I740809

(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 I740809 B**

(45)公告日： 中華民國 110 (2021) 年 10 月 01 日

(21)申請案號：104137120 (22)申請日： 中華民國 104 (2015) 年 11 月 11 日

(51)Int. Cl.： *C07K16/28 (2006.01)* *C07K14/705 (2006.01)*
C40B30/04 (2006.01) *C40B40/10 (2006.01)*

(30)優先權：2014/11/11 世界智慧財產權組織 PCT/JP2014/079785
2015/05/13 日本 2015-097884

(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) ；門野正次郎 KADONO, SHOJIRO (JP) ；廣庭奈緒香 HIRONIWA, NAOKA (JP) ；櫻井実香 SAKURAI, MIKA (JP)

(74)代理人：洪澄文

(56)參考文獻：

WO 2006/047639A2 WO 2015/068847A1

Schaefer G et al., "A Two-in-One Antibody against HER3 and EGFR Has Superior Inhibitory Activity Compared with Monospecific Antibodies", Cancer Cell, vol.20, no.4, p.472-486, 2011/10/18

審查人員：顏逸瑜

申請專利範圍項數：7 項 圖式數：25 共 424 頁

(54)名稱

包含經改變之抗體可變區之抗原結合分子的資料庫

(57)摘要

本案發明人等成功地製作包括對於第 1 抗原及和該第 1 抗原不同之第 2 抗原有結合活性但不和該第 1 抗原與該第 2 抗原同時結合之抗體可變區之彼此序列不同之多數抗原結合分子為主而成之資料庫。藉由使用本發明的資料庫，能取得對於第 1 抗原之結合能力增強之可變區、製造針對第 1 抗原及癌抗原之雙專一性抗體。再者，本案發明人等也成功地製作包括對於不同之 3 個抗原有結合活性但不會同時和該等抗原結合之抗體可變區的抗原結合分子。

公告本

I740809

發明摘要

※ 申請案號：

※ 申請日：　　※IPC 分類：

【發明名稱】（中文/英文）

包含經改變之抗體可變區之抗原結合分子的資料庫

【中文】

本案發明人等成功地製作包括對於第 1 抗原及和該第 1 抗原不同之第 2 抗原有結合活性但不和該第 1 抗原與該第 2 抗原同時結合之抗體可變區之彼此序列不同之多數抗原結合分子為主而成之資料庫。藉由使用本發明的資料庫，能取得對於第 1 抗原之結合能力增強之可變區、製造針對第 1 抗原及癌抗原之雙專一性抗體。再者，本案發明人等也成功地製作包括對於不同之 3 個抗原有結合活性但不會同時和該等抗原結合之抗體可變區的抗原結合分子。

【英文】

無。

【代表圖】

【本案指定代表圖】：無。

【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）

包含經改變之抗體可變區之抗原結合分子的資料庫

【技術領域】

【0001】本發明提供包括：能和不同的 2 個抗原（第 1 抗原及第 2 抗原）結合但是不會和兩抗原同時結合之抗體之可變區的抗原結合分子之集團（資料庫）、該資料庫之製造方法、使用該資料庫之包括共通 L 鏈可變區之雙專一性抗體之製造方法、及選擇含有對於第 1 抗原之結合增強之可變區的抗原結合分子的方法。本發明並提供包括會與不同的 3 個抗原（第 1 抗原、第 2 抗原及第 4 抗原）結合但不同時和該該 3 個抗原結合之抗體之可變區的抗原結合分子、含該抗原結合分子之醫藥組合物、以及此等之製造方法。

【先前技術】

【0002】抗體在血漿中的安定性高、副作用少，故作為醫藥品受到重視(Nat. Biotechnol. (2005) 23, 1073-1078(非專利文獻 1)及 Eur J Pharm Biopharm. (2005) 59 (3), 389-396(非專利文獻 2))。抗體，不僅有和抗原結合之作用、致效劑作用、拮抗劑作用，尚可誘導 ADCC(Antibody Dependent Cytotoxicity：抗體依存性障害活性)、ADCP(Antibody Dependent Cell phagocytosis：抗體依存性細胞吞噬作用)、CDC(補體依存性細胞傷害活性)此類由效應子細胞所致之細胞毒性活性(也稱為效應子機能)。尤其 IgG1 次型的抗體對於癌細胞顯示效應子機

能，故在癌領域已有多數抗體醫藥品開發。

【0003】抗體為了表現 ADCC、ADCP、CDC，抗體之 Fc 區，必須與 NK 細胞、巨噬細胞等效應子細胞中存在的抗體受體(FcγR)及各種補體成分結合。人之中，作為 FcγR 之蛋白質家族，已有人報告 FcγRIa、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa、FcγRIIIb 之異構體(isoform)，也有人報告各自的異型(allotype)(Immunol. Lett. (2002) 82, 57-65(非專利文獻 3))。該等異構體(isoform)之中，FcγRIa、FcγRIIa、FcγRIIIa 在細胞內分域帶有稱為 ITAM(Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif)的分域，傳遞活化信號。而只有 FcγRIIb 在細胞內分域帶有稱為 ITIM(Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif)的分域，傳遞抑制信號。任一 FcγR 已知均藉由免疫複合體等而被交聯，以傳遞信號(Nat. Rev. Immunol. (2008) 8, 34-47(非專利文獻 4))。實際上，抗體在對於癌細胞發揮效應子機能時，於癌細胞膜上有多數個結合的抗體的 Fc 區，效應子細胞膜上的 FcγR 成為簇集，利用效應子細胞傳遞活化信號。其結果雖發揮殺細胞效果，但是 FcγR 的交聯只限於存在癌細胞附近的效應子細胞，所以免疫活化呈現只在癌細胞局部發生的情形。(Ann. Rev. Immunol. (1988). 6. 251-81(非專利文獻 5))

【0004】天然型免疫球蛋白，於可變區和抗原結合，於不變區則和 FcγR、FcRn、FcαR、FcεR 此類受體、補體結合。於 IgG 之 Fc 區交互作用的一結合分子即 FcRn，會和抗體之重鏈各結合 1 分子，所以據報告 IgG 型之抗體 1 分子會有 2 分子 FcRn 結合。但是 FcγR 和 FcRn 等不同，FcγR 係於抗體之鉸鏈

區及 CH2 分域交互作用，對於 IgG 型抗體 1 分子只有 1 分子結合(J. Bio. Chem., (20001) 276, 16469-16477)。又，FcγR 與抗體之 Fc 區之結合，據顯示：抗體之鉸鏈區及 CH2 分域內的一些胺基酸殘基及 CH2 分域所結合之 EU 編號 297 號之 Asn 上附加的糖鏈係為重要(Chem. Immunol. (1997), 65, 88-110(非專利文獻 6)、Eur. J. Immunol. (1993) 23, 1098-1104(非專利文獻 7)、Immunol. (1995) 86, 319-324(非專利文獻 8))。以此結合部位為中心，至今已有各種帶有 FcγR 結合特性的 Fc 區的變異體被研究，已獲得對於活化 FcγR 有更高結合活性的 Fc 區變異體(WO2000/042072(專利文獻 1)、WO2006/019447(專利文獻 2))。例如：Lazar 等人，成功地藉由將人 IgG1 之 EU 編號 239 號之 Ser、330 之 Ala、332 之 Ile 各取代為 Asn、Leu、Glu，而使人 IgG1 對於人 FcγRIIIa(V158)之結合活性增加至約 370 倍(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (2006) 103, 4005-4010(非專利文獻 9)、WO2006/019447(專利文獻 2))。此改變體比起野生型，對於 FcγRIIIa 與 FcγIIb 之結合活性之比(A/I 比)成為約 9 倍。又，Shinkawa 等人藉由使在 EU 編號 297 號之 Asn 附加之糖鏈之岩藻糖缺失，而成功地使對於 FcγRIIIa 之結合活性增加至約 100 倍(J. Biol. Chem. (2003) 278, 3466-3473(非專利文獻 10))。利用該等方法，相對於天然型人 IgG1，人 IgG1 之 ADCC 活性能大幅提高。

【0005】通常天然型 IgG 型之抗體，係利用其可變區(Fab)認識並結合 1 個抗原決定位，所以只會和 1 個抗原結合。而已知涉及癌、發炎的多種蛋白質，蛋白質彼此有時會交擾

(crosstalk)。例如免疫病症中，已知有一些發炎性細胞介素(TNF, IL1、IL6)涉及(Nat. Biotech., (2011) 28, 502-10(非專利文獻 11))。且已知癌獲得藥劑耐性的一機轉，係其他受體活化(Endocr Relat Cancer (2006) 13, 45-51(非專利文獻 12))。在如此的情形，認識 1 個抗原決定位的通常的抗體，無法阻斷(block)多數蛋白質。

【0006】作為阻斷多數標靶的分子，已有人研究以 1 分子和 2 種以上的抗原結合的抗體(稱為雙專一性(Bispecific)抗體)。藉由將天然型 IgG 型抗體予以改良，能賦予對於不同的 2 個抗原(第 1 抗原與第 2 抗原)的結合活性(MAbs. (2012) Mar 1, 4(2))。所以，不僅是將 2 種以上的抗原以 1 個分子中和，也有藉由將帶有細胞毒性活性之細胞與癌細胞予以交聯而提高抗腫瘤活性的作用。至今，作為雙專一性(Bispecific)抗體之分子形式，已有人報告：在抗體之 N 末端、C 末端附加抗原結合部位之分子(DVD-Ig、scFv-IgG)、抗體之 2 個 Fab 區有不同序列之分子(共通 L 鏈雙專一性抗體及混合融合瘤(hybrid hybridoma)、1 個 Fab 區認識 2 個抗原的分子(Two-in-one IgG)、將 CH3 區的迴圈部位作為新抗原結合部位的分子(Fcab)(Nat. Rev. (2010), 10, 301-316(非專利文獻 13)、Peds(2010), 23(4), 289-297(非專利文獻 14))。任一雙專一性抗體均是以 Fc 區和 FcγR 交互作用，所以可保守抗體的效應子機能。因此雙專一性抗體對於認識的任一抗原，均會和 FcγR 同時結合並對於表現抗原的細胞呈現 ADCC 活性。

