腺苷及/或 ATP 不存在/存在下結合於在各井存在的抗原。於以 TBST 或(腺

昔 + ATP)/TBST 洗滌之各井添加經 TBS 或(腺昔 + ATP)/TBS 稀釋之 HRP 結合抗 M13 抗體(Amersham Pharmacia Biotech)，將該板於溫育 1 小時。以 TBST 或(腺昔 + ATP)/TBST 洗滌後，將添加有 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反應停止後，測定 450 nm 之吸光度以測定該發色。其結果，確認對於人類 IL6、人類 IL6 Receptor、HAS(人類血清白蛋白)之三種抗原，於低分子存在下結合之多個抗體。也從人類未改變抗體庫取得於 ATP 存在下結合之抗體，但能以更高效率取得對於人類 IL6、人類 IL6 Receptor、HAS 之開關抗體。噬菌體 ELISA 之結果如表 16。

【0594】

【表 16】

	Human IL6	Human IL6R		HSA
淘選次數	4	3	4	4
ELISA 實施選殖體數	96	96	96	96
陽性選殖體數(S/N 比>10)	35	23	64	52
依存性選殖體數(SM+/-比> 2)	18	22	64	50
依存性選殖體序列數	2	17	35	5

【0595】 (10-5)因腺昔及 ATP 之有無而改變對抗原之結合活性之開關抗體之結合能力之評價及序列解析

由(10-4)表示之噬菌體 ELISA 之結果，解析從判斷為於腺昔或 ATP 存在之條件下對抗原有結合活性之選殖體使用專一性的引子(序列編號：111 及 112)放大之基因之鹼基序列。解析之結果，取得具有與抗原 human IL6、HSA、 human IL6R 結合之多數彼此互異之序列之抗體。對於 human IL6 之抗體

I6DL2C5-4_076、對於 HAS 之抗體 HSDL3C5-4_015、及對於 human IL-6R 之抗體 6RAD2C1-4_011 與 6RAD2C1-4_076 之胺基酸序列，如表 17。

【0596】

【表 17】

選殖體名	重鏈序列編號	輕鏈序列編號
I6DL2C5-4_076	序列編號:78	序列編號:79
HSDL3C5-4_015	序列編號:80	序列編號:81
6RAD2C1-4_011	序列編號:82	序列編號:83
6RAD2C1-4_076	序列編號:84	序列編號:85

【0597】 (10-6)取得之抗體對抗原結合所必要之低分子之鑑定

取得之 I6DL2C5-4_076、HSDL3C5-4_015、6RAD2C1-4_011、6RAD2C1-4_076 之各抗體供 ELISA 使用。低分子使用 1mM ATP、腺苷、及其混合物。抗原使用經生物素標記之人類 IL6、人類 IL6R、HSA。

【0598】 首先，使 StreptaWell 96 微滴定板(Roche)以含生物素標記抗原之 100 μ L 之 TBS 於室溫塗覆 1 小時以上。將該板之各井以 TBST 洗滌以去除未與板結合之生物素標記抗原後，將該井以 2% 脫脂奶/TBS 250 μ L 阻斷 1 小時以上。於已去除 2% 脫脂奶/TBS 之各井，加入提示抗體之噬菌體 50 μ L，將該板於室溫靜置 1 小時，使各噬菌體與各井存在之生物素標記抗原在 ATP 及/或腺苷存在下及不存在下結合。以含 ATP 及/或腺苷之 TBST 或不含之 TBST 洗滌後，將已添加經 TBS 或(腺苷及/或 ATP)/TBS 稀釋之 HRP 結合抗 M13 抗體(Amersham

Pharmacia Biotech)於各井之板溫育 1 小時。以含各低分子之 TBST、及不含之 TBST 洗滌後，將添加有 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反應停止後，測定 450 nm 之吸光度以測定該發色。(圖 25、26、27)。

【0599】 [實施例 11]實施例 2 取得之抗體在犬尿胺酸 (kyneurine)以外之胺基酸代謝物存在下對人類 IL-6 之結合活性

實施例 2-4 取得之低分子存在下與人類 IL-6 結合之抗體 I6NMSC1-3_A11，如實施例 3-2 所示，係於犬尿胺酸存在下與人類 IL-6 結合之抗體。犬尿胺酸是色胺酸代謝物，且犬尿胺酸會利用犬尿胺酸酶變換為鄰胺苯甲酸、及利用犬尿胺酸 3-脫羧酶變換為 3-羥基犬尿胺酸、利用犬尿胺酸胺基轉移酶變換為犬尿喹啉酸(Stefan Lob et. Al. Nat Rev Cancer. (2009) 9 (6), 445-452)。針對如此之一系列色胺酸代謝物等胺基酸代謝物，是否適於作為本發明使用之癌組織專一性化合物、尤其癌細胞專一性代謝產物之非限定態樣進行驗證。

【0600】 將實施例 3-2 所示之於犬尿胺酸存在下對抗原有結合活性之抗體 I6NMSC1-3_A11 及既知之抗人類 IL-6 抗體 CLB8-F1、及作為陰性對照之 GC413，於表 18 所示 7 種條件下供 ELISA。又，以表 4 所示緩衝液製備各胺基酸及其代謝物為表 18 所示濃度。抗原使用經生物素標記之人類 IL-6。

【0601】

【表 18】

條件	低分子(Small molecule)	濃度
1	犬尿胺酸(Kynurenine)	100 μ M
2	色胺酸(Tryptophan)	100 μ M
3	苯丙胺酸(Phenylalanine)	100 μ M
4	鄰胺苯甲酸(Anthranilic acid)	100 μ M
5	3-羥基犬尿胺酸(3-Hydroxykynurenine)	100 μ M
6	犬尿喹啉酸(Kynurenic acid)	100 μ M
7	-	-

【0602】 首先，將 StreptaWell 96 微滴定板(Roche)以含生物素標記抗原之 100 μ L 之 PBS 於室溫塗覆 1 小時以上。將該板之各井以 Wash buffer 洗滌，以去除未與板結合之抗原後，將該井以 Blocking Buffer 250 μ L 阻斷 1 小時以上。於已去除 Blocking Buffer 之各井，將以表 18 之終濃度含低分子之 Sample Buffer 製備為 2.5 μ g/mL 之精製 IgG 之各 100 μ L 加入，將該板於室溫靜置 1 小時，使各 IgG 與各井存在之抗原結合。以表 18 終濃度含胺基酸及胺基酸代謝物之 Wash Buffer 洗滌後，將經含胺基酸及胺基酸代謝物之 Sample Buffer 稀釋之 HRP 結合抗人類 IgG 抗體(BIOSOURCE)對各井添加，將該板溫育 1 小時。以含各胺基酸及胺基酸代謝物之 Wash Buffer 洗滌後，將添加有 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反應停止後，測定 450 nm 之吸光度以測定該發色。又， Bufferr 使用含有表 4 記載之組成之 Buffer。

【0603】 測定結果如圖 21。CLB8-F1 不論低分子種類及其有無，吸光度相同，相對於此，I6NMSC1-3_A11，相較於在條件 1(犬尿胺酸溶液)之吸光度，在條件 7(無低分子)之吸光度顯著較低。同樣，在條件 2(色胺酸溶液)與條件 5(3-羥基犬尿胺

酸溶液)之吸光度，與條件 1 顯示同樣為高之吸光度，所以，代表 I6NMSC1-3_A11 係不僅在犬尿胺酸存在下，於犬尿胺酸之前驅體胺基酸(色胺酸)及犬尿胺酸之代謝物存在下也會與抗原即人類 IL-6 結合之抗體。

【0604】 由此，可認為藉由相同方法，不僅於一種胺基酸代謝物存在下，於結構相異之多數種類胺基酸或胺基酸代謝物存在下，可取得與目的抗原結合之抗體。

【0605】 [實施例 12]

從使用噬菌體展示技術之人類抗體庫取得於低分子存在下與人類 IL-6 結合之抗體

(12-1)利用珠粒淘選或負選擇法，從庫取得於低分子存在下與人類 IL-6 結合之抗體

從實施例 2-1 建構之未改變人類抗體噬菌體展示庫，以與 2-2 及 2-3 所示之方法為相同方法，篩選於低分子存在下對抗原顯示結合活性之抗體。

【0606】 (12-2) 利用噬菌體 ELISA 評價於低分子存在下之結合活性

以與實施例 2-4 相同之方法，從獲得之大腸菌單一菌落回收含噬菌體之培養上清，將精製噬菌體供 ELISA。使用單離之 768 個選殖體進行噬菌體 ELISA，新獲得於低分子雞尾酒成分(cocktail)存在下對抗原人類 IL-6 有結合活性之選殖體「I6NMSC1-3_#03」及「I6NMSC1-3_#17」。

【0607】 (12-3)與人類 IL-6 結合之抗體之表現與精製

解析從噬菌體 ELISA 顯示之判斷於 SC 存在下對抗原有結

合活性之選殖體選殖體 I6NMSC1-3_#03 及 I6NMSC1-3_#17 使用專一性的引子(序列編號：110 及 112)放大之基因之鹼基序列。I6NMSC1-3_#03 之重鏈之序列為序列編號：50 及輕鏈之序列為序列編號：51。又，I6NMSC1-3_#17 之重鏈之序列為序列編號：52 及輕鏈之序列為序列編號：53。將編碼為 I6NMSC1-3_#17 之可變區之基因插入人類 IgG1/Lambda 之動物表現用質體，I6NMSC1-3_#03、既知之抗人類 IL-6 抗體 CLB8-F1(重鏈為序列編號：32、輕鏈為序列編號：33)、及編碼為陰性對照即抗人類 Glypican 3 抗體 GC413(重鏈為序列編號：34、輕鏈為序列編號：35)之可變區之基因各插入人類 IgG1/kappa 之動物表現用質體。表現之抗體依實施例 3 記載之方法精製。

【0608】 (12-4) I6NMSC1-3_#03 抗體對人類 IL-6 之結合為必要之低分子之鑑定

I6NMSC1-3_#03，於表 3 所示之 9 種條件下供 ELISA。又，以表 4 所示之緩衝液以表 3 所示濃度適當製備各低分子。抗原使用經生物素標記之人類 IL-6。

【0609】 先將 StreptaWell 96 微滴定板(Roche)以含生物素標記抗原之 PBS 100 μ L 塗覆一晚。以 Wash buffer 洗滌該板之各井以去除抗原後，將該井以 Blocking Buffer 250 μ L 阻斷 1 小時以上。於已去除 Blocking Buffer 之各井添加以表 3 之終濃度含有低分子之 Sample Buffer 製備為 2.5 μ g/mL 之精製 IgG 各 100 μ L，將該板於室溫靜置 1 小時，使 IgG 結合於在各井存在的抗原。於表 3 之終濃度且含低分子之 Wash Buffer 洗滌後，

將以含該低分子之 Sample Buffer 稀釋之 HRP 結合抗人類 IgG 抗體 (BIOSOURCE) 添加到各井之板於溫育 1 小時。以含各低分子之 Wash Buffer 洗滌後，將添加有 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反應停止後，測定 450 nm 之吸光度以測定該發色。又，Buffer 使用含表 4 記載之組成之 Buffer。

【0610】 測定結果如圖 22。I6NMSC1-3_#03，比起於條件 8(全部低分子之雞尾酒溶液)之吸光度，於條件 9(無低分子)之吸光度顯著較低。從此結果，於噬菌體 ELISA 同樣可確認 I6NMSC1-3_#03 具有取決於低分子有無而改變與抗原之結合之性質。又，I6NMSC1-3_#03 在條件 7(犬尿胺酸 100 μ M 存在下)中，顯示與條件 8 為同等吸光度，在其他條件下則吸光度為顯著較低，顯示係與實施例 3 記載之 I6NMSC1-3_A11 同樣，為於犬尿胺酸存在下會與抗原人類 IL-6 結合之抗體。

I6NMSC1-3_#03，與 I6NMSC1-3_A11 具有相異胺基酸序列，藉此方法，可取得多種於低分子存在下與抗原之抗體。

【0611】 (12-5)I6NMSC1-3_#17 抗體對人類 IL-6 之結合所必要之低分子之鑑定

取得之 I6NMSC1-3_#17 與對照之 CLB8-F1 及陰性對照 GC413 之 3 種抗體，於表 3 所示之 9 種條件下供 ELISA。又，以表 4 所示之緩衝液以表 3 所示濃度適當製備各低分子。抗原使用經生物素標記之人類 IL-6。

【0612】 先將 StreptaWell 96 微滴定板 (Roche) 以含生物素標記抗原之 PBS 100 μ L 塗覆一晚。以 Wash buffer 洗滌該板之

各井以去除抗原後，將該井以 Blocking Buffer 250 μ L 阻斷 1 小時以上。於已去除 Blocking Buffer 之各井添加為表 3 之終濃度且含有低分子之以 Sample Buffer 製備為 0.15 μ g/mL 之精製 IgG 各 100 μ L，將該板於室溫靜置 1 小時，使 IgG 結合於在各井存在的抗原。於表 3 之終濃度且含低分子之 Wash Buffer 洗滌後，將以含該低分子之 Sample Buffer 稀釋之 HRP 結合抗人類 IgG 抗體 (BIOSOURCE) 添加到各井之板於溫育 1 小時。以含各低分子之 Wash Buffer 洗滌後，將添加有 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反應停止後，測定 450 nm 之吸光度以測定該發色。又， Buffer 使用含有表 4 記載之組成之 Buffer。

【0613】 測定結果如圖 23。CLB8-F1，不論低分子之種類及是否存在，吸光度為相同，相對於此，I6NMSC1-3_#17，比起於條件 8(全部低分子之雞尾酒溶液)之吸光度，於條件 9(無低分子)之吸光度顯著較低。從此結果，於噬菌體 ELISA 同樣可確認 I6NMSC1-3_#17 具有取決於低分子有無而改變與抗原之結合之性質。又，I6NMSC1-3_#17 在條件 1(ATP-Na 1mM) 及條件 5(琥珀酸 1mM) 中，顯示與條件 8 為同等吸光度，在其他條件下則吸光度為顯著較低，顯示係於 ATP-Na 或琥珀酸其中之一存在下會與抗原人類 IL-6 結合之抗體。ATP 已知會從癌細胞放出，但關於琥珀酸，已知癌細胞專一性地在細胞內外會蓄積。癌細胞在好氧環境下，已知比起氧化性磷酸化，會傾向進行解糖系依存性代謝，稱為 Warburg 效果，但缺血性癌症中，由於慢性的血流不足，使得解糖、氧化性磷酸化都被慢性

地受限，在更惡劣環境下獲得能量。如此之缺血性癌症，已知會進行富馬酸呼吸依存性的能量代謝，其結果會堆積富馬酸代謝物即琥珀酸(Succinic acid) (Cancer Res. (2009) 69 (11), 4918-4925)。

【0614】 藉由使用如此的方法，顯示可取得於犬尿胺酸以外之低分子存在下與抗原結合之抗體。又，ATP-Na 與琥珀酸具有帶有多數負電荷之共通特徵，顯示可取得在結構彼此互異之低分子之存在下與抗原結合之抗體。

【0615】 [實施例 13]從使用噬菌體展示技術之人類抗體庫取得於低分子存在下與人類血清白蛋白(人類血清白蛋白、以下也稱為 HSA)結合之抗體

(13-1) 利用珠粒淘選由庫取得於低分子存在下與 HSA 結合之抗體

從實施例 2 建構之未改變人類抗體噬菌體展示庫，進行低分子存在下對 HSA 顯示結合活性之抗體之篩選。亦即，收集提示對捕捉在珠粒之 HSA 於低分子存在下顯示結合活性之抗體的噬菌體。從於低分子不存在之條件從珠粒溶出之噬菌體溶出液回收噬菌體。本取得方法，係使用經生物素標記之 HSA 作為抗原。

【0616】 由保持已構建之噬菌體提示用噬粒之大腸菌產生之噬菌體，係依一般的方法精製。之後，獲得經 TBS 透析處理之噬菌體庫液。對噬菌體庫液添加脫脂奶，使終濃度為 3%。實施使用於磁珠固定化之抗原的淘選。磁珠使用 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) 或

Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)。

【0617】 為了有效率地取得能在癌組織作為開關作用的依存於低分子之低分子開關抗體，實施濃縮於該等低分子(腺苷(adenosine)、腺苷 3 磷酸(adenosine 5'-triphosphate; ATP)、肌苷(inosine)、犬尿胺酸、前列腺素 E2(prostaglandin E2; PGE2)、琥珀酸(succinic acid)、乳酸(lactic acid))之混合液(以下記載為 SC(small molecule cocktail))存在下結合於抗原，且於 SC 不存在下不結合於抗原之抗體之淘選。

【0618】 具體而言，藉由在製備之噬菌體庫液加入 250 pmol 生物素標記抗原以及由各終濃度 1 mM 之腺苷 3 磷酸鈉鹽(ATP-Na)、腺苷(Adenosine)、肌苷(Inosine)、琥珀酸(Succinic acid)、及乳酸(Lactic acid)、終濃度為 1 μ M 之前列腺素 E2(PGE2)、以及終濃度為 100 μ M 之犬尿胺酸構成且利用 NaOH 調整其 pH 為 7.4 之 SC，以使於室溫接觸 60 分鐘。然後，於噬菌體庫液加入經脫脂奶阻斷之磁珠，使抗原與噬菌體之複合體與磁珠在室溫結合 15 分鐘。將珠粒以 SC/TBS(含 SC 之 TBS)洗滌 1 次。之後，將已加入 1 mg/mL 胰蛋白酶溶液 0.5 mL 之珠粒於室溫懸浮 15 分鐘後，即時使用磁座分離珠粒，從珠粒回收噬菌體溶液。將回收之噬菌體溶液，對成為對數增殖期(OD600 為 0.4-0.7)之 10 mL 大腸菌株 ER2738 添加。於 37 $^{\circ}$ C 緩慢進行 1 小時上述大腸菌之攪拌培養以使噬菌體感染大腸菌。將已感染之大腸菌接種於 225 mm x 225 mm 之板。然後從接種之大腸菌之培養液回收噬菌體，以製備噬菌體庫液。

【0619】 第 1 次淘選係回收於低分子存在下可對抗原結合

之噬菌體，但第 2 次以後之淘選，係濃縮在低分子存在下可對抗原結合之噬菌體。具體而言，藉由在製備之噬菌體庫液加入 40 pmol 生物素標記抗原以及 SC、NaOH，以使噬菌體庫與抗原及低分子於室溫接觸 60 分鐘。然後，於噬菌體庫液加入經脫脂奶阻斷之磁珠，使抗原與噬菌體之複合體與磁珠在室溫結合 15 分鐘。將珠粒以 1 mL 之 SC/TBST 與 SC/TBS 洗滌。之後，將已加入 0.5 mL 之 TBS 之珠粒於室溫懸浮後，即時使用磁座分離珠粒，從珠粒回收噬菌體溶液。再次重複此作業後，將分 2 次溶出之噬菌體液混合。再對殘留的珠粒加入 0.5 mL 之 TBS，將該珠粒於室溫進行 5 分鐘攪拌。從使用磁座分離之珠粒回收噬菌體溶液。於回收之噬菌體溶液加入 100 mg/mL 胰蛋白酶 5 μ L，將未提示 Fab 之噬菌體之 pIII 蛋白質(幫助者噬菌體來源之 pIII 蛋白質)切斷，未提示 Fab 之噬菌體喪失對大腸菌之感染能力。將從經胰蛋白酶處理之噬菌體溶液回收之噬菌體，添加到成為對數增殖期 (OD600 為 0.4-0.7) 之 10 mL 大腸菌株 ER2738。於 37°C 緩慢進行 1 小時上述大腸菌之攪拌培養以使噬菌體感染大腸菌。將已感染之大腸菌接種於 225 mm x 225 mm 之板。將第 2 次淘選獲得之 2 種感染大腸菌於此時點點以等量混合，然後從接種之大腸菌之培養液回收噬菌體，得到菌體庫液。取得於低分子存在下對抗原有結合活性之抗體的淘選係重複 3 次。

【0620】 (13-2) 利用負選擇法從庫取得於低分子存在下與 HSA 結合之抗體

從建構之未改變人類抗體噬菌體展示庫，進行低分子存在

下對 HSA 顯示結合活性之抗體之篩選。為了篩選，首先使未改變人類抗體噬菌體展示庫於低分子不存在下與生物素標記抗原-鏈黴親和素(streptavidin)接觸，去除提示即使於分子不存在下仍對 HSA 有結合活性之抗體的噬菌體。然後，於低分子存在下同樣進行淘選，以實施於低分子存在之條件下對 HSA 有結合活性之抗體之篩選。抗原使用經生物素標記之 HSA。

【0621】 由保持已構建之噬菌體提示用噬粒之大腸菌產生噬菌體。依一般的方法精製產生之噬菌體後，獲得經 TBS 透析處理之噬菌體庫液。對噬菌體庫液添加脫脂奶，使終濃度為 3%。磁珠使用 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) 或 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)，並實施使用於磁珠固定化之生物素標記 HSA 的淘選。

【0622】 於製備之噬菌體庫液加入 250 pmol 之生物素標記 HSA、及由各終濃度為 1 mM 之 ATP-Na、Adenosine、Inosine、Succinic acid、及 Lactic acid、終濃度 1 μ M 之 PGE2、以及終濃度 100 μ M 之犬尿胺酸構成且以 NaOH 調整 pH 為 7.4 之 SC，使與該噬菌體庫液於室溫接觸 60 分鐘。於噬菌體庫液添加以脫脂奶阻斷的磁珠，將生物素標記 HSA 與噬菌體之複合體於室溫結合於磁珠 15 分鐘。將珠以 SC/TBS 洗滌 1 次。之後，將添加有 0.5 mL 之 1 mg/mL 之胰蛋白酶之珠於室溫懸浮 15 分鐘後，立即使用磁座分離珠，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 0.4-0.7)之 10 mL 之大腸菌株 ER2738。於 37 $^{\circ}$ 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。

【0623】 第 1 次之淘選係回收於低分子存在存在下可結合之噬菌體，第 2 次後之淘選，係實施於低分子存在存在下對生物素標記 HSA 可結合之噬菌體之濃縮。具體而言，具體而言，於經脫脂奶阻斷之 Sera-Mag NeutrAvidin 珠粒加入 250pmol 生物素化 HSA，於室溫使結合 15 分鐘。對於以 TBS 洗滌 3 次的珠粒，加入經脫脂奶阻斷的噬菌體庫液，於室溫使其進行 1 小時結合。使用磁座將珠粒分離，以回收未與生物素標記 HSA 及珠粒結合之噬菌體。對回收之噬菌體加入 40 pmol 之生物素標記 HSA 及 SC、NaOH，使噬菌體庫於室溫與含生物素標記 HSA 及 SC 之低分子接觸 60 分鐘。然後，於生物素標記 HSA、SC 及噬菌體庫之混合液中加入以脫脂奶阻斷之磁珠，於室溫使生物素標記 HSA 與噬菌體之複合體與磁珠結合 15 分鐘。珠粒以 1 mL 之 SC/TBST 與 SC/TBS 洗滌。之後將 1 mg/mL 之 Trypsin 溶液 0.5mL 加到該混合液。將該混合液於室溫進行 20 分鐘攪拌後，從使用磁座分離之珠粒回收噬菌體。回收之噬菌體添加到成為對數增殖期(OD600 為 0.4-0.7)之 10 mL 之大腸菌株 ER2738。於 37°C 緩慢進行上述大腸菌之攪拌培養 1 小時，以使噬菌體感染到大腸菌。受感染之大腸菌接種到 225 mm x 225 mm 之板。取得於低分子存在下對生物素標記 HSA 有結合活性之抗體的淘選重複進行 3 次。

【0624】 (13-3)利用噬菌體 ELISA 評價於低分子存在下之

結合活性

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

使用 NucleoFast 96 (MACHERY-NAGEL)，將回收之培養上清進行超過濾。將已將培養上清各 100 μ L 對各井塗用之 NucleoFast 96 進行離心分離 (4,500g, 45 分鐘)，以去除通流物 (flow through)。將 100 μ L 之 H₂O 已加到各井之該 NucleoFast 96 再度離心分離 (4,500g, 30 分鐘離心) 以洗滌。最後，加入 TBS 100 μ L，回收於室溫靜置 5 分鐘之該 NucleoFast 96 之各井之上清含有之噬菌體液。

【0625】 已加入 TBS、或 SC/TBS 之精製噬菌體依以下程序供 ELISA。將 StreptaWell 96 微滴定板 (Roche) 以含生物素標記 HSA 之 TBS 100 μ L 塗覆一晚。以 TBST 洗滌該板之各井以去除生物素標記 HSA 後，將該井以 250 μ L 之 2% 脫脂奶-TBS 阻斷 1 小時以上。去除 2% 脫脂奶-TBS，於各井添加製備的精製噬菌體，將該板於 37 $^{\circ}$ C 靜置 1 小時，使提示噬菌體之抗體於 SC 不存在/存在下結合於在各井存在的生物素標記 HSA。於以 TBST 或 SC/TBST 洗滌之各井添加經 TBS 或 SC/TBS 稀釋之 HRP 結合抗 M13 抗體 (Amersham Pharmacia Biotech)，將該板於溫育 1 小時。以 TBST 或 SC/TBST 洗滌後，將添加有 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反應停止後，測定 450 nm 之吸光度以測定該發色。

【0626】 使用經單離之 782 種選殖體進行噬菌體 ELISA，獲得於低分子雞尾酒存在下對抗原 HSA 有結合活性之選殖體

HSNMSC1-4_#22。

【0627】 (13-4)與 HSA 結合之抗體之表現與精製

解析從(13-3) 記載之噬菌體 ELISA 顯示之判斷於 SC 存在下對生物素標記 HSA 有結合活性之選殖體 HSNMSC1-4_#22 使用專一性的引子(序列編號：110 及 112)放大之基因之鹼基序列(重鏈之序列為序列編號：54 及輕鏈之序列為序列編號：55)。將編碼為 HSNMSC1-4_#22 之可變區之基因插入人類 IgG1/Lambda 之動物表現用質體。將編碼為陰性對照即抗人類 Glypican 3 抗體 GC413(重鏈為序列編號：34、輕鏈為序列編號：35)之可變區之基因各插入人類 IgG1/kappa 之動物表現用質體。表現之抗體依實施例 3 記載之方法精製。

【0628】 (13-5)取得之抗體對 HSA 之結合為必要之低分子之鑑定

取得之 HSNMSC1-4_#22 與 GC413 共 2 種之抗體，於表 3 所示之 9 種條件下供 ELISA。又，以表 19 所示之緩衝液以表 3 所示濃度適當製備各低分子。抗原使用經生物素標記之 HSA。

【0629】

【表 19】

Wash buffer	10 mM ACES, 150 mM NaCl, 0.05% Tween20, pH7.4
Blocking Buffer	10 mM ACES, 150 mM NaCl, 2%SkimMilk, pH7.4
Sample Buffer	10 mM ACES, 150 mM NaCl, 低分子 (Small molecule), pH7.4

【0630】 先將 StreptaWell 96 微滴定板(Roche)以含生物素標記 HSA 之 PBS 100 μ L 塗覆 1 小時以上。以 Wash buffer 洗滌該板之各井以去除未與板結合之生物素標記 HSA 後，將該井

以 Blocking Buffer 250 μ L 阻斷 1 小時以上。於已去除 Blocking Buffer 之各井添加為表 3 之終濃度且含有低分子之以 Sample Buffer 製備為 2.5 μ g/mL 之精製 IgG 各 100 μ L，將該板於室溫靜置 1 小時，使 IgG 結合於在各井存在的生物素標記 HSA。於表 3 之終濃度且含低分子之 Wash Buffer 洗滌後，將以含該低分子之 Sample Buffer 稀釋之 HRP 結合抗人類 IgG 抗體 (BIOSOURCE) 添加到各井之板於溫育 1 小時。以含各低分子之 Wash Buffer 洗滌後，將添加有 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反應停止後，測定 450 nm 之吸光度以測定該發色。又， Bufferr 係使用含表 19 記載之組成之 Buffer。

【0631】 測定結果如圖 24。HSNMSC1-4_#22，比起於條件 8(全部低分子之雞尾酒溶液)之吸光度，於條件 9(無低分子)之吸光度顯著較低。從此結果，於噬菌體 ELISA 同樣可確認 HSNMSC1-4_#22 具有取決於低分子有無而改變與抗原之結合之性質。又，HSNMSC1-4_#22 在條件 2(腺苷 1mM)中，顯示與條件 8 為同等吸光度，在其他條件下則吸光度為顯著較低，顯示係於腺苷存在下會與抗原 HSA 結合之抗體。藉由使用如此之方法，顯示可取得於犬尿胺酸以外之低分子存在下與抗原結合之抗體。

【0632】 [實施例 14] 從使用噬菌體展示技術之人類抗體庫取得於低分子存在下與人類 IL-6 受體(hIL-6R)結合之抗體

(14-1) 利用珠粒淘選從未改變人類抗體庫取得於低分子存在下與 hIL-6R 結合之抗體

從實施例 2 建構之未改變人類抗體噬菌體展示庫，篩選於低分子存在下對 hIL-6R 顯示結合活性之抗體。亦即，收集提示對捕捉在珠粒之 HSA 於低分子存在下顯示結合活性之抗體的噬菌體。從於低分子不存在之條件從珠粒溶出之噬菌體溶出液回收噬菌體。本取得方法，係使用經生物素標記之 hIL-6R 作為抗原。

【0633】 由保持已構建之噬菌體提示用噬粒之大腸菌產生之噬菌體，係依一般的方法精製。之後，獲得經 TBS 透析處理之噬菌體庫液。對噬菌體庫液添加 BSA，使終濃度為 4%。實施使用於磁珠固定化之抗原的淘選。磁珠使用 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) 或 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)。

【0634】 為了有效率地取得能在癌組織作為開關作用的依存於低分子之低分子開關抗體，實施濃縮於(2-2)記載之 SC 存在下與抗原結合且於 SC 不存在下不與抗原結合之抗體的淘選。

【0635】 具體而言，藉由在製備之噬菌體庫液加入 250 pmol 生物素標記抗原以及(2-2)記載之方式製備之 SC，以使於室溫接觸 60 分鐘。然後，於噬菌體庫液加入經 BSA 阻斷之磁珠，使抗原與噬菌體之複合體與磁珠在室溫結合 15 分鐘。將珠粒以 SC/TBS(含 SC 之 TBS)洗滌 1 次。之後，將已加入 1 mg/mL 胰蛋白酶溶液 0.5 mL 之珠粒於室溫懸浮 15 分鐘後，即時使用磁座分離珠粒，從珠粒回收噬菌體溶液。將回收之噬菌體溶液，對於成為對數增殖期(OD600 為 0.4-0.7)之 10 mL 大腸菌株

ER2738 添加。於 37°C 緩慢進行 1 小時上述大腸菌之攪拌培養以使噬菌體感染大腸菌。將已感染之大腸菌接種於 225 mm x 225 mm 之板。然後從接種之大腸菌之培養液回收噬菌體，以製備噬菌體庫液。

【0636】 為了將未提示 Fab 之噬菌體之 pIII 蛋白質(幫助者噬菌體來源之 pIII 蛋白質)切斷，使未提示 Fab 之噬菌體喪失對大腸菌之感染能力，而加入 100 mg/mL 胰蛋白酶 10 μ L，除此以外實施(2-2)記載之淘選。

【0637】 (14-2)利用負選擇法從未改變人類抗體庫取得於低分子存在下與 hIL-6R 結合之抗體

從建構之未改變人類抗體噬菌體展示庫，進行低分子存在下對 hIL-6R 顯示結合活性之抗體之篩選。為了篩選，首先使未改變人類抗體噬菌體展示庫於低分子不存在下與生物素標記抗原- 鏈黴親和素(streptavidin)接觸，去除提示即使於分子不存在下仍對 hIL-6R 有結合活性之抗體的噬菌體。然後，於低分子存在下同樣進行淘選，以實施於低分子存在之條件下對 hIL-6R 有結合活性之抗體之篩選。抗原使用經生物素標記之 hIL-6R。然後依使用生物素標記 hIL-6R 作為抗原之(2-3)記載之方法，製備噬菌體庫液。

【0638】 (14-3) 利用噬菌體 ELISA 評價於低分子存在下之結合活性

從(14-2)獲得之大腸菌單一菌落，參考常法(Methods Mol Biol. 2002;178:133-145.)回收含噬菌體之培養上清。將以(2-4)記載之方法精製之精製噬菌體以以下程序供 ELISA。

將 StreptaWell 96 微滴定板(Roche)以含生物素標記 hIL-6R 之 TBS 100 μ L 塗覆一晚。以 TBST 洗滌該板之各井以去除生物素標記 hIL-6R 後，將該井以 250 μ L 之 2%脫脂奶-TBS 阻斷 1 小時以上。去除 2%脫脂奶-TBS，於各井添加製備的精製噬菌體，將該板於 37 $^{\circ}$ C 靜置 1 小時，使提示噬菌體之抗體於 SC 不存在/存在下結合於在各井存在的生物素標記 HSA。於以 TBST 或 SC/TBST 洗滌之各井添加經 TBS 或 SC/TBS 稀釋之 HRP 結合抗 M13 抗體(Amersham Pharmacia Biotech)，將該板於溫育 1 小時。以 TBST 或 SC/TBST 洗滌後，將添加有 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反應停止後，測定 450 nm 之吸光度以測定該發色。

【0639】 使用經單離 960 種選殖體進行噬菌體 ELISA，獲得於低分子雞尾酒存在下對抗原 hIL-6R 有結合活性之選殖體 6RNMSC1-2_F02 及 6RNMSC1-3_G02。

【0640】 (14-4)與 hIL-6R 結合之抗體之表現與精製

解析從(14-3)記載之噬菌體 ELISA 顯示之判斷於 SC 存在下對生物素標記 hIL-6R 有結合活性之選殖體 6RNMSC1-2_F02 及 6RNMSC1-3_G02 使用專一性的引子(序列編號：110 及 112)放大之基因之鹼基序列 (6RNMSC1-2_F02:重鏈之序列為序列編號：86 及輕鏈之序列為序列編號：87、6RNMSC1-3_G02:重鏈之序列為序列編號：88 及輕鏈之序列為序列編號：89 表示)。將編碼為 6RNMSC1-2_F02、6RNMSC1-3_G02 之可變區及編碼為陰性對照即抗人類 Glypican 3 抗體 GC413(重鏈為序列編號：34、輕鏈為序列編號：35)之可變區之基因插入人類

IgG1/kappa 之動物表現用質體。表現之抗體依實施例 3 記載之方法精製。

【0641】 (14-5)取得之抗體對 hIL-6R 之結合所必要之低分子之鑑定

取得之 6RNMSC1-2_F02 及 6RNMSC1-3_G02 與 GC413 共 3 種之抗體，於表 3 所示之 9 種條件下供 ELISA。又，以表 19 所示之緩衝液以表 3 所示濃度適當製備各低分子。抗原使用經生物素標記之 hIL-6R。