【0007】雙專一性抗體所認識之抗原若均為在癌專一性地

表現的抗原，則對於任一抗原均對於癌細胞顯示細胞毒性活性，能期待比起認識 1 個抗原的通常抗體醫藥品有更高效率的抗癌效果。但是雙專一性抗體所認識之抗原中有任一抗原是在正常組織表現時、在免疫細胞表現的細胞時，會因和 FcγR 之交聯而傷害正常組織、釋出細胞介素(J. Immunol. (1999) Aug 1, 163(3), 1246-52(非專利文獻 15))。其結果會誘導強副作用。

【0008】例如：已知 Catumaxomab 係認識在 T 細胞表現之蛋白質及在癌細胞表現的蛋白質(癌抗原)的雙專一性抗體。Catumaxomab 以 2 個 Fab 各和癌抗原(EpCAM)與 T 細胞表現的 CD3ε 鏈結合。Catumaxomab 藉由和癌抗原與 CD3ε 同時結合，會誘導 T 細胞所致之細胞毒性活性，藉由和癌抗原與 FcγR 同時結合，會誘導 NK 細胞、巨噬細胞等抗原展示細胞所致之細胞毒性活性。藉由利用 2 種細胞毒性活性，Catumaxomab 利用腹腔內投予顯示於惡性腹水症有高治療效果，且已在歐洲獲認可。(Cancer Treat Rev. (2010) Oct 36(6), 458-67(非專利文獻 16))進一步報告利用 Catumaxomab 投予而出現對於癌細胞有反應的抗體的例子，而解明：可誘導獲得性免疫(Future Oncol. (2012) Jan 8(1), 73-85(非專利文獻 17))。由此結果，同時帶有由 T 細胞獲致之細胞毒性活性及介由 FcγR 之 NK 細胞、巨噬細胞等細胞獲致之作用兩者的抗體(特別稱為三官能(trifunctional)抗體)，因可期待強抗腫瘤效果及獲得性免疫誘導，故受人重視。

【0009】但是三官能(trifunctional)抗體即是於癌抗原不存在時，仍會和 CD3ε 與 FcγR 同時結合，故在癌細胞不存在的

環境，表現 CD3ε 之 T 細胞與表現 FcγR 之細胞還是會交聯，而大量產生各種細胞介素。由於如此的癌抗原非依存性的各種細胞介素的產生誘導，目前三官能(trifunctional)抗體之投予係限於腹腔內(Cancer Treat Rev. 2010 Oct 36(6), 458-67(非專利文獻 16))，由於嚴重的細胞介素風暴(cytokine storm)狀的副作用，全身投予極困難(Cancer Immunol Immunother. 2007 Sep;56(9):1397-406(非專利文獻 18))。

又，習知技術之雙專一性抗體，由於第 1 抗原即癌抗原(EpCAM)和第 2 抗原即 CD3ε 兩者的抗原可能和 FcγR 同時結合，所以於分子結構無法避免由於 FcγR 和第 2 抗原之 CD3ε 之同時結合導致的如此的副作用。

【0010】近年來，藉由使用使對 FcγR 之結合活性減低的 Fc 區，已能提供避免副作用且同時引起 T 細胞所致細胞傷害活性之改良型抗體(WO2012/073985)。

但是如此的抗體，於分子結構上，也無法和癌抗原結合且和 CD3ε 與 FcγR 之 2 個免疫受體作用。

至今，尚未知有能避免副作用且同時以癌抗原專一性地使 T 細胞所致之細胞毒性活性與 T 細胞以外之細胞所致之細胞傷害活性兩者作用的抗體。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0011】

[專利文獻 1]WO2000/042072

[專利文獻 2]WO2006/019447

[非專利文獻]

【0012】

[非專利文獻 1] Nat. Biotechnol. (2005) 23, 1073-1078

[非專利文獻 2] Eur J Pharm Biopharm. (2005) 59 (3), 389-396

[非專利文獻 3] Immunol. Lett. (2002) 82, 57-65

[非專利文獻 4] Nat. Rev. Immunol. (2008) 8, 34-47

[非專利文獻 5] Ann. Rev. Immunol. (1988). 6. 251-81

[非專利文獻 6] Chem. Immunol. (1997), 65, 88-110

[非專利文獻 7] Eur. J. Immunol. (1993) 23, 1098-1104

[非專利文獻 8] Immunol. (1995) 86, 319-324

[非專利文獻 9] Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (2006) 103, 4005-4010

[非專利文獻 10] J. Biol. Chem. (2003) 278, 3466-3473

[非專利文獻 11] Nat. Biotech., (2011) 28, 502-10

[非專利文獻 12] Endocr Relat Cancer (2006) 13, 45-51

[非專利文獻 13] Nat. Rev. (2010), 10, 301-316

[非專利文獻 14] Peds(2010), 23(4), 289-297

[非專利文獻 15] J. Immunol. (1999) Aug 1, 163(3), 1246-52

[非專利文獻 16] Cancer Treat Rev. (2010) Oct 36(6), 458-67

[非專利文獻 17] Future Oncol. (2012) Jan 8(1), 73-85

[非專利文獻 18] Cancer Immunol Immunother. 2007 Sep; 5

56(9):1397-406

【發明內容】

(發明欲解決之課題)

【0013】本發明係有鑑於如此的狀況而生，其課題在於提供含有對於不同的 2 個抗原(第 1 抗原與第 2 抗原)有結合活性，但不同時和該等抗原結合之抗體可變區的抗原結合分子的集團(資料庫)、該資料庫之製造方法、使用該資料庫選擇或製造所望抗原結合分子之方法、及選擇含有對於第 1 抗原之結合增強之可變區的抗原結合分子的方法。又，本發明之課題在於提供含有能和不同的 3 個抗原（第 1 抗原、第 2 抗原及第 4 抗原）結合但不同時和該 3 個抗原結合之抗體可變區的抗原結合分子、含有該抗原結合分子之醫藥組合物、及此等之製造方法。

(解決課題之方式)

【0014】本案發明人等為了解決上述課題努力研究。其結果，本案發明人等藉由製作包含 1 個可變區係對於不同的 2 個抗原（第 1 抗原與第 2 抗原）有結合活性但對於該等抗原不同時結合之抗體之可變區，及與和該等抗原不同之抗原（第 3 抗原）結合之可變區之抗原結合分子，利用該抗原結合分子對於 3 個不同抗原的結合活性，而成功地使抗原結合分子產生的活性增強。再者，將能避免至今的多專一性抗原結合分子利用於作為醫藥品時據認為會成為副作用之原因的因和在不同的細胞上表現之抗原結合所導致的該不同的細胞間的交聯的抗原結合分子予以成功地製作。再者，成功地製作含有能和不同的 2 個抗原（第 1 抗原及第 2 抗原）結合，但不同時和兩抗原結

合之抗體可變區之抗原結合分子資料庫之製作。此外，使用該資料庫成功地取得（選擇）對於所望之2種抗原有結合活性之抗原結合分子，並成功地取得（選擇）對於所望抗原之結合增強之可變區。再者，本案發明人等成功地製作含有能和不同的3個抗原（第1抗原、第2抗原及第4抗原）結合但不同時和該3個抗原結合之抗體可變區之抗原結合分子。

【0015】更具體而言，本發明係關於以下。

[1] 一種資料庫，係由序列彼此不同之複數的抗原結合分子為主而成，

其特徵為：

該抗原結合分子中之抗原結合域，係能和第1抗原及與該第1抗原為不同之第2抗原結合但不同時和該第1抗原與該第2抗原結合之抗體之可變區，

該第1抗原及該第2抗原中之任一抗原為CD3，另一抗原為在T細胞或其他之免疫細胞表面表現之分子。

[2] 如[1]之資料庫，其中，不同時和第1抗原與第2抗原結合之該可變區，係不同時和在各不同之細胞上表現之第1抗原與第2抗原結合之可變區。

[3] 如[1]或[2]之資料庫，其中，該可變區係被導入至少1個胺基酸之改變的可變區，且被改變之胺基酸為抗體之可變區之CDR1、CDR2、CDR3或FR3區域的胺基酸。

[4] 如[3]之資料庫，其中，被改變之胺基酸係選自抗體之H鏈可變區之Kabat編號31~35、50~65、71~74及95~102、及L鏈可變區之Kabat編號24~34、50~56及89~97中之至少1

者之位置的胺基酸。

[5] 如[1]至[4]中任一項之資料庫，其中，該另一抗原係FcγR、TLR、凝集素、IgA、免疫檢查點分子、TNF超級家族分子、TNFR超級家族分子或NK受體分子。

[6] 如[1]至[5]中任一項之資料庫，其中，該抗原結合分子係抗體之可變區與病毒外殼蛋白質之至少一部分的融合多肽。

[7] 如[3]至[6]中任一項之資料庫，其中，

該至少1個胺基酸之改變係對於由序列辨識號：96記載之重鏈可變區序列及/或序列辨識號：53記載之輕鏈可變區序列所構成之模板序列導入，

該被改變之胺基酸係選自於以下任一者以上之位置的胺基酸：

H鏈：31、52b、52c、53、54、56、57、61、98、99、100、100a、100b、100c、100d、100e、100f、100g（Kabat編號）；

L鏈：24、25、26、27、27a、27b、27c、27e、30、31、33、34、51、52、53、54、55、56、74、77、89、90、92、93、94、96（Kabat編號）。

[8] 一種如[1]至[7]中任一項之資料庫之製造方法，包括以下的步驟(a)及(b)：

(a) 將和第1抗原結合之抗體之可變區序列作為資料庫之模板序列，指定滿足以下的(i)至(iii)中之任一者以上之胺基酸改變的步驟；

(i) 不使對於第1抗原之結合能力實質上帶來變化的改

變；

(ii) 不使 ECM 結合能力實質上帶來變化之改變；及

(iii) 向重鏈可變區之 CDR1、CDR2、CDR3 或 FR3 區域插入由 1 至 25 個殘基胺基酸構成之胜肽；及

(b) 設計包括編碼為該模板序列之核酸、及編碼為在該模板序列中具有該步驟(a)指定之 1 或多數胺基酸改變之彼此序列不同之可變區之核酸的資料庫的步驟。

[9] 如[8]之資料庫之製造方法，其中，使用序列辨識號：96 記載之重鏈可變區序列及/或序列辨識號：53 記載之輕鏈可變區序列作為該資料庫之模板序列而製造資料庫。

[10] 一種抗原結合分子之製造方法，該抗原結合分子包括能和為 CD3 之第 1 抗原及與該第 1 抗原為不同之第 2 抗原結合，但不同時和該第 1 抗原與該第 2 抗原結合之可變區；

包括以下的步驟(a)至(c)：

(a) 使如[1]至[7]中任一項之資料庫接觸第 2 抗原的步驟；

(b) 回收在該步驟(a)和第 2 抗原結合之抗原結合分子的步驟；

(c) 從該步驟(b)回收之抗原結合分子之集團選擇包括不同時和第 1 抗原與該第 2 抗原結合之可變區之抗原結合分子的步驟。

[11] 如[10]之抗原結合分子之製造方法，其中，該第 2 抗原為 FcγR、TLR、凝集素、IgA、免疫檢查點分子、TNF 超級家族分子、TNFR 超級家族分子或 NK 受體分子。

[12] 一種雙專一性抗體之製造方法，係使用以下列為特

徵的資料庫：

由序列彼此不同之複數的抗原結合分子為主而成之資料庫，該抗原結合分子中之抗原結合域係由模板序列構成之抗體之可變區或該模板序列中具有至少1個胺基酸之改變之抗體之可變區，且係能和第1抗原及與該第1抗原為不同之第2抗原結合，但不同時和該第1抗原與該第2抗原結合之抗體之可變區；

包括以下的步驟(a)至(c)：

(a) 選擇該資料庫之模板序列作為和第1抗原結合之可變區的步驟；

(b) 選擇會和第2抗原結合但不和第1抗原結合之可變區作為和第2抗原結合之可變區的步驟，其包括以下的步驟(i)至(iv)：

(i) 使該資料庫接觸第2抗原的步驟；

(ii) 回收在該步驟(i)和第2抗原結合之抗原結合分子的步驟；

(iii) 使在該步驟(ii)回收之抗原結合分子之集團接觸第1抗原的步驟；及

(iv) 選擇在該步驟(iii)未和第1抗原結合之抗原結合分子的步驟；及

(c) 製造包括在該步驟(a)選擇之會和第1抗原結合之可變區、及在該步驟(b)選擇之會和第2抗原結合之可變區之雙專一性抗體的步驟。

[13] 如[12]之雙專一性抗體之製造方法，其中，該第1抗

原為 CD3，該第 2 抗原為在癌組織專一性地表現之分子。

[14] 一種對於第 1 抗原之結合增強之可變區之選擇方法，包括以下步驟(a)至(c)：

(a) 使如[1]至[7]中任一項之資料庫接觸第 1 抗原的步驟；

(b) 回收在該步驟(a)和第 1 抗原結合之抗原結合分子的步驟；及

(c) 從在該步驟(b)和第 1 抗原結合之抗原結合分子之集團，選擇包括對於第 1 抗原之結合增強之可變區之抗原結合分子的步驟。

[15] 一種抗原結合分子，包括能和不同之 3 個抗原（第 1 抗原、和該第 1 抗原為不同之第 2 抗原、及和該第 1 抗原及該第 2 抗原為不同之第 4 抗原）結合但不同時和該 3 個抗原結合之抗體之可變區。

[16] 如[15]之抗原結合分子，更包括和與該 3 個抗原不同之第 3 抗原結合的可變區。

[17] 如[15]或[16]之抗原結合分子，其中，不同時和該 3 個抗原結合之該可變區，係不同時和在各不同之細胞上表現之第 1 抗原、第 2 抗原及第 4 抗原結合之可變區。

[18] 如[15]至[17]中任一項之抗原結合分子，更包括抗體之 Fc 區。

[19] 如[18]之抗原結合分子，其中，該 Fc 區對於 FcγR 之結合活性，比起天然型人 IgG1 抗體之 Fc 區對於 FcγR 之結合活性更低。

[20] 如[15]至[19]中任一項之抗原結合分子，其中，能和

該3個抗原結合之該抗體之可變區係被導入了至少1個胺基酸之改變之可變區，且被改變之胺基酸係抗體之可變區之CDR1、CDR2、CDR3或FR3區域之胺基酸。

[21] 如[20]之抗原結合分子，其中，該被改變之胺基酸係選自抗體之H鏈可變區之Kabat編號31~35、50~65、71~74及95~102、及L鏈可變區之Kabat編號24~34、50~56及89~97中之至少1者之位置的胺基酸。

[22] 如[15]至[21]中任一項之抗原結合分子，其中，該第1抗原、第2抗原及第4抗原中之任一抗原係在T細胞表面專一性地表現之分子，其餘2個抗原係在T細胞或其他免疫細胞表面表現之分子。

[23] 如[22]之抗原結合分子，其中，該其餘的2個抗原係FcγR、TLR、凝集素、IgA、免疫檢查點分子、TNF超級家族分子、TNFR超級家族分子或NK受體分子。

[24] 如[16]至[23]之抗原結合分子，其中，該第3抗原係在癌組織專一性地表現之分子。

[25] 一種醫藥組合物，包括如[15]至[24]中任一項之抗原結合分子及醫學上可容許之擔體。

[26] 一種製造如[15]至[24]中任一項之抗原結合分子之方法，包括步驟(i)~(iv)：

(i) 製作抗原結合分子的資料庫，該抗原結合分子係和不同之3個抗原(第1抗原、和該第1抗原為不同之第2抗原、及和該第1抗原及該第2抗原為不同之第4抗原)結合之抗體之可變區之至少1個胺基酸被改變之抗原結合分子，且包括該

被改變之可變區之胺基酸之至少 1 者彼此不同之可變區的步驟；

(ii) 從製作之資料庫之中選擇包括對於該 3 個抗原有結合活性但不同時和該 3 個抗原結合之可變區之抗原結合分子的步驟；

(iii) 培養包括編碼為在步驟(ii)選擇之抗原結合分子之該可變區的核酸的寄主細胞，使包括能和該 3 個抗原結合但不同時和該 3 個抗原結合之抗體之可變區之抗原結合分子表現的步驟；及

(iv) 從該寄主細胞培養物回收抗原結合分子的步驟。

[27] 如[26]之抗原結合分子之製造方法，其中，

在步驟(ii)選擇之抗原結合分子包括之不同時和前述 3 個抗原結合之可變區，係不同時和在各不同之細胞上表現之該 3 個抗原結合的可變區。

[28] 如[26]或[27]之抗原結合分子之製造方法，其中，在步驟(iii)培養之寄主細胞更包括編碼為抗體之 Fc 區之核酸。

[29] 如[28]之抗原結合分子之製造方法，其中，前述 Fc 區對於 FcγR 之結合活性，比起天然型人 IgG1 抗體之 Fc 區對於 FcγR 之結合活性還低。

[30] 如[26]至[29]中任一項之抗原結合分子之製造方法，其中，製造之抗原結合分子為多專一性抗體。

[31] 如[26]至[30]中任一項之抗原結合分子之製造方法，其中，步驟(i)中之可變區之至少 1 個改變之胺基酸為取代或插入之胺基酸。

[32] 如[31]之抗原結合分子之製造方法，其中，插入之胺基酸之數目為 1~25 個。

[33] 如[26]至[32]中任一項之抗原結合分子之製造方法，其中，改變係抗體之可變區之 CDR1、CDR2、CDR3 或 FR3 區域之胺基酸之改變。

[34] 如[26]至[33]中任一項之抗原結合分子之製造方法，其中，改變係迴圈區域之胺基酸之改變。

[35] 如[26]至[33]中任一項之抗原結合分子之製造方法，其中，改變係選自抗體之 H 鏈可變區之 Kabat 編號 31~35、50~65、71~74 及 95~102、及 L 鏈可變區之 Kabat 編號 24~34、50~56 及 89~97 中之至少 1 者之胺基酸之改變。

[36] 如[26]至[35]中任一項之抗原結合分子之製造方法，其中，前述第 1 抗原、第 2 抗原及第 4 抗原中之任一抗原為在 T 細胞表面專一性地表現之分子，其餘的 2 個抗原係在 T 細胞或其他免疫細胞表面表現之分子。

[37] 如[36]之抗原結合分子之製造方法，其中，前述第 1 抗原、第 2 抗原及第 4 抗原中之任一抗原為 CD3，其餘的 2 個抗原係 FcγR、TLR、IgA、凝集素、免疫檢查點分子、TNF 超家族分子、TNFR 超家族分子或 NK 受體分子。