【0642】 先將 StreptaWell 96 微滴定板(Roche)以含生物素標記 HSA 之 hIL-6R 100 μ L 塗覆 1 小時以上。以 Wash buffer 洗滌該板之各井以去除未與板結合之生物素標記 hIL-6R 後，將該井以 Blocking Buffer 250 μ L 阻斷 1 小時以上。於已去除 Blocking Buffer 之各井添加為表 3 之終濃度且含有低分子之以 Sample Buffer 製備為 2.5 μ g/mL 之精製 IgG 各 100 μ L，將該板於室溫靜置 1 小時，使 IgG 結合於在各井存在的生物素標記 hIL-6R。於表 3 之終濃度且含低分子之 Wash Buffer 洗滌後，將以含該低分子之 Sample Buffer 稀釋之 HRP 結合抗人類 IgG 抗體(BIOSOURCE)添加到各井之板於溫育 1 小時。以含各低分子之 Wash Buffer 洗滌後，將添加有 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反應停止後，測定 450 nm 之吸光度以測定該發色。又， Bufferr 係使用含表 19 記載之組成之 Buffer。

【0643】 測定結果如圖圖 28 與圖 29。使用 6RNMSC1-2_F02 及 6RNMSC1-3_G02 之情形，比起於條件 8(全部低分子之雞尾

酒溶液)之吸光度，於條件 9(無低分子)之吸光度顯著較低。從此結果，於噬菌體 ELISA 同樣可確認 6RNMSC1-2_F02 及 6RNMSC1-3_G02 具有取決於低分子有無而改變與抗原之結合之性質。又，6RNMSC1-2_F02 之情形，在條件 7(犬尿胺酸 100 μ M)中，顯示與條件 8 為同等吸光度，在其他條件下則吸光度為顯著較低，顯示 6RNMSC1-2_F02 係於犬尿胺酸存在下會與抗原 hIL-6R 結合之抗體(圖 28)。又，6RNMSC1-3_G02 之情形，在條件 1(ATP-Na 1mM)中，顯示與條件 8 為同等吸光度，在其他條件下則吸光度為顯著較低，顯示 6RNMSC1-3_G02 係於 ATP 存在下會與抗原 hIL-6R 結合之抗體(圖 29)。藉由使用如此之方法，顯示可一次取得多數在不同低分子存在下對抗原之結合能力改變之抗體。

【0644】 [實施例 15]6RNMSC1-2_F02 抗體之定性

(15-1)利用 ELISA 評價在犬尿胺酸以外之胺基酸及胺基酸代謝物存在下對 hIL6R 之結合活性

實施例 2-4 取得之低分子存在下與 hIL-6R 結合之抗體 6RNMSC1-2_F02，係於犬尿胺酸存在下與 hIL-6R 結合之抗體。針對如此之一系列色胺酸代謝物等胺基酸代謝物，是否適於作為本發明使用之癌組織專一性化合物、尤其癌細胞專一性代謝產物之非限定態樣進行驗證。

【0645】 將實施例 14 所示之於犬尿胺酸存在下對抗原有結合活性之抗體 6RNMSC1-2_F02、及作為陰性對照之 GC413，於表 18 所示 7 種條件下供 ELISA。又，以表 4 所示緩衝液製備各胺基酸及其代謝物為表 18 所示濃度。抗原使用經生物素

標記之 hIL-6R，ELISA 使用實施例 11 記載之方法。

【0646】 測定結果如圖圖 30。6RNMSC1-2_F02 之情形，相較於在條件 1(犬尿胺酸溶液)之吸光度，在條件 7(無低分子)之吸光度顯著較低。同樣，在條件 5(3-羥基犬尿胺酸溶液)之吸光度，與條件 1 顯示同樣為高之吸光度，所以，代表 6RNMSC1-2_F02 係不僅在犬尿胺酸存在下，於犬尿胺酸之代謝物存在下也會與抗原即 hIL-6R 結合之抗體。又，於其他條件也是顯著低之吸光度，可知 6RNMSC1-2_F02 係即使犬尿胺酸之前驅體色胺酸存在，也不與抗原 hIL-6R 結合之抗體。在癌微小環境，代謝色胺酸而產生犬尿胺酸之酵素 IDO 之表現上昇，所以，與色胺酸存在下不與抗原結合，而在犬尿胺酸及其代謝物存在下與抗原結合之抗體，據認為作為僅在癌微小環境下與抗原結合之抗體為重要。又，由此，可認為藉由相同方法，可取得不僅於一種類胺基酸代謝物存在，在結構相異之多種胺基酸代謝物存在下也對目的抗原結合之抗體。

【0647】 (15-2)利用表面電漿共振評價犬尿胺酸對人類 IL6 受體之結合之影響

使用 Biacore T200 (GE Healthcare)，解析 6RNMSC1-2_F02 與人類 IL-6 受體(IL-6R)間之抗原抗體反應之交互作用。使目的抗體捕捉於經胺偶聯法固定適量 protein A(Invitrogen)之 Sensor chip CM5(GE Healthcare)，使抗原 IL-6R 交互作用。運行緩衝液使用 20 mmol/L ACES、150 mmol/L NaCl、0.05% (w/v) Tween20、pH7.4。與抗原 IL-6R 之交互作用係於 25 °C 測定，IL-6R 之稀釋使用運行緩衝液、運行緩衝液中加有 100 μmol/L

犬尿胺酸之緩衝液，又，為了比較對照，使用於運行緩衝液加有 10 mmol/L ATP 之緩衝液。

【0648】 將 IL-6R 稀釋液與空白運行緩衝液以流速 10 μ L/min 注射 1 分鐘，使捕捉於感測晶片上之 6RNMSC1-2_F02 與 IL-6R 交互作用。之後，以流速 10 μ L/min 流過 1 分鐘運行緩衝液，觀察到 IL-6R 從抗體解離之後，將 10 mmol/L Glycine-HCl、pH1.5 以流速 30 μ L/min 注射 30 秒，將感測晶片再生。從測定獲得之感測圖算出之動力學參數結合速度常數 $k_a(1/MS)$ 、及解離速度常數 $k_d(1/s)$ 為依據，計算 6RNMSC1-2_F02 對 IL-6R 之解離常數 $K_D(M)$ 。各參數之計算，使用 Biacore T200 Evaluation Software(GE Healthcare)。

【0649】 於此測定取得之 100 μ mol/L 犬尿胺酸存在下、10 mmol/L ATP 存在下、或不存在下之 6RNMSC1-2_F02 與 1 μ mol/L 之 IL-6R 間之交互作用之感測圖，如圖 31。如圖 31，6RNMSC1-2_F02 於 100 μ mol/L 之犬尿胺酸存在下會與 IL-6R 結合，但於犬尿胺酸不存在下未觀察到與 IL-6R 結合。由此，可確認 6RNMSC1-2_F02 具有以犬尿胺酸為開關而與 IL-6R 結合之性質。又，100 μ mol/L 犬尿胺酸存在下之 6RNMSC1-2_F02 之解離常數 K_D 為 1.5 μ mol/L。

【0650】 (15-3) 犬尿胺酸開關對抗體從 IL-6R 解離之效果使用 Biacore T200(GE Healthcare)，評價於犬尿胺酸存在下對 IL-6R 已結合之 6RNMSC1-2_F02，是否會於犬尿胺酸存在下以犬尿胺酸濃度依存的解離。運行緩衝液使用 20 mmol/L ACES、150 mmol/L NaCl、0.05% (w/v) Tween20、pH7.4 及 20

mmol/L ACES、150 mmol/L NaCl、0.05% (w/v) Tween20、pH7.4、100 μ mol/L 犬尿胺酸，於 25 $^{\circ}$ C 測定。於利用胺偶聯固定 IL-6R 之感測晶片 CM5，將以含 100 μ mol/L 之犬尿胺酸之 20 mmol/L ACES、150 mmol/L NaCl、0.05% (w/v) Tween20、pH7.4 稀釋之 5 μ g/mL 之 6RNMSC1-2_F02 作為分析物，進行 180 秒交互作用後，觀察於各運行緩衝液條件下之 IL-6R 之解離狀態。為了比較於各運行緩衝液條件下之解離程度，比較將於 100 μ mol/L 犬尿胺酸存在下對 IL-6R 之 6RNMSC1-2_F02 之結合量定為 100 而標準化(normalize)之值。此標準化後之 6RNMSC1-2_F02 與 IL-6R 之交互作用之狀態之感測圖，如圖 32。從圖 32 之結果，可知：6RNMSC1-2_F02 於犬尿胺酸存在下與 IL-6R 結合後，若犬尿胺酸不存在，會有快速解離出 IL-6R 之性質。亦即，可確認犬尿胺酸獲致之影響抗體對 IL-6R 之結合之控制係可逆的。

【0651】 (15-4) 犬尿胺酸濃度對 IL-6R 結合之影響之評價

然後使用 Biacore T200(GE Healthcare)，評價在 6RNMSC1-2_F02 與 IL-6R 之抗原抗體反應中，犬尿胺酸濃度之影響。運行緩衝液使用 20 mmol/L ACES、150 mmol/L NaCl、0.05% (w/v) Tween20、pH7.4，6RNMSC1-2_F02 與人類 IL-6R 之抗原抗體反應於 25 $^{\circ}$ C 測定。在感測晶片 CM5 上利用胺偶聯固定 IL-6R，將經製備為含各種濃度之犬尿胺酸之 20 mmol/L ACES、150 mmol/L NaCl、0.05% (w/v) Tween20、pH7.4 稀釋之 1 μ g/mL 之 6RNMSC1-2_F02 當作分析物，進行 180 秒交互作用，觀察其結合量的變化。其結果如圖 33。從此結果，可知：

成為開關之犬尿胺酸濃度愈高，6RNMSC1-2_F02 對 IL-6R 會結合更多。

【0652】 又，此評價系中，IL-6R 係固定於感測晶片上，可認為 6RNMSC1-2_F02 係以二價結合。在如此之 6RNMSC1-2_F02 係以二價認識 IL-6R 之評價系中，亦觀察到犬尿胺酸濃度愈高，則 RNMSC1-2_F02 之 IL-6R 之結合量愈增加。從此結果可知，於二價之結合亦為 6RNMSC1-2_F02 對 IL-6R 有以犬尿胺酸作為開關而結合之性質。

【0653】 從該等結果可明白：6RNMSC1-2_F02，係以犬尿胺酸作為開關，於尿胺酸存在下與 IL-6R 結合且於犬尿胺酸不存在下從 IL-6R 解離之抗體。又，可確認 6RNMSC1-2_F02 顯示於犬尿胺酸不存在下不顯示與 IL-6R 結合之活性之完全 ON/OFF 控制，可推測可以圖 2 之態樣發揮開關機能。

【0654】 (15-5) 犬尿胺酸對 6RNMSC1-2_F02 之 ADCC 活性之影響

將實施例 14 決定之編碼為 6RNMSC1-2_F02 之可變區之基因，插入包含序列編號：90 之重鏈抗體不變區與包含序列編號：91 之輕鏈 kappa 不變區序列之人類 IgG1/Kappa 之動物表現用質體。(重鏈之序列以序列編號：92 表示，輕鏈之序列以序列編號：93 表示)、編碼為既知之抗人類 IL-6R 抗體 MRA 之可變區之基因，也分別插入具有上述(序列編號：90、及 91)之不變區之人類 IgG1/Kappa 之動物表現用質體。使用以下方法表現抗體。於 FreeStyle 293 Expression Medium 培養基 (Invitrogen) 以 1.33×10^6 細胞/mL 之細胞密度懸浮且對於 6well

plate 之各井各接種 3 mL 之人類胎兒腎細胞來源 FreeStyle 293-F 株 (Invitrogen), 利用脂轉染法導入製備之質體。M61CO2 培養箱 (37°C、8%CO₂, 90 rpm) 培養 4 日, 從培養上清使用 rProtein A Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences), 以該技術領域中具有通常知識者公眾所知之方法精製抗體。使用分光光度計, 測定精製之抗體溶液於 280 nm 之吸光度。從得到之測定值利用 PACE 法算出之吸光係數, 計算經精製之抗體之濃度 (Protein Science (1995) 4, 2411-2423)。

【0655】 評價實施例 14 所示之於犬尿胺酸存在下對抗原之結合活性之抗體 6RNMSC1-2_F02 是否對於至今為止之可溶型 hIL-6R 結合。為了評價 6RNMSC1-2_F02 對 hIL-6R 表現細胞之 ADCC 活性, 首先, 評價 6RNMSC1-2_F02 是否對 hIL-6R 表現細胞表現之膜型 hIL-6R 有結合能力。具體而言, 使用 Flow cytometer 測定、及解析 6RNMSC1-2_F02 對 BaF/hIL-6R 細胞株 (WO2012/073992) 之結合。將製成適當細胞數之 BaF/hIL-6R 於冰上, 以 2%FBS 於 PBS 阻斷 1 小時以上。經已阻斷之細胞利用離心分離從上清除去, 將 6RNMSC1-2_F02 或對照抗體 MRA (重鏈之序列以序列編號: 92 表示, 輕鏈之序列以序列編號: 93 表示) 於終濃度 100 μ M 之犬尿胺酸存在或不存在下二種條件, 添加 100 μ L。此時於冰上使抗體與細胞膜上之 hIL-6R 接觸 30 分鐘。將細胞與抗體之複合體以含犬尿胺酸之 Wash Buffer 或不含之 Wash Buffer 洗滌, 其次使認識該複合體與抗體之不變區之二次抗體 (Beckman Coulter IM1627) 於犬尿胺酸存在下、或不存在下接觸。經冰上與抗體反應 30 分鐘後, 將

細胞再度以 Wash Buffer 洗滌後，再懸浮於 2%FBS 於 PBS。6RNMSC1-2_F02 對製備之細胞之結合，以 BD FACS cant II Flow Cytometer(BD)測定、及解析。

【0656】 測定結果如圖 34。對照抗體 MRA 無論犬尿胺酸是否存在，認為有螢光發色，相對於此，6RNMSC1-2_F02 於犬尿胺酸 100 μ M 存在下才可觀察到螢光的轉移(shift)，於犬尿胺酸不存在下未認有螢光發色，代表 6RNMSC1-2_F02 係於犬尿胺酸存在下對細胞膜上表現之 hIL-6R 有結合能力之抗體。

【0657】 通常，天然型抗體藉由標的細胞上之抗原與抗體之 Fab 直接結合，再使效應子細胞上之 Fc γ R 與抗體之 Fc 結合，以從效應子細胞誘導對標的細胞之細胞傷害活性(ADCC 活性)。而，依以下方法驗證藉由 6RNMSC1-2_F02 於犬尿胺酸存在下與 hIL-6R 結合，是否對表現 hIL-6R 之細胞發揮 ADCC 活性。

【0658】 使用 6RNMSC1-2_F02 之效應子作用增強改變體(重鏈之序列以序列編號：94 輕鏈 序列編號：91 表示)。依參考例 1 之方法，測定於犬尿胺酸存在或不存在下，相異濃度之 6RNMSC1-2_F02h 所致之對表現 IL-6R 之細胞之 ADCC 活性。測定結果如圖 35。

【0659】 測定結果，確認於犬尿胺酸存在下，對表現 hIL-6R 之細胞，6RNMSC1-2_F02 具有抗體濃度依存的 ADCC 活性。從此結果，利用經由犬尿胺酸之抗原與抗體之結合，會誘導該抗體所致之對表現抗原之細胞之 ADCC 活性，所以，於成為開關之低分子分子存在下與抗原結合之抗體，也可利用是否有成

為開關之低分子控制 ADCC 活性等抗腫瘤活性之功能。

【0660】 又，犬尿胺酸濃度在正常組織中與腫瘤組織中有差異，所以，希望僅對於於腫瘤組織中犬尿胺酸濃度表現抗原之腫瘤細胞發揮抗體所致之 ADCC 活性，而在正常組織中之濃度不發揮或減弱 ADCC 活性。而，依參考例 2 之方法，測定不同犬尿胺酸濃度中，6RNMSC1-2_F02 所致對表現 hIL-6R 之細胞之 ADCC 活性。測定結果如圖 36。測定結果，確認 6RNMSC1-2_F02 帶來對犬尿胺酸濃度依存性表現 hIL-6R 之細胞之 ADCC 活性。再者，作為正常組織中之犬尿胺酸濃度考慮的 4~6 μ M，ADCC 活性約 10%，作為腫瘤組織中之犬尿胺酸濃度考慮的 30~40 μ M，ADCC 活性約 25%。

【0661】 從該等結果，可知，於犬尿胺酸濃度低之正常組織，6RNMSC1-2_F02 所致對表現 hIL-6R 之細胞之 ADCC 活性弱，於濃度高之腫瘤組織中，6RNMSC1-2_F02 所致對表現 hIL-6R 之細胞之 ADCC 活性較強。由以上顯示，藉由投予以犬尿胺酸作為開關之抗體，能維持對表現標的抗原之腫瘤組織之藥效，另一方面，可減輕對表現標的抗原之正常組織之毒性。

【0662】 (15-6)利用 IgG ELISA 評價取得之抗體對小鼠血清中之 hIL-6R 之結合活性

實施例 14 取得之於低分子存在下與 hIL-6R 結合之抗體 6RNMSC1-2_F02，係於犬尿胺酸存在下與 hIL-6R 結合之抗體。至今為止，6RNMSC1-2_F02 在 PBS 或 TBS 等緩衝中與抗原之結合能力已有人評價。小鼠血清中存在胺基酸等各種未知低分子，由於此等低分子，無法否定 6RNMSC1-2_F02 對抗原

結合之影響。而，評價小鼠血清中之 6RNMSC1-2_F02 之抗原結合能力。

【0663】 將實施例 14 表示之於犬尿胺酸存在下對抗原有結合活性之抗體 6RNMSC1-2_F02 及既知之抗 hIL-6R 抗體 MRA，以表 20 所示之二種條件下供 ELISA。抗原使用經生物素標記之 hIL-6R。

【0664】

【表 20】

條件	緩衝液組成
1	小鼠血清
2	小鼠血清,100 μ M 犬尿胺酸

【0665】 首先，使 StreptaWell 96 微滴定板(Roche)以含生物素標記抗原之 100 μ L 之 PBS 於室溫塗覆 1 小時以上。將該板之各井以 Wash buffer 洗滌以去除未與板結合之抗原後，將該井以 Blocking Buffer 250 μ L 阻斷 1 小時以上。於已去除 Blocking Buffer 250 μ L 之各井，加入以表 20 條件 2 製備為 2.5 μ g/mL 之精製 IgG 各 100 μ L，將該板於室溫靜置 1 小時，使 IgG 結合於在各井存在的抗原。以含 100 μ M 之犬尿胺酸之 Wash Buffer 洗滌後，將以含該犬尿胺酸之 Sample Buffer 稀釋之 HRP 結合抗人類 IgG 抗體(BIOSOURCE)添加到各井之板於溫育 1 小時。以含犬尿胺酸之 Wash Buffer 洗滌後，將添加有 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反應停止後，測定 450 nm 之吸光度以測定該發色。

【0666】 測定結果如圖 37。使用 MRA 之情形，無論有無

犬尿胺酸，吸光度均相同，相對於此，使用 6RNMSC1-2_F02 之情形，比起於表 20 所示之條件 2((犬尿胺酸存在之小鼠血清)之吸光度，於條件 1(不存在犬尿胺酸存在之小鼠血清)之吸光度顯著較低。由此可顯示，6RNMSC1-2_F02 係不受小鼠血清中之未知低分子影響，於犬尿胺酸存在下會與抗原 hIL-6R 結合之抗體。

【0667】 [實施例 16] 從使用噬菌體展示技術之抗體庫取得於腺苷、ATP 不存在下與抗原結合之抗體

(16-1)利用腺苷及 ATP 之混合物，從庫取得於低分子存在下對抗原之結合受抑制之抗體

取得上述實施例中於成為開關之低分子存在下與標的抗原結合之抗體。本實施例中嘗試取得於低分子不存在下與標的抗原結合之抗體。

【0668】 從建構之合理設計抗體噬菌體展示庫，取得於腺苷、及/或 ATP 不存在條件下對抗原顯示結合活性之抗體且於存在下結合能力衰減之抗體。為了取得，首先使抗體噬菌體展示庫與生物素化腺苷及 ATP-NeutrAvidin 接觸，回收與腺苷及/或 ATP 結合之抗體噬菌體展示庫。然後使該抗體噬菌體展示庫於腺苷及 ATP 不存在條件下與生物素化抗原-鏈黴親和素接觸，回收於腺苷及 ATP 不存在下與抗原結合之抗體。藉由交替進行如此之淘選，篩選具有與腺苷及/或 ATP、及抗原兩者有結合活性之抗體。帶有如此性質之抗體，於腺苷及 ATP 存在下，藉由抗體與腺苷及/或 ATP 結合，可期待抑制抗體對抗原之結合。

【0669】 使保持建構之噬菌體展示用噬粒之大腸菌生產噬菌體。對產生噬菌體之大腸菌之培養液添加 2.5M NaCl/10%PEG，將沉澱之噬菌體之集團以 TBS 稀釋，獲得噬菌體庫液。然後，於該噬菌體庫液添加 BSA 使終濃度成為 4%。使用固定於磁珠之抗原實施淘選。磁珠，使用 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) 或 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)，並使用固定於磁珠之抗原實施淘選。

【0670】 於製備之噬菌體庫液，加入 500 pmol 之生物素化 ATP、2'-Adenosine-PEG-Biotin、及 5'-Adenosine-PEG-Biotin，以使該噬菌體庫液於室溫與腺苷、及 ATP 接觸 60 分鐘。於該噬菌體庫液加入經 BSA 阻斷的磁珠，使腺苷及/或 ATP 與噬菌體之複合體與磁珠在室溫進行 15 分鐘結合。將珠粒以 TBS 洗滌 1 次。之後，加入 1 mg/mL 胰蛋白酶 0.5 mL。

【0671】 將珠粒於室溫懸浮 15 分鐘後，即時使用磁座分離珠粒，從珠粒回收噬菌體溶液。將回收之噬菌體溶液添加到對數增殖期(OD600 為 0.4-0.7)之 10 mL 大腸菌株 ER2738。於 37°C 緩慢進行 1 小時上述大腸菌之攪拌培養，使噬菌體感染大腸菌。感染之大腸菌，接種到 225 mm x 225 mm 之板。然後，從接種之大腸菌之培養液回收噬菌體，以製備噬菌體庫液。

【0672】 第 2 次之淘選，係濃縮在腺苷及 ATP 不存在下可對生物素化抗原結合之噬菌體。具體而言，藉由在製備之噬菌體庫液加入 250 pmol 生物素化抗原以使噬菌體庫於室溫與抗原接觸 60 分鐘。於噬菌體庫液加入經 BSA 阻斷之磁珠，使抗

原與噬菌體之複合體與磁珠在室溫結合 15 分鐘。將珠粒以 TBST 洗滌 2 次、以 TBS 洗 1 次。之後，將已加入 1 mg/mL 胰蛋白酶溶液 0.5 mL 之珠粒於室溫懸浮 15 分鐘後，即時使用磁座分離珠粒，從珠粒回收噬菌體溶液。將回收之噬菌體溶液加入對於成為對數增殖期(OD600 為 0.4-0.7)之 10 mL 大腸菌株 ER2738。於 37°C 緩慢進行 1 小時上述大腸菌之攪拌培養以使噬菌體感染大腸菌。將已感染之大腸菌接種於 225 mm x 225 mm 之板。然後從接種之大腸菌之培養液回收噬菌體，以回收噬菌體庫液。

【0673】 之後，在第奇數次淘選中，以與第 1 次淘選為相同條件反復實施淘選。惟，以 TBST 及 TBS 進行之珠粒洗滌，各增為 3 次、2 次實施。

【0674】 之後，於第偶數次淘選中，重複實施與第 2 次淘選為相同條件之淘選。惟，第 4 次以後的淘選，將生物素化抗原減為 40pmol，利用 TBST 及 TBS 進行之珠粒之洗滌各增為 3 次、2 次。

【0675】 (16-2)利用噬菌體 ELISA 評價低分子存在下之結合活性

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

使用 NucleoFast 96(MACHERY-NAGEL)，將回收之培養上清進行超過濾。將已將培養上清各 100 μ L 對於各井塗用之 NucleoFast 96 進行離心分離(4,500g, 45 分鐘)，以去除通流物(flow through)。將 100 μ L 之 H₂O 已加到各井之該 NucleoFast

96 再度離心分離 (4,500g, 30 分鐘離心) 以洗滌。最後，加入 TBS 100 μ L，回收於室溫靜置 5 分鐘之該 NucleoFast 96 之各井之上清含有之噬菌體液。

【0676】 已加入 TBS、或 ATP 及腺苷/TBS 之精製噬菌體依以下程序供 ELISA。將 StreptaWell 96 微滴定板 (Roche) 以含生物素標記抗原之 TBS 100 μ L 塗覆一晚。以 TBST 洗滌該板之各井以去除抗原後，將該井以 250 μ L 之 2% 脫脂奶-TBS 阻斷 1 小時以上。去除 2% 脫脂奶-TBS，於各井添加製備的精製噬菌體，將該板於 37 $^{\circ}$ C 靜置 1 小時，使提示噬菌體之抗體於腺苷及/或 ATP 10 mM 存在下或不存在下結合於在各井存在的抗原。於以 TBST 或 10 mM ATP 及腺苷/TBST 洗滌之各井添加經 TBS 或 10 mM ATP 及腺苷/TBS 稀釋之 HRP 結合抗 M13 抗體 (Amersham Pharmacia Biotech)，將該板於溫育 1 小時。以 TBST 或 10 mM ATP 及腺苷/TBST 洗滌後，將添加有 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反應停止後，測定 450 nm 之吸光度以測定該發色。

【0677】 使用經單離之 96 個選殖體進行噬菌體 ELISA，從合理設計抗體庫獲得於 ATP 及腺苷不存在下顯示對於係抗原之人類 IL-6 有結合活性之選殖體「I6RLSA1-6_011」、於 ATP 及腺苷不存在下對抗原人類血清白蛋白 (HSA) 顯示結合活性之選殖體「HSADSA1-6_020」、及於 ATP 及腺苷不存在下顯示對人類 IL-6 receptor 有結合活性之選殖體「6RRLSA1-6_037」、
「6RRLSA1-6_045」(圖 38、39、45)。

【0678】 (16-3) 將腺苷及 ATP 作為開關之抗體之序列解析

解析從(16-2)表示之噬菌體 ELISA 之結果，判斷在腺苷或 ATP 之不存在條件下對抗原有結合活性之選殖體使用專一性的引子序列編號：111 及 112)放大之基因之鹼基序列。針對解析結果，於以下表 21 表示胺基酸序列。

【0679】

【表 21】

選殖體名	重鏈序列編號	輕鏈序列編號
I6RLSA1-6_011	序列編號:95	序列編號:96
HSADSA1-6_020	序列編號:97	序列編號:98
6RRLSA1-6_037	序列編號:106	序列編號:107
6RRLSA1-6_045	序列編號:108	序列編號:109

【0680】 [實施例 17]從使用多價提示噬菌體展示技術之抗體庫取得於腺苷、ATP 存在下與抗原結合之抗體

(17-1)從利用多價提示之庫取得於低分子存在下與抗原結合之抗體

利用抗體對噬菌體之多價提示，從合理設計抗體噬菌體展示庫取得對抗原於腺苷、及/或 ATP 存在下顯示結合活性之抗體。從庫取得抗體時，於低分子存在下與不存在下對抗原之結合能力比愈大，取得機率愈高。而，為了以良好效率回收於低分子存在下有結合能力之抗體，實施利用增強視結合能力之淘選。更具體而言，藉由使抗體對於噬菌體以多價提示，利用結合性效果(由於多價對抗原之結合效果)增強視結合能力。首先，使合理設計抗體噬菌體展示庫於腺苷及 ATP 存在下接觸生物素化抗原，於腺苷及 ATP 存在下回收與抗原結合之抗體噬菌

體展示庫。然後參照於 Rondot(Nat. Biotechnol. (2001) 19, 75-78)記載之方法，對於已感染回收之抗體噬菌體展示庫之大腸菌，使編碼為 pIII 之基因已缺失之幫助者噬菌體感染，製備在所有 pIII 提示抗體之抗體多價提示噬菌體提示庫。使此抗體多價提示噬菌體展示庫於腺苷及 ATP 存在條件下接觸生物素化抗原-鏈黴親和素並回收後，於腺苷、及 ATP 不存在條件下，回收從珠粒溶出之溶出液中的噬菌體。進行多次如此之噬菌體製備及淘選，篩選僅於腺苷及/或 ATP 存在下對抗原有結合活性之抗體。

【0681】 使幫助者噬菌體 M13KO7 感染保持已建構之噬菌體展示用噬粒的大腸菌，於 30°C 培養一晚，產生抗體一價提示噬菌體展示庫。於產生噬菌體之大腸菌之培養液添加 2.5 M NaCl/10%PEG，將沉澱之噬菌體之集團以 TBS 稀釋，得到噬菌體庫液。然後於噬菌體庫液添加 BSA，使終濃度成為 4%。磁珠使用 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated)或 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)，並實施使用固定於磁珠之抗原之淘選。

【0682】 於製備之噬菌體庫液中，加入作為抗原之 500 pmol 之生物素標記人類 IgA-Fc(序列編號：99)、以及各終濃度 1 mM 之 ATP-Na 及腺苷，以使該噬菌體庫液於室溫與抗原及腺苷、及 ATP 接觸 60 分鐘。於該噬菌體庫液加入經 BSA 阻斷之磁珠，使抗原與噬菌體之複合體和磁珠於室溫進行 15 分鐘結合。將珠粒以溶有 ATP 及腺苷之 TBS 洗 1 次。之後，將已加入 1 mg/mL 胰蛋白酶 0.5 mL 之珠粒於室溫懸浮 15 分鐘後，

即時使用磁座分離珠粒，從珠粒回收噬菌體溶液。將回收之噬菌體溶液加到對數增殖期(OD600 為 0.4-0.7)之 10 mL 大腸菌株 ER2738。於 37°C 緩慢進行 1 小時上述大腸菌之攪拌培養以使噬菌體感染大腸菌。將感染的大腸菌接種於 225 mm x 225 mm 之板。然後使幫助者噬菌體 M13KO7、或 M13KO7 Δ pIII(稱為高(hyper)噬菌體)(PROGEN Biotechnik)感染已接種之大腸菌培養液，從於 30°C 培養一晚之上清回收噬菌體，以分別製備抗體一價提示噬菌體庫及抗體多價提示噬菌體庫液。

【0683】 第 1 次之淘選係回收於腺苷及 ATP 存在下可結合於抗原之噬菌體，第 2 次後之淘選，係實施僅於腺苷及 ATP 存在下對抗原可結合之噬菌體之濃縮。具體而言，於製備的噬菌體庫液添加 250 pmol 之生物素標記抗原及各終濃度 1 mM 之腺苷及 ATP，藉此使噬菌體庫於室溫與抗原及腺苷及 ATP 接觸 60 分鐘。添加經 BSA 阻斷的磁珠，使抗原與噬菌體之複合體於室溫結合於磁珠 15 分鐘。珠以 1 mL 之溶解腺苷及 ATP 之 TBST(以下稱為(腺苷 + ATP)/TBST)、溶解腺苷及 ATP 之 TBS(以下稱為(腺苷 + ATP)/TBS)洗滌。之後，將添加有 0.5 mL 之 TBS 的珠於室溫懸浮後，立即使用磁座分離珠，並回收噬菌體溶液。再次重複此作業後，將分 2 次溶出之噬菌體液混合。於回收之噬菌體溶液添加 100 mg/mL 之胰蛋白酶 5 μ L，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

ER2738。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 之板。然後從已接種之大腸菌之培養液與第 1 次淘選同樣回收噬菌體，將抗體一價提示噬菌體庫及抗體多價提示噬菌體庫液回收。重複 3 次取得於腺苷及 ATP 存在下對抗原有結合活性之抗體的淘選。但，第 3 次以後的淘選，使用生物素化抗原 40 pmol。

【0684】 (17-2)利用噬菌體 ELISA 評價於腺苷及/或 ATP 存在及不存在下之結合活性

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

使用 NucleoFast 96(MACHERY-NAGEL)，將回收之培養上清進行超過濾。將已將培養上清各 100 μ L 對於各井塗用之 NucleoFast 96 進行離心分離(4,500g, 45 分鐘)，以去除通流物(flow through)。將 100 μ L 之 H₂O 已加到各井之該 NucleoFast 96 再度離心分離(4,500g, 30 分鐘離心)以洗滌。最後，加入 TBS 100 μ L，回收於室溫靜置 5 分鐘之該 NucleoFast 96 之各井之上清含有之噬菌體液。

【0685】 已加入 TBS、或或(腺苷 + ATP)/TBS 之精製噬菌體依以下程序供 ELISA。將 StreptaWell 96 微滴定板(Roche)以含生物素標記抗原之 TBS100 μ L 塗覆一晚。以 TBST 洗滌該板之各井以去除抗原後，將該井以 250 μ L 之 2%脫脂奶-TBS 阻斷 1 小時以上。去除 2%脫脂奶-TBS，於各井添加製備的精製噬菌體，將該板於 37°C 靜置 1 小時，使提示抗體之噬菌體於腺苷及

ATP 不存在/存在下結合於在各井存在的抗原。於以 TBST 或(腺苷 + ATP)/TBST 洗滌之各井添加經 TBS 或(腺苷 + ATP)/TBS 稀釋之 HRP 結合抗 M13 抗體(Amersham Pharmacia Biotech)，將該板於溫育 1 小時。以 TBST 或(腺苷 + ATP)/TBST 洗滌後，將添加有 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反應停止後，測定 450 nm 之吸光度以測定該發色。其結果，於抗體多價提示噬菌體展示庫中，取得較多於低分子存在下具結合活性之抗體 (圖 40、41)。由此啟示，藉由使用抗體多價提示噬菌體展示法，能以較好效率取得在低分子存在下具有結合活性之抗體。噬菌體 ELISA 之結果如以下表 22。

【0686】

【表 22】

	一價提示	多價提示
淘選次數	4	4
ELISA 實施選殖體數	96	96
陽性選殖體數(吸光度>0.1)	6	28
依存性選殖體數(SM+/-比>1.3)	1	19
依存性選殖體序列數	1	5

【0687】 (17-3)將腺苷及 ATP 作為開關之抗體之結合能力之評價及序列解析

解析從(17-2)表示之噬菌體 ELISA 之結果判斷在腺苷及 ATP 存在之條件下對抗原有結合活性之選殖體使用專一性的引子(序列編號：111 及 112)放大之基因之鹼基序列。其結果，取得於腺苷及 ATP 存在下對抗原顯示結合活性之選殖體

「IADL3C5-4_048(重鏈序列編號：100、輕鏈序列編號：101)」
(圖 42)。

【0688】 [實施例 18] 從庫取得之 ATP/腺苷依存性抗體之
定性

(18-1)從庫取得之 ATP/腺苷依存性抗體之製備

【0689】 從在實施例 10 取得之判斷於 ATP 或腺苷存在下對
生物素標記 hIL-6R(hI-L6) 有結合活性之選殖體
6RAD2C1-4_001、6RAD2C1-4_005、6RAD2C1-4_011、
6RAD2C1-4_026、6RAD2C1-4_030、6RAD2C1-4_042、
6RAD2C1-4_076、6RDL3C1-4_085、6RDL3C5-4_011，解析使
用專一性的引子放大之基因之鹼基序列 (表 23)。