[38] 如[26]至[37]中任一項之抗原結合分子之製造方法，其中，前述抗原結合分子更包括和與前述 3 個抗原不同之第 3 抗原結合之可變區。

[39] 如[38]之抗原結合分子之製造方法，其中，前述第 3 抗原係在癌組織專一性地表現之分子。

[40] 一種癌之治療方法，包括投予如[15]至[24]中任一項之抗原結合分子之步驟。

[41] 如[15]至[24]中任一項之抗原結合分子，係使用於治療癌。

[42] 一種如[15]至[24]中任一項之抗原結合分子之用途，係用於製造癌之治療劑。

[43] 一種製造癌之治療劑之處理，包括使用如[15]至[24]中任一項之抗原結合分子之步驟。

該技術領域之人士當然理解：將上述記載之1或多數態樣任意組合者，只要基於該技術領域之人士之技術常識在技術上不矛盾，則包括在本發明。

【圖式簡單說明】

【0016】

第1圖係和第1抗原與第2抗原結合但不同時結合之抗體之概念圖。

第2圖係由於不和2個抗原同時結合，故不引起交聯之抗體之概念圖。

第3圖係即使和2個抗原同時結合，仍不同時和2個細胞結合之抗體之概念圖。

第4圖係將癌細胞、以及表現第1受體之T細胞交聯之抗體之概念圖。

第5圖係將癌細胞、以及表現第2受體之細胞交聯之抗體之概念圖。

第6圖係將癌細胞與免疫細胞交聯，但免疫細胞彼此不交

聯之抗體之概念圖。

第 7 圖係 CE115 對 CD3ε 之細胞 ELISA 之結果。

第 8 圖係 EGFR_ERY22_CE115 之分子形式圖。

第 9 圖係 EGFR_ERY22_CE115 之 TDCC 結果(SK-pca13a)。

第 10 圖係顯示人化 CE115 對 CD3ε 之結合性。

第 11 圖係顯示檢測 RGD 插入 CE115 對於整合素(integrin)之結合之 ECL-ELISA 之結果。

第 12 圖係顯示檢測 RGD 插入 CE115 對於 CD3ε 之結合之 ECL-ELISA 之結果。

第 13 圖係顯示檢測 RGD 插入 CE115 對於整合素及 CD3ε 之同時結合之 ECL-ELSIA 之結果。顯示針對同時結合之改變體之結果。

第 14 圖係 RGD 插入 CE115 之同時結合 ECL-ELISA 之結果。顯示針對未同時結合之改變體之結果。

第 15 圖係檢測 TLR2 結合胜肽插入 CE115 對於 TLR2 之結合之 ECL-ELISA 之結果。

第 16 圖係檢測 TLR2 結合胜肽插入 CE115 對於 CD3ε 之結合之 ECL-ELISA 之結果。

第 17 圖係檢測 TLR2 結合胜肽插入 CE115 對於 TLR2 及 CD3 之同時結合之 ECL-ELISA 之結果。

第 18 圖係結合量之比未達 0.8 之抗體之感應圖之例。縱軸為 RU 值（回應）、橫軸為時間。

第 19 圖係噬菌體展示之 Fab 分域與 CD3ε、IL6R 之結合。

第 20 圖係噬菌體展示之 Fab 分域與 CD3ε、人 IgA(hIgA)

之結合。NC 代表對於未固定抗原之板之結合。

第 21 圖係 IgG 化之選殖體之與 CD3ε、人 IgA(hIgA)之結合。

第 22 圖係 IgG 化之選殖體與人 IgA 之結合因 CD3ε 而受阻斷，該選殖體無法和人 IgA(hIgA)及 CD3ε 同時結合之圖。

第 23 圖係噬菌體展示之 Fab 分域與 CD3ε、人 CD154 之結合。NC 代表對於未固定抗原之板之結合。

第 24 圖係 IgG 化之選殖體與 CD3ε、人 CD154 之結合。

第 25 圖係 IgG 化之選殖體和人 CD154 之結合因 CD3ε 而受阻斷，該選殖體無法和人 CD154 及 CD3ε 同時結合之圖。

【實施方式】

【0017】於一態樣，本發明係以序列彼此不同之複數之抗原結合分子為主而成之資料庫，其特徵為：前述抗原結合分子中之抗原結合域係能和第 1 抗原及與該第 1 抗原為不同之第 2 抗原結合，但不同時和該第 1 抗原與該第 2 抗原結合之抗體可變區（以下也稱為本發明之抗體可變區）。本發明之資料庫所含之抗原結合域中，較佳為前述第 1 抗原及前述第 2 抗原中之其中任一抗原為 CD3，另一抗原為在 T 細胞或其他免疫細胞表面表的分子。

【0018】又，於另一態樣，本發明係關於包括能和不同之 3 個抗原（第 1 抗原、第 2 抗原及第 4 抗原）結合但不同時和該 3 個抗原之抗體可變區之抗原結合分子。在此，本發明中，「不同之 3 個抗原」係指第 1 抗原、和該第 1 抗原為不同之第 2 抗原、及和該第 1 抗原及該第 2 抗原為不同之第 4 抗原。

【0019】本說明書中，用語「不同之 2 個抗原」所含之各抗原係以「第 1 抗原」及「第 2 抗原」之用語表達，用語「不同之 3 個抗原」所含之各抗原係以「第 1 抗原」、「第 2 抗原」及「第 4 抗原」之用語表達。

【0020】再者，本發明係關於更包括和前述「不同之 3 個抗原」為不同之抗原即「第 3 抗原」結合之可變區的抗原結合分子。

【0021】本發明中「抗體之可變區」通常意指由 4 個框架區域(FR)及夾在其之間的 3 個互補性決定區域(complementarity-determining region；CDR)構成的區域，只要有和抗原之一部分或全部結合之活性即可，也包括其部分序列。尤其宜為包括抗體輕鏈可變區(VL)與抗體重鏈可變區(VH)之區域為較佳。本發明之抗體之可變區可為任意序列，也可為小鼠抗體、大鼠抗體、兔抗體、山羊抗體、駱駝抗體、及將該等非人抗體予以人化而成的人化抗體、及人抗體等任一來源的抗體之可變區。「人化抗體」，也稱為再構成(reshaped)人抗體。人以外的哺乳動物來源的抗體，例如係將小鼠抗體的互補性決定區域(CDR;complementarity determining region)移植到人抗體之 CDR 者。鑑別 CDR 的方法為公知(Kabat et al., Sequence of Proteins of Immunological Interest (1987), National Institute of Health, Bethesda, Md.; Chothia et al., Nature (1989) 342: 877)。又，其一般的基因重組手法亦為公知（參照歐洲專利申請公開編號 EP 125023 號公報、WO 96/02576 號公報）。

【0022】本發明之「抗體之可變區」，所謂「不和第 1 抗

原與第 2 抗原同時結合」是指本發明之抗體之可變區在和第 1 抗原結合之狀態時，無法和第 2 抗原結合，反之該可變區在和第 2 抗原結合的狀態時，無法和第 1 抗原結合。亦即，本發明之「抗體之可變區（抗體可變區）」之「能夠和第 1 抗原及第 2 抗原結合，但不同時和該第 1 抗原與該第 2 抗原結合」或「和於第 1 抗原及第 2 抗原結合，且不同時和該第 1 抗原與該第 2 抗原結合」，係指本發明之抗體可變區在結合於第 1 抗原之狀態不能和第 2 抗原結合，在未結合於第 1 抗原之狀態能和第 2 抗原結合，反之，該可變區在結合於第 2 抗原之狀態不能和第 1 抗原結合，在未結合於第 2 抗原之狀態能和第 1 抗原結合。在此，「不和第 1 抗原與第 2 抗原同時結合」，也包括表現第 1 抗原表現之細胞與表現第 2 抗原之細胞之 2 個細胞不交聯，或不和分別在各自細胞表現的第 1 抗原與第 2 抗原同時結合。再者，也包括：第 1 抗原與第 2 抗原於係像可溶型蛋白質般不在細胞膜上、或兩者係存在於同一細胞上時，雖能和第 1 抗原與第 2 抗原兩者同時結合，但是在各自不同的細胞上表現時無法同時結合的情形。作為如此的抗體之可變區，只要有該機能即可，不特別限定，例如：將 IgG 型抗體之可變區之一部分胺基酸結合於所望抗原的方式改變而得之可變區。經改變之胺基酸，可選擇例如，和第 1 抗原或第 2 抗原結合之抗體之可變區之中，不因胺基酸改變而喪失和該抗原之結合的胺基酸。

在此，「於不同的細胞上表現」只要在各別細胞上表現即可，如此的細胞的組合，例如：T 細胞和另一 T 細胞之類的同種細胞，也可為 T 細胞與 NK 細胞之類的異種細胞。

【0023】本發明之「抗體之可變區」「不同時和不同之 3 個抗原（第 1 抗原、第 2 抗原及第 4 抗原）結合」，係指本發明之抗體之可變區能同時結合之抗原為該不同之 3 個抗原（亦即 3 種抗原）之中，(A)任 1 種抗原、或(B)任 2 種抗原之組合。

換言之，本發明之抗體之可變區「不同時和不同之 3 個抗原（第 1 抗原、第 2 抗原及第 4 抗原）結合」，係指(A)在和該不同之 3 個抗原（3 種抗原）中之任 1 種抗原結合之狀態，不能和其餘 2 種抗原結合，或(B)在和該不同之 3 個抗原（3 種抗原）中之任 2 種抗原結合之狀態，不能和其餘 1 種抗原結合。上述(A)，具體而言，係指(i) 本發明之抗體之可變區在和第 1 抗原結合之狀態，該可變區不能和第 2 抗原結合也不能和第 4 抗原結合，(ii) 該可變區在和第 2 抗原結合之狀態，該可變區不能和第 1 抗原結合也不能和第 4 抗原結合，(iii) 該可變區在和第 4 抗原結合之狀態，該可變區不能和第 1 抗原結合也不能和第 2 抗原結合。上述(B)，具體而言，係指(i) 本發明之抗體之可變區在和第 1 抗原及第 2 抗原結合之狀態，該可變區不能和第 4 抗原結合，(ii) 本發明之抗體之可變區在和第 1 抗原及第 4 抗原結合之狀態，該可變區不能和第 2 抗原結合，(iii) 本發明之抗體之可變區在和第 2 抗原及第 4 抗原結合之狀態，該可變區不能和第 1 抗原結合。

本發明之抗體之可變區，宜不能同時和不同之 3 個抗原，亦即，不能同時和第 1 抗原、第 2 抗原及第 4 抗原結合，除此以外，也不同時和第 1 抗原及第 2 抗原結合、不同時和第 1 抗原及第 4 抗原結合，及/或不同時和第 2 抗原及第 4 抗原結合

較佳。

最佳為本發明之抗體之可變區不同時和選自由第 1 抗原、第 2 抗原及第 4 抗原構成之群組中之至少 2 種以上之抗原結合（亦即，不同時和第 1 抗原與第 2 抗原之組合、第 1 抗原與第 4 抗原之組合、第 2 抗原與第 4 抗原之組合、第 1 抗原與第 2 抗原與第 4 抗原之組合結合）。

在此，「不同時和不同之 3 個抗原（第 1 抗原、第 2 抗原及第 4 抗原）結合」，也包括以下情形：選自由表現第 1 抗原之細胞、表現第 2 抗原之細胞、及表現第 4 抗原之細胞構成之群組中之 2 種以上之細胞不交聯、或不同時結合於在各自之細胞表現之由第 1 抗原、第 2 抗原及第 4 抗原構成之群組中之 2 種以上之抗原。再者，也包括以下的情形：不同之 3 個抗原（第 1 抗原、第 2 抗原及第 4 抗原）中之任 1 種以上之抗原不在如可溶型蛋白質之細胞膜上表現、或當不同之 3 個抗原中之任 2 種以上存在於同一細胞上時，對於此等抗原能同時結合，但當在各自不同的細胞上表現時不能同時結合。作為如此之抗體之可變區，只要有該機能即可，並不特別限定，例如，IgG 型抗體之可變區之一部分胺基酸改變為結合於所望抗原之可變區。

【0024】本發明之胺基酸改變可單獨使用也可使用多種。

使用多種時，組合數不特別限定，可於能達成發明目的之範圍內適當設定，例如，2 個以上 30 個以下，較佳為 2 個以上 25 個以下、2 個以上 22 個以下、2 個以上 20 個以下、2 個以上 15 個以下、2 個以上 10 個以下、2 個以上 5 個以下、2 個以上 3 個以下。

複數組合時，可只對抗體之重鏈可變區或輕鏈可變區施以該胺基酸改變，也可對於重鏈可變區與輕鏈可變區兩者適當區分施加。

【0025】改變的胺基酸殘基（改變胺基酸）只要能維持其抗原結合活性即可，可容許可變區中之 1 或多數胺基酸殘基改變。改變可變區之胺基酸時，不特別限定，宜維持改變前之抗體之結合活性較佳，例如：宜和改變前相較，有 50%以上，較佳為 80%以上，更佳為 100%以上的結合活性。又，也可利用胺基酸改變而結合活性上昇，例如宜和結合活性改變前相較，成為 2 倍、5 倍、10 倍等。

【0026】作為用以胺基酸改變之理想區域，可列舉可變區中之露出於溶劑之區域及迴圈區域。其中，CDR1、CDR2、CDR3、FR3 區域、及迴圈區域為較佳。具體而言，H 鏈可變區之 Kabat 編號 31~35、50~65、71~74、95~102、及 L 鏈可變區之 Kabat 編號 24~34、50~56、89~97 較理想，H 鏈可變區之 Kabat 編號 31、52a~61、71~74、97~101、及 L 鏈可變區之 Kabat 編號 24~34、51~56、89~96 更理想。又，胺基酸改變時，也可一併導入使和抗原之結合活性上昇的胺基酸。

【0027】又，本發明中「迴圈區域」，係指不涉及免疫球蛋白之 β 筒狀結構之維持的殘基所存在的區域。

本發明中，胺基酸之改變係指取代、缺失、附加、插入、或修飾中任一者、或此等的組合。本發明中，胺基酸之改變也可改稱胺基酸之變異，以相同含意使用。

【0028】取代胺基酸殘基時，目的為藉由取代為其他胺基

酸殘基，而針對例如以下(a)~(c)的點加以改變。(a) 片結構、或、螺旋結構的區域中的多肽的骨幹結構；(b) 標的部位的電荷或疏水性、或(c) 側鏈大小。

胺基酸殘基依據一般側鏈的特性分類為以下群：(1) 疏水性：正白胺酸、met、ala、val、leu、ile；(2) 中性親水性：cys、ser、thr、asn、gln；(3) 酸性：asp、glu；(4) 鹼性：his、lys、arg；(5) 影響鏈配向之殘基：gly、pro；及(6) 芳香族性：trp、tyr、phe。

【0029】該等各群內的胺基酸殘基的取代稱為保守性取代，另一方面，他群間彼此的胺基酸殘基的取代稱為非保守性取代。

本發明中的取代可為保守性取代，也可為非保守性取代，且也可為保守性取代與非保守性取代之組合。

【0030】又，對於胺基酸殘基施加改變，也包括：從可和第1抗原或第2抗原結合之抗體之可變區當中不因胺基酸改變而喪失向該抗原之結合之胺基酸予以隨機改變者當中，選擇會和第1抗原與第2抗原結合但不能和該等抗原同時結合之可變區、或也包括預先將已知對於所望抗原有結合活性之胜肽插入到上述區域之改變。又，選擇會和第1抗原、第2抗原或第4抗原結合之抗體可變區當中，不因胺基酸改變而喪失向該抗原之結合之胺基酸予以隨機改變而得者之中能和第1抗原、第2抗原及第4抗原結合但和該等抗原不能同時結合的可變區、或預先將已知具有對於所望抗原有結合活性的胜肽插入上述區域之改變。預先已知對於所望抗原有結合活性的胜肽，例如：S

表 1 所示胜肽。

【0031】

【表 1】

結合伙伴/ 關心對象的 蛋白質	參考文獻
VEGFR	J Biol Chem. 2002 Nov 8;277(45):43137-42. Epub 2002 Aug 14.,EMBO J. 2000 Apr 3;19(7):1525-33.,J Med Chem. 2010 Jun 10;53(11):4428-40.
TNFR	Mol Immunol. 2004 Jul;41(8):741-9.,Eur J Pharmacol. 2011 Apr 10;656(1-3):119-24.
TLR5	J Immunol 2010;185;1744-1754
TLR4	PLoS ONE, February 2012 | Volume 7 | Issue 2 | e30839
TLR2	WO2006/083706A2,
T 細胞 VLA 受體	Int Immunopharmacol. 2003 Mar;3(3):435-43.
PDGFR	Biochemical Pharmacology(2003), 66(7), 1307-1317, FEBS Lett. 1997 Dec 15;419(2-3):166-70.
Naip5(NLR)	NATURE IMMUNOLOGY VOLUME 9 NUMBER 10 OCTOBER 2008 1171-
整合素	WO 95/14714,WO 97/08203, WO 98/10795,WO 99/24462, J. Biol. Chem. 274: 1979-1985
FcgRIIa	J Biol Chem. 2009 Jan 9;284(2):1126-35
EGFR	Journal of Biotechnology(2005), 116(3) 211-219
DR5 致效劑	Journal of Biotechnology(2006), 361(3) 522-536
CXCR4	Science 330, 1066 (2010);Vol. 330 no. 6007 pp. 1066-1071
CD40	Eur J Biochem. 2003 May;270(10):2287-94.
CD154	J Mol Med (Berl). 2009 Feb;87(2):181-97.

【0032】本發明之一態樣中，提供一種抗原結合分子，包含以能和第 1 抗原以及和該第 1 抗原不同的第 2 抗原結合但是不和第 1 抗原與第 2 抗原同時結合的方式將重鏈可變區之胺基酸予以改變而得之抗體之可變區。本發明之另一態樣提供一種抗原結合分子，包括以能和不同的 3 個抗原（第 1 抗原、第 2 抗原、及第 4 抗原）結合但不和該 3 個抗原同時結合的方式改變重鏈可變區之胺基酸的抗體可變區。例如，藉由將上述胺基酸改變（取代、缺失、附加、插入、或修飾中之任一者、或此

等之組合）導入到重鏈可變區，能製作可和第 1 抗原以及與該第 1 抗原不同之第 2 抗原結合但不和第 1 抗原與第 2 抗原同時結合的抗體之可變區，或是能和不同的 3 個抗原（第 1 抗原、第 2 抗原、及第 4 抗原）結合但不和該 3 個抗原同時結合之抗體可變區。導入胺基酸改變的位置宜為重鏈可變區，作為更理想的區域，可列舉可變區中露出於溶劑之區域及迴圈區域。其中，CDR1、CDR2、CDR3、FR3 區域、及迴圈區域為較佳。具體而言，H 鏈可變區之 Kabat 編號 31~35、50~65、71~74、95~102 較理想，H 鏈可變區之 Kabat 編號 31、52a~61、71~74、97~101 更理想。又，胺基酸改變時，也可一併導入使和抗原之結合活性上昇的胺基酸。

【0033】本發明之抗體之可變區，除了上述改變，還可組合公知之改變。例如：可變區之 N 末端之麩醯胺酸利用焦麩胺醯基化而修飾為焦麩胺酸係該領域中通常知識者熟知的修飾。因此本發明之抗體，於其重鏈之 N 末端為麩醯胺酸時，包括其修飾成焦麩胺酸而成的可變區。