【0690】

【表 23】

選殖體名	重鏈序列編號	輕鏈序列編號
6RAD2C1-4_001	序列編號:113	序列編號:114
6RAD2C1-4_005	序列編號:115	序列編號:116
6RAD2C1-4_011	序列編號:82	序列編號:83
6RAD2C1-4_026	序列編號:117	序列編號:118
6RAD2C1-4_030	序列編號:119	序列編號:120
6RAD2C1-4_042	序列編號:121	序列編號:122
6RAD2C1-4_076	序列編號:84	序列編號:85
6RAD3C1-4_085	序列編號:123	序列編號:124
6RAD3C1-5_011	序列編號:125	序列編號:126

【0691】 將 6RAD2C1-4_001、6RAD2C1-4_005、
6RAD2C1-4_011、6RAD2C1-4_026、6RAD2C1-4_030、
6RAD2C1-4_042、6RAD2C1-4_076、6RDL3C1-4_085、

6RDL3C5-4_011 之可變區序列，插入到具序列編號：90 之重鏈抗體不變區及具序列編號：91 之輕鏈 kappa 不變區序列的人類 IgG1/Kappa 的動物表現用質體。使用以下方法表現抗體。對在 FreeStyle 293 Expression Medium 培養基(Invitrogen)以 1.33×10^6 細胞/mL 之細胞密度懸浮且對於 6well plate 之各井各接種 3 mL 之人類胎兒腎細胞來源 FreeStyle 293-F 株 (Invitrogen)，將製備之質體以脂轉染法導入。於 CO₂ 培養箱 (37°C、8%CO₂，90 rpm) 培養 4 日，從培養上清使用 rProtein A Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences)，以該技術領域中具有通常知識者公眾所知之方法精製抗體。使用分光光度計，測定精製之抗體溶液於 280 nm 之吸光度。使用從獲得之測定值依 PACE 法算出之吸光係數，計算精製之抗體之濃度 (Protein Science (1995) 4, 2411-2423)。

【0692】 (18-2) 利用表面電漿共振評價各種低分子對於對人類 IL6 受體之結合之影響

使用 Biacore T200 (GE Healthcare)，評價從庫取得之 ATP/腺苷依存性抗體 9 選殖體 (6RAD2C1-4_001、6RAD2C1-4_005、6RAD2C1-4_011、6RAD2C1-4_026、6RAD2C1-4_030、6RAD2C1-4_042、6RAD2C1-4_076、6RDL3C1-4_085、6RDL3C5-4_011) 與 IL-6R 之抗原抗體反應中的各種低分子的影響。運行緩衝液使用 20 mmol/L ACES、150 mmol/L NaCl、0.05% (w/v) Tween20、pH7.4，於 25 °C 測定。在感測晶片 CM5 上利用胺偶聯將 IL-6R 固定，將抗體作為分析物交互作用 120 秒，並觀察其結合量之變化。抗體稀釋，使用運行緩衝液及在

運行緩衝液分別添加 ATP、ADP、AMP、cAMP、或腺苷(ADO)中之任一者的緩衝液，並製備為各低分子之終濃度成為 1 mM、抗體之終濃度為 1 μ M。又，1 mM ATP 條件下，測定數階段之抗體之濃度系列，從平衡值對抗體濃度作圖，計算各選殖體對 IL-6R 之解離常數 K_D (mol/L)。參數計算使用 Biacore T200 Evaluation Software(GE Healthcare)。1 mM ATP 存在下之各選殖體之解離常數 K_D ，如表 24。

【0693】

【表 24】

選殖體名	解離常數 K_D (mol/L)
6RAD2C1-4_01	3.0E-07
6RAD2C1-4_05	3.4E-07
6RAD2C1-4_11	2.3E-07
6RAD2C1-4_26	2.1E-07
6RAD2C1-4_30	3.3E-07
6RAD2C1-4_42	2.5E-07
6RAD2C1-4_76	2.5E-07
6RDL3C1-4_85	3.9E-07
6RDL3C5-4_11	1.3E-07

【0694】於此測定取得之 1 mM 之各低分子存在下、或不存在下，各選殖體對 IL-6 之結合量如圖 43。如圖 43，各選殖體於 1 mM ATP 存在下與 IL-6R 結合，但於 ATP 不存在下未觀察到與 IL-6R 結合。由此可確認，具有以 ATP 作為開關而與 IL-6R 結合之性質。ATP 以外之低分子中，全部選殖體均觀察到 ADP 存在下之結合，一部分選殖體也觀察到於 AMP 及 cAMP 存在下之結合。ADO 存在下，未觀察到對 IL-6R 之結合。

【0695】藉由使用合理設計庫，可取得於 ATP、ADP、AMP、

cAMP 中之 1 個或任一者存在下與標的抗原結合之抗體。本實施例中，設計庫設計時係於參照之抗體 ATNLSA1-4_D12 所結合之 ATP 與 ADO 共存下進行淘選，但是其結果，會取得於 ATNLSA1-4_D12 較強結合之 ATP 存在下與標的抗原強力結合之抗體，但不取得 ATNLSA1-4_D12 比 ATP 弱結合之 ADO 存在下與標的抗原強結合之抗體。僅於所望低分子存在之條件下使抗原與庫接觸，並將與抗原結合之抗體單離，能夠取得僅依存於該低分子而與抗原結合之抗體。例如藉由僅於 ADO 存在下淘選，據認為可從本庫以良好效率取得於 ADO 存在下結合之抗體。

【0696】 (18-3) ATP 對於取得之抗體之 ADCC 活性之影響

依以下方法驗證：取得之抗體 6RAD2C1-4_030、6RAD2C1-4_011 在 Adenosine Triphosphate(ATP)存在下與 hIL-6R 結合，是否能對表現 hIL-6R 之細胞發揮 ADCC 活性。本驗證係使用實施例 18-1 製作之 6RAD2C1-4_030 之效應子作用增強改變體(重鏈抗體可變區：序列編號 119、輕鏈抗體可變區：序列編號 120、重鏈抗體不變區：序列編號 90、輕鏈抗體不變區：序列編號 91)、6RAD2C1-4_011 之效應子作用增強改變體(重鏈抗體可變區：序列編號 82、輕鏈抗體可變區：序列編號 83、重鏈抗體不變區：序列編號 90、輕鏈抗體不變區：序列編號 91)、及實施例 15-5 製作之既知之抗人類 IL-6R 抗體 MRA(重鏈抗體可變區：序列編號 92、輕鏈抗體可變區：序列編號 92、重鏈抗體不變區：序列編號 90、輕鏈抗體不變區：序列編號 91)。依參考例 3 之方法，測定於 ATP 存在、或不存

在下，對表現 hIL-6R 之細胞，不同抗體濃度之 6RAD2C1-4_030、6RAD2C1-4_011、MRA 所獲之 ADCC 活性。測定結果如圖 44。

【0697】 測定結果，確認 ATP 存在下，6RAD2C1-4_030、6RAD2C1-4_011

有抗體濃度依存性 ADCC 活性。由此結果，可知：不僅犬尿胺酸，介由 ATP 之抗原與抗體之結合，也能誘導該抗體對表現抗原之細胞之 ADCC 活性，所以，在成為開關之低分子分子存在下與抗原結合之抗體，其 ADCC 活性等抗腫瘤活性之功能也可利用成為開關之低分子控制。

【0698】 從該等結果，可認為在 ATP 濃度低之正常組織中，對於表現 hIL-6R 之細胞之 ADCC 活性誘導弱，在濃度高之腫瘤組織中，對於表現 hIL-6R 之細胞之 ADCC 活性誘導強。由以上啟示，藉由投予將 ATP 作為開關之抗體，對於表現標的抗原之腫瘤組織的藥效可維持，此外，對於表現標的抗原之正常組織的毒性可減輕。

【0699】 [參考例 1]使用人類末梢血單核球作為效應子細胞之待驗抗體之 ADCC 活性

依以下方法，測定犬尿胺酸依存的與抗原結合之抗體所致之對表現抗原之細胞在不同抗體濃度之 ADCC 活性。使用人類末梢血單核球(以下稱為人類 PBMC)作為效應子細胞測定各待驗抗體之 ADCC 活性，係以下列方式進行。

【0700】 (1)人類 PBMC 溶液之製備

使用預先注有 1000 單位/ml 肝素溶液(NOVO·HEPARIN

注 5 千單位、NOVO·NORDISK) 200 μ l 之注射器，從中外製藥(股)公司所屬之健常人自願者(成人男性)抽取末梢血 50 ml。將使用 PBS(-)稀釋為 2 倍後等分為四的該末梢血，加入預先注入 15 ml 之 Ficoll-Paque PLUS 並實施離心分離操作之 Leucosep 淋巴球分離管(Greiner bio-one)。分注該末梢血後，以 2150 rpm 之速度於室溫進行 10 分鐘離心分離之操作後的分離管，分取單核球組分層。將以含 10%FBS 之 RPMI-1640(nacalaitesque)(以下稱為 10%FBS/RPMI)洗滌一次後的該組分層含有之細胞，懸浮於 10%FBS/RPMI 中使其細胞密度成為 1×10^7 細胞/ml。將該細胞懸浮液作為人類 PBMC 溶液，供以後實驗。

【0701】 (2)標的細胞之製備

於 Ba/F3 使人類 IL-6 receptor 強制表現之 BaF/hIL6R(Mihara 等人(Int. Immunopharmacol. (2005) 5, 1731-40) 3×10^6 細胞，加入 0.74MBq 之 Cr-51。之後於 5%二氧化碳中於 37 $^{\circ}$ C 進行 1 小時溫育後，將該細胞以 10%FBS/RPMI 洗滌 3 次後，於 10%FBS/RPMI 中懸浮使其細胞密度成為 2×10^5 細胞/ml。該細胞懸浮液作為標的細胞，供以後實驗。

【0702】 (3)犬尿胺酸溶液之製備

將使用 PBS(-)稀釋為 5 mM 之 L-犬尿胺酸(sigma)，使用 10%FBS/RPMI 製備為 400 μ M 之濃度。該溶液作為犬尿胺酸溶液，供以後試驗。

【0703】 (4)鉻游離試驗(ADCC 活性)

ADCC 活性以利用鉻釋出法之專一性鉻游離率評價。首先，將製備為各濃度(0、0.04、0.4、4、40 μ g/ml)之抗體溶液，

各以 50 μ l 添加到 96 井 U 底板之各井中。其次，於該井接種(2) 製備之標的細胞各 50 μ l (1 \times 10⁴ 細胞/井)。其次，將於該井已各添加(3)製備之犬尿胺酸溶液 50 μ l 之板於室溫靜置 15 分鐘。然後，於各井中，添加(1)製備之人類 PBMC 溶液各 50 μ l(5 \times 10⁵ 細胞/井)，於 5%二氧化碳培養箱中於 37 $^{\circ}$ C 靜置 4 小時之後，進行離心操作。使用蓋氏計數器測定該板之各井中之 100 μ l 之培養上清之放射活性。依下式求取專一性鉻游離率。

$$\text{【0704】 鉻游離率(\%)} = (A-C) \times 100 / (B-C)$$

【0705】 上式中，A 代表各井中之 100 μ l 培養上清之放射活性(cpm)之平均值。又，B 代表對標的細胞添加 50 μ l 之 4% NP-40 水溶液(Nonidet P-40、NACALAI TESQUE)及 100 μ l 之 10% FBS/RPMI 之井中之 100 μ l 培養上清之放射活性(cpm)之平均值。再者，C 代表對標的細胞添加 150 μ l 之 10% FBS/RPMI 或 100 μ l 之 10% FBS/RPMI 及 50 μ l 之犬尿胺酸溶液之井中之 100 μ l 培養上清之放射活性(cpm)之平均值。試驗以二重複實施，計算反映各待驗抗體之 ADCC 活性之前述試驗中的專一的鉻游離率(%)的平均值。

【0706】 [參考例 2] 使用人類末梢血單核球作為效應子細胞之各待驗抗體之 ADCC 活性

依以下方法，測定犬尿胺酸依存的與抗原結合之抗體所致之對表現抗原之細胞在不同犬尿胺酸濃度之 ADCC 活性。使用人類末梢血單核球作為效應子細胞之各待驗抗體所致之 ADCC 活性，如以下方式測定。又，人類 PBMC 溶液、及標的細胞，依與參考例 1 相同方法製備。

【0707】 (1)犬尿胺酸溶液之製備

將使用 PBS(-)稀釋為 5 mM 之 L-犬尿胺酸(sigma)，使用 10%FBS/RPMI 製備為 1200、400、133、44、14.8、4.9 μ M 之濃度。該溶液作為犬尿胺酸溶液，供以後試驗。

【0708】 (2)鉻游離試驗(ADCC 活性)

ADCC 活性以利用鉻釋出法之專一性鉻游離率評價。首先，將製備為 200 μ g/ml 之抗體溶液，各以 50 μ l 添加到 96 井 U 底板之各井中。其次，於該井接種前述標的細胞 50 μ l (1 \times 10⁴ cells/井)。其次，將於該井已各添加(1)製備之各濃度之犬尿胺酸溶液 50 μ l 之板於室溫靜置 15 分鐘。然後，於各井中，添加前述人類 PBMC 溶液各 50 μ l(5 \times 10⁵ 細胞/井)，於 5%二氧化碳培養箱中於 37 $^{\circ}$ C 靜置 4 小時之後，進行離心操作。使用蓋氏計數器測定該板之各井中之 100 μ l 之培養上清之放射活性。依參考例 1 記載之式求取專一性鉻游離率。

【0709】 [參考例 3] 使用人類 NK 細胞株 NK92 作為效應子細胞之各受測抗體之 ADCC 活性

依以下方法，測定 ATP 依存性地與抗原結合之抗體對表現抗原之細胞在不同抗體濃度時之 ADCC 活性。

使用使人類 NK 細胞株 NK92 強制表現人類 Fc γ RIIIa 而得之 NK92-CD16(V)作為效應子細胞，依以下方式測定各受測抗體之 ADCC 活性。

【0710】 (1)NK92-CD16(V)之製備

將 NK92-CD16(V)懸浮於 10%FBS/ RPMI 中使其細胞密度成為 1 \times 10⁷ 細胞/ml。定該細胞懸浮液為 NK92-CD16(V)溶液，

供以後之實驗。

【0711】 (2)標的細胞之製備

對於使 CHO 強制表現人類 IL-6 受體之 CHO/hIL6R 3×10^6 細胞加入 0.74MBq 之 Cr-51。之後於 5%二氧化碳培養箱中於 37°C 進行 1 小時溫育後，以 10%FBS/D-MEM 洗滌細胞 3 次，並將該細胞懸浮於 10%FBS/RPMI 中使其細胞密度成為 2×10^5 細胞/ml。將該細胞懸浮液作為標的細胞，供以後實驗。

【0712】 (3)ATP 溶液之製備

將使用 10%FBS/RPMI 稀釋為 100 mM 之 ATP(sigma)調整為 4 mM 之濃度。將該溶液作為 ATP 溶液，供以後之試驗。

【0713】 (4)鉻游離試驗(ADCC 活性)

ADCC 活性以利用鉻釋出法之專一性鉻游離率評價。首先，將製備為各濃度(0、0.004、0.04、0.4、4、40 $\mu\text{g}/\text{ml}$)之抗體溶液，各以 50 μl 添加到 96 井 U 底板之各井中。其次，接種(2)製備之標的細胞 50 μl (1×10^4 cells/井)，於室溫靜置 15 分鐘。於各井中，將添加有於(1)製備之 NK92-CD16(V)溶液各 50 μl (5×10^5 cells/井)之該板，於 5%二氧化碳培養箱中於 37°C 靜置 4 小時之後，進行離心操作。使用蓋氏計數器測定該板之各井中之 100 μl 之培養上清之放射活性。依參考例 1 記載之式求取專一性鉻游離率。

【符號說明】

無。

【序列表】

<110> 中外製藥股份有限公司(CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)

<120> 標的組織專一的抗原結合分子(ANTIGEN BINDING MOLECULES SPECIFIC AT TARGET TISSUES)

<130> C1-A1204Y1-TWD1

<150> JP 2012-123781

<151> 2012-05-30

<150> JP 2012-177311

<151> 2012-08-09

<160> 126

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 468

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 1

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

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> 2
 <211> 1407
 <212> DNA
 <213> 人類(Homo sapiens)

<400> 2
 atgctggccg tcggctgcgc gctgctggct gccctgctgg ccgcgccggg agcggcgctg 60
 gcccgaagc gctgccctgc gcaggaggtg gcgagaggcg tgctgaccag tctgccagga 120
 gacagcgtga ctctgacctg cccgggggta gagccggaag acaatgccac tgttcaactgg 180
 gtgctcagga agccggctgc aggctccac ccagcagat gggtggcat gggaaggagg 240
 ctgctgctga ggtcggtgca gctccacgac tctgaaact attcatgcta ccgggccggc 300
 cgcccagctg ggactgtgca cttgctggtg gatgttccc ccgaggagcc ccagctctcc 360
 tgcttccgga agagcccct cagcaatggt gtttgtgagt ggggtcctcg gagcacccca 420
 tccctgacga caaaggctgt gctcttggtg aggaagtttc agaacagtcc ggccgaagac 480
 ttccaggagc cgtgccagta ttcccaggag tcccagaagt tctctgcca gttagcagtc 540
 ccggagggag acagctcttt ctacatagtg tccatgtgcg tcgccagtag tgtcgggagc 600
 aagttcagca aaactcaaac ctttcagggt tgtggaatct tgcagcctga tccgctgcc 660
 aacatcacag tcaactgccg ggccagaaac ccccgctggc tcagtgtcac ctggcaagac 720

cccactcct ggaactcatc tttctacaga ctacggtttg agctcagata tcgggctgaa 780
 cggtaaaga cattcacaac atggatggtc aaggacctcc agcatcactg tgcatccac 840
 gagcctgga gcggcctgag gcacgtggg cagcttcgtg cccaggagga gttcgggcaa 900
 ggcgagtgga gcgagtggag cccggaggcc atgggcacgc cttggacaga atccaggagt 960
 cctccagctg agaacgaggt gtccaccccc atgcaggcac ttactactaa taaagacgat 1020
 gataatattc tcttcagaga ttctgcaaat gcgacaagcc tcccagtga agattcttct 1080
 tcagtaccac tgcccacatt cctggttgct ggaggagacc tggccttcgg aacgctcctc 1140
 tgcattgcca ttgttctgag gttcaagaag acgtggaagc tgcgggctct gaaggaaggc 1200
 aagacaagca tgcacccgcc gtactctttg gggcagctgg tcccggagag gcctcgaccc 1260
 accccagtgc ttgttctct catctcccca ccggtgtccc ccagcagcct ggggtctgac 1320
 aatacctcga gccacaaccg accagatgcc agggaccac ggagccctta tgacatcagc 1380
 aatacagact acttcttccc cagatag 1407

<210> 3

<211> 19

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人工合成之序列

<400> 3

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser

<210> 4
<211> 21
<212> PRT
<213> 梭菌屬(Clostridium sp.)

<400> 4

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
1 5 10 15

Ala Ser His Leu Glu
 20

<210> 5
<211> 330
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成之序列

<400> 5

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

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

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

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

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

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 6

<211> 326

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人工合成之序列

<400> 6

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

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

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

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

50

55

60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
 100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
 115 120 125

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
 130 135 140

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
 145 150 155 160

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 165 170 175

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 180 185 190

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
 195 200 205

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 210 215 220

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 225 230 235 240

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 245 250 255

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
 260 265 270

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 275 280 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 290 295 300

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 305 310 315 320

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 325 330 335

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
 340 345 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
 355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375

<210> 8

<211> 327

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人工合成之序列

<400> 8

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

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

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

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

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

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

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

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

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

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 9

<211> 1125

<212> DNA

<213> 人類(Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1125)

<400> 9

atg tgg ttc ttg aca act ctg ctc ctt tgg gtt cca gtt gat ggg caa 48
Met Trp Phe Leu Thr Thr Leu Leu Leu Trp Val Pro Val Asp Gly Gln
1 5 10 15

gtg gac acc aca aag gca gtg atc act ttg cag cct cca tgg gtc agc 96
Val Asp Thr Thr Lys Ala Val Ile Thr Leu Gln Pro Pro Trp Val Ser
20 25 30

gtg ttc caa gag gaa acc gta acc ttg cac tgt gag gtg ctc cat ctg 144
Val Phe Gln Glu Glu Thr Val Thr Leu His Cys Glu Val Leu His Leu
35 40 45

cct ggg agc agc tct aca cag tgg ttt ctc aat ggc aca gcc act cag 192
Pro Gly Ser Ser Ser Thr Gln Trp Phe Leu Asn Gly Thr Ala Thr Gln
50 55 60

acc tcg acc ccc agc tac aga atc acc tct gcc agt gtc aat gac agt 240
Thr Ser Thr Pro Ser Tyr Arg Ile Thr Ser Ala Ser Val Asn Asp Ser
65 70 75 80

ggt gaa tac agg tgc cag aga ggt ctc tca ggg cga agt gac ccc ata 288
Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Arg Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Pro Ile
85 90 95

cag ctg gaa atc cac aga ggc tgg cta cta ctg cag gtc tcc agc aga 336
Gln Leu Glu Ile His Arg Gly Trp Leu Leu Leu Gln Val Ser Ser Arg
100 105 110

gtc ttc acg gaa gga gaa cct ctg gcc ttg agg tgt cat gcg tgg aag 384

Val Phe Thr Glu Gly Glu Pro Leu Ala Leu Arg Cys His Ala Trp Lys	
115	120
gat aag ctg gtg tac aat gtg ctt tac tat cga aat ggc aaa gcc ttt	432
Asp Lys Leu Val Tyr Asn Val Leu Tyr Tyr Arg Asn Gly Lys Ala Phe	
130	135
aag ttt ttc cac tgg aat tct aac ctc acc att ctg aaa acc aac ata	480
Lys Phe Phe His Trp Asn Ser Asn Leu Thr Ile Leu Lys Thr Asn Ile	
145	150
agt cac aat ggc acc tac cat tgc tca ggc atg gga aag cat cgc tac	528
Ser His Asn Gly Thr Tyr His Cys Ser Gly Met Gly Lys His Arg Tyr	
	165
aca tca gca gga ata tct gtc act gtg aaa gag cta ttt cca gct cca	576
Thr Ser Ala Gly Ile Ser Val Thr Val Lys Glu Leu Phe Pro Ala Pro	
	180
gtg ctg aat gca tct gtg aca tcc cca ctc ctg gag ggg aat ctg gtc	624
Val Leu Asn Ala Ser Val Thr Ser Pro Leu Leu Glu Gly Asn Leu Val	
	195
acc ctg agc tgt gaa aca aag ttg ctc ttg cag agg cct ggt ttg cag	672
Thr Leu Ser Cys Glu Thr Lys Leu Leu Leu Gln Arg Pro Gly Leu Gln	
	210
ctt tac ttc tcc ttc tac atg ggc agc aag acc ctg cga ggc agg aac	720
Leu Tyr Phe Ser Phe Tyr Met Gly Ser Lys Thr Leu Arg Gly Arg Asn	
	225
aca tcc tct gaa tac caa ata cta act gct aga aga gaa gac tct ggg	768
Thr Ser Ser Glu Tyr Gln Ile Leu Thr Ala Arg Arg Glu Asp Ser Gly	
	245
tta tac tgg tgc gag gct gcc aca gag gat gga aat gtc ctt aag cgc	816
Leu Tyr Trp Cys Glu Ala Ala Thr Glu Asp Gly Asn Val Leu Lys Arg	
	260
agc cct gag ttg gag ctt caa gtg ctt ggc ctc cag tta cca act cct	864
Ser Pro Glu Leu Glu Leu Gln Val Leu Gly Leu Gln Leu Pro Thr Pro	
	275
gtc tgg ttt cat gtc ctt ttc tat ctg gca gtg gga ata atg ttt tta	912

Val Trp Phe His Val Leu Phe Tyr Leu Ala Val Gly Ile Met Phe Leu
 290 295 300

gtg aac act gtt ctc tgg gtg aca ata cgt aaa gaa ctg aaa aga aag 960
 Val Asn Thr Val Leu Trp Val Thr Ile Arg Lys Glu Leu Lys Arg Lys
 305 310 315 320

aaa aag tgg gat tta gaa atc tct ttg gat tct ggt cat gag aag aag 1008
 Lys Lys Trp Asp Leu Glu Ile Ser Leu Asp Ser Gly His Glu Lys Lys
 325 330 335

gta att tcc agc ctt caa gaa gac aga cat tta gaa gaa gag ctg aaa 1056
 Val Ile Ser Ser Leu Gln Glu Asp Arg His Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 340 345 350

tgt cag gaa caa aaa gaa gaa cag ctg cag gaa ggg gtg cac cgg aag 1104
 Cys Gln Glu Gln Lys Glu Glu Gln Leu Gln Glu Gly Val His Arg Lys
 355 360 365

gag ccc cag ggg gcc acg tag 1125
 Glu Pro Gln Gly Ala Thr
 370

<210> 10

<211> 374

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 10

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

Val Asp Thr Thr Lys Ala Val Ile Thr Leu Gln Pro Pro Trp Val Ser
 20 25 30

Val Phe Gln Glu Glu Thr Val Thr Leu His Cys Glu Val Leu His Leu
 35 40 45

Pro Gly Ser Ser Ser Thr Gln Trp Phe Leu Asn Gly Thr Ala Thr Gln

50

55

60

Thr Ser Thr Pro Ser Tyr Arg Ile Thr Ser Ala Ser Val Asn Asp Ser
65 70 75 80

Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Arg Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Pro Ile
85 90 95

Gln Leu Glu Ile His Arg Gly Trp Leu Leu Leu Gln Val Ser Ser Arg
100 105 110

Val Phe Thr Glu Gly Glu Pro Leu Ala Leu Arg Cys His Ala Trp Lys
115 120 125

Asp Lys Leu Val Tyr Asn Val Leu Tyr Tyr Arg Asn Gly Lys Ala Phe
130 135 140

Lys Phe Phe His Trp Asn Ser Asn Leu Thr Ile Leu Lys Thr Asn Ile
145 150 155 160

Ser His Asn Gly Thr Tyr His Cys Ser Gly Met Gly Lys His Arg Tyr
165 170 175

Thr Ser Ala Gly Ile Ser Val Thr Val Lys Glu Leu Phe Pro Ala Pro
180 185 190

Val Leu Asn Ala Ser Val Thr Ser Pro Leu Leu Glu Gly Asn Leu Val
195 200 205

Thr Leu Ser Cys Glu Thr Lys Leu Leu Leu Gln Arg Pro Gly Leu Gln
210 215 220

Leu Tyr Phe Ser Phe Tyr Met Gly Ser Lys Thr Leu Arg Gly Arg Asn

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(951)

<400> 11

atg act atg gag acc caa atg tct cag aat gta tgt ccc aga aac ctg 48
 Met Thr Met Glu Thr Gln Met Ser Gln Asn Val Cys Pro Arg Asn Leu
 1 5 10 15

tgg ctg ctt caa cca ttg aca gtt ttg ctg ctg ctg gct tct gca gac 96
 Trp Leu Leu Gln Pro Leu Thr Val Leu Leu Leu Leu Ala Ser Ala Asp
 20 25 30

agt caa gct gct ccc cca aag gct gtg ctg aaa ctt gag ccc ccg tgg 144
 Ser Gln Ala Ala Pro Pro Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Pro Trp
 35 40 45

atc aac gtg ctc cag gag gac tct gtg act ctg aca tgc cag ggg gct 192
 Ile Asn Val Leu Gln Glu Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Gln Gly Ala
 50 55 60

cgc agc cct gag agc gac tcc att cag tgg ttc cac aat ggg aat ctc 240
 Arg Ser Pro Glu Ser Asp Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly Asn Leu
 65 70 75 80

att ccc acc cac acg cag ccc agc tac agg ttc aag gcc aac aac aat 288
 Ile Pro Thr His Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn Asn
 85 90 95

gac agc ggg gag tac acg tgc cag act ggc cag acc agc ctc agc gac 336
 Asp Ser Gly Glu Tyr Thr Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu Ser Asp
 100 105 110

cct gtg cat ctg act gtg ctt tcc gaa tgg ctg gtg ctc cag acc cct 384
 Pro Val His Leu Thr Val Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln Thr Pro
 115 120 125

cac ctg gag ttc cag gag gga gaa acc atc atg ctg agg tgc cac agc 432
 His Leu Glu Phe Gln Glu Gly Glu Thr Ile Met Leu Arg Cys His Ser
 130 135 140

tgg aag gac aag cct ctg gtc aag gtc aca ttc ttc cag aat gga aaa 480
 Trp Lys Asp Lys Pro Leu Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly Lys

145	150	155	160	
tcc cag aaa ttc tcc cat ttg gat ccc acc ttc tcc atc cca caa gca				528
Ser Gln Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr Phe Ser Ile Pro Gln Ala				
	165	170	175	
aac cac agt cac agt ggt gat tac cac tgc aca gga aac ata ggc tac				576
Asn His Ser His Ser Gly Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile Gly Tyr				
	180	185	190	
acg ctg ttc tca tcc aag cct gtg acc atc act gtc caa gtg ccc agc				624
Thr Leu Phe Ser Ser Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Val Pro Ser				
	195	200	205	
atg ggc agc tct tca cca atg ggg gtc att gtg gct gtg gtc att gcg				672
Met Gly Ser Ser Ser Pro Met Gly Val Ile Val Ala Val Val Ile Ala				
	210	215	220	
act gct gta gca gcc att gtt gct gct gta gtg gcc ttg atc tac tgc				720
Thr Ala Val Ala Ala Ile Val Ala Ala Val Val Ala Leu Ile Tyr Cys				
	225	230	235	240
agg aaa aag cgg att tca gcc aat tcc act gat cct gtg aag gct gcc				768
Arg Lys Lys Arg Ile Ser Ala Asn Ser Thr Asp Pro Val Lys Ala Ala				
	245	250	255	
caa ttt gag cca cct gga cgt caa atg att gcc atc aga aag aga caa				816
Gln Phe Glu Pro Pro Gly Arg Gln Met Ile Ala Ile Arg Lys Arg Gln				
	260	265	270	
ctt gaa gaa acc aac aat gac tat gaa aca gct gac ggc ggc tac atg				864
Leu Glu Glu Thr Asn Asn Asp Tyr Glu Thr Ala Asp Gly Gly Tyr Met				
	275	280	285	
act ctg aac ccc agg gca cct act gac gat gat aaa aac atc tac ctg				912
Thr Leu Asn Pro Arg Ala Pro Thr Asp Asp Asp Lys Asn Ile Tyr Leu				
	290	295	300	
act ctt cct ccc aac gac cat gtc aac agt aat aac taa				951
Thr Leu Pro Pro Asn Asp His Val Asn Ser Asn Asn				
	305	310	315	

<210> 12

<211> 316
 <212> PRT
 <213> 人類(Homo sapiens)

<400> 12

Met Thr Met Glu Thr Gln Met Ser Gln Asn Val Cys Pro Arg Asn Leu
 1 5 10 15

Trp Leu Leu Gln Pro Leu Thr Val Leu Leu Leu Leu Ala Ser Ala Asp
 20 25 30

Ser Gln Ala Ala Pro Pro Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Pro Trp
 35 40 45

Ile Asn Val Leu Gln Glu Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Gln Gly Ala
 50 55 60

Arg Ser Pro Glu Ser Asp Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly Asn Leu
 65 70 75 80

Ile Pro Thr His Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn Asn
 85 90 95

Asp Ser Gly Glu Tyr Thr Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu Ser Asp
 100 105 110

Pro Val His Leu Thr Val Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln Thr Pro
 115 120 125

His Leu Glu Phe Gln Glu Gly Glu Thr Ile Met Leu Arg Cys His Ser
 130 135 140

Trp Lys Asp Lys Pro Leu Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly Lys
 145 150 155 160

Ser Gln Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr Phe Ser Ile Pro Gln Ala
 165 170 175

Asn His Ser His Ser Gly Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile Gly Tyr
 180 185 190

Thr Leu Phe Ser Ser Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Val Pro Ser
 195 200 205

Met Gly Ser Ser Ser Pro Met Gly Val Ile Val Ala Val Val Ile Ala
 210 215 220

Thr Ala Val Ala Ala Ile Val Ala Ala Val Val Ala Leu Ile Tyr Cys
 225 230 235 240

Arg Lys Lys Arg Ile Ser Ala Asn Ser Thr Asp Pro Val Lys Ala Ala
 245 250 255

Gln Phe Glu Pro Pro Gly Arg Gln Met Ile Ala Ile Arg Lys Arg Gln
 260 265 270

Leu Glu Glu Thr Asn Asn Asp Tyr Glu Thr Ala Asp Gly Gly Tyr Met
 275 280 285

Thr Leu Asn Pro Arg Ala Pro Thr Asp Asp Asp Lys Asn Ile Tyr Leu
 290 295 300

Thr Leu Pro Pro Asn Asp His Val Asn Ser Asn Asn
 305 310 315

<210> 13

<211> 876

<212> DNA

<213> 人類(Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(876)

<400> 13

atg gga atc ctg tca ttc tta cct gtc ctt gcc act gag agt gac tgg 48
 Met Gly Ile Leu Ser Phe Leu Pro Val Leu Ala Thr Glu Ser Asp Trp
 1 5 10 15

gct gac tgc aag tcc ccc cag cct tgg ggt cat atg ctt ctg tgg aca 96
 Ala Asp Cys Lys Ser Pro Gln Pro Trp Gly His Met Leu Leu Trp Thr
 20 25 30

gct gtg cta ttc ctg gct cct gtt gct ggg aca cct gca gct ccc cca 144
 Ala Val Leu Phe Leu Ala Pro Val Ala Gly Thr Pro Ala Ala Pro Pro
 35 40 45

aag gct gtg ctg aaa ctc gag ccc cag tgg atc aac gtg ctc cag gag 192
 Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Gln Trp Ile Asn Val Leu Gln Glu
 50 55 60

gac tct gtg act ctg aca tgc cgg ggg act cac agc cct gag agc gac 240
 Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Arg Gly Thr His Ser Pro Glu Ser Asp
 65 70 75 80

tcc att cag tgg ttc cac aat ggg aat ctc att ccc acc cac acg cag 288
 Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly Asn Leu Ile Pro Thr His Thr Gln
 85 90 95

ccc agc tac agg ttc aag gcc aac aac aat gac agc ggg gag tac acg 336
 Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Thr
 100 105 110

tgc cag act ggc cag acc agc ctc agc gac cct gtg cat ctg act gtg 384
 Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu Ser Asp Pro Val His Leu Thr Val
 115 120 125

ctt tct gag tgg ctg gtg ctc cag acc cct cac ctg gag ttc cag gag 432
 Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln Thr Pro His Leu Glu Phe Gln Glu
 130 135 140

gga gaa acc atc gtg ctg agg tgc cac agc tgg aag gac aag cct ctg . 480
 Gly Glu Thr Ile Val Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asp Lys Pro Leu
 145 150 155 160

gtc aag gtc aca ttc ttc cag aat gga aaa tcc aag aaa ttt tcc cgt 528
 Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly Lys Ser Lys Lys Phe Ser Arg
 165 170 175

tcg gat ccc aac ttc tcc atc cca caa gca aac cac agt cac agt ggt 576
 Ser Asp Pro Asn Phe Ser Ile Pro Gln Ala Asn His Ser His Ser Gly
 180 185 190

gat tac cac tgc aca gga aac ata ggc tac acg ctg tac tca tcc aag 624
 Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile Gly Tyr Thr Leu Tyr Ser Ser Lys
 195 200 205

cct gtg acc atc act gtc caa gct ccc agc tct tca ccg atg ggg atc 672
 Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Gly Ile
 210 215 220

att gtg gct gtg gtc act ggg att gct gta gcg gcc att gtt gct gct 720
 Ile Val Ala Val Val Thr Gly Ile Ala Val Ala Ala Ile Val Ala Ala
 225 230 235 240

gta gtg gcc ttg atc tac tgc agg aaa aag cgg att tca gcc aat ccc 768
 Val Val Ala Leu Ile Tyr Cys Arg Lys Lys Arg Ile Ser Ala Asn Pro
 245 250 255

act aat cct gat gag gct gac aaa gtt ggg gct gag aac aca atc acc 816
 Thr Asn Pro Asp Glu Ala Asp Lys Val Gly Ala Glu Asn Thr Ile Thr
 260 265 270

tat tca ctt ctc atg cac ccg gat gct ctg gaa gag cct gat gac cag 864
 Tyr Ser Leu Leu Met His Pro Asp Ala Leu Glu Glu Pro Asp Asp Gln
 275 280 285

aac cgt att tag 876
 Asn Arg Ile
 290

<210> 14

<211> 291

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 14

Met Gly Ile Leu Ser Phe Leu Pro Val Leu Ala Thr Glu Ser Asp Trp
 1 5 10 15

Ala Asp Cys Lys Ser Pro Gln Pro Trp Gly His Met Leu Leu Trp Thr
 20 25 30

Ala Val Leu Phe Leu Ala Pro Val Ala Gly Thr Pro Ala Ala Pro Pro
 35 40 45

Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Gln Trp Ile Asn Val Leu Gln Glu
 50 55 60

Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Arg Gly Thr His Ser Pro Glu Ser Asp
 65 70 75 80

Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly Asn Leu Ile Pro Thr His Thr Gln
 85 90 95

Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Thr
 100 105 110

Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu Ser Asp Pro Val His Leu Thr Val
 115 120 125

Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln Thr Pro His Leu Glu Phe Gln Glu
 130 135 140

Gly Glu Thr Ile Val Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asp Lys Pro Leu
 145 150 155 160

Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly Lys Ser Lys Lys Phe Ser Arg
 165 170 175

Ser Asp Pro Asn Phe Ser Ile Pro Gln Ala Asn His Ser His Ser Gly
 180 185 190

Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile Gly Tyr Thr Leu Tyr Ser Ser Lys
 195 200 205

Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Gly Ile
 210 215 220

Ile Val Ala Val Val Thr Gly Ile Ala Val Ala Ala Ile Val Ala Ala
 225 230 235 240

Val Val Ala Leu Ile Tyr Cys Arg Lys Lys Arg Ile Ser Ala Asn Pro
 245 250 255

Thr Asn Pro Asp Glu Ala Asp Lys Val Gly Ala Glu Asn Thr Ile Thr
 260 265 270

Tyr Ser Leu Leu Met His Pro Asp Ala Leu Glu Glu Pro Asp Asp Gln
 275 280 285

Asn Arg Ile
 290

<210> 15
 <211> 765
 <212> DNA
 <213> 人類(Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(765)

<400> 15

atg tgg cag ctg ctc ctc cca act gct ctg cta ctt cta gtt tca gct 48
 Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala
 1 5 10 15

ggc atg cgg act gaa gat ctc cca aag gct gtg gtg ttc ctg gag cct 96
 Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
 20 25 30

caa tgg tac agg gtg ctc gag aag gac agt gtg act ctg aag tgc cag 144
 Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
 35 40 45

gga gcc tac tcc cct gag gac aat tcc aca cag tgg ttt cac aat gag 192
 Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
 50 55 60

agc ctc atc tca agc cag gcc tcg agc tac ttc att gac gct gcc aca 240
 Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
 65 70 75 80

gtt gac gac agt gga gag tac agg tgc cag aca aac ctc tcc acc ctc 288
 Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu
 85 90 95

agt gac ccg gtg cag cta gaa gtc cat atc ggc tgg ctg ttg ctc cag 336
 Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln
 100 105 110

gcc cct cgg tgg gtg ttc aag gag gaa gac cct att cac ctg agg tgt 384
 Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
 115 120 125

cac agc tgg aag aac act gct ctg cat aag gtc aca tat tta cag aat 432
 His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
 130 135 140

ggc aaa ggc agg aag tat ttt cat cat aat tct gac ttc tac att cca 480
 Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro
 145 150 155 160

aaa gcc aca ctc aaa gac agc ggc tcc tac ttc tgc agg ggg ctt gtt 528
 Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val
 165 170 175

ggg agt aaa aat gtg tct tca gag act gtg aac atc acc atc act caa 576
 Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
 180 185 190

ggt ttg tca gtg tca acc atc tca tca ttc ttt cca cct ggg tac caa 624
 Gly Leu Ser Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln
 195 200 205

gtc tct ttc tgc ttg gtg atg gta ctc ctt ttt gca gtg gac aca gga 672
 Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly
 210 215 220

cta tat ttc tct gtg aag aca aac att cga agc tca aca aga gac tgg 720
 Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp
 225 230 235 240

aag gac cat aaa ttt aaa tgg aga aag gac cct caa gac aaa tga 765
 Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys
 245 250

<210> 16

<211> 254

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 16

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala
 1 5 10 15

Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
 20 25 30

Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
 35 40 45

Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
 50 55 60

Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
 65 70 75 80

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

Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln
 100 105 110

Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
 115 120 125

His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
 130 135 140

Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro
 145 150 155 160

Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val
 165 170 175

Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
 180 185 190

Gly Leu Ser Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln
 195 200 205

Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly
 210 215 220

Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp
 225 230 235 240

Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys
 245 250

<210> 17
 <211> 702
 <212> DNA
 <213> 人類(Homo sapiens)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(702)

<400> 17
 atg tgg cag ctg ctc ctc cca act gct ctg cta ctt cta gtt tca gct 48
 Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala
 1 5 10 15

ggc atg cgg act gaa gat ctc cca aag gct gtg gtg ttc ctg gag cct 96
 Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
 20 25 30

caa tgg tac agc gtg ctt gag aag gac agt gtg act ctg aag tgc cag 144
 Gln Trp Tyr Ser Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
 35 40 45

gga gcc tac tcc cct gag gac aat tcc aca cag tgg ttt cac aat gag 192
 Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
 50 55 60

agc ctc atc tca agc cag gcc tcg agc tac ttc att gac gct gcc aca 240
 Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
 65 70 75 80

gtc aac gac agt gga gag tac agg tgc cag aca aac ctc tcc acc ctc 288
 Val Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu
 85 90 95

agt gac ccg gtg cag cta gaa gtc cat atc ggc tgg ctg ttg ctc cag 336

Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln
100 105 110

gcc cct cgg tgg gtg ttc aag gag gaa gac cct att cac ctg agg tgt 384
Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
115 120 125

cac agc tgg aag aac act gct ctg cat aag gtc aca tat tta cag aat 432
His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
130 135 140

ggc aaa gac agg aag tat ttt cat cat aat tct gac ttc cac att cca 480
Gly Lys Asp Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe His Ile Pro
145 150 155 160

aaa gcc aca ctc aaa gat agc ggc tcc tac ttc tgc agg ggg ctt gtt 528
Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val
165 170 175

ggg agt aaa aat gtg tct tca gag act gtg aac atc acc atc act caa 576
Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
180 185 190

ggt ttg gca gtg tca acc atc tca tca ttc tct cca cct ggg tac caa 624
Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Ser Pro Pro Gly Tyr Gln
195 200 205

gtc tct ttc tgc ttg gtg atg gta ctc ctt ttt gca gtg gac aca gga 672
Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly
210 215 220

cta tat ttc tct gtg aag aca aac att tga 702
Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile
225 230

<210> 18

<211> 233

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 18

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala

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

180

185

190

Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Ser Pro Pro Gly Tyr Gln
 195 200 205

Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly
 210 215 220

Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile
 225 230

<210> 19
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 人工合成之序列

<400> 19

Gly Gly Gly Ser
 1

<210> 20
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 人工合成之序列

<400> 20

Ser Gly Gly Gly
 1

<210> 21

<211> 5
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成之序列

<400> 21

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 22
<211> 5
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成之序列

<400> 22

Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 23
<211> 6
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成之序列

<400> 23

Gly Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 24
<211> 6
<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人工合成之序列

<400> 24

Ser Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人工合成之序列

<400> 25

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人工合成之序列

<400> 26

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 27

<211> 107

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 27

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
 100 105

<210> 28

<211> 365

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 28

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> 29

<211> 119

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 29

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> 30

<211> 451

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 30

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 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 Asp Ala Val Thr Gly Asp Asp Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
 100 105 110
 Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

180

185

190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

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

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu 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 Gly Lys
 450

<210> 31

<211> 214

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 31

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
 35 40 45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
 85 90 95

Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
 100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
 115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
 130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
 145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
 165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
 180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
 195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210

<210> 32
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 人工合成之序列

<400> 32

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Glu Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60

Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

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

Thr Ser 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> 33

<211> 213

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人工合成之序列

<400> 33

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 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> 34

<211> 443

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人工合成之序列

<400> 34

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

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

Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser 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 Ala Ala 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 Ala 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> 35
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 人工合成之序列

<400> 35

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
 85 90 95

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 36

<211> 453

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 36

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Gln Ser Gly Asp Thr His Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Val Ser Thr Gly Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Gly Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Ser Leu Ile Thr Ala Ala Gly Pro Pro Pro Phe Glu His
 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 Gly Lys
 450

<210> 37

<211> 213

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 37

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

Thr Ala Thr Met Pro Cys Ser Gly Asn Gly Leu Gly Asp Lys Phe Val
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly His Ser Pro Val Ala Val Ile Tyr
 35 40 45

Gln Asp Ala Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Gly Ser Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Ala
 65 70 75 80

1 5 10 15
 Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ile Ile Gly Ala Asp Ser Ser Thr Trp Tyr Pro Ser Trp Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Met
 65 70 75 80
 Thr Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly
 85 90 95
 Arg Phe Val Gly Tyr Thr Asn Ala Phe Asp Pro Trp Gly Pro 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 Glu Glu Met 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> 39

<211> 220

<212> PRT

<213> 穴兔(Oryctolagus cuniculus)

<400> 39

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

Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Trp Asn Asn
 20 25 30

Asn Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu
 35 40 45

Leu Ile Phe Asp Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Arg Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val
 65 70 75 80

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

Ser Gly Trp Tyr Asp Asn Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val
 100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 180 185 190

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

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220

<210> 40

<211> 452

<212> PRT

<213> 穴兔(*Oryctolagus cuniculus*)

<400> 40

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

Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Tyr Ile
 35 40 45

Gly Phe Ile Asn Thr Gly Gly Ser Ser Tyr Tyr Ala Pro Trp Ala Ile
 50 55 60

Gly Arg Leu 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 Val
 85 90 95

Lys Ser Tyr Val Asn Ser Asn Gly Tyr Phe Ile Phe Ser Arg Leu Asp
 100 105 110

Leu 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 Glu Glu Met 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> 41

<211> 218

<212> PRT

<213> 穴兔(Oryctolagus cuniculus)

<400> 41

Ala Gln Val Leu Thr Gln Thr Ala Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
 1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Lys Ser Val Tyr Asn Asn
 20 25 30

Asn Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Gln Pro Pro Lys Leu
 35 40 45

Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 50 55 60

Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu
 65 70 75 80

Glu Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Tyr Ser Gly
 85 90 95

Ile Pro Ile Asn Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val 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> 42
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> 穴兔(Oryctolagus cuniculus)

<400> 42

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

Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser Asn
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Ala Ile Gly Gly Ser Gly Asp Thr Gly Tyr Ala Ser Trp Ala Asn
 50 55 60

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

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

Ser Val Gly Ala Ser Trp Trp Val Phe Asn Ile Trp Gly Pro 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 Glu Glu Met 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> 43
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> 穴兔(Oryctolagus cuniculus)

<400> 43

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

Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Ser Gly
 20 25 30

Asn Phe Phe Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu
 35 40 45

Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 50 55 60

Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val
 65 70 75 80

Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Thr Tyr Tyr Asn
 85 90 95

Ser Gly Trp Ser Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val 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> 44
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> 穴兔(*Oryctolagus cuniculus*)

<400> 44

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

Ser Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Gly Phe Ile Asp Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Met
 65 70 75 80

Thr Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly
 85 90 95

Gly Val Asn Val Asp Tyr Tyr Ile Trp Gly Pro 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 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

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

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

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

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

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

<210> 45
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> 穴兔(Oryctolagus cuniculus)

<400> 45

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

Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Ser Asn
 20 25 30

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

Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 50 55 60

Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val
 65 70 75 80

Val Cys Asp Asp Ala Ala Ser Tyr Tyr Cys Gln Gly Tyr Tyr Tyr Gly
 85 90 95

Gly Ile Gly Pro 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> 46

<211> 122

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 46

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

Asn Asn Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 48

<211> 119

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人工合成之序列

<400> 48

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 49

<211> 107

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人工合成之序列

<400> 49

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

Asp 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 Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 50

<211> 449

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 50

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ile 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 Gly Pro Leu Val Ser Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

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

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

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

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

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

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

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

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

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

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

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

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

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

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

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

Lys

<210> 51

<211> 219

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 51

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Leu Ser Leu Leu Asn Arg
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Phe Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

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

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

Asn Arg Val Glu Ala Asp Asp Ala Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
 85 90 95

Leu His Leu Pro Arg Thr Phe Gly Leu Arg Thr Lys Val 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> 52

<211> 450

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 52

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 Asp Arg Gly Met Gly Gly Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Met 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

Gly Lys
 450

<210> 53

<211> 216
 <212> PRT
 <213> 人類(Homo sapiens)
 <400> 53

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr His Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

Asn Gly Pro 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> 54

<211> 456

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 54

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Tyr Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30

Gly Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Trp Asn Asp Ala Ser Asn Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Glu Gly Ser Ser Pro Lys Thr Pro Thr Ser Thr Trp Ser Ser
 100 105 110

Leu Glu Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu 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 Gly Lys
 450 455

<210> 55

<211> 217

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 55

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

Ser Ile 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 His Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
 85 90 95

Thr Thr Pro Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 56

<211> 30

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 56

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

Phe Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30

<210> 57

<211> 14
 <212> PRT
 <213> 人類(Homo sapiens)

<400> 57

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

<210> 58
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 人類(Homo sapiens)

<400> 58

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 59
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人類(Homo sapiens)

<400> 59

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 60
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人類(Homo sapiens)

<400> 60

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln

<210> 64
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 人工合成之序列

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> n i s a , c , g , o r t

<400> 64
 tattactcgc ggcccagccg gccatggcag ccwtcganwt gaccagact 50

<210> 65
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 人工合成之序列

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (39)..(39)
 <223> n i s a , c , g , o r t

<400> 65
 tattactcgc ggcccagccg gccatggcag cctatgatnt gaccagact 50

<210> 66
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 人工合成之序列

<400> 66
tattactcgc ggcccagccg gccatggcag cbcaagtgt gaccagact 50

<210> 67
<211> 50
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成之序列

<400> 67
tattactcgc ggcccagccg gccatggcag cmtygtgat gaccagact 50

<210> 68
<211> 50
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成之序列

<400> 68
tattactcgc ggcccagccg gccatggcag cgcctgtgt gaccagact 50

<210> 69
<211> 50
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成之序列

<400> 69
tattactcgc ggcccagccg gccatggcgg ctgacattgt gatgaccag 50

<210> 70
<211> 50
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>

<223> 人工合成之序列

<400> 70

tattactcgc ggcccagccg gccatggccg ccgayrtygt gatgaccag 50

<210> 71

<211> 41

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 人工合成之序列

<400> 71

ctcttctaga acgctctaa gcgtcacccc tattgaagct c 41

<210> 72

<211> 55

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 人工合成之序列

<400> 72

tattactcgc ggcccagccg gccatggcgc agcytytgct gactcagtcg ccctc 55

<210> 73

<211> 44

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 人工合成之序列

<400> 73

ctcttctaga acgctctaa gcttctgcag gggccagct cttc 44

<210> 74
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 人工合成之序列

<400> 74
 ttccgcctcg gcgctagccc aggagcagst ggwggagtcc

40

<210> 75
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 人工合成之序列

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(26)
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 75
 ttccgcctcg gcgctagccc agtcnntgga ggagtccggg

40

<210> 76
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 人工合成之序列

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(27)
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 76

ttccgcctcg gcgctagccc agtcgnngga ggagtccggg

40

<210> 77

<211> 40

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 人工合成之序列

<400> 77

ttccgcctcg gcgctagccc agcagcagct ggwggagtcc

40

<210> 78

<211> 122

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 78

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

Gly Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly His
 20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Thr His Ile Phe 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 Tyr Gly Arg Arg Trp Ala Met Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 79

<211> 110

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 79

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp 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 Gly Gly Ser Lys Lys Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Leu Lys Ser Tyr Ala
 85 90 95

Glu Gly Pro Met Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 80
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人類(Homo sapiens)

<400> 80

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

Gly Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn His Ile Asn 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 Tyr Gly His Arg Arg Asp Leu Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 81
 <211> 110
 <212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 81

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Phe 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 Gly Gly 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 Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Val Thr Tyr Ser Ile
85 90 95

Ala Asp Pro Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 82

<211> 122

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 82

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

Gly Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly His

20

25

30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Ser Tyr 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 Tyr Gly Ala Leu Gly Gln Met Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 83

<211> 110

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 83

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Asp 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 Ser 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 Val Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Ser Arg Ser Ser Ser
 85 90 95

Met Asn Val Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 84

<211> 122

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 84

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

Gly Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Ser Tyr Ile Asp 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 Tyr Gly Ala Leu Gly Gln Arg Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 85

<211> 109

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 85

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Asp 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 Gln Thr 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 Val Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Ser Arg Ser Ile Lys
 85 90 95

His Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 86

<211> 123

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<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 Asp Ala Pro Val Val Ala Arg Pro Arg Gly Ala Phe Asp Ile
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 87

<211> 112

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 87

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
 35 40 45

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

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asn Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95

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

<210> 88

<211> 122

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 88

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Ala Val Val 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 Leu Val Pro Ser Ser Gly Tyr Pro Gly Arg Phe Asp Pro Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 89

<211> 106

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 89

Asn 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 Ser
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile 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 Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ala Trp Thr
 85 90 95

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

<210> 90

<211> 328

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 90

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

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> 91

<211> 107

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 91

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> 92

<211> 119

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 92

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
 115

<210> 93

<211> 107

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 93

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
 100 105

<210> 94
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 人工合成之序列

<400> 94

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 Asp 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 Glu 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> 95

<211> 122

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 95

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

Gly Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Ser His Ile Ser Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Phe Gly Arg Lys Tyr Arg Met Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 96
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 人類(Homo sapiens)

<400> 96

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe 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 Thr 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 Val Ser Gly Leu
 65 70 75 80

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

Trp Ser Val Gly Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 97
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人類(Homo sapiens)

<400> 97

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

1 5 10 15
 Gly Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His
 20 25 30
 Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn His Ala Thr 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 Phe Gly Lys Lys Gly Arg Tyr Leu Trp Val Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 98
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 人類(Homo sapiens)
 <400> 98
 Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp 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 Tyr 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 Val Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Leu Thr Thr Asp Ser
 85 90 95

Leu Asn Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 99

<211> 233

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 99

Cys His Pro Arg Leu Ser Leu His Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Gly Ser Glu Ala Asn Leu Thr Cys Thr Leu Thr Gly Leu Arg Asp
 20 25 30

Ala Ser Gly Val Thr Phe Thr Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Ser Ala
 35 40 45

Val Gln Gly Pro Pro Glu Arg Asp Leu Cys Gly Cys Tyr Ser Val Ser
 50 55 60

Ser Val Leu Pro Gly Cys Ala Glu Pro Trp Asn His Gly Lys Thr Phe
65 70 75 80

Thr Cys Thr Ala Ala Tyr Pro Glu Ser Lys Thr Pro Leu Thr Ala Thr
85 90 95

Leu Ser Lys Ser Gly Asn Thr Phe Arg Pro Glu Val His Leu Leu Pro
100 105 110

Pro Pro Ser Glu Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr Cys
115 120 125

Leu Ala Arg Gly Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu Gln
130 135 140

Gly Ser Gln Glu Leu Pro Arg Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala Ser Arg
145 150 155 160

Gln Glu Pro Ser Gln Gly Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile Leu
165 170 175

Arg Val Ala Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys Met
180 185 190

Val Gly His Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp
195 200 205

Arg Leu Ala Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe
210 215 220

Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
225 230

<210> 100
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人類(Homo sapiens)

<400> 100

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

Gly Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly His
 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn His 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 Tyr Gly Arg Lys Phe Met Met Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 101
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 人類(Homo sapiens)

<400> 101

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe 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 Gln Asn 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 Val Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Leu Arg Ser Ser Asn
 85 90 95

Leu Ser Pro Gly Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 102

<211> 25

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 人工合成之序列

<400> 102

actcgcggcc cagccggcca tggcg

25

<210> 103

<211> 27
 <212> DNA
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 人工合成之序列

<400> 103
 taggacggtc agcttggtac ctccgcc 27

<210> 104
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 人工合成之序列

<400> 104
 gcgcagccgg cgctagcc 18

<210> 105
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 人工合成之序列

<400> 105
 tgggcccttg gtcgacgc 18

<210> 106
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人類(Homo sapiens)

<400> 106

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

Gly Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Gly His Arg His 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 Tyr Gly Lys Lys Gly Asn Arg Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 107

<211> 110

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 107

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr 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 Ser Thr 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 Val Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Thr Thr Thr Tyr Ala
 85 90 95

Lys Asn Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 108

<211> 122

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 108

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

Gly Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn His Arg Ser Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Phe Gly Lys Arg Phe Asp Arg Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 109

<211> 110

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 109

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Thr 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 Lys Thr 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 Val Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Ser Arg Arg Tyr Arg

85

90

95

Arg Ser Leu Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 110

<211> 20

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 人工合成之序列

<400> 110

cgcaacgcaa ttaatgtgag

20

<210> 111

<211> 18

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 人工合成之序列

<400> 111

gcgtcacact ttgctatg

18

<210> 112

<211> 21

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 人工合成之序列

<400> 112

tgagttccac gacaccgtca c

21

<210> 113

<211> 122

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 113

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

Gly Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly His
 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr 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 Tyr Gly Arg Leu His Asp Arg Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 114

<211> 110

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 114

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Asp 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 Gln Val Ser Lys Lys Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
 65 70 75 80

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

Ala Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 115

<211> 122

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 115

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

Gly Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr His
 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Ser Tyr Ile His 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 Phe Gly Lys Leu Gly Glu Arg Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 116

<211> 110

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 116

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Asp 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 Gln Val Ser Lys Lys Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

50

55

60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

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

His Gly Pro Met Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 117

<211> 122

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 117

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

Gly Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr Ala His 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 Tyr Gly Arg Leu Gly Asp Arg Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 118

<211> 110

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 118

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Ala 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 Lys Val Ser Lys Lys Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Leu Arg Ala Ala Thr
 85 90 95

Thr Gly Val Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 119
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人類(Homo sapiens)

<400> 119

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

Gly Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Gly Tyr Ala 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 Phe Gly Ala Leu Asn Thr Leu Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 120
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 人類(Homo sapiens)

<400> 120

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Asp 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 Gln Val Ser Lys Lys Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Thr Arg Thr Ala Asn
 85 90 95

Ala Gly Val Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 121

<211> 122

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 121

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

Gly Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Ser Tyr Ala Ser Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Tyr Gly Arg Leu Asn Ser His Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 122

<211> 110

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 122

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe 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 Gln Gly Ser Lys Lys Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Thr Arg Ala Thr Thr
 85 90 95

Lys Gly Val Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 123

<211> 122

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 123

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

Gly Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly His
 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr 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 Tyr Gly Arg Leu His Asp Arg Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 124

<211> 110

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 124

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Asp 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 Gln Val Ser Lys Lys Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
 65 70 75 80

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

Ala Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100

105

110

<210> 125

<211> 122

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 125

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

Gly Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His
 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Gly Tyr Ile Phe 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 Phe Gly Lys Leu Asn His Met Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 126

<211> 110

<212> PRT

<213> 人類(Homo sapiens)

<400> 126

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Thr 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 Gln 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 Val Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Thr Arg Ala Ile Thr
 85 90 95

Arg Gly Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

申請專利範圍

1. 一種抗原結合分子，其包含因應選自於腺苷、腺苷 3 磷酸、腺苷 2 磷酸、腺苷 1 磷酸、及肌苷所組成的群組中之至少一種化合物的濃度而改變對抗原的結合活性之抗原結合分域，其中該抗原結合分域包含一抗體重鏈可變區及一抗體輕鏈可變區，其中該抗體重鏈可變區包含 Kabat 編號表示之 52 位之 Ser、52a 位之 Ser、53 位之 Arg、96 位之 Gly、100a 位之 Leu 及 100c 位之 Trp 中之一或多個胺基酸。
2. 如申請專利範圍第 1 項之抗原結合分子，其中，該抗原為膜型分子。
3. 如申請專利範圍第 1 項之抗原結合分子，其係具有中和活性之抗原結合分子。
4. 如申請專利範圍第 1 項之抗原結合分子，其係具有細胞傷害活性之抗原結合分子。
5. 如申請專利範圍第 1 項之抗原結合分子，其包含 Fc 區。
6. 如申請專利範圍第 5 項之抗原結合分子，其中，該 Fc 區係序列編號：5、6、7、或 8 記載之不變區含有之 Fc 區。
7. 如申請專利範圍第 5 項之抗原結合分子，其中，該 Fc 區包含對 Fc γ 受體之結合活性高於對天然型人類 IgG 之 Fc 區的 Fc γ 受體之結合活性的 Fc γ R 結合改變 Fc 區。
8. 如申請專利範圍第 7 項之抗原結合分子，其包含該 Fc γ R 結合改變 Fc 區之胺基酸序列之中選自下列 EU 編號表示之胺基酸之群組的至少一種以上之胺基酸不同於天然型人類 IgG 之 Fc 區之胺基酸的胺基酸：

221 位、222 位、223 位、224 位、225 位、227 位、228 位、
230 位、231 位、232 位、233 位、234 位、235 位、236 位、
237 位、238 位、239 位、240 位、241 位、243 位、244 位、
245 位、246 位、247 位、249 位、250 位、251 位、254 位、
255 位、256 位、258 位、260 位、262 位、263 位、264 位、
265 位、266 位、267 位、268 位、269 位、270 位、271 位、
272 位、273 位、274 位、275 位、276 位、278 位、279 位、
280 位、281 位、282 位、283 位、284 位、285 位、286 位、
288 位、290 位、291 位、292 位、293 位、294 位、295 位、
296 位、297 位、298 位、299 位、300 位、301 位、302 位、
303 位、304 位、305 位、311 位、313 位、315 位、317 位、
318 位、320 位、322 位、323 位、324 位、325 位、326 位、
327 位、328 位、329 位、330 位、331 位、332 位、333 位、
334 位、335 位、336 位、337 位、339 位、376 位、377 位、
378 位、379 位、380 位、382 位、385 位、392 位、396 位、
421 位、427 位、428 位、429 位、434 位、436 位或 440 位。

9. 如申請專利範圍第 8 項之抗原結合分子，其包含該 Fc γ R 結合改變 Fc 區之胺基酸序列之中選自下列 EU 編號所示之群的至少一個以上的胺基酸：

221 位之胺基酸為 Lys 或 Tyr 中之任一者、
222 位之胺基酸為 Phe、Trp、Glu 或 Tyr 中之任一者、
223 位之胺基酸為 Phe、Trp、Glu 或 Lys 中之任一者、
224 位之胺基酸為 Phe、Trp、Glu 或 Tyr 中之任一者、
225 位之胺基酸為 Glu、Lys 或 Trp 中之任一者、

- 227 位之胺基酸為 Glu、Gly、Lys 或 Tyr 中之任一者、
- 228 位之胺基酸為 Glu、Gly、Lys 或 Tyr 中之任一者、
- 230 位之胺基酸為 Ala、Glu、Gly 或 Tyr 中之任一者、
- 231 位之胺基酸為 Glu、Gly、Lys、Pro 或 Tyr 中之任一者、
- 232 位之胺基酸為 Glu、Gly、Lys 或 Tyr 中之任一者、
- 233 位之胺基酸為 Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、
- 234 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、
- 235 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、
- 236 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、
- 237 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、
- 238 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、
- 239 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、

Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

240 位之胺基酸為 Ala、Ile、Met 或 Thr 中之任一者、

241 位之胺基酸為 Asp、Glu、Leu、Arg、Trp 或 Tyr 中之任一者、

243 位之胺基酸為 Leu、Glu、Leu、Gln、Arg、Trp 或 Tyr 中之任一者、

244 位之胺基酸為 His、

245 位之胺基酸為 Ala、

246 位之胺基酸為 Asp、Glu、His 或 Tyr 中之任一者、

247 位之胺基酸為 Ala、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Thr、Val 或 Tyr 中之任一者、

249 位之胺基酸為 Glu、His、Gln 或 Tyr 中之任一者、

250 位之胺基酸為 Glu 或 Gln 中之任一者、

251 位之胺基酸為 Phe、

254 位之胺基酸為 Phe、Met 或 Tyr 中之任一者、

255 位之胺基酸為 Glu、Leu 或 Tyr 中之任一者、

256 位之胺基酸為 Ala、Met 或 Pro 中之任一者、

258 位之胺基酸為 Asp、Glu、His、Ser 或 Tyr 中之任一者、

260 位之胺基酸為 Asp、Glu、His 或 Tyr 中之任一者、

262 位之胺基酸為 Ala、Glu、Phe、Ile 或 Thr 中之任一者、

263 位之胺基酸為 Ala、Ile、Met 或 Thr 中之任一者、

264 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Trp 或 Tyr 中

之任一者、

265 位之胺基酸為 Ala、Leu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

266 位之胺基酸為 Ala、Ile、Met 或 Thr 中之任一者、

267 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

268 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、Gly、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Thr、Val 或 Trp 中之任一者、

269 位之胺基酸為 Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

270 位之胺基酸為 Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Trp 或 Tyr 中之任一者、

271 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

272 位之胺基酸為 Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

273 位之胺基酸為 Phe 或 Ile 中之任一者、

274 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

275 位之胺基酸為 Leu 或 Trp 中之任一者、

276 位之胺基酸為、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

278 位之胺基酸為 Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val 或 Trp 中之任一者、

279 位之胺基酸為 Ala、

280 位之胺基酸為 Ala、Gly、His、Lys、Leu、Pro、Gln、Trp 或 Tyr 中之任一者、

281 位之胺基酸為 Asp、Lys、Pro 或 Tyr 中之任一者、

282 位之胺基酸為 Glu、Gly、Lys、Pro 或 Tyr 中之任一者、

283 位之胺基酸為 Ala、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Arg 或 Tyr 中之任一者、

284 位之胺基酸為 Asp、Glu、Leu、Asn、Thr 或 Tyr 中之任一者、

285 位之胺基酸為 Asp、Glu、Lys、Gln、Trp 或 Tyr 中之任一者、

286 位之胺基酸為 Glu、Gly、Pro 或 Tyr 中之任一者、

288 位之胺基酸為 Asn、Asp、Glu 或 Tyr 中之任一者、

290 位之胺基酸為 Asp、Gly、His、Leu、Asn、Ser、Thr、Trp 或 Tyr 中之任一者、

291 位之胺基酸為 Asp、Glu、Gly、His、Ile、Gln 或 Thr 中之任一者、

292 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Pro、Thr 或 Tyr 中之任一者、

293 位之胺基酸為 Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

294 位之胺基酸為 Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

295 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

296 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr 或 Val 中之任一者、

297 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

298 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

299 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

300 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val 或 Trp 中之任一者、

301 位之胺基酸為 Asp、Glu、His 或 Tyr 中之任一者、

302 位之胺基酸為 Ile、

303 位之胺基酸為 Asp、Gly 或 Tyr 中之任一者、

304 位之胺基酸為 Asp、His、Leu、Asn 或 Thr 中之任一者、

- 305 位之胺基酸為 Glu、Ile、Thr 或 Tyr 中之任一者、
- 311 位之胺基酸為 Ala、Asp、Asn、Thr、Val 或 Tyr 中之任一者、
- 313 位之胺基酸為 Phe、
- 315 位之胺基酸為 Leu、
- 317 位之胺基酸為 Glu 或 Gln、
- 318 位之胺基酸為 His、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val 或 Tyr 中之任一者、
- 320 位之胺基酸為 Asp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Asn、Pro、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、
- 322 位之胺基酸為 Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Pro、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、
- 323 位之胺基酸為 Ile、
- 324 位之胺基酸為 Asp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、
- 325 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、
- 326 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、
- 327 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、
- 328 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、

Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

329 位之胺基酸為 Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

330 位之胺基酸為 Cys、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

331 位之胺基酸為 Asp、Phe、His、Ile、Leu、Met、Gln、Arg、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

332 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

333 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Ser、Thr、Val 或 Tyr 中之任一者、

334 位之胺基酸為 Ala、Glu、Phe、Ile、Leu、Pro 或 Thr 中之任一者、

335 位之胺基酸為 Asp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Val、Trp 或 Tyr 中之任一者、

336 位之胺基酸為 Glu、Lys 或 Tyr 中之任一者、

337 位之胺基酸為 Glu、His 或 Asn 中之任一者、

339 位之胺基酸為 Asp、Phe、Gly、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、Ser 或 Thr 中之任一者、

376 位之胺基酸為 Ala 或 Val 中之任一者、

377 位之胺基酸為 Gly 或 Lys 中之任一者、

378 位之胺基酸為 Asp、

379 位之胺基酸為 Asn、

380 位之胺基酸為 Ala、Asn 或 Ser 中之任一者、

382 位之胺基酸為 Ala 或 Ile 中之任一者、

385 位之胺基酸為 Glu、

392 位之胺基酸為 Thr、

396 位之胺基酸為 Leu、

421 位之胺基酸為 Lys、

427 位之胺基酸為 Asn、

428 位之胺基酸為 Phe 或 Leu 中之任一者、

429 位之胺基酸為 Met、

434 位之胺基酸為 Trp、

436 位之胺基酸為 Ile、或

440 位之胺基酸為 Gly、His、Ile、Leu 或 Tyr 中之任一者。

10. 如申請專利範圍第 5 項之抗原結合分子，其中，該 Fc 區為以提高 Fc 區之 EU 編號 297 位所結合的糖鏈之組成結合岩藻醣缺損糖鏈之 Fc 區的比例、或者提高加成有二分化 N-乙醯基葡糖胺之 Fc 區的比例之方式修飾的 Fc 區。
11. 如申請專利範圍第 5 項之抗原結合分子，其中，該 Fc 區於 pH 酸性域之條件下對 FcRn 之結合活性被增強高於序列編號：5、6、7、或 8 中之任一者表示之 Fc 區對 FcRn 之結合活性。
12. 如申請專利範圍第 11 項之抗原結合分子，其中，該 Fc 區

係序列編號：5、6、7、或 8 記載之不變區含有之 Fc 區的胺基酸序列中選自下列 EU 編號表示之群的至少一個以上的胺基酸被取代之 Fc 區，

238 位、244 位、245 位、249 位、250 位、251 位、252 位、
253 位、254 位、255 位、256 位、257 位、258 位、260 位、
262 位、265 位、270 位、272 位、279 位、283 位、285 位、
286 位、288 位、293 位、303 位、305 位、307 位、308 位、
309 位、311 位、312 位、314 位、316 位、317 位、318 位、
332 位、339 位、340 位、341 位、343 位、356 位、360 位、
362 位、375 位、376 位、377 位、378 位、380 位、382 位、
385 位、386 位、387 位、388 位、389 位、400 位、413 位、
415 位、423 位、424 位、427 位、428 位、430 位、431 位、
433 位、434 位、435 位、436 位、438 位、439 位、440 位、
442 位、或 447 位。