【0034】又，例如：對於該等抗體之可變區，為了改善向抗原之結合、藥物動態、安定性、抗原性，也可進一步導入胺基酸改變。本發明之抗體之可變區，可藉由施以對抗原有 pH 依存性結合性之改變，能對抗原重複結合(WO/2009/125825)。

【0035】又，例如：也可對於該等抗體之和第 3 抗原結合之可變區，施加能因應標的組織專一性化合物之濃度而改變對於抗原之結合活性之胺基酸改變(WO2013/180200)。

【0036】又，可變區之改變會使結合活性上升、專一性改s

善、pI下降，對於抗原之結合賦予pH依存的性質、結合熱安定性改善、溶解性改善、對於化學修飾之安定性、來自於糖鏈之異質性(heterogeneity)之改善、免疫原性下降的現象，可使用經電腦模擬(in silico)預測鑑定，或利用使用體外(in vitro)的T細胞的分析鑑定之T細胞抗原決定部位的規避、或活化調節性T細胞之T細胞抗原決定部位之導入等作為目的而實施(mAbs 3:243-247、2011)

【0037】本發明之抗體之可變區是否「能和第1抗原與第2抗原結合」，可使用公知之方法測定。

例如，可利用電化學發光法(ECL法)測定(BMC Research Notes 2011, 4:281)。

具體而言，例如：使由經生物素標記之待驗抗原結合分子之能和第1抗原與第2抗原結合之區域，例如，由Fab區構成之低分子化抗體、或一價性抗體（通常的抗體所擁有之2個Fab區中的1個沒有的抗體），混合經sulfo-tag(Ru錯合物)標記的第1抗原或第2抗原，添加在鏈黴抗生物素蛋白固相化板上。此時經生物素標記之待驗抗原結合分子會與板上之鏈黴抗生物素蛋白結合。藉由使Sulfo-tag發光，利用ector Imager 600、2400(MSD)等以檢測其發光信號，能確認第1抗原或第2抗原和待驗抗原結合分子之上述區域間之結合。

又，也可利用ELISA、FACS(fluorescence activated cell sorting)、ALPHAscreen(Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay)、利用表面電漿子共振(SPR)現象之BIACORE法等進行測定(Proc.Natl.Acad.Sci.USA (2006) 103

(11), 4005-4010)。

【0038】具體而言，例如，可使用利用表面電漿子共振(SPR)現象之交互作用解析設備 Biacore(GE Healthcare)測定。Biacore 包括 Biacore T100、T200、X100、A100、4000、3000、2000、1000、C 等任一機種。感應晶片可使用 CM7、CM5、CM4、CM3、C1、SA、NTA、L1、HPA，Au 晶片等任一 Biacore 用感應晶片。於感應晶片上利用胺偶聯、雙硫鍵偶聯、醛偶聯等偶聯方法將捕捉本發明之抗原結合分子捕捉之 ProteinA、ProteinG、ProteinL、抗人 IgG 抗體、抗人 IgG-Fab、抗人 L 鏈抗體、抗人 Fc 抗體、抗原蛋白質、抗原胜肽等捕捉用蛋白質固定化。使第 1 抗原或第 2 抗原作為分析物流入此晶片，並測定交互作用，取得感應圖。此時之第 1 抗原或第 2 抗原濃度，可配合測定樣本之 KD 等交互作用的強度，於數 μM 至數 pM 之範圍內實施。

【0039】又，也可不是固定抗原結合分子，而是將第 1 抗原或第 2 抗原固定在感應晶片上，並使其和欲評價之抗體樣本交互作用。從交互作用之感應圖算出之解離常數(KD)值、或使抗原結合分子樣本作用前後之感應圖之增加程度，能判斷本發明之抗原結合分子之抗體可變區是否對於第 1 抗原或第 2 抗原有結合活性。

【0040】ALPHAscreen，係使用提供者(donor)與接受者(acceptor)的 2 種珠粒，利用 ALPHA 技術依下列原理實施。和提供者珠粒已結合的分子，會與和接受者珠粒已結合的分子進行生物學交互作用，而僅於 2 個珠粒接近的狀態時方檢測到發

光信號。因雷射而激發的提供者珠粒內的光敏劑會將周圍的氧變換為激發狀態之單線態氧。單線態氧向提供者珠粒周邊擴散，若到達接近的接受者珠粒，則引起珠粒內的化學發光反應，最終放出光。若與提供者珠粒結合之分子和與接受者珠粒結合之分子不交互作用時，提供者珠粒產生之單線態氧不會到達接受者珠粒，不引起化學發光反應。

【0041】將觀察交互作用的物質中之一者（配體）固定在感應晶片的金薄膜上，若光從感應晶片的內側照到金薄膜與玻璃之交界面而發生全反射，則會形成反射光的一部分的反射強度降低的部分（SPR 信號）。若觀察交互作用之物質的另一者（分析物）流到感應晶片表面並且配體和分析物結合，則固定化配體分子的質量增加，並且感應晶片表面之溶劑之折射率變化。由於此折射率之變化，PR 信號之位置偏移（反之若結合解離，則信號位置回復）。Biacore 系統取上述偏移之量，亦即在感應晶片表面的質量變化為縱軸，將質量之時間變化作為測定數據顯示（感應圖）。從感應圖求出分析物對於在感應晶片表面捕捉之配體的結合量（使分析物交互作用前後在感應圖上之回應之變化量）。惟，結合量也依存於配體量，所以比較時，須在將配體量視為本質為同量的條件下進行比較。又，從感應圖的曲線可求出動力學：結合速度常數(ka)與解離速度常數(kd)，從該常數之比可求出親和性(KD)。BIACORE 法也可理想地用在抑制測定法。抑制測定法例如記載於 Proc.Natl.Acad. Sci.USA (2006) 103 (11), 4005-4010。

【0042】本發明之抗體之可變區是否「能結合於不同之 3

個抗原（第 1 抗原、第 2 抗原、及第 4 抗原）」，可由該技術領域中具有通常知識者依據上述公知方法，例如使用電化學發光法(ECL)法適當測定。

【0043】本發明之抗原結合分子是否「不和第 1 抗原與第 2 抗原同時結合」，可使用上述方法測定以下事項以確認：確認對於第 1 抗原及第 2 抗原有結合活性後，對於包括有該結合活性之可變區之抗原結合分子，先使第 1 抗原或第 2 抗原中任一者結合後，確認是否和其餘的一者有結合活性。

又，抗原結合分子向已固定在 ELISA 板或感應晶片之第 1 抗原或第 2 抗原中任一者的結合，也可藉由測定是否因將另一者添加在溶液中能抑制以確認。

【0044】具體而言，例如，使用 ECL 法時，準備經生物素標記之待驗抗原結合分子、經 sulfo-tag(Ru 錯合物)標記之第 1 抗原與未經標記之第 2 抗原。待驗抗原結合分子能和第 1 抗原與第 2 抗原結合但不和第 1 抗原與第 2 抗原同時結合的情形，於未經標記之第 2 抗原非存在下，將待驗抗原結合分子與第 1 抗原之混合物添加到鏈黴抗生物素蛋白固相化板上，使 Sulfo-tag 發光的話，會檢測到其發光信號，但於第 2 抗原存在下則發光信號減少。藉由將此發光信號之減少予以定量，可決定相對的結合活性。

【0045】又，ALPHAscreen 的情形，於互相競爭的第 2 抗原非存在下，待驗抗原結合分子會和第 1 抗原交互作用並產生 520-620nm 的信號。未標記的第 2 抗原會和待驗抗原結合分子與第 1 抗原間之交互作用進行競爭。將競爭之結果表達出的螢

光減少予以定量，可決定相對的結合活性。多肽使用Sulfo-NHS-生物素等予以生物素化係為公知。將第 1 抗原以GST 予以加標籤的方法，可適當採用以下方法：把將編碼為第1抗原之多核苷酸與編碼為 GST之多核苷酸於讀框內融合成的融合基因於保持能表現之載體的細胞等中表現，並使用谷胱甘肽管柱精製之方法等。獲得之信號例如使用 GRAPHPAD PRISM(GraphPad 公司、San Diego)等軟體，以利用非線形迴歸解析之一部位競爭(one-site competition)模型擬合，可理想地解析。此時，第 2 抗原予以標籤化、第 1 抗原不標籤化，也可同樣地解析。

又，也可使用利用螢光共振能量移動(FRET; Fluorescence Resonance Energy Transfer)之方法。FRET 係接近的 2 個螢光分子之間，激發能量因電子共振而直接移動的現象。若發生FRET，提供者（處於激發狀態之螢光分子）的激發能量會向接受者（處於提供者附近的另 1 個螢光分子）移動，所以從提供者發射的螢光消失（正確說，是螢光壽命縮短），而代之以從接受者發射螢光。使用此現象能解析是否為雙 Fab(dual-Fab)。例如，若已導入螢光提供者之第 1 抗原與已導入螢光接受者的第 2 抗原和待驗抗原結合分子同時結合，則提供者之螢光消失，且從接受者發出螢光，故出現螢光波長變化。如此的抗體可判斷不是雙 Fab(dual-Fab)。另一方面，將第 1 抗原、第 2 抗原、待驗抗原結合分子混合時，若已和第 1 抗原結合之螢光提供者之螢光波長不變化，可判斷此待驗抗原結合分子為雙Fab(dual-Fab)。

【0046】又，例如，於提供者珠粒，有生物素標記之待驗抗原結合分子會和提供者珠粒上之鏈黴抗生物素蛋白結合，接受者珠粒則有經谷胱甘肽 S 轉移酶(GST)標籤化的第 1 抗原結合。於競爭之第 2 抗原非存在下，待驗抗原結合分子與第 1 抗原會交互作用並發出 520-620nm 之信號。未經標籤化的第 2 抗原，會和待驗抗原結合分子與第 1 抗原間之交互作用競爭。藉由將競爭之結果表達之螢光之減少予以定量，可決定相對的結合活性。將多肽使用 Sulfo-NHS-生物素等予以生物素化係公知。作為將第 1 抗原以 GST 標籤化的方法，可適當採用以下方法：把將編碼為第 1 抗原之多核苷酸與編碼為 GST 之多核苷酸於讀框內融合成的融合基因於保持能表現之載體的細胞等中表現，並使用谷胱甘肽管柱精製之方法等。獲得之信號例如使用 GRAPHPAD PRISM(GraphPad 公司、San Diego)等軟體，以利用非線形迴歸解析之一部位競爭(one-site competition)模型擬合，可理想地解析。

【0047】又，加標籤不限 GST，也可為如組胺酸標籤、MBP、CBP、Flag 標籤、HA 標籤、V5 標籤、c-myc 標籤等的標籤，無限定。又，針對待驗抗原結合分子向提供者珠粒之結合，不限於利用生物素-鏈黴抗生物素蛋白反應之結合。尤其待驗抗原結合分子包括 Fc 時，可考慮介由提供者珠粒上之 Protein A、Protein G 等 Fc 認識蛋白質使待驗抗原結合分子結合之方法。

【0048】又，針對第 1 抗原與第 2 抗原為可溶型蛋白質般未在細胞膜上表現時，或兩者存在於同一細胞上時，能和第 1

抗原與第 2 抗原兩者同時結合，但分別在不同的細胞上表現時，無法同時結合的情形，也可使用公知方法測定。

具體而言，即使在檢測對於第 1 抗原與第 2 抗原同時結合之 ECL-ELISA 為陽性，若分別表現第 1 抗原之細胞與表現第 2 抗原之細胞及待驗抗原結合分子混合時，此等 3 者不同時結合，則代表在不同的細胞上表現時無法同時結合。例如：可利用使用細胞之 ECL-ELISA 法測定。預先將表現第 1 抗原之細胞固定於板，使待驗抗原結合分子結合後，加入表現第 2 抗原之細胞。藉由使用只在表現第 2 抗原之細胞中表現的對抗其他抗原之 sulfo-tag 標記抗體進行檢測，於和在 2 個細胞上表現的 2 個抗原同時結合的情形，會觀測到信號，未同時結合時則未觀測到信號。

或也可利用 alphascreen 法測定。當經已結合提供者珠粒之表現第 1 抗原之細胞、與已結合接受者珠粒之表現第 2 抗原之細胞、與待驗抗原結合分子混合時，於和在 2 個細胞上表現的 2 個抗原同時結合的情形，會觀測到信號，未同時結合時則未觀測到信號。

或可利用使用 Octet 之交互作用解析法測定。首先，使附加胜肽標籤之表現第 1 抗原之細胞結合於認識胜肽標籤之生物感測子(biosensor)。在已放入表現第 2 抗原之細胞與待驗抗原結合分子的井內進行交互作用解析時，若和在 2 個細胞上表現的 2 個抗原同時結合，則待驗抗原結合分子與表現第 2 抗原之細胞因為和生物感測子結合而觀測到大的波長偏移，未同時結合時，只有待驗抗原結合分子和生物感測子結合，故觀測到小

的波長偏移。

【0049】或也可不利用結合活性，而是利用生物活性測定。例如：當將表現第 1 抗原之細胞與表現第 2 抗原之細胞與待驗抗原結合分子進行混合培養時，當和在 2 個細胞上表現之 2 個抗原同時結合時，因介由待驗抗原結合分子而相互活化，故可檢測到各抗原的下游的磷酸化增加等活化信號的變化。或就活化之結果，誘導細胞介素產生，故藉由測定細胞介素之產生量，可判斷是否和 2 個細胞同時結合。

【0050】本發明之抗原結合分子是否「不同時和不同之 3 個抗原結合」，例如可確認對於不同之 3 個抗原（第 1 抗原、第 2 抗原、及第 4 抗原）有結合活性後，依據上述公知方法，使用例如電化學發光法(ECL)法等由該技術領域中有通常知識者適當測定。

【0051】本發明中，「Fc 區」係指包括由抗體分子中之鉸鏈部或其一部分、CH2、CH3 分域之片段的區域。IgG 類別的 Fc 區，以 EU 編號(本說明書也稱為 EU INDEX)，指例如 226 號之半胱胺酸至 C 末端、或 230 號之脯胺酸至 C 末端，但不限於此。Fc 區，可藉由將 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 單株抗體等以胃蛋白酶等蛋白質分解酵素進行部分消化後，將已吸附於蛋白質 A 管柱或蛋白質 G 管柱之級分予以再溶出以理想地取得。作為該蛋白分解酵素，只要是可利用適當設定 pH 等酵素的反應條件，以限制性地產生 Fab、$F(ab')_2$ 的方式將全長抗體消化者即可，無特殊限定，例如：胃蛋白酶、木瓜酶等。

【0052】本發明中，「抗原結合分子」只要是包括本發明

之「抗體之可變區」的分子即可，不特別限定，也包括有5個胺基酸左右以上的長度的胜肽、蛋白質。不限於生物來源的胜肽、蛋白質，例如，可為由人工設計的序列構成的多肽。又，天然多肽、或合成多肽、重組多肽等均可。

【0053】本發明之抗原結合分子之理想例，可舉包括抗體之Fc區之抗原結合分子。

【0054】本發明之「Fc區」，可使用例如：天然型IgG來源的Fc區。在此，天然型IgG，係指包括和天然發現的IgG有同一胺基酸序列，且屬於利用免疫球蛋白gamma基因實質編碼的抗體的類別的多肽。例如天然型人IgG，係指天然型人IgG1、天然型人IgG2、天然型人IgG3、天然型人IgG4等。天然型IgG也包括由其自然產生之變異體等。作為人IgG1、人IgG2、人IgG3、人IgG4抗體之不變區，因基因多型所得之多數異型序列已記載於Sequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No.91-3242，本發明中可為其任一者。尤其人IgG1之序列，EU編號356-358號之胺基酸序列為DEL也可為EEM。

【0055】抗體之Fc區，例如存在IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM類型的Fc區。本發明之抗體之Fc區，可使用例如天然型人IgG抗體來源的Fc區。作為本發明之Fc區，可使用例如：天然型IgG之不變區，具體而言，以天然型人IgG1為起源之不變區（序列辨識號：1）、以天然型人IgG2為起源之不變區(序列辨識號：2)、以天然型人IgG3為起源之不變區（序列辨識號：3）、以天然型人IgG4為起源

之不變區（序列辨識號：4）來源的 Fc 區。天然型 IgG 之不變區也包括由此自然產生的變異體等。

【0056】作為本發明之 Fc 區，對於其 Fcγ 受體之結合活性低的 Fc 區為較佳。在此，Fcγ 受體（本說明書有時記載為 Fcγ 受體、FcγR 或 Fcγ 受體），係指能和 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 之 Fc 區結合之受體，也意指實質上由 Fcγ 受體基因編碼的蛋白質家族的各種成員。人的話，此家族包括：含有 FcγRIa、FcγRIb 及 FcγRIc 之 FcγRI(CD64)；FcγRIIa（包含異型 H131(H 型)及 R131(R 型)）、FcγRIIb（包含 FcγRIIb-1 及 FcγRIIb-2）及包含 FcγRIIc 之 FcγRII(CD32)；及含有 FcγRIIIa（包含異型 V158 及 F158）及 FcγRIIIb（包含異型 FcγRIIIb-NA1 及 FcγRIIIb-NA2）之 FcγRIII(CD16)、及各種未發現的人 FcγR 類或 FcγR 或異型，但不限於此等。FcγR 包括人、小鼠、大鼠、兔及猴來源者，但不限於此等，可為各種生物來源。小鼠 FcγR 類，包括 FcγRI(CD64)、FcγRII(CD32)、FcγRIII(CD16)及 FcγRIII-2(CD16-2)、及各種未發現的小鼠 FcγR 類或 FcγR 或異型，但不限於此等。如此的 Fcγ 受體的理想例，可列舉人 FcγRI(CD64)、FcγRIIa(CD32)、FcγRIIb(CD32)、FcγRIIIa(CD16)及/或 FcγRIIIb(CD16)。

【0057】FcγR 存在帶有 ITAM(Immunoreceptor tyrosine-based activation motif)之活性型受體與帶有 ITIM(immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif)之抑制型受體。FcγR 分類為：FcγRI、FcγRIIa R、FcγRIIa H、FcγRIIIa、FcγRIIIb 之活性型 FcγR、及 FcγRIIb 之抑制型 FcγR。

FcγRI之多核苷酸序列及胺基酸序列各記載於NM_000566.3及NP_000557.1，FcγRIIa之多核苷酸序列及胺基酸序列各記載於BC020823.1及AAH20823.1，FcγRIIb之多核苷酸序列及胺基酸序列各記載於BC146678.1及AAI46679.1，FcγRIIIa之多核苷酸序列及胺基酸序列各記載於BC033678.1及AAH33678.1，及FcγRIIIb之多核苷酸序列及胺基酸序列各記載於BC128562.1及AAI28563.1（RefSeq註冊編號）。又，FcγRIIa存在FcγRIIa之131號之胺基酸取代為組胺酸(H型)或精胺酸(R型)的2種基因多型(J. Exp. Med, 172, 19-25, 1990)。又，FcγRIIb存在FcγRIIb之232號之胺基酸取代為異白胺酸(I型)或蘇胺酸(T型)之2種基因多型(Arthritis. Rheum. 46: 1242-1254 (2002))。又，FcγRIIIa存在FcγRIIIa之158號之胺基酸取代為纈胺酸(V型)或苯丙胺酸(F型)之2種基因多型(J. Clin. Invest. 100(5): 1059-1070 (1997))。又，FcγRIIIb存在NA1型、NA2型之2種基因多型(J. Clin. Invest. 85: 1287-1295 (1990))。