13. 如申請專利範圍第 12 項之抗原結合分子，其中，該 Fc 區係序列編號：5、6、7、或 8 記載之不變區含有之 Fc 區的胺基酸序列中選自下列 EU 編號表示之群的至少一個以上的胺基酸：

238 位之胺基酸為 Leu、

244 位之胺基酸為 Leu、

245 位之胺基酸為 Arg、

249 位之胺基酸為 Pro、

250 位之胺基酸為 Gln 或 Glu 中之任一者、或

251 位之胺基酸為 Arg、Asp、Glu、或 Leu 中之任一者、

- 252 位之胺基酸為 Phe、Ser、Thr、或 Tyr 中之任一者、
- 254 位之胺基酸為 Ser 或 Thr 中之任一者、
- 255 位之胺基酸為 Arg、Gly、Ile、或 Leu 中之任一者、
- 256 位之胺基酸為 Ala、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Pro、或 Thr 中之任一者、
- 257 位之胺基酸為 Ala、Ile、Met、Asn、Ser、或 Val 中之任一者、
- 258 位之胺基酸為 Asp、
- 260 位之胺基酸為 Ser、
- 262 位之胺基酸為 Leu、
- 270 位之胺基酸為 Lys、
- 272 位之胺基酸為 Leu、或 Arg 中之任一者、
- 279 位之胺基酸為 Ala、Asp、Gly、His、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Trp、或 Tyr 中之任一者、
- 283 位之胺基酸為 Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Trp、或 Tyr 中之任一者、
- 285 位之胺基酸為 Asn、
- 286 位之胺基酸為 Phe、
- 288 位之胺基酸為 Asn、或 Pro 中之任一者、
- 293 位之胺基酸為 Val、
- 307 位之胺基酸為 Ala、Glu、Gln、或 Met 中之任一者、
- 311 位之胺基酸為 Ala、Glu、Ile、Lys、Leu、Met、Ser、Val、或 Trp 中之任一者、

- 309 位之胺基酸為 Pro、
- 312 位之胺基酸為 Ala、Asp、或 Pro 中之任一者、
- 314 位之胺基酸為 Ala 或 Leu 中之任一者、
- 316 位之胺基酸為 Lys、
- 317 位之胺基酸為 Pro、
- 318 位之胺基酸為 Asn、或 Thr 中之任一者、
- 332 位之胺基酸為 Phe、His、Lys、Leu、Met、Arg、Ser、
或 Trp 中之任一者、
- 339 位之胺基酸為 Asn、Thr、或 Trp 中之任一者、
- 341 位之胺基酸為 Pro、
- 343 位之胺基酸為 Glu、His、Lys、Gln、Arg、Thr、或 Tyr
中之任一者、
- 375 位之胺基酸為 Arg、
- 376 位之胺基酸為 Gly、Ile、Met、Pro、Thr、或 Val 中之
任一者、
- 377 位之胺基酸為 Lys、
- 378 位之胺基酸為 Asp、Asn、或 Val 中之任一者、
- 380 位之胺基酸為 Ala、Asn、Ser、或 Thr 中之任一者
- 382 位之胺基酸為 Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、
Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、或 Tyr 中之任一者、
- 385 位之胺基酸為 Ala、Arg、Asp、Gly、His、Lys、Ser、
或 Thr 中之任一者、
- 386 位之胺基酸為 Arg、Asp、Ile、Lys、Met、Pro、Ser、
或 Thr 中之任一者、

387 位之胺基酸為 Ala、Arg、His、Pro、Ser、或 Thr 中之任一者、

389 位之胺基酸為 Asn、Pro、或 Ser 中之任一者、

423 位之胺基酸為 Asn、

427 位之胺基酸為 Asn、

428 位之胺基酸為 Leu、Met、Phe、Ser、或 Thr 中之任一者

430 位之胺基酸為 Ala、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、或 Tyr 中之任一者、

431 位之胺基酸為 His、或 Asn 中之任一者、

433 位之胺基酸為 Arg、Gln、His、Ile、Lys、Pro、或 Ser 中之任一者、

434 位之胺基酸為 Ala、Gly、His、Phe、Ser、Trp、或 Tyr 中之任一者、

436 位之胺基酸為 Arg、Asn、His、Ile、Leu、Lys、Met、或 Thr 中之任一者、

438 位之胺基酸為 Lys、Leu、Thr、或 Trp 中之任一者、

440 位之胺基酸為 Lys、或、

442 位之胺基酸為 Lys、308 位之胺基酸為 Ile、Pro、或 Thr 中之任一者。

14. 如申請專利範圍第 1 項之抗原結合分子，其中，該抗原結合分域係多重專一性或多重抗原結合位之抗原結合分域。

15. 如申請專利範圍第 14 項之抗原結合分子，其中，該抗原結合分域之中，至少一個抗原結合分域結合之抗原為癌細胞

之細胞膜表現之膜型分子，且至少一個抗原結合分域結合之抗原為效應子細胞之細胞膜表現之膜型分子。

16. 如申請專利範圍第 15 項之抗原結合分子，其中，該效應子細胞為 NK 細胞、巨噬體、或 T 細胞。
17. 如申請專利範圍第 15 或 16 項之抗原結合分子，其中，於該效應子細胞之細胞膜表現之膜型分子，係構成 TCR 之多胜肽、CD2、CD3、CD28、CD44、CD16、CD32、CD64、或 NKG2D。
18. 如申請專利範圍第 14 項之抗原結合分子，其中，該抗原結合分域之中，至少一個抗原結合分域結合之抗原為癌細胞細胞膜表現之膜型分子、且至少一個抗原結合分域結合之抗原為細胞傷害性物質。
19. 如申請專利範圍第 14 項之抗原結合分子，其中，該抗原結合分子係抗體片段。
20. 如申請專利範圍第 1 項之抗原結合分子，其中，該抗原結合分子為抗體。
21. 如申請專利範圍第 1 項之抗原結合分子，其中，該抗原為可溶型分子。
22. 如申請專利範圍第 21 項之抗原結合分子，其係具有中和活性之抗原結合分子。
23. 如申請專利範圍第 21 項之抗原結合分子，其包含 Fc 區。
24. 如申請專利範圍第 23 項之抗原結合分子，其中，該 Fc 區係序列編號：5、6、7、或 8 記載之不變區含有之 Fc 區。
25. 如申請專利範圍第 23 項之抗原結合分子，其中，該 Fc 區

於 pH 酸性域條件下對 FcRn 之結合活性被增強高於序列編號：5、6、7、或 8 記載之不變區含有之 Fc 區對 FcRn 之結合活性。

26. 如申請專利範圍第 25 項之抗原結合分子，其中，該 Fc 區係於序列編號：5、6、7、或 8 記載之不變區含有之 Fc 區的胺基酸序列之中選自下列 EU 編號表示之群的至少一個以上之胺基酸被取代之 Fc 區：

238 位、244 位、245 位、249 位、250 位、251 位、252 位、253 位、254 位、255 位、256 位、257 位、258 位、260 位、262 位、265 位、270 位、272 位、279 位、283 位、285 位、286 位、288 位、293 位、303 位、305 位、307 位、308 位、309 位、311 位、312 位、314 位、316 位、317 位、318 位、332 位、339 位、340 位、341 位、343 位、356 位、360 位、362 位、375 位、376 位、377 位、378 位、380 位、382 位、385 位、386 位、387 位、388 位、389 位、400 位、413 位、415 位、423 位、424 位、427 位、428 位、430 位、431 位、433 位、434 位、435 位、436 位、438 位、439 位、440 位、442 位、或 447 位。

27. 如申請專利範圍第 26 項之抗原結合分子，其中，該 Fc 區係於序列編號：5、6、7、或 8 記載之不變區含有之 Fc 區的胺基酸序列之中選自下列 EU 編號表示之群組中之至少一個以上之胺基酸；

238 位之胺基酸為 Leu、

244 位之胺基酸為 Leu、

- 245 位之胺基酸為 Arg、
- 249 位之胺基酸為 Pro、
- 250 位之胺基酸為 Gln 或 Glu 中之任一者、或
- 251 位之胺基酸為 Arg、Asp、Glu、或 Leu 中之任一者、
- 252 位之胺基酸為 Phe、Ser、Thr、或 Tyr 中之任一者、
- 254 位之胺基酸為 Ser 或 Thr 中之任一者、
- 255 位之胺基酸為 Arg、Gly、Ile、或 Leu 中之任一者、
- 256 位之胺基酸為 Ala、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Pro、
或 Thr 中之任一者、
- 257 位之胺基酸為 Ala、Ile、Met、Asn、Ser、或 Val 中之
任一者、
- 258 位之胺基酸為 Asp、
- 260 位之胺基酸為 Ser、
- 262 位之胺基酸為 Leu、
- 270 位之胺基酸為 Lys、
- 272 位之胺基酸為 Leu、或 Arg 中之任一者、
- 279 位之胺基酸為 Ala、Asp、Gly、His、Met、Asn、Gln、
Arg、Ser、Thr、Trp、或 Tyr 中之任一者、
- 283 位之胺基酸為 Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、
Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Trp、或 Tyr 中之任
一者、
- 285 位之胺基酸為 Asn、
- 286 位之胺基酸為 Phe、
- 288 位之胺基酸為 Asn、或 Pro 中之任一者、

- 293 位之胺基酸為 Val、
- 307 位之胺基酸為 Ala、Glu、Gln、或 Met 中之任一者、
- 311 位之胺基酸為 Ala、Glu、Ile、Lys、Leu、Met、Ser、Val、或 Trp 中之任一者、
- 309 位之胺基酸為 Pro、
- 312 位之胺基酸為 Ala、Asp、或 Pro 中之任一者、
- 314 位之胺基酸為 Ala 或 Leu 中之任一者、
- 316 位之胺基酸為 Lys、
- 317 位之胺基酸為 Pro、
- 318 位之胺基酸為 Asn、或 Thr 中之任一者、
- 332 位之胺基酸為 Phe、His、Lys、Leu、Met、Arg、Ser、或 Trp 中之任一者、
- 339 位之胺基酸為 Asn、Thr、或 Trp 中之任一者、
- 341 位之胺基酸為 Pro、
- 343 位之胺基酸為 Glu、His、Lys、Gln、Arg、Thr、或 Tyr 中之任一者、
- 375 位之胺基酸為 Arg、
- 376 位之胺基酸為 Gly、Ile、Met、Pro、Thr、或 Val 中之任一者、
- 377 位之胺基酸為 Lys、
- 378 位之胺基酸為 Asp、Asn、或 Val 中之任一者、
- 380 位之胺基酸為 Ala、Asn、Ser、或 Thr 中之任一者
- 382 位之胺基酸為 Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、或 Tyr 中之任一者、

- 385 位之胺基酸為 Ala、Arg、Asp、Gly、His、Lys、Ser、或 Thr 中之任一者、
- 386 位之胺基酸為 Arg、Asp、Ile、Lys、Met、Pro、Ser、或 Thr 中之任一者、
- 387 位之胺基酸為 Ala、Arg、His、Pro、Ser、或 Thr 中之任一者、
- 389 位之胺基酸為 Asn、Pro、或 Ser 中之任一者、
- 423 位之胺基酸為 Asn、
- 427 位之胺基酸為 Asn、
- 428 位之胺基酸為 Leu、Met、Phe、Ser、或 Thr 中之任一者
- 430 位之胺基酸為 Ala、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、或 Tyr 中之任一者、
- 431 位之胺基酸為 His、或 Asn 中之任一者、
- 433 位之胺基酸為 Arg、Gln、His、Ile、Lys、Pro、或 Ser 中之任一者、
- 434 位之胺基酸為 Ala、Gly、His、Phe、Ser、Trp、或 Tyr 中之任一者、
- 436 位之胺基酸為 Arg、Asn、His、Ile、Leu、Lys、Met、或 Thr 中之任一者、
- 438 位之胺基酸為 Lys、Leu、Thr、或 Trp 中之任一者、
- 440 位之胺基酸為 Lys、或、
- 442 位之胺基酸為 Lys、308 位之胺基酸為 Ile、Pro、或 Thr 中之任一者。

28. 如申請專利範圍第 23 項之抗原結合分子，其中，該 Fc 區於 pH 中性域下對 FcRn 之結合活性被增強高於序列編號：5、6、7、或 8 記載之不變區含有之 Fc 區對 FcRn 之結合活性增強。
29. 如申請專利範圍第 28 項之抗原結合分子，其中，該 Fc 區係序列編號：5、6、7、或 8 記載之不變區含有之 Fc 區的胺基酸序列之中選自下列 EU 編號表示之群組中之至少一個以上之胺基酸經取代之 Fc 區：
- 237 位、248 位、250 位、252 位、254 位、255 位、256 位、257 位、258 位、265 位、286 位、289 位、297 位、298 位、303 位、305 位、307 位、308 位、309 位、311 位、312 位、314 位、315 位、317 位、332 位、334 位、360 位、376 位、380 位、382 位、384 位、385 位、386 位、387 位、389 位、424 位、428 位、433 位、434 位或 436 位。
30. 如申請專利範圍第 29 項之抗原結合分子，其中，該 Fc 區係序列編號：5、6、7、或 8 記載之不變區含有之 Fc 區之胺基酸序列之中選自下列 EU 編號表示之群組中之至少一個以上之胺基酸；
- 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 中之任一者、
- 252 位之胺基酸為 Phe、Trp、或 Tyr 中之任一者、
- 254 位之胺基酸為 Thr、

- 255 位之胺基酸為 Glu、
- 256 位之胺基酸為 Asp、Asn、Glu、或 Gln 中之任一者、
- 257 位之胺基酸為 Ala、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr、或 Val 中之任一者、
- 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 中之任一者、
- 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 中之任一者、
- 308 位之胺基酸為 Ala、Phe、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、或 Thr 中之任一者、
- 309 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Pro、或 Arg 中之任一者、
- 311 位之胺基酸為 Ala、His、或 Ile 中之任一者、
- 312 位之胺基酸為 Ala 或 His 中之任一者、
- 314 位之胺基酸為 Lys 或 Arg 中之任一者、
- 315 位之胺基酸為 Ala、Asp 或 His 中之任一者、
- 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 中之任一者、

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 中之任一者、

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 中之任
一者、

433 位之胺基酸為 Lys、

434 位之胺基酸為 Ala、Phe、His、Ser、Trp、或 Tyr 中之
任一者、或

436 位之胺基酸為 His、Ile、Leu、Phe、Thr、或 Val。

31. 如申請專利範圍第 23 或 25 至 30 項中任一項之抗原結合分
子，其中，該 Fc 區為對抑制型 Fc γ 受體之結合活性高於對
活性型 Fc γ 受體之結合活性的 Fc 區。

32. 如申請專利範圍第 31 項之抗原結合分子，其中，該抑制型
Fc γ 受體係人類 Fc γ R2b。

33. 如申請專利範圍第 31 項之抗原結合分子，其中，該活性型

Fc γ 受體，係人類 Fc γ RIa、人類 Fc γ RIIa(R)、人類 Fc γ RIIa(H)、人類 Fc γ RIIIa(V)或人類 Fc γ RIIIa(F)。

34. 如申請專利範圍第 31 項之抗原結合分子，其中，包含該 Fc 區之 EU 編號表示之 238 位或 328 位之胺基酸不同於天然型人類 IgG 之 Fc 區之胺基酸的胺基酸。
35. 如申請專利範圍第 34 項之抗原結合分子，其中，該 Fc 區之 EU 編號表示之 238 位之胺基酸為 Asp，或 328 位之胺基酸為 Glu。
36. 如申請專利範圍第 34 或 35 項之抗原結合分子，其為該 Fc 區之胺基酸序列之中選自下列 EU 編號表示之群組中之至少一個以上之胺基酸：
 - 233 位之胺基酸為 Asp、
 - 234 位之胺基酸為 Trp、或 Tyr 中之任一者、
 - 237 位之胺基酸為 Ala、Asp、Glu、Leu、Met、Phe、Trp 或 Tyr 中之任一者、
 - 239 位之胺基酸為 Asp、
 - 267 位之胺基酸為 Ala、Gln 或 Val 中之任一者、
 - 268 位之胺基酸為 Asn、Asp、或 Glu 中之任一者、
 - 271 位之胺基酸為 Gly、
 - 326 位之胺基酸為 Ala、Asn、Asp、Gln、Glu、Leu、Met、Ser 或 Thr 中之任一者、
 - 330 位之胺基酸為 Arg、Lys、或 Met 中之任一者、
 - 323 位之胺基酸為 Ile、Leu、或 Met 中之任一者、或
 - 296 位之胺基酸為 Asp。

37. 如申請專利範圍第 21 項之抗原結合分子，其中，該抗原結合分子為抗體。
38. 一種醫藥組合物，包含如申請專利範圍第 1 至 37 項中任一項之抗原結合分子。

圖式

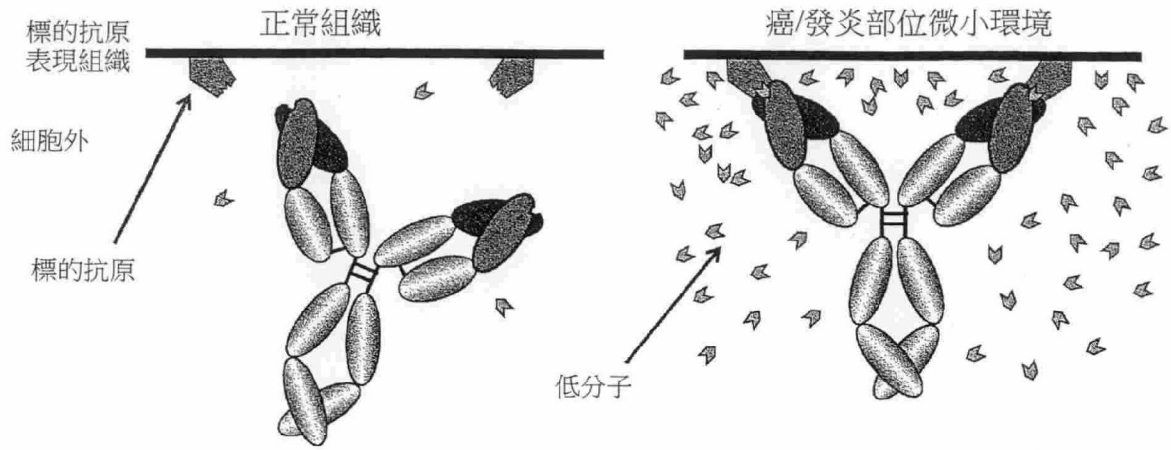


圖1

無低分子開關

有低分子開關

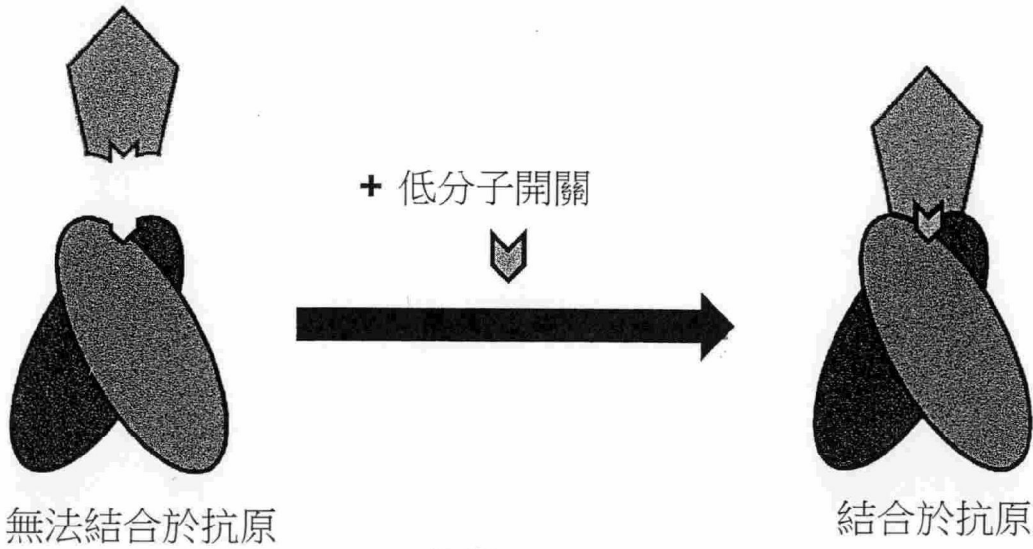


圖2

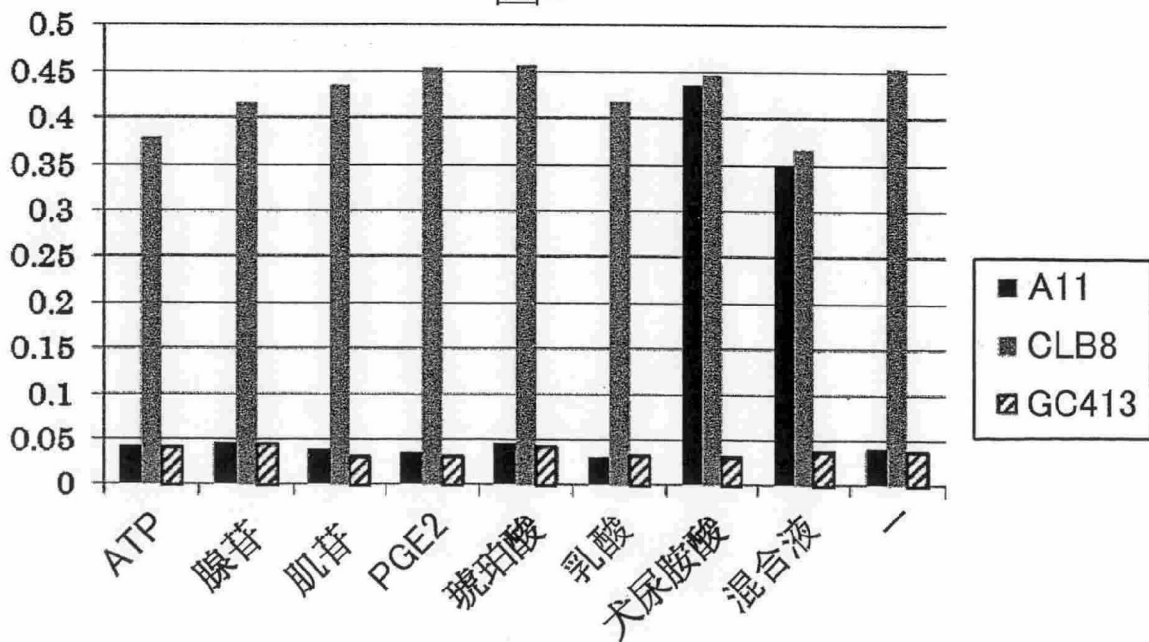


圖3

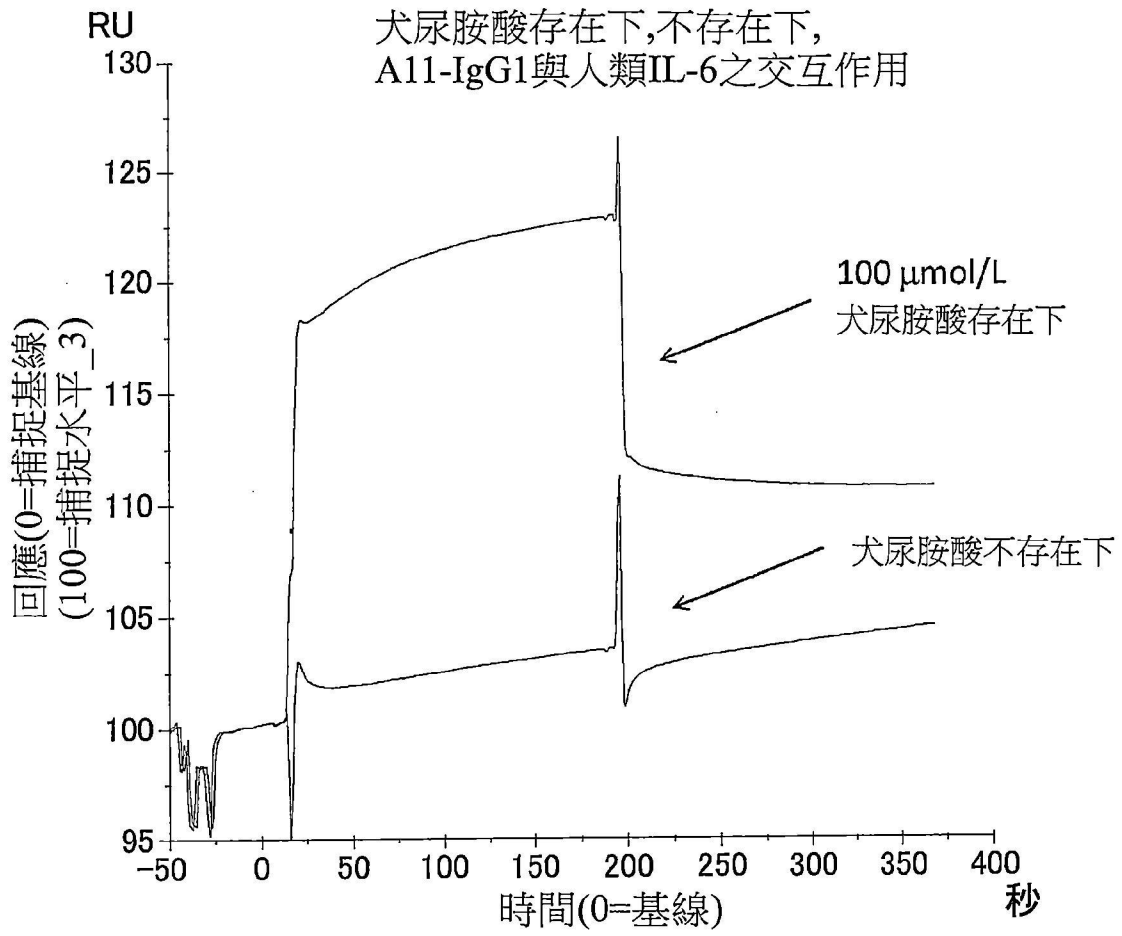


圖4

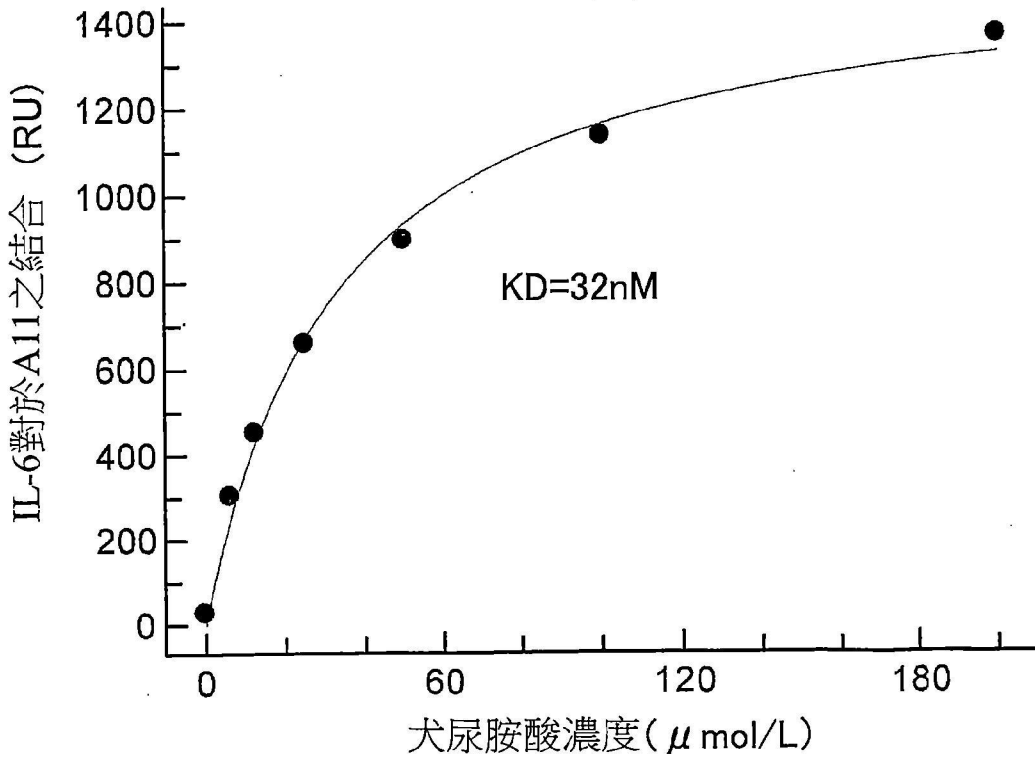


圖5

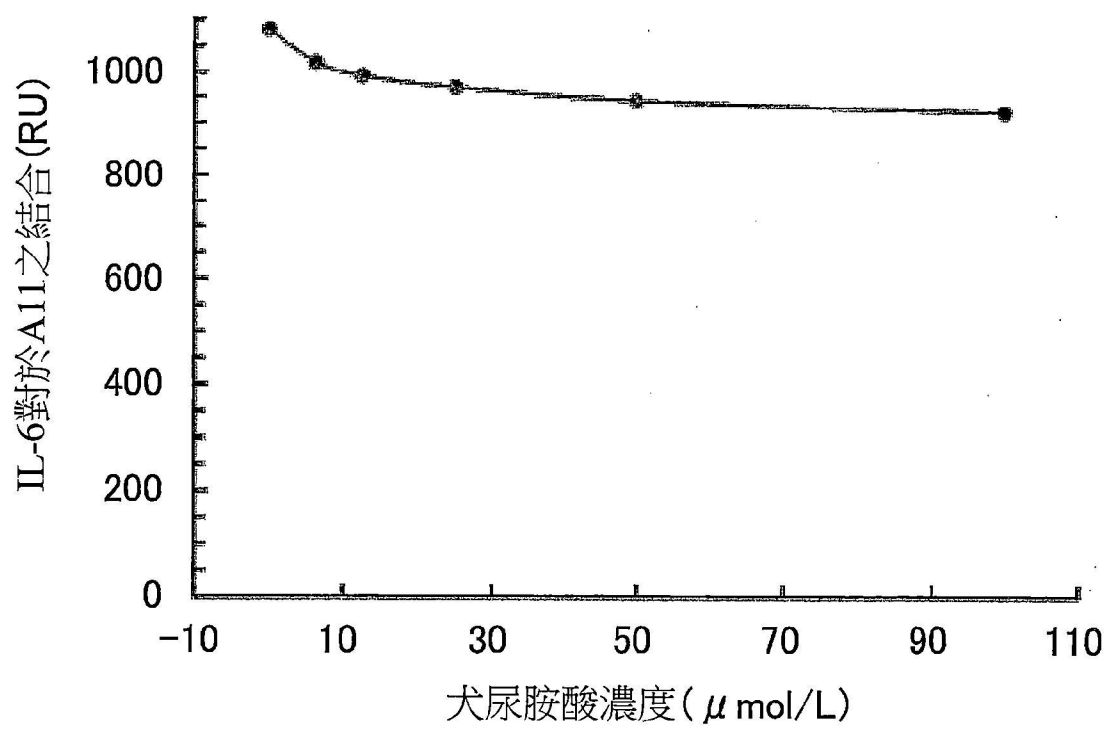


圖6

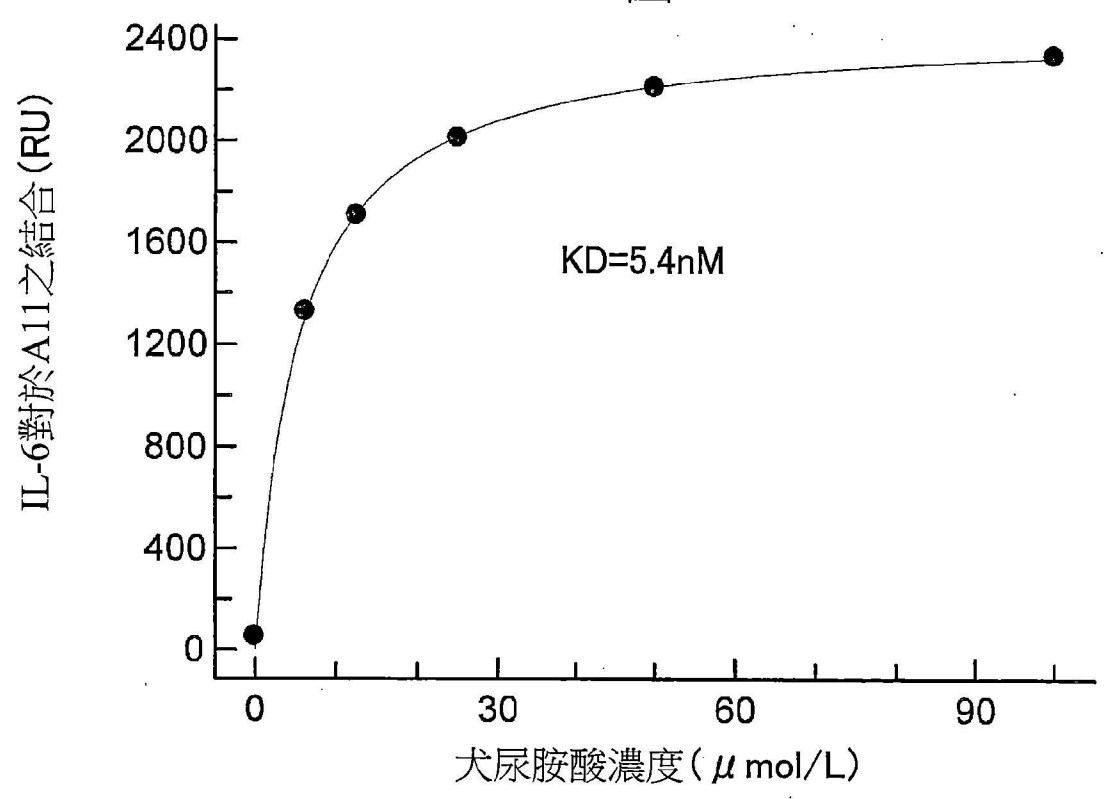


圖7

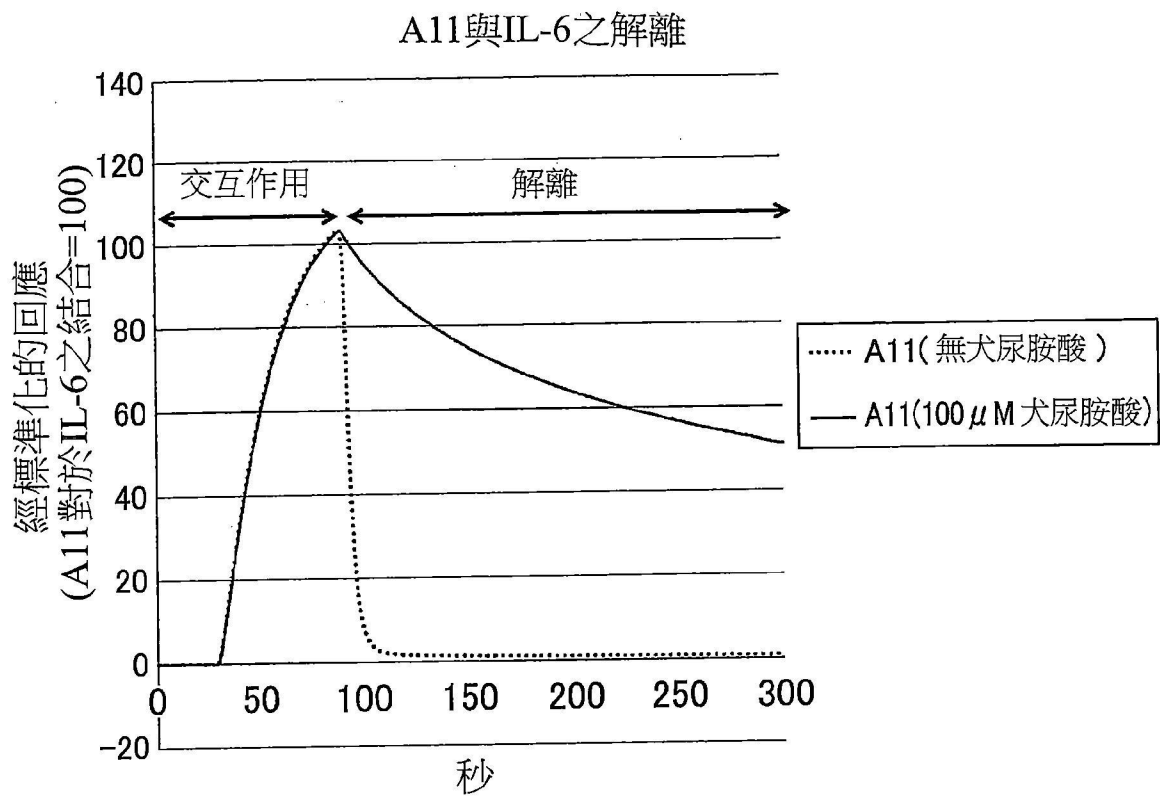


圖8

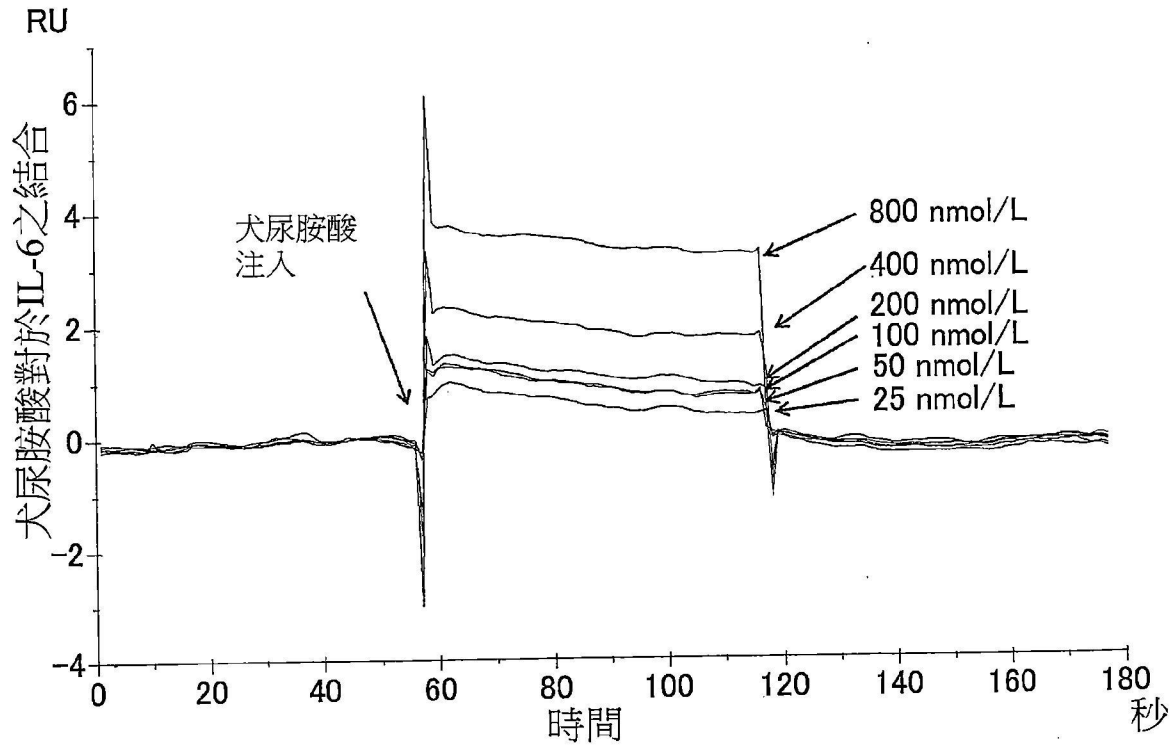


圖9

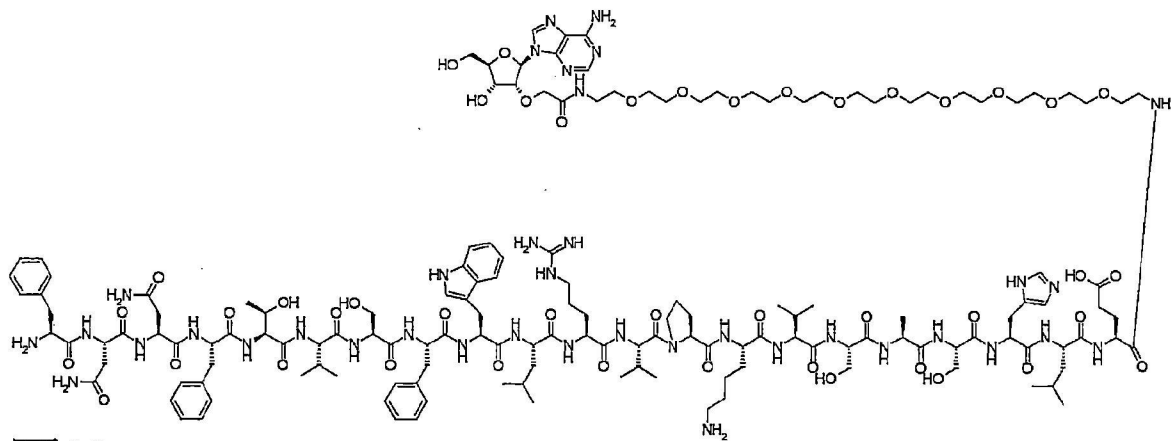


圖 10

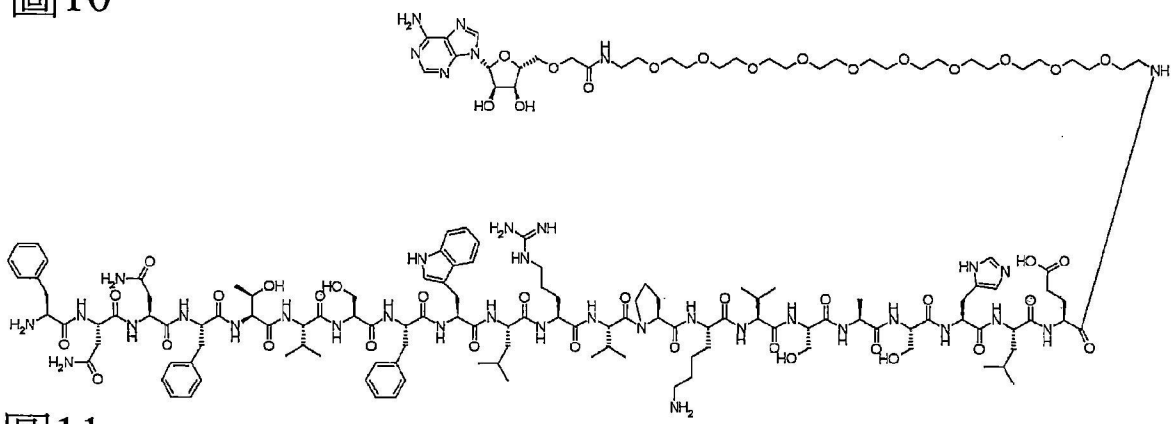


圖 11

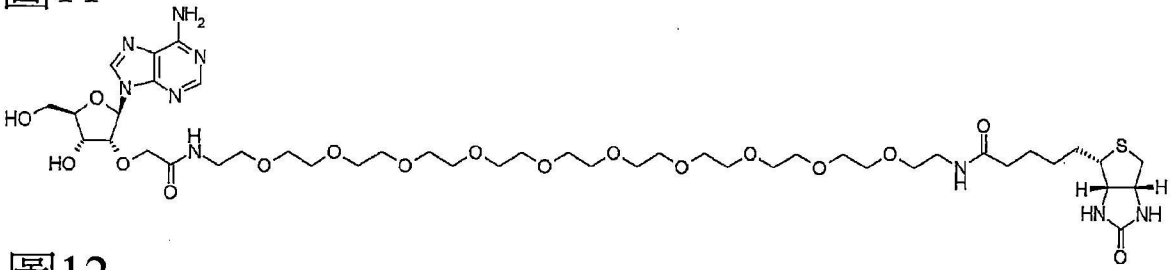


圖 12

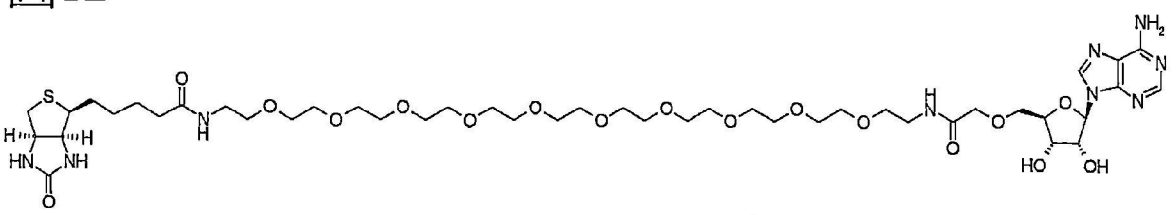


圖 13

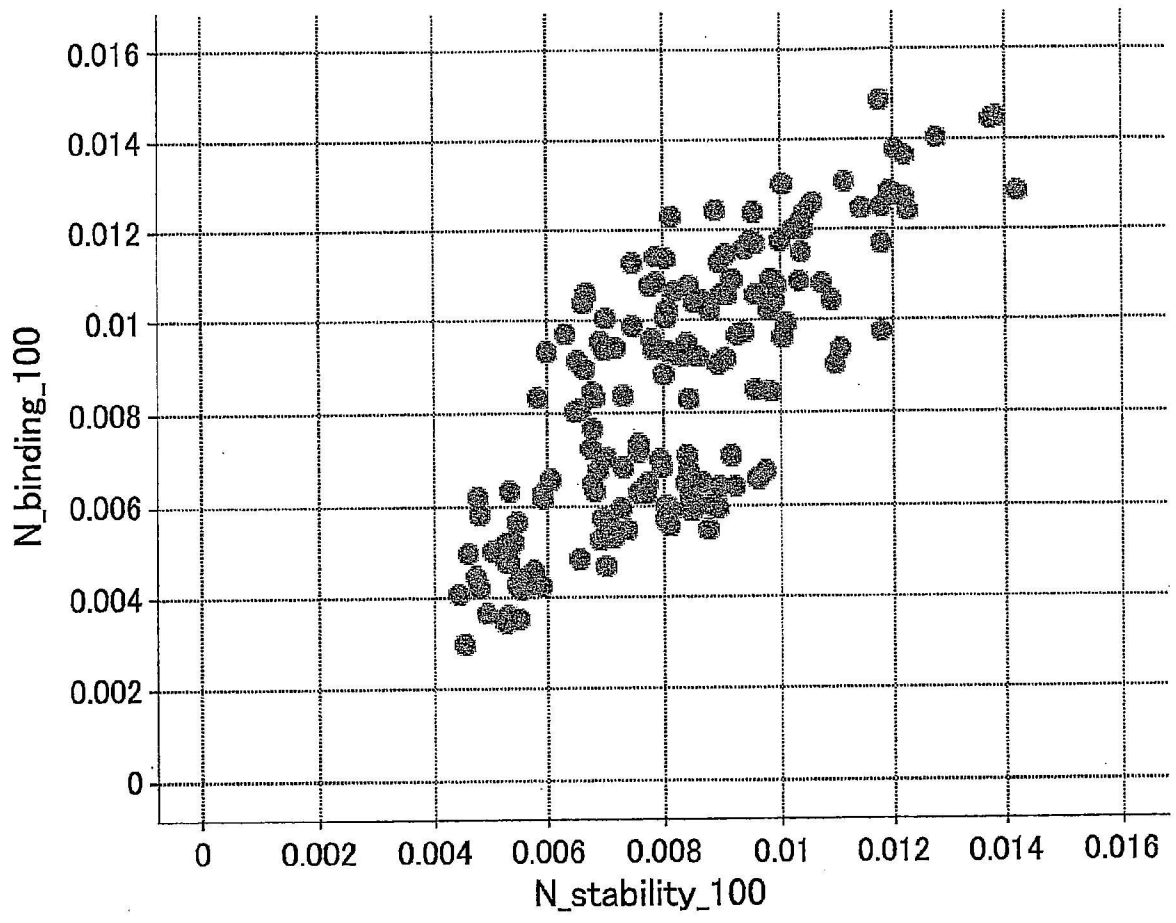


圖14

SMB0002: 腺苷

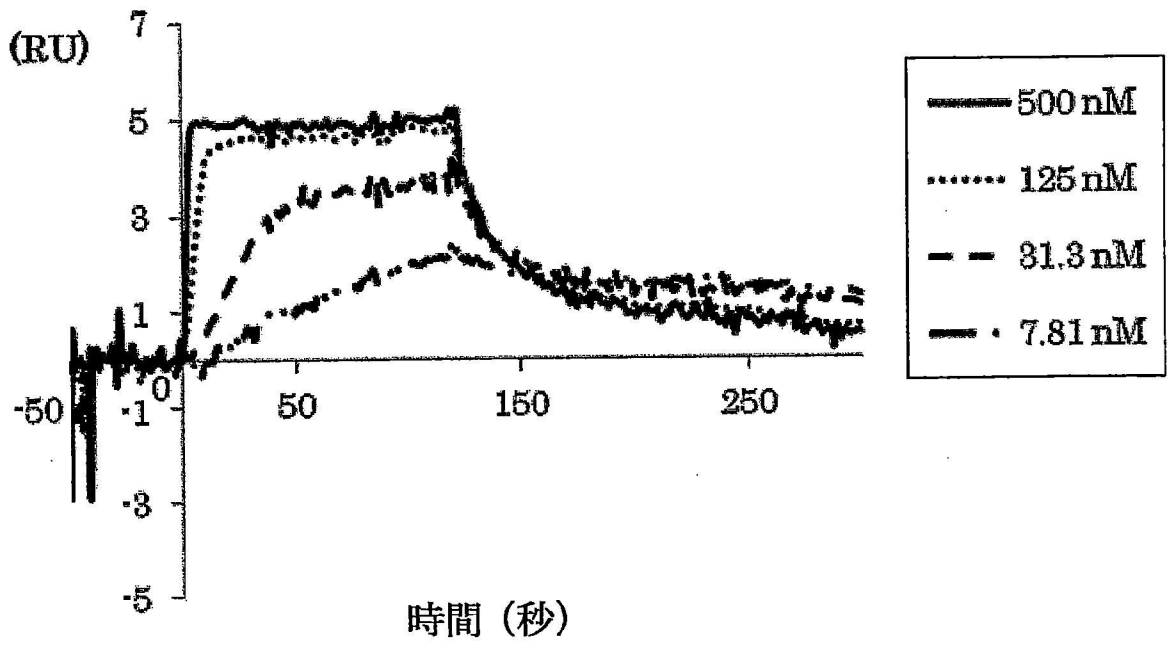


圖15A

SMB0002: ATP

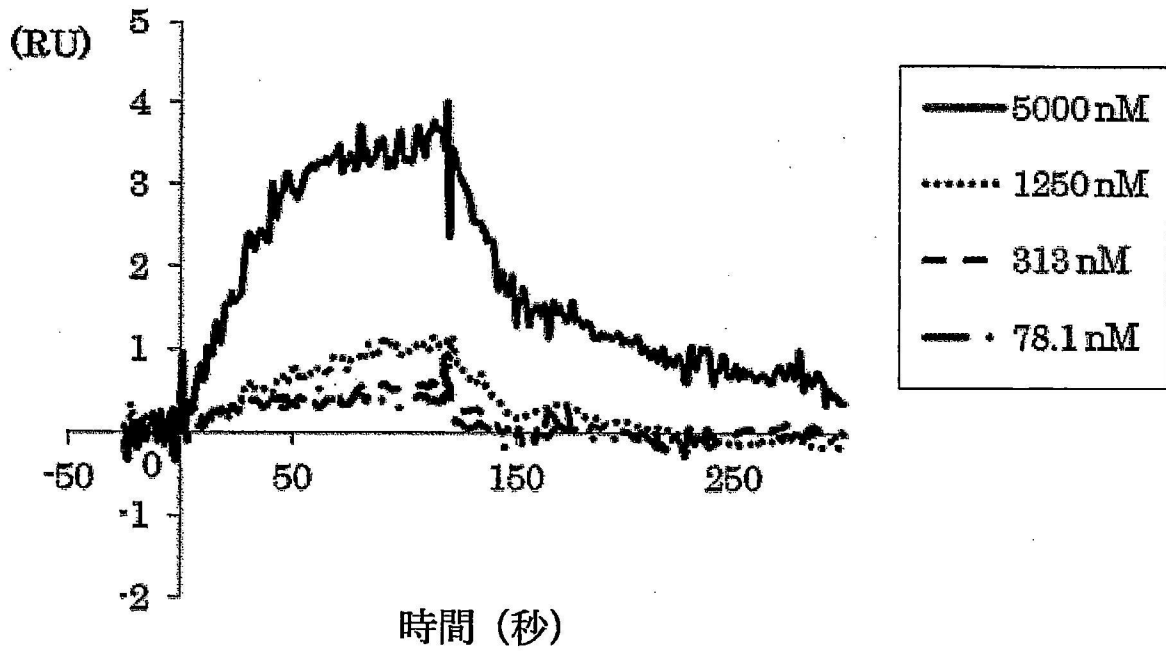


圖15B

SMB0089: 腺苷

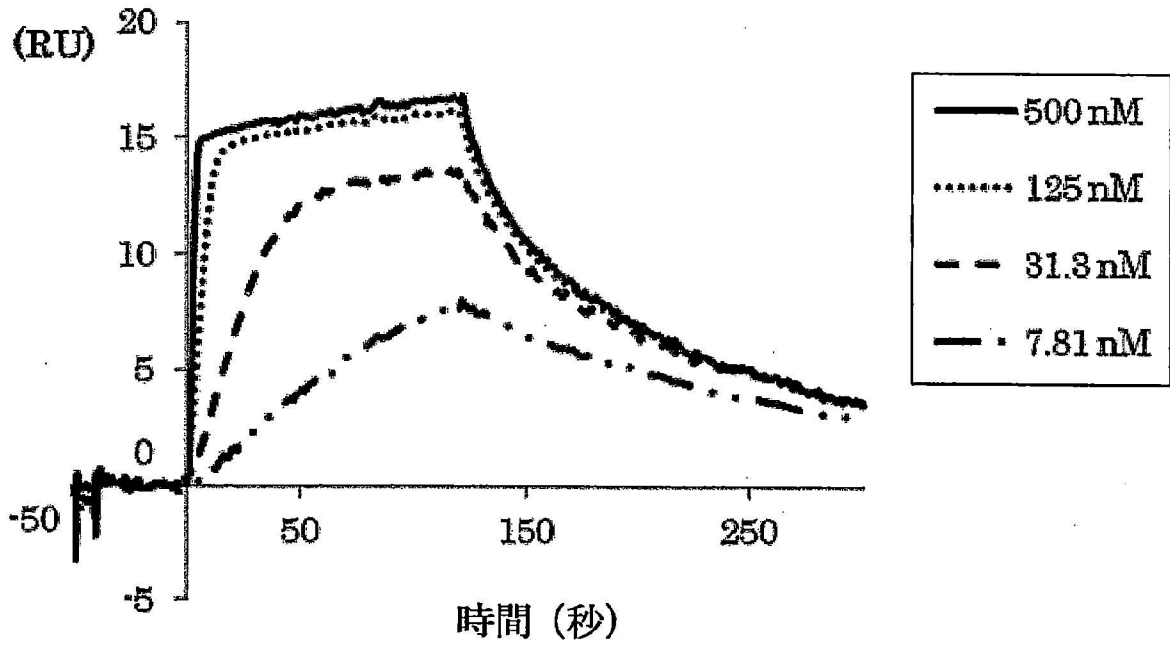


圖15C

SMB0089: ATP

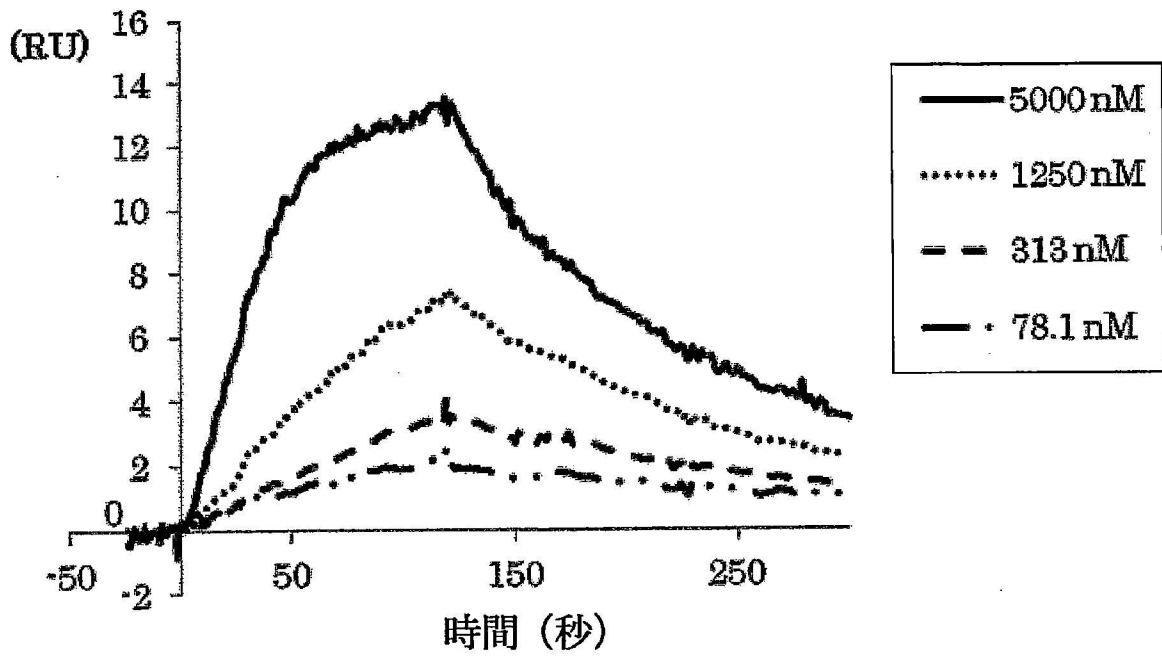


圖15D

SMB0104: 腺苷

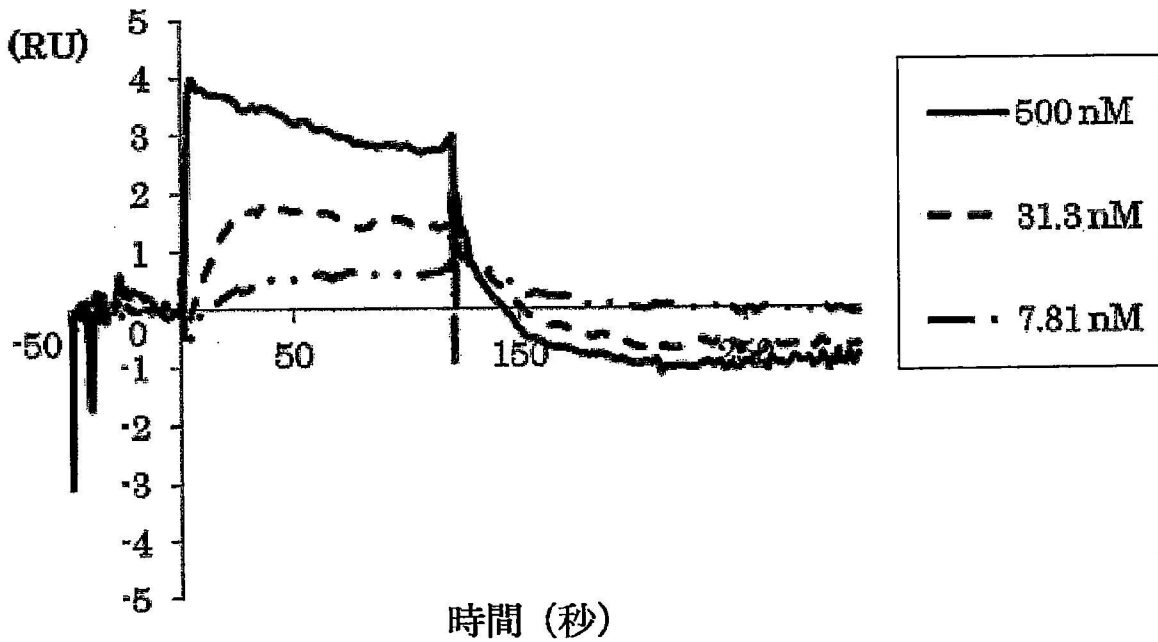


圖15E

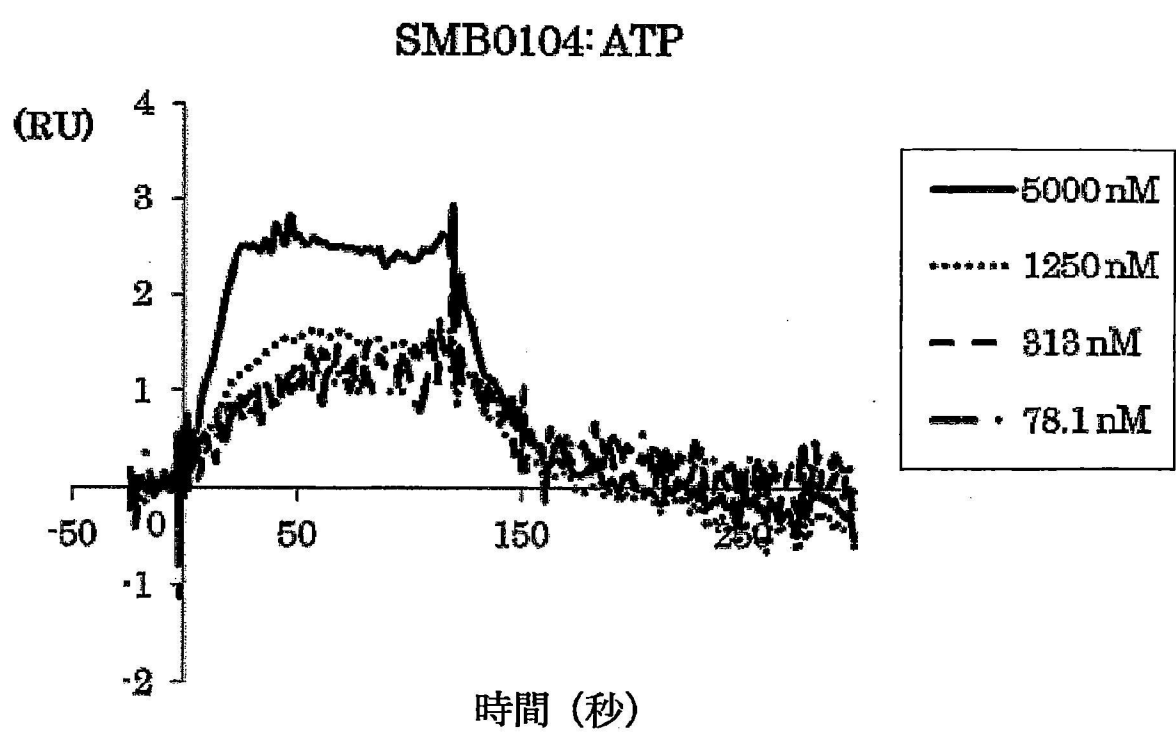


圖 15F

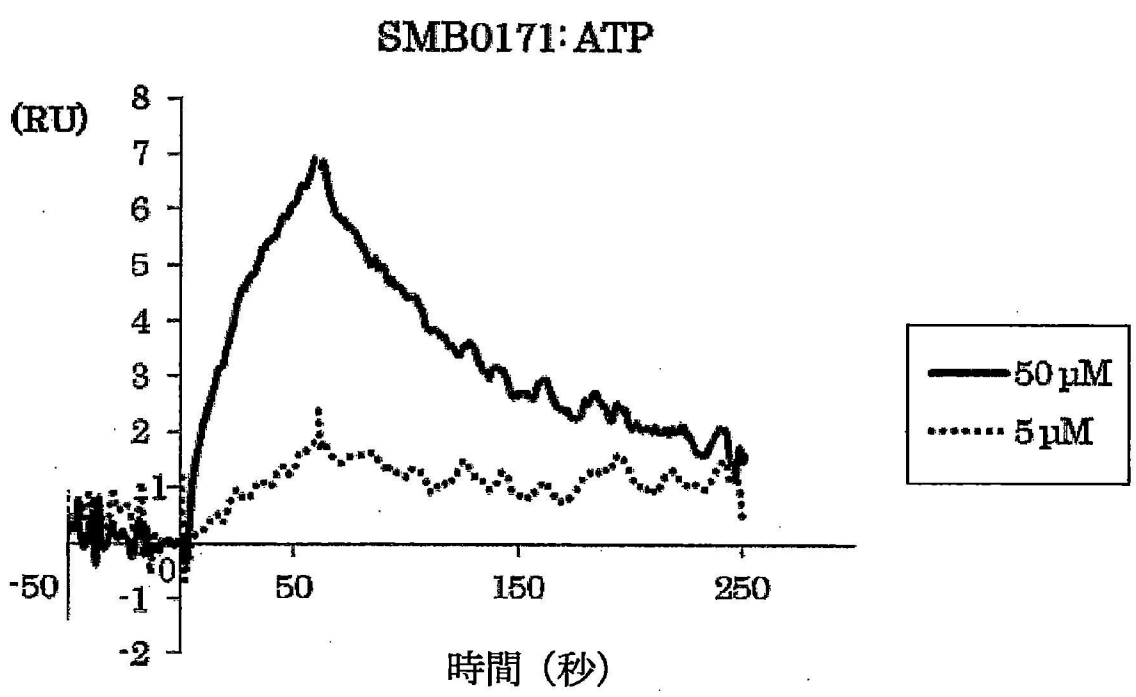


圖 16

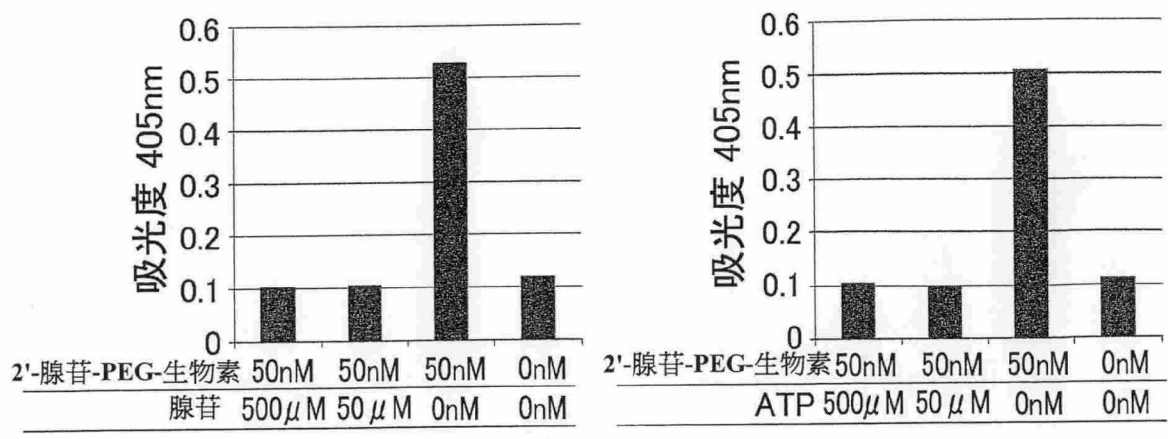


圖17

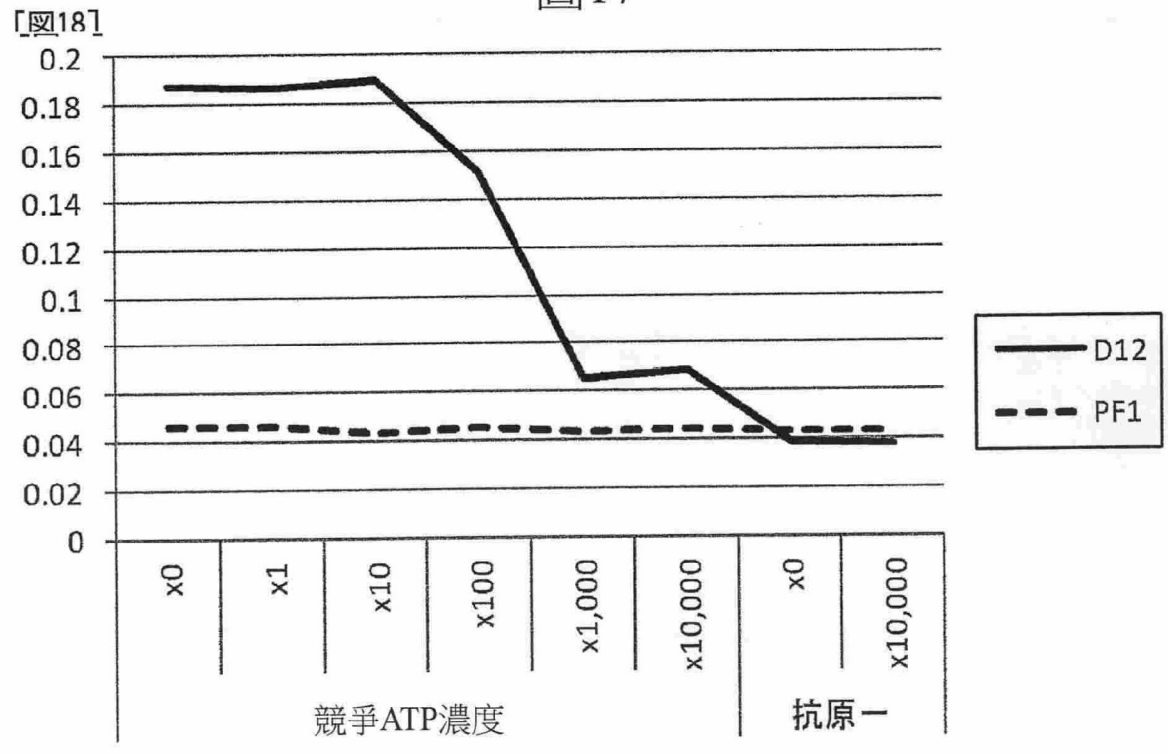
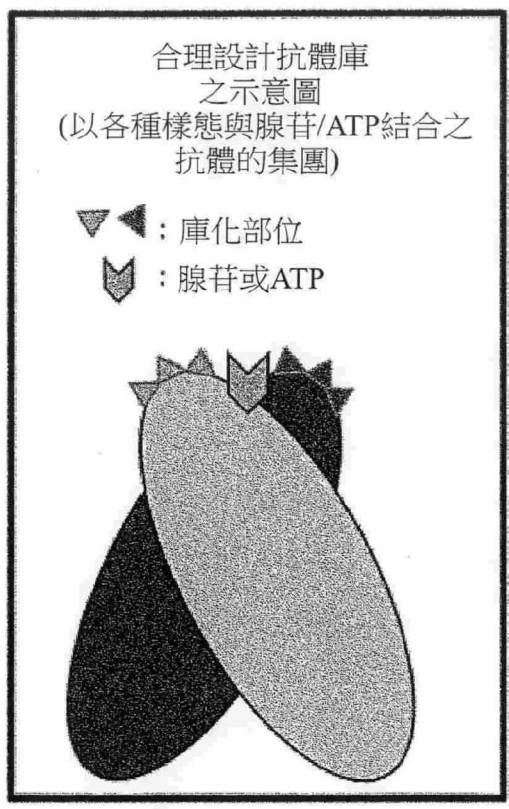
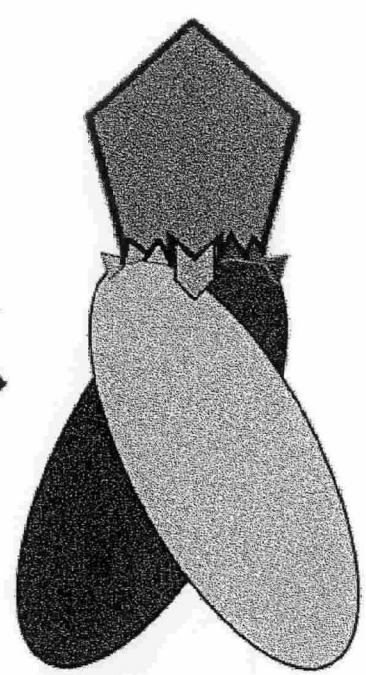
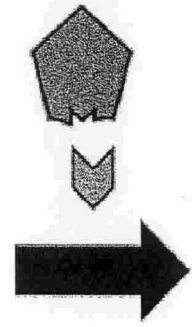