【0058】對於Fcγ受體之結合活性是否低落，可依FACS、ELISA格式、ALPHAscreen(Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay)、利用表面電漿子共振(SPR)現象之BIACORE法等周知方法確認(Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103 (11), 4005-4010)。

ALPHAscreen，係使用提供者(donor)與接受者(acceptor)的2種珠粒，利用ALPHA技術依下列原理實施。和提供者珠粒已結合的分子，會與和接受者珠粒已結合的分子進行生物學

交互作用，而僅於2個珠粒接近的狀態時方檢測到發光信號。因雷射而激發的提供者珠粒內的光敏劑會將周圍的氧變換為激發狀態之單線態氧。單線態氧向提供者珠粒周邊擴散，若到達接近的接受者珠粒，則引起珠粒內的化學發光反應，最終放出光。若與提供者珠粒結合之分子和與接受者珠粒結合之分子不交互作用時，提供者珠粒產生之單線態氧不會到達接受者珠粒，不引起化學發光反應。

【0059】例如，提供者珠粒有經生物素標記之抗原結合分子結合，接受者珠粒有經谷胱甘肽S轉移酶(GST)加標籤之Fcγ受體結合。於有競爭之變異Fc區之抗原結合分子非存在下，有野生型Fc區之抗原結合分子與Fcγ受體交互作用並產生520-620nm之信號。有未加標籤的變異Fc區的抗原結合分子，會和有野生型Fc區之抗原結合分子與Fcγ受體間之交互作用競爭。藉由將表達競爭之結果之螢光之減少予以定量，可決定相對的結合親和性。將抗體等抗原結合分子使用Sulfo-NHS-生物素等予以生物素化係公知。Fcγ受體以GST予以加標籤之方法，可適當採用以下方法：把將編碼為Fcγ受體之多核苷酸與編碼為GST之多核苷酸於讀框內融合成的融合基因於保持能表現之載體的細胞等中表現，並使用谷胱甘肽管柱精製之方法等。獲得之信號例如使用GRAPHPAD PRISM(GraphPad公司、San Diego)等軟體，以利用非線形迴歸解析之一部位競爭(one-site competition)模型擬合，可理想地解析。

【0060】將觀察交互作用的物質中之一者(配體)固定在感應晶片的金薄膜上，若光從感應晶片的內側照到金薄膜與玻璃

之交界面而發生全反射，則會形成反射光的一部分的反射強度降低的部分（SPR 信號）。若觀察交互作用之物質的另一者（分析物）流到感應晶片表面並且配體和分析物結合，則固定化配體分子的質量增加，並且感應晶片表面之溶劑之折射率變化。由於此折射率之變化，SPR 信號之位置偏移（反之若結合解離，則信號位置回復）。Biacore 系統取上述偏移之量，亦即在感應晶片表面的質量變化為縱軸，將質量之時間變化作為測定數據顯示（感應圖）。又，從感應圖的曲線可求出動力學：結合速度常數(ka)與解離速度常數(kd)，從該常數之比可求出親和性(KD)。BIACORE 法也可理想地用在抑制測定法。抑制測定法例如記載於 Proc.Natl.Acad.Sci.USA (2006) 103 (11), 4005-4010。

【0061】本說明書中，對於 Fcγ 受體之結合活性低落，例如指基於上述解析方法，和包括作為對照之 Fc 區之抗原結合分子之結合活性進行比較，待驗抗原結合分子之結合活性為50%以下，較佳為 45%以下、40%以下、35%以下、30%以下、20%以下、15%以下，尤佳為 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%以下之結合活性者。

作為對照之抗原結合分子，可適當使用有 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 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辨識號：1（RefSeq 註冊編號 AAC82527.1 之 N 末有 A 附加）、序列辨識號：2（RefSeq 註冊編號 AAB59393.1 之 N 末有 A 附加）、序列辨識號：3（RefSeq 註冊編號 CAA27268.1

之 N 末有 A 附加）、序列辨識號：4（RefSeq 註冊編號 AAB59394.1 之 N 末有 A 附加）。又，使用有特定抗體之 Fc 區之變異體的抗原結合分子作為待驗物質時，藉由使用有該特定之抗體之 Fc 區之抗原結合分子作為對照，可驗證該變異體擁有之變異所致對於 Fcγ 受體之結合活性的效果。依上述，可適當製作已驗證有對於 Fcγ 受體之結合活性低落的 Fc 區之變異體的抗原結合分子。

【0062】作為如此的變異體，例如依 EU 編號指定的胺基酸 231A-238S 之缺失(WO 2009/011941)、C226S, C229S, P238S, (C220S)(J.Rheumatol (2007) 34, 11)、C226S, C229S(Hum. Antibod.Hybridomas (1990) 1(1), 47-54)、C226S, C229S, E233P, L234V, L235A(Blood (2007) 109, 1185-1192)等變異體為公知。

亦即，具有構成特定抗體之 Fc 區之胺基酸中依 EU 編號指定之下列任一胺基酸；220 位、226 位、229 位、231 位、232 位、233 位、234 位、235 位、236 位、237 位、238 位、239 位、240 位、264 位、265 位、266 位、267 位、269 位、270 位、295 位、296 位、297 位、298 位、299 位、300 位、325 位、327 位、328 位、329 位、330 位、331 位、332 位有取代之 Fc 區之抗原結合分子為理想例。Fc 區之起源抗體之不特別限定，可適當利用以 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 單株抗體為起源之 Fc 區，可適當利用以天然型人 IgG1 抗體為起源之 Fc 區。

例如，具施以構成 IgG1 抗體之 Fc 區之胺基酸之中依 EU 編號指定之下列任一取代的 Fc 區、或具 231 位至 238 位之胺基酸序列缺失之 Fc 區的抗原結合分子也可適當使用（數字代

表依 EU 編號指定之胺基酸殘基之位置、位於數字前之單字母胺基酸記號代表取代前之胺基酸殘基、位於數字後之單字母胺基酸記號代表取代前之胺基酸殘基）；

(a) L234F、L235E、P331S、

(b) C226S、C229S、P238S、

(c) C226S、C229S、

(d) C226S、C229S、E233P、L234V、L235A。

【0063】又，具有施以構成 IgG2 抗體之 Fc 區之胺基酸中之依 EU 編號指定之下列任一取代的 Fc 區的抗原結合分子也可適當使用（數字代表依 EU 編號指定之胺基酸殘基之位置、位於數字前之單字母胺基酸記號代表取代前之胺基酸殘基、位於數字後之單字母胺基酸記號代表取代前之胺基酸殘基）；

(e) H268Q、V309L、A330S、P331S

(f) V234A

(g) G237A

(h) V234A、G237A

(i) A235E、G237A

(j) V234A、A235E、G237A。

【0064】又，也可適當使用具有施以構成 IgG3 抗體之 Fc 區之胺基酸中之依 EU 編號指定之下列任一取代之 Fc 區的抗原結合分子（數字代表依 EU 編號指定之胺基酸殘基之位置、位於數字前之單字母胺基酸記號代表取代前之胺基酸殘基、位於數字後之單字母胺基酸記號代表取代前之胺基酸殘基）；

(k) F241A

(l) D265A

(m) V264A。

【0065】又，也可適當使用具有施以構成 IgG4 抗體之 Fc 區之胺基酸中之依 EU 編號指定之下列任一取代之 Fc 區之抗原結合分子（數字代表依 EU 編號指定之胺基酸殘基之位置、位於數字前之單字母胺基酸記號代表取代前之胺基酸殘基、位於數字後之單字母胺基酸記號代表取代前之胺基酸殘基）；

(n) L235A、G237A、E318A

(o) L235E

(p) F234A、L235A。

【0066】作為其他理想例，可列舉具有構成天然型人 IgG1 抗體之 Fc 區之胺基酸中之依 EU 編號指定之下列任一胺基酸；233 位、234 位、235 位、236 位、237 位、327 位、330 位、331 位取代為對應之 IgG2 或 IgG4 中之其 EU 編號所對應之胺基酸之 Fc 區的抗原結合分子。

【0067】作為其他理想例，可列舉具有構成天然型人 IgG1 抗體之 Fc 區之胺基酸中之依 EU 編號指定之下列任一或更多胺基酸；234 位、235 位、297 位取代為其他胺基酸之 Fc 區的抗原結合分子為理想例。取代後存在之胺基酸之種類不特別限定，具 234 位、235 位、297 位中之任一或更多的胺基酸取代為丙胺酸之 Fc 區之抗原結合分子尤佳。

【0068】作為其他理想例，具有構成 IgG1 抗體之 Fc 區之胺基酸中之依 EU 編號指定之下列任一胺基酸；265 位取代為其他胺基酸之 Fc 區之抗原結合分子為理想例。取代後存在之

胺基酸之種類不特別限定，尤其具265位之胺基酸取代為丙胺酸之Fc區之抗原結合分子尤佳。

【0069】又，本發明之「抗原結合分子」之理想態樣之一，可列舉包含本發明之抗體之可變區之多專一性抗體。

【0070】多專一性抗體之締合化可應用在抗體H鏈之第2不變區(CH2)或H鏈之第3不變區(CH3)的界面導入電荷性排斥而抑制非目的之H鏈彼此的締合的技術(WO2006/106905)。

於在CH2或CH3的界面導入電荷性排斥而抑制未意欲之H鏈彼此之締合的技術，於H鏈之其他不變區界面接觸之胺基酸殘基，例如和CH3區中之EU