圖18



腺苷或ATP
存在下對於抗原
之淘選



將腺苷或ATP作為開關
與抗原結合之抗體

圖19

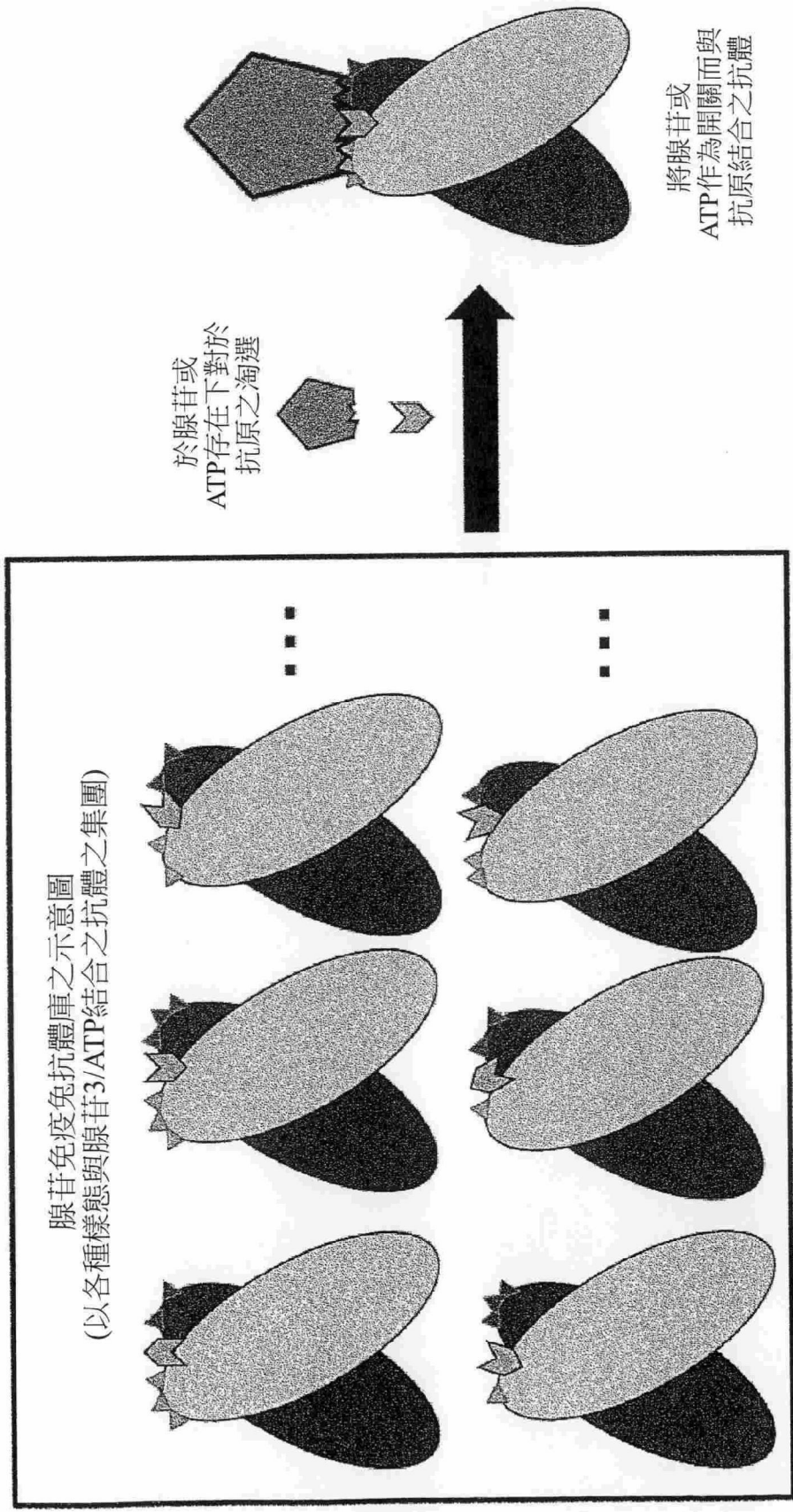


圖20

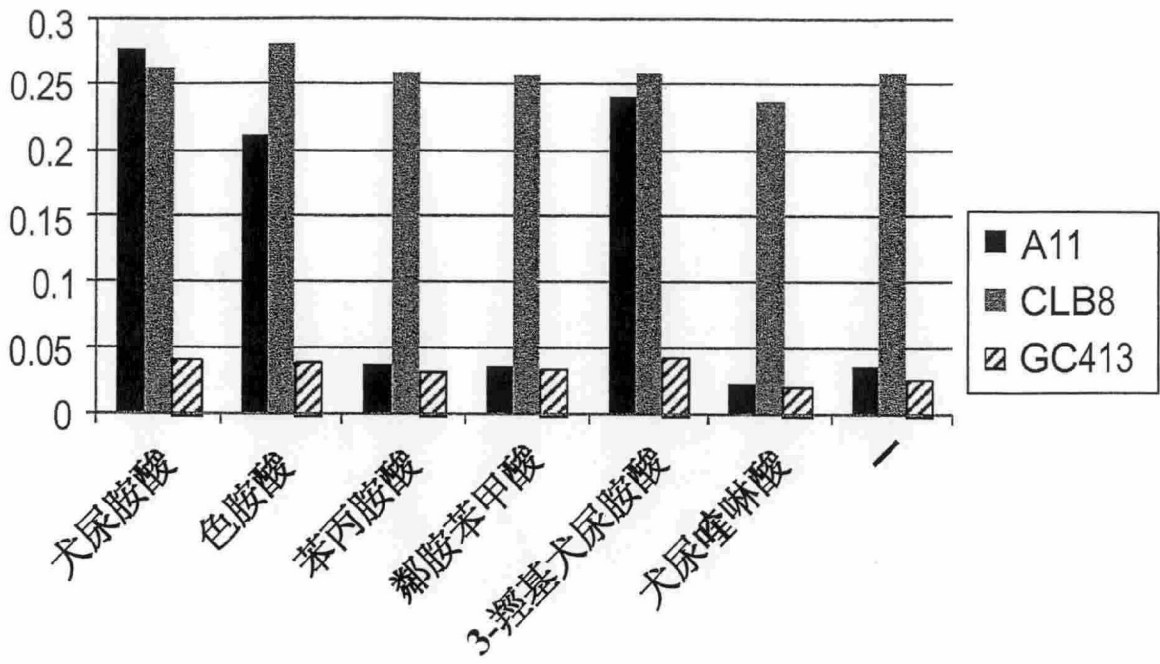


圖21

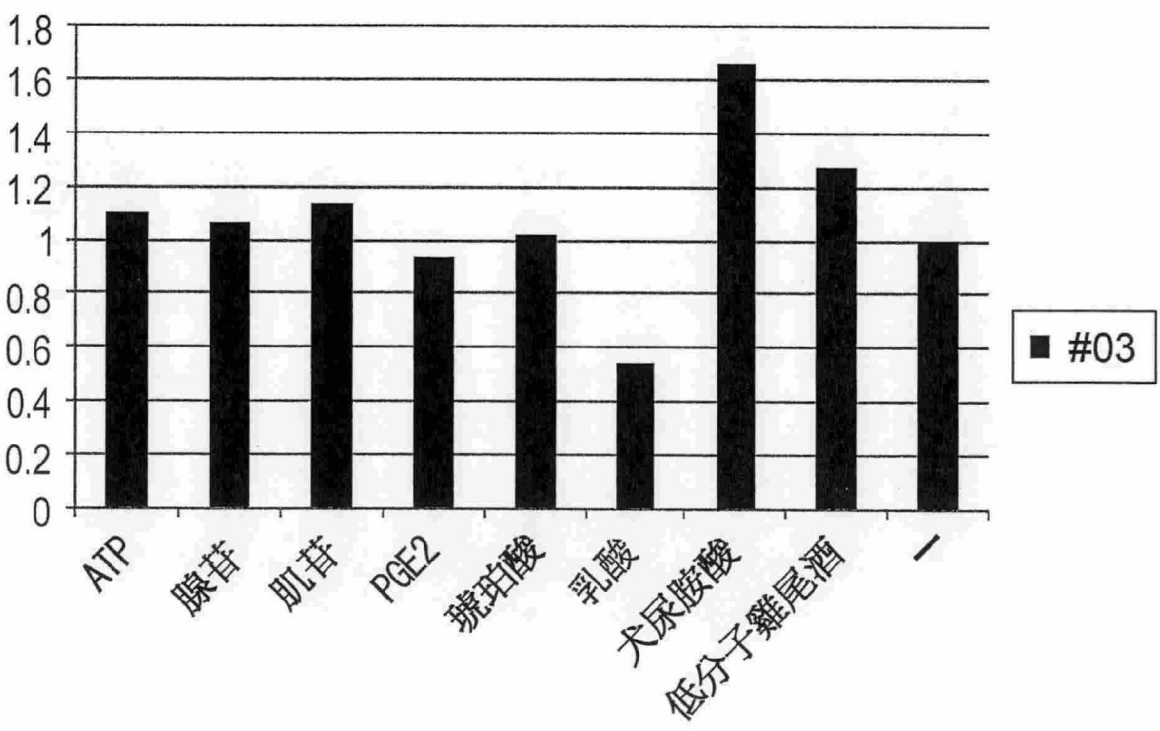


圖22

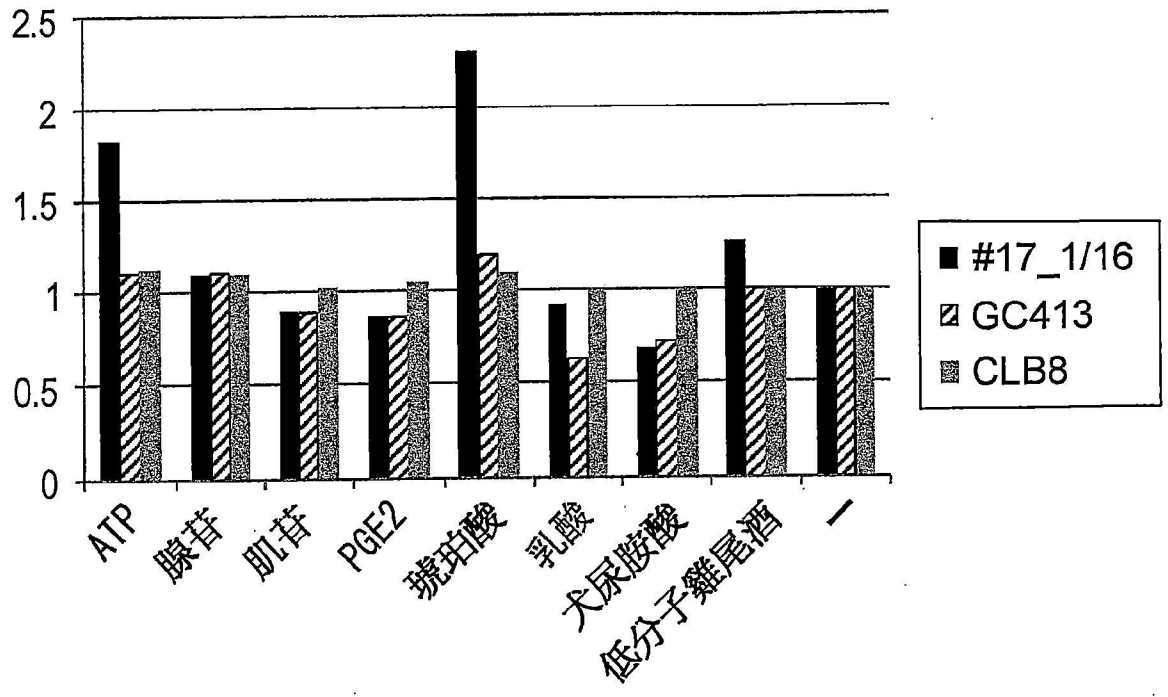


圖23

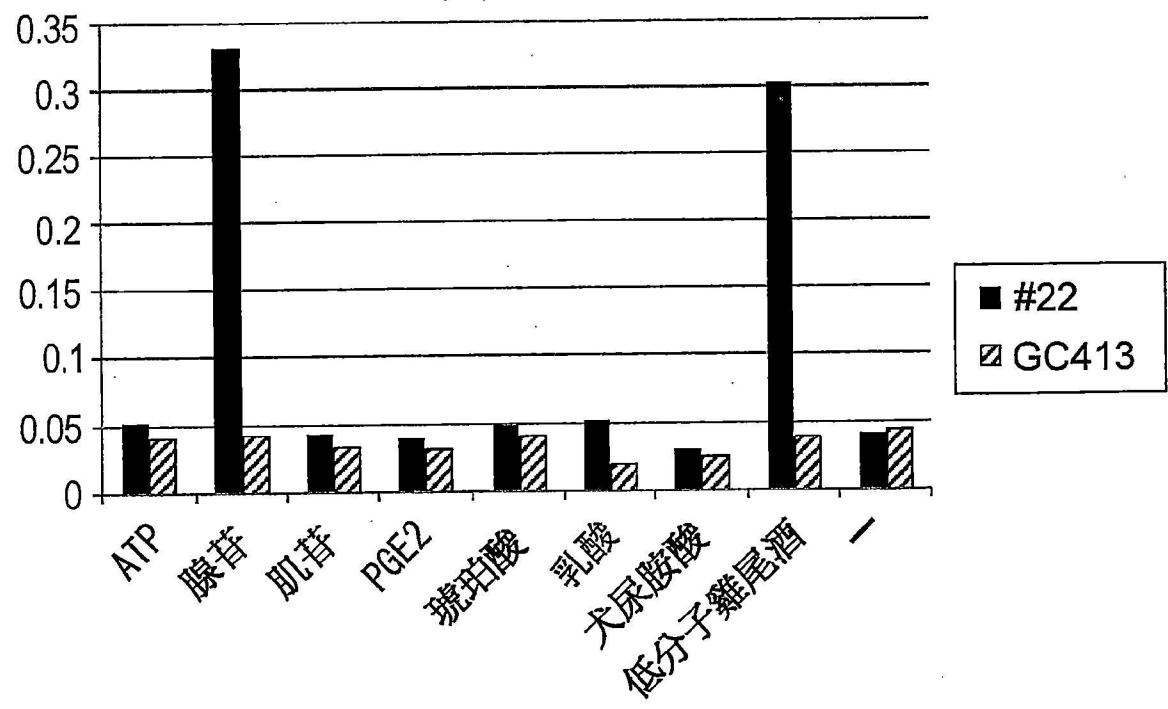


圖24

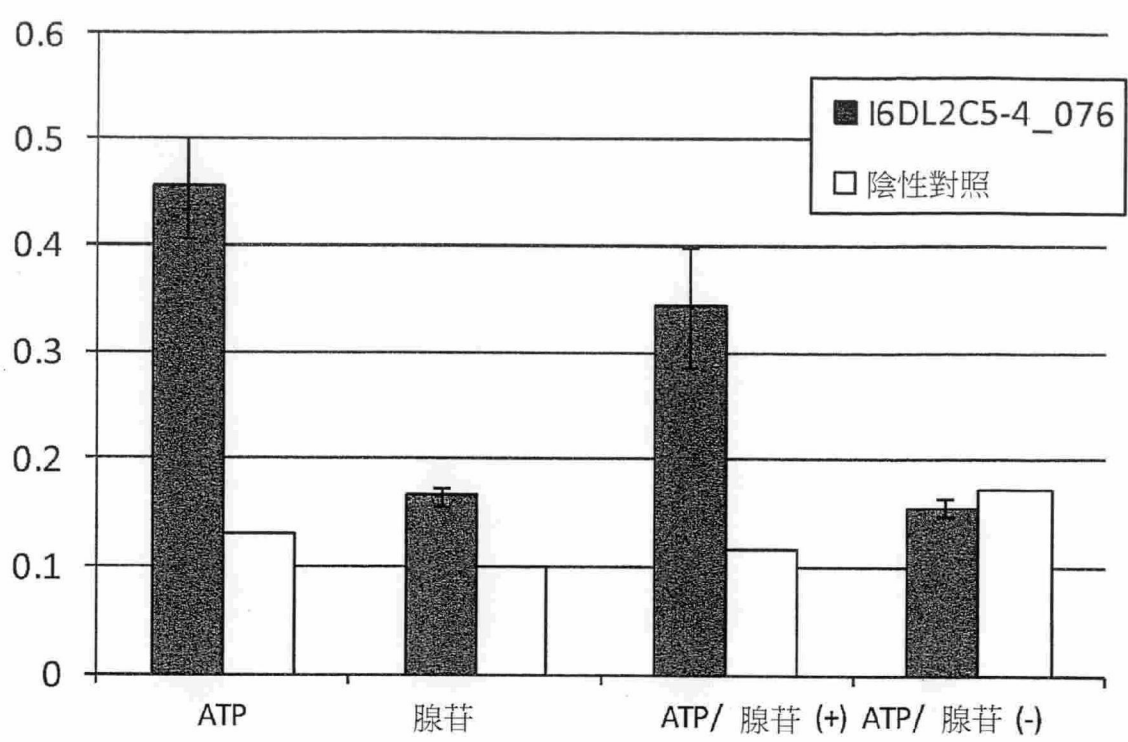


圖25

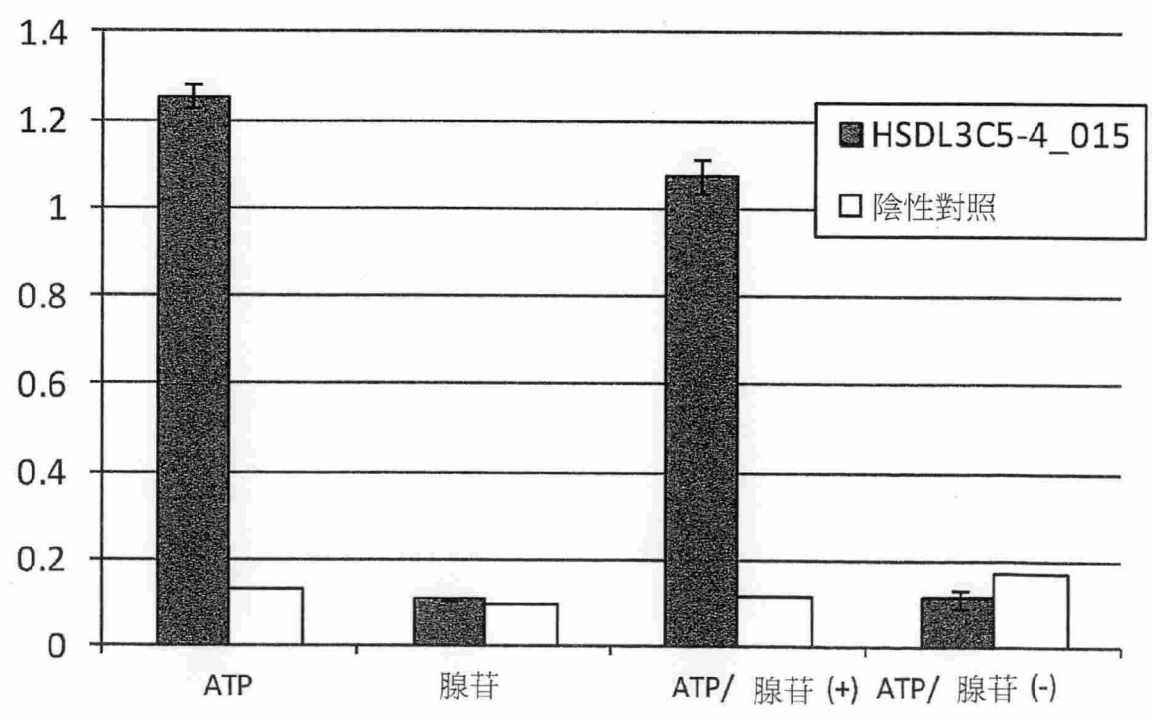


圖26

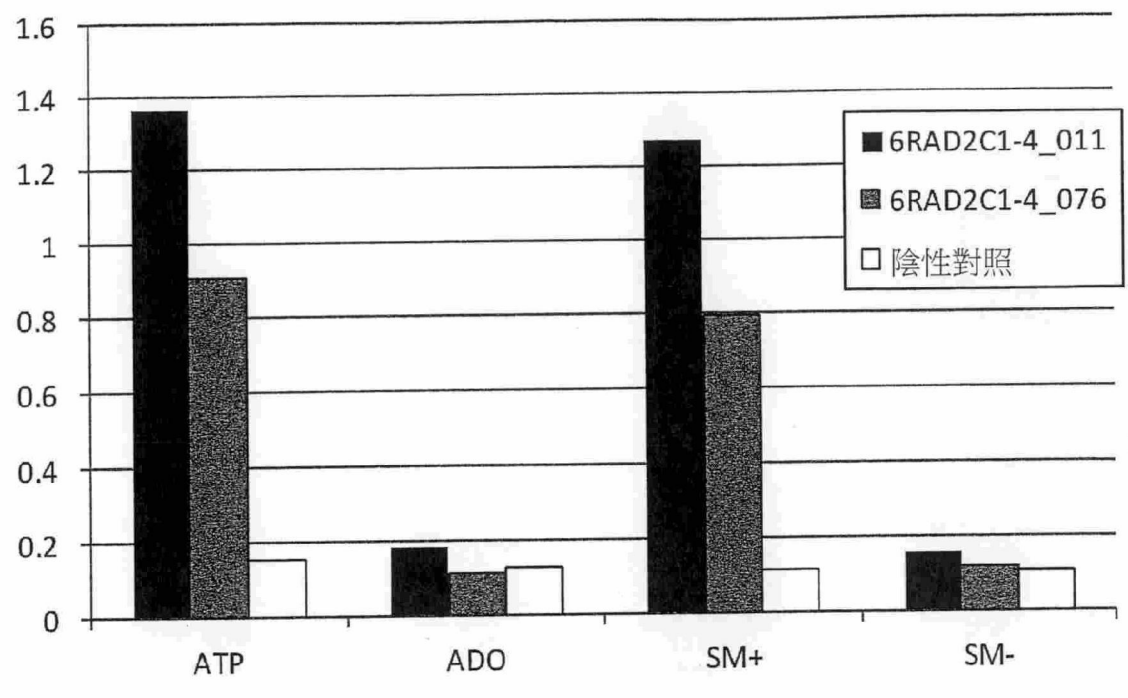


圖27

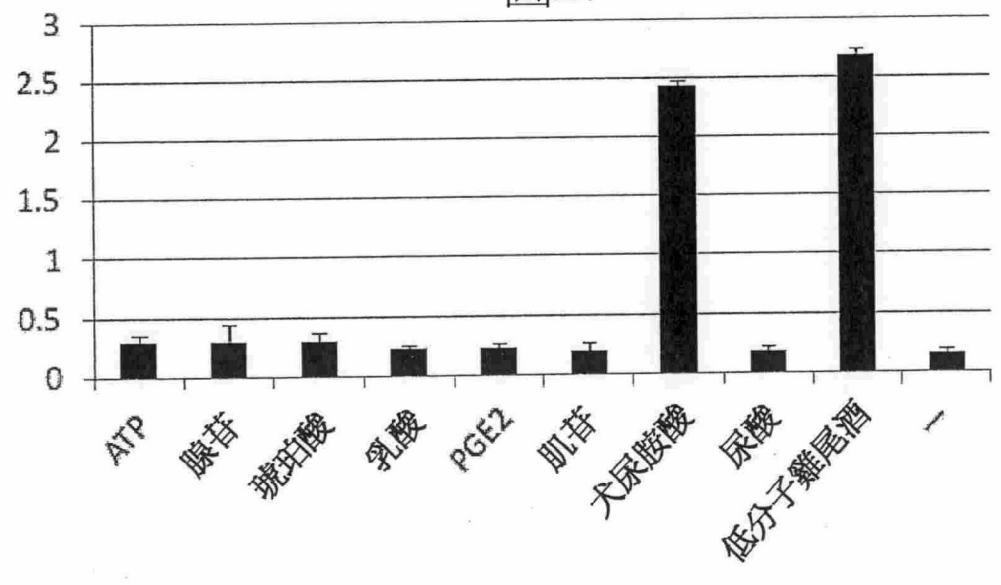


圖28

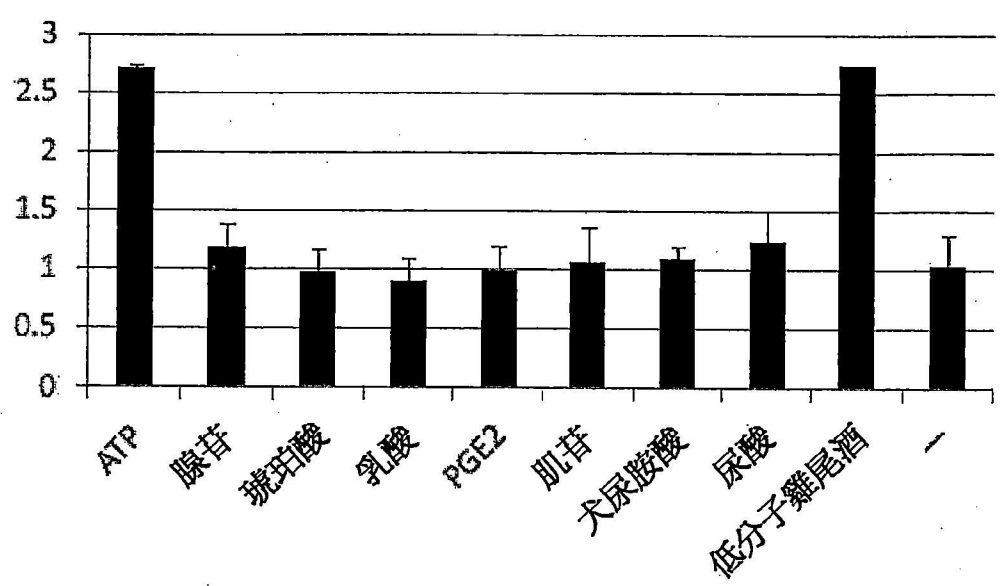


圖29

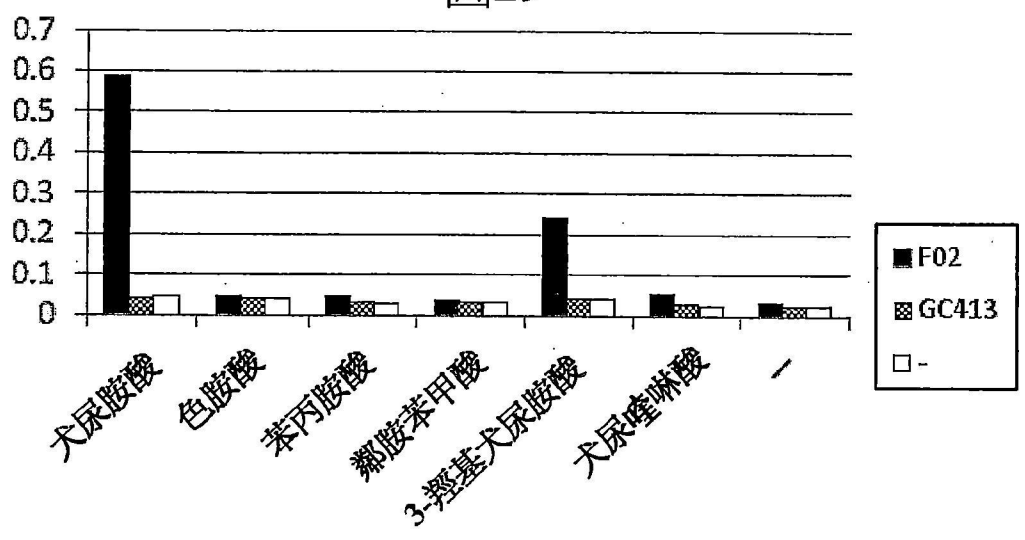


圖30

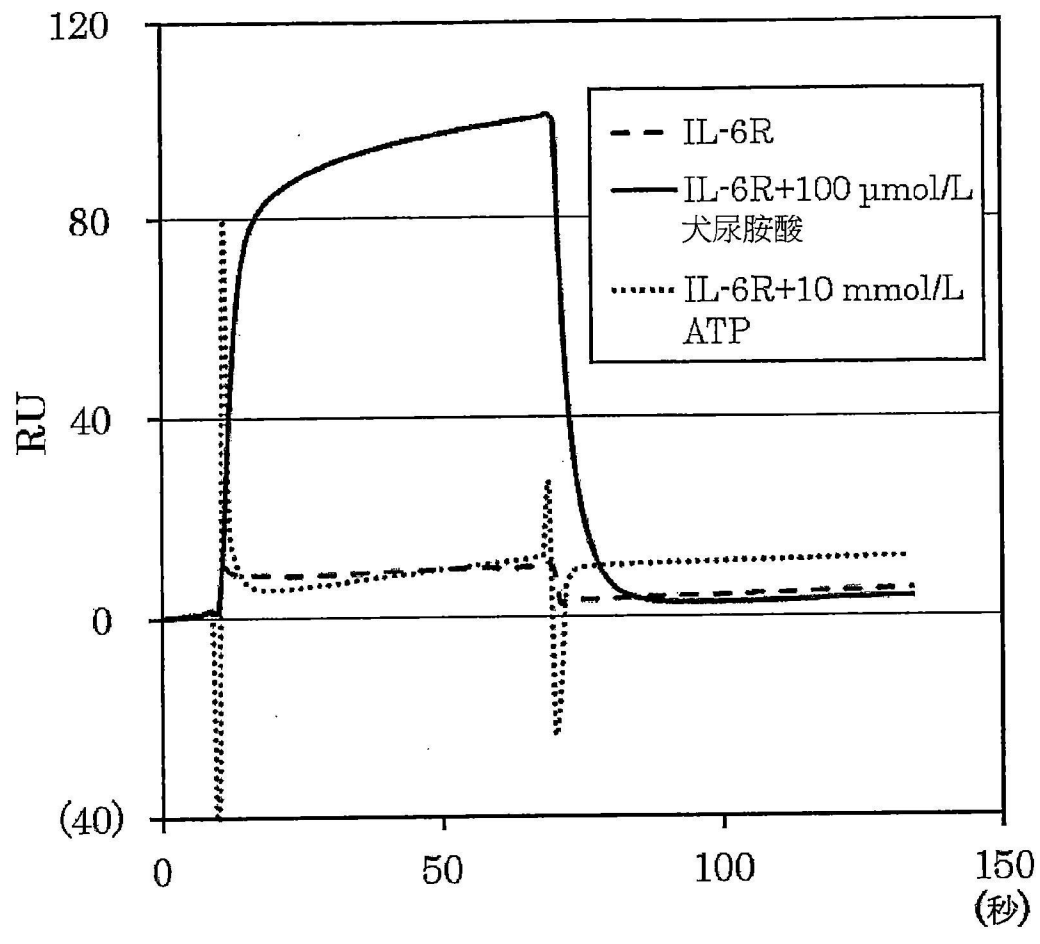


圖31

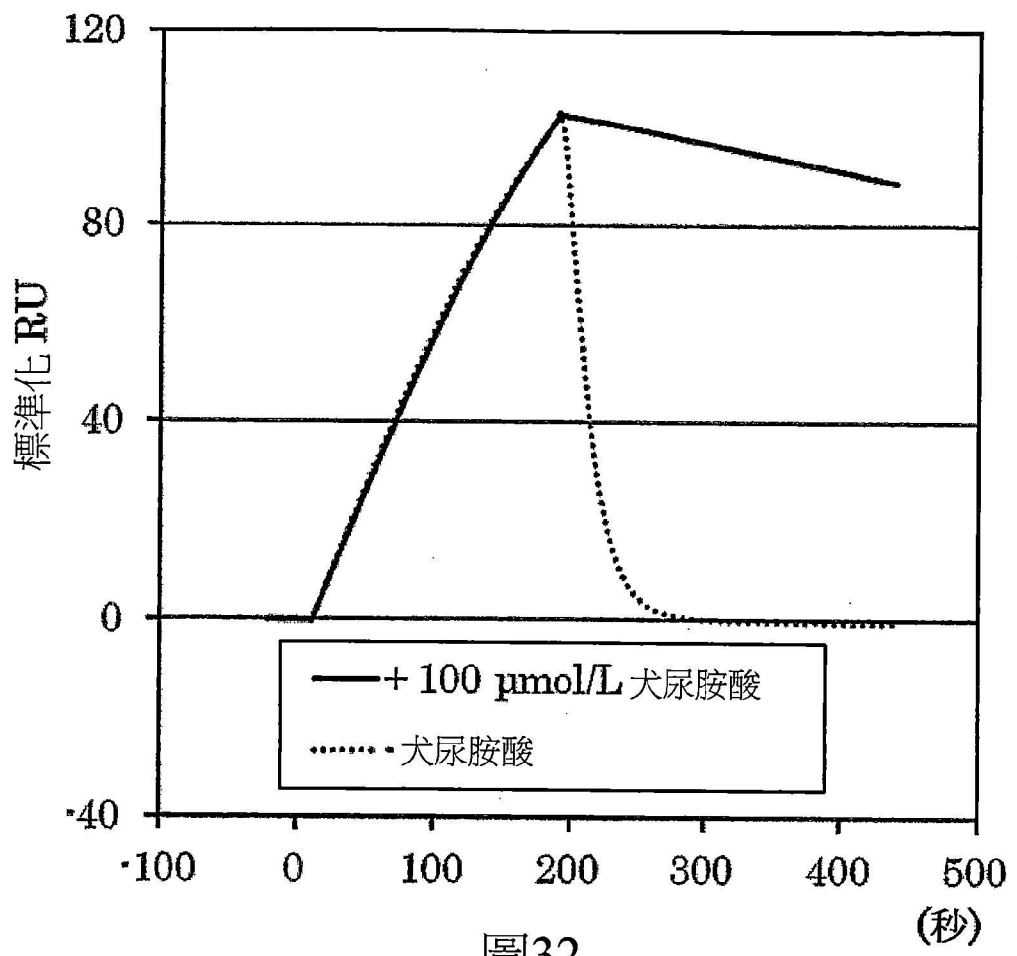


圖32

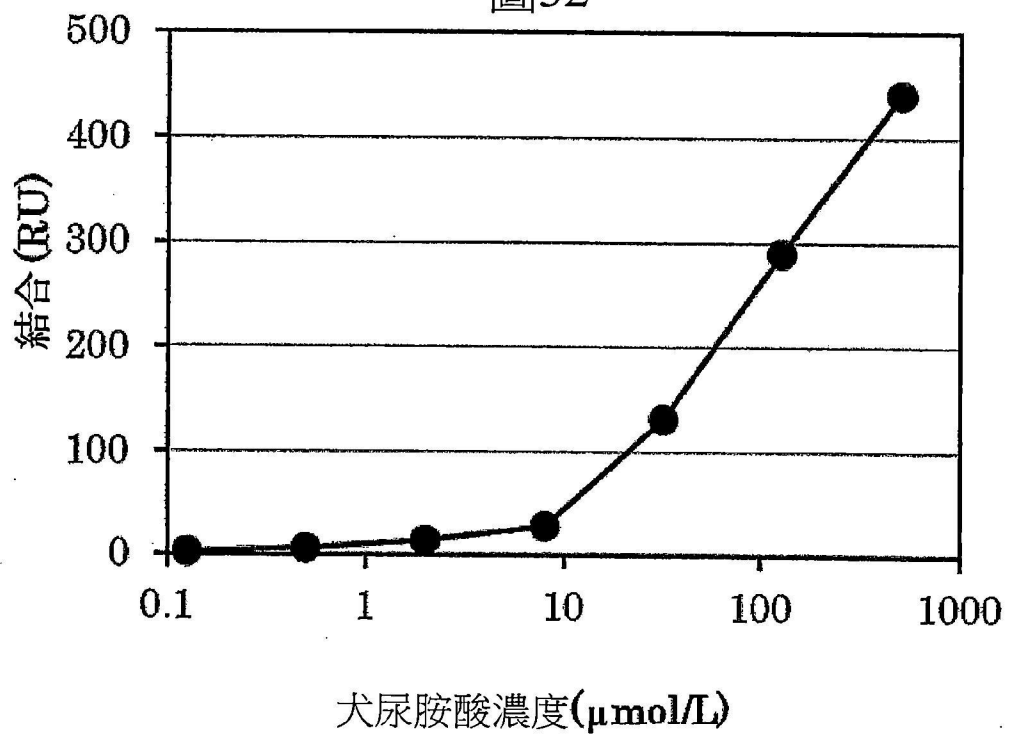


圖33

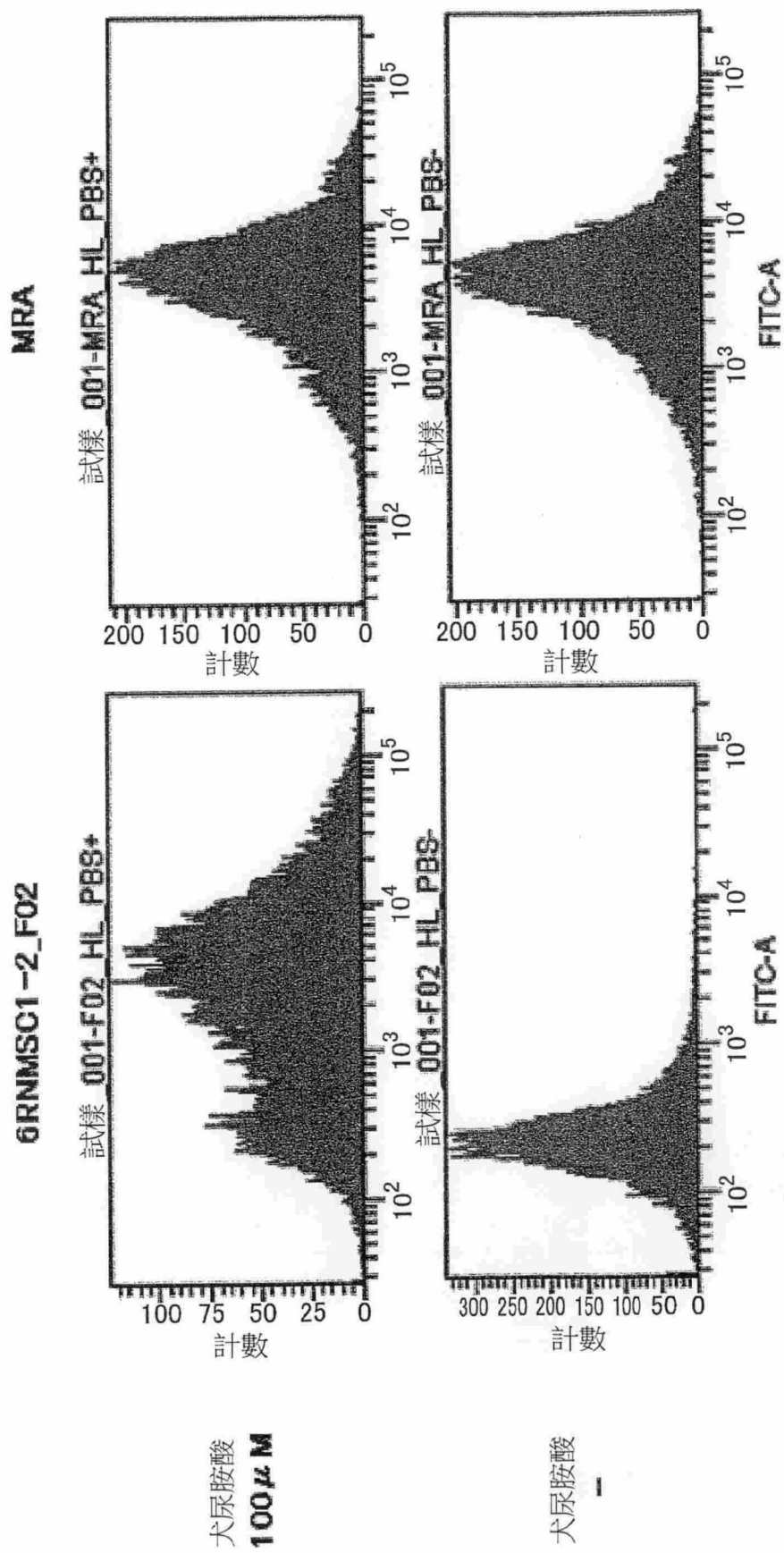


圖34

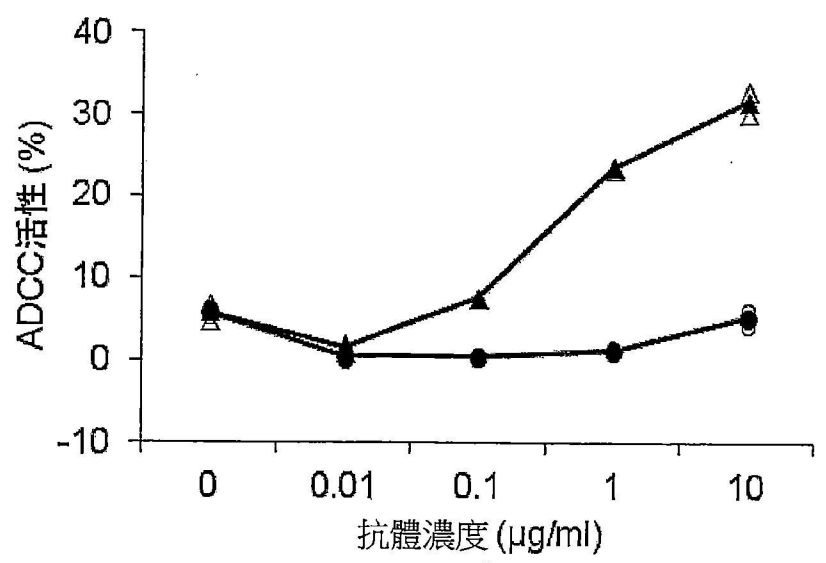


圖35A

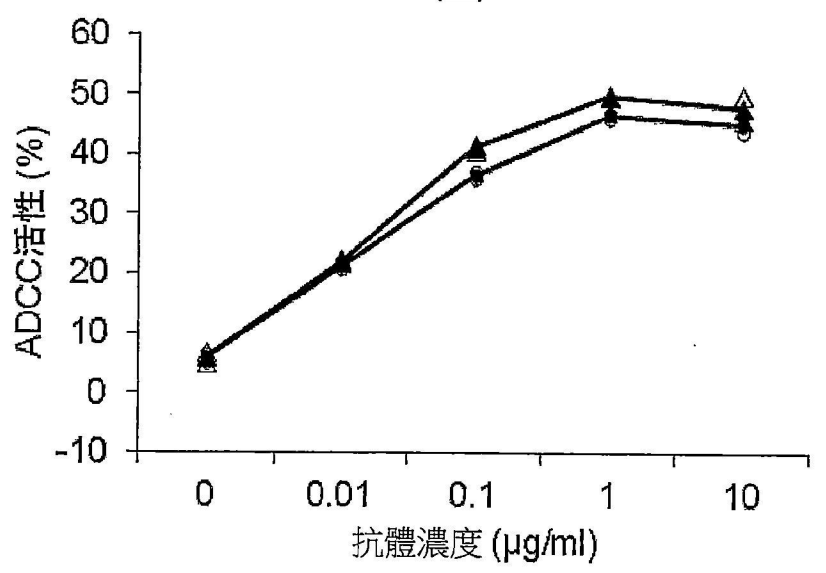


圖35B

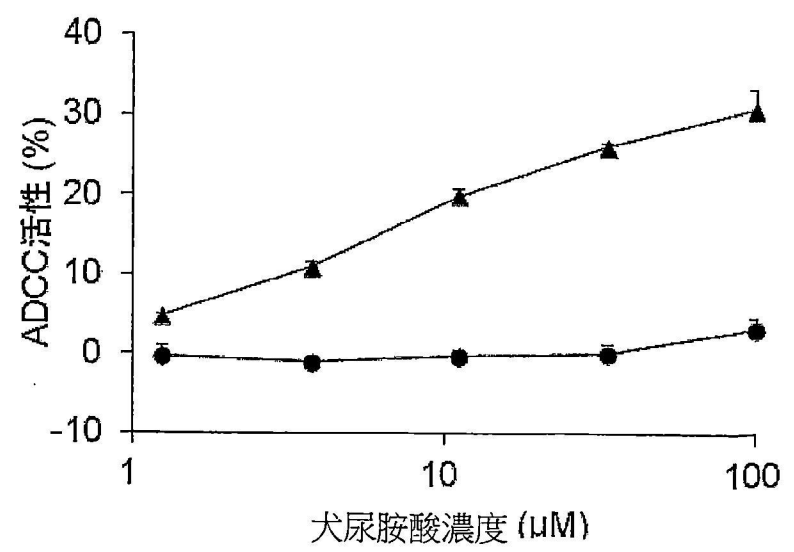


圖36

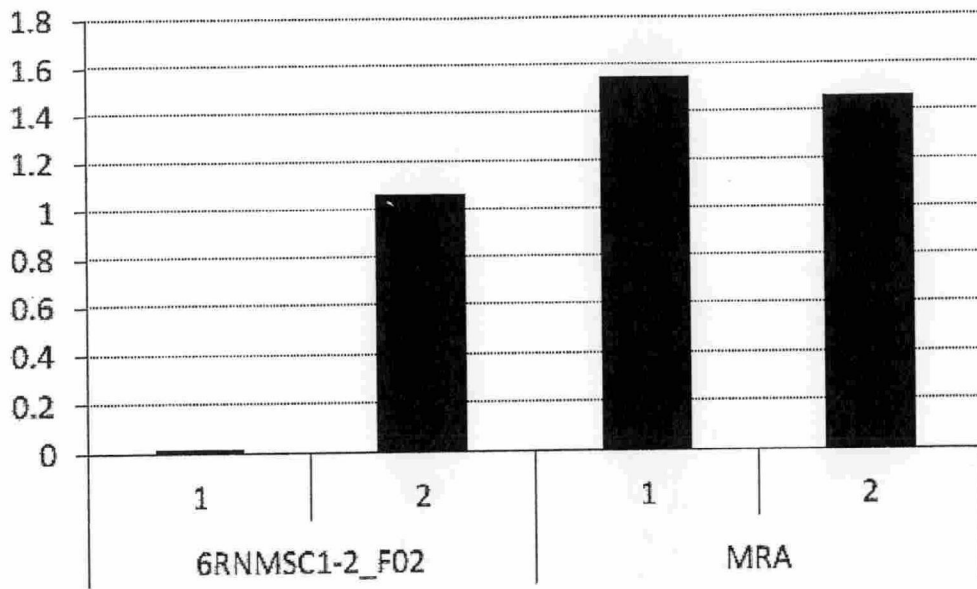


圖37

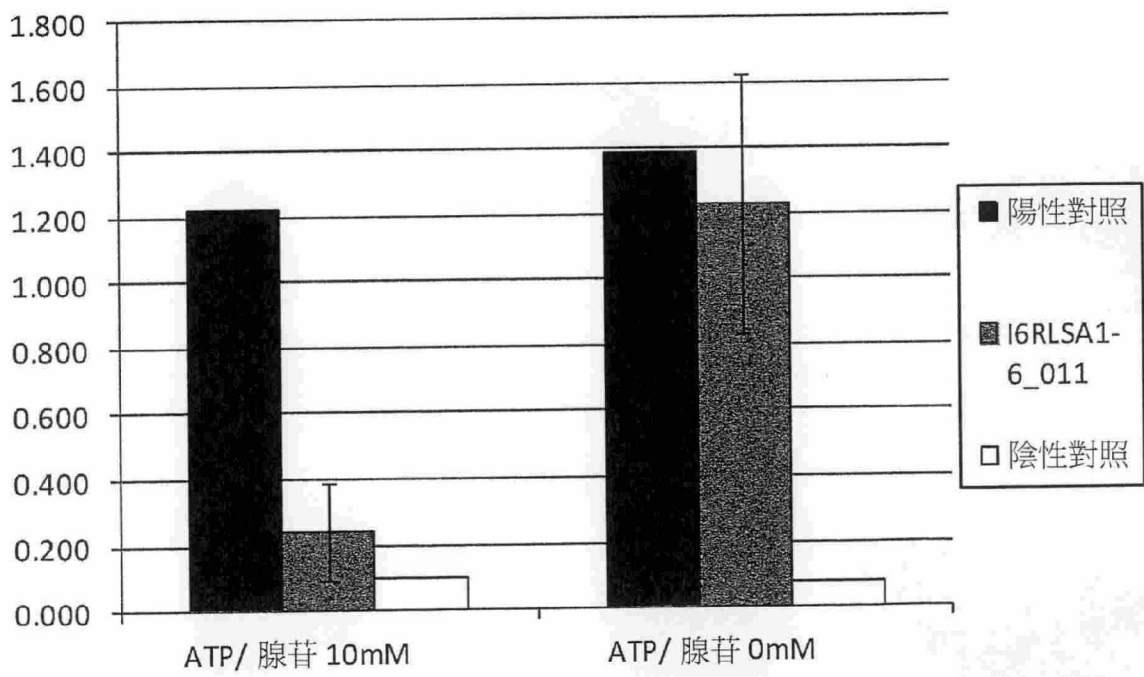


圖38

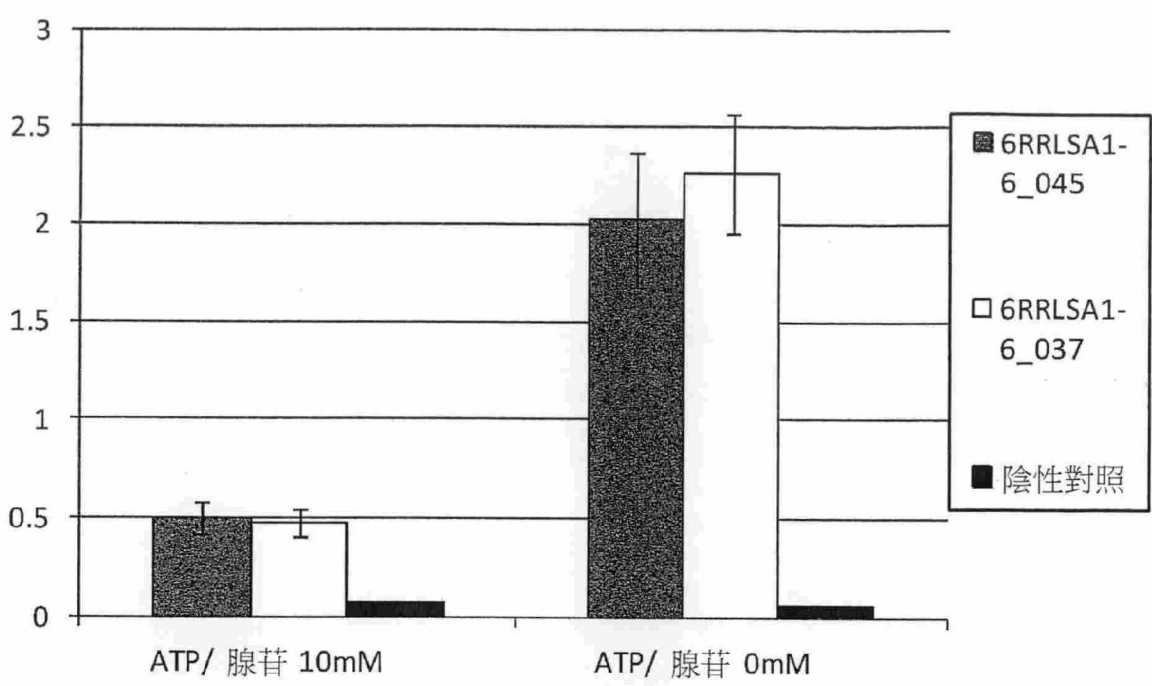


圖39

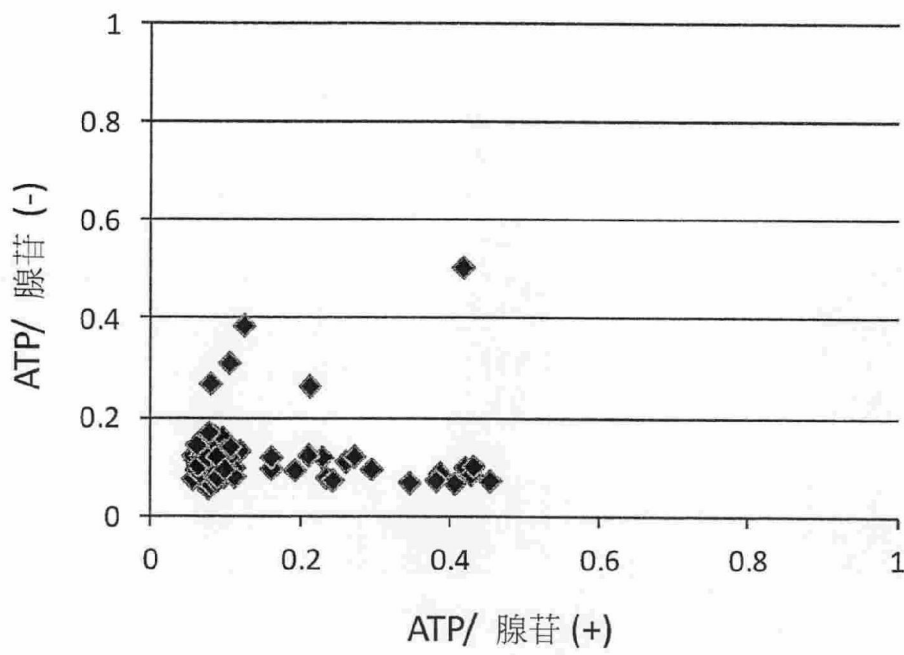


圖40

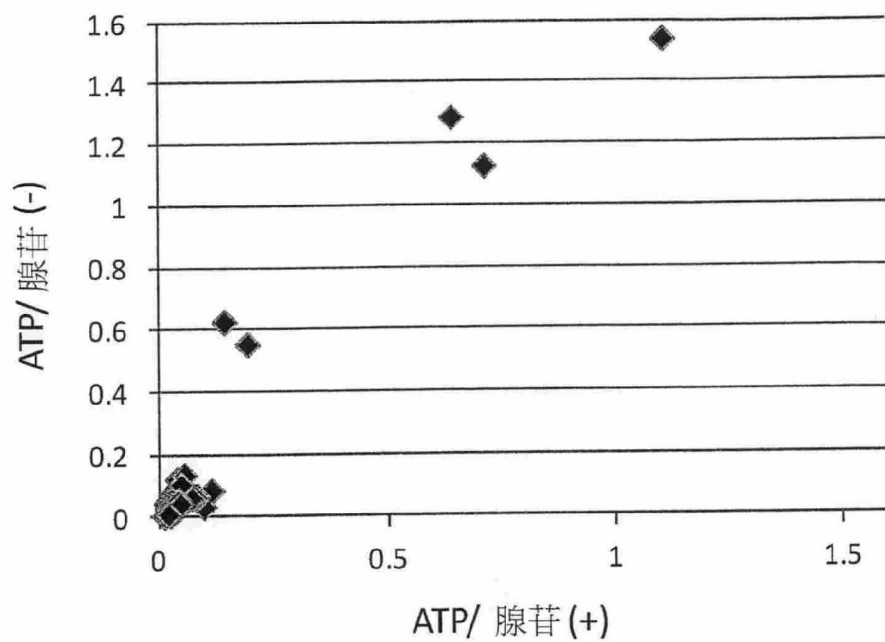


圖41

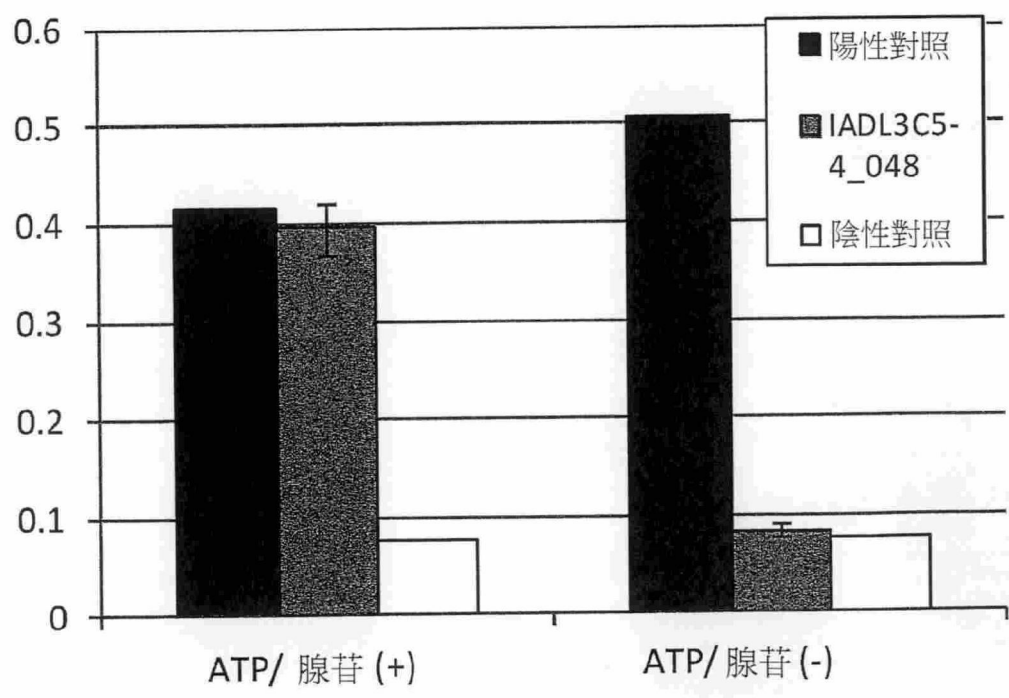


圖42

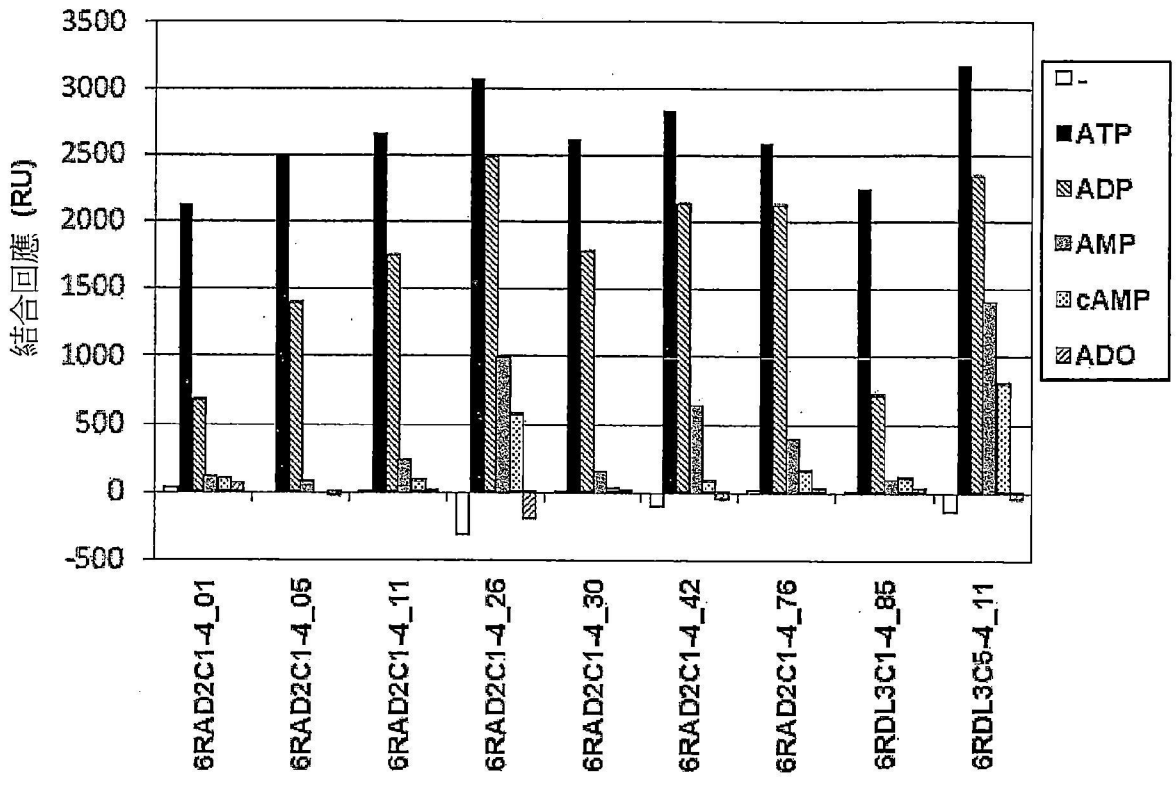


圖43

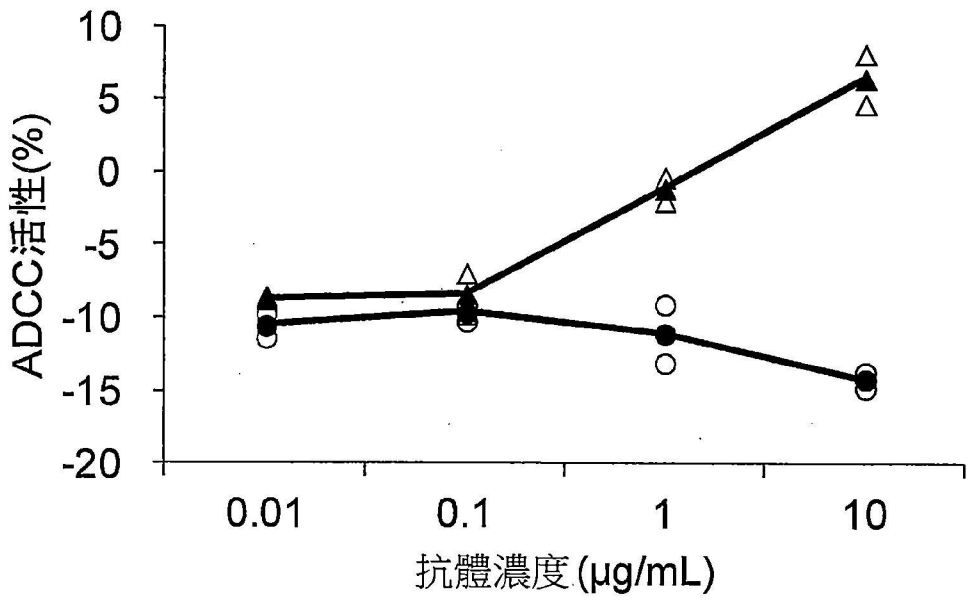


圖44A

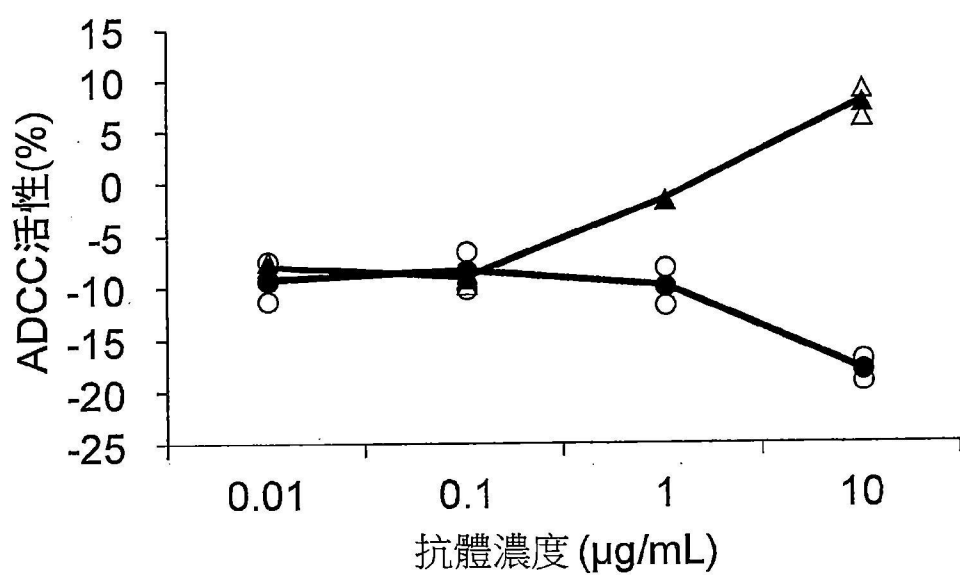


圖44B

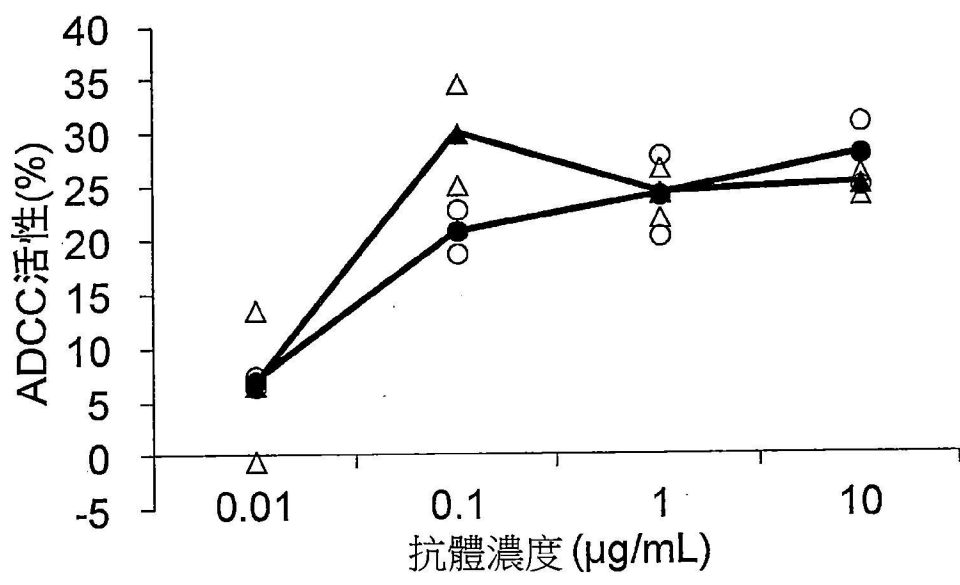


圖44C

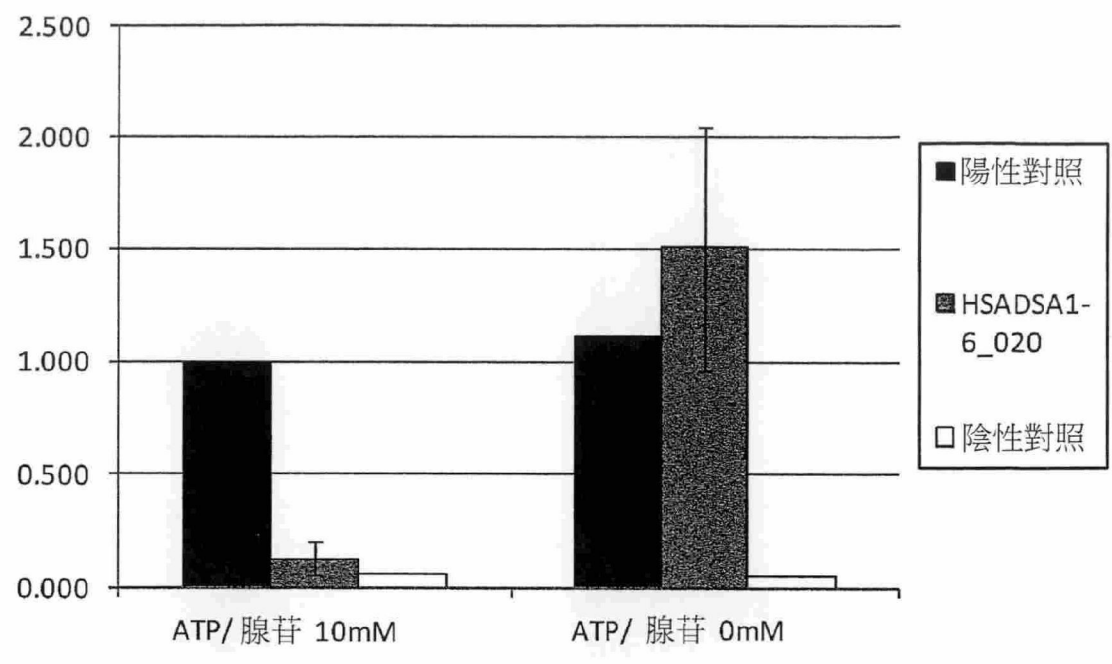


圖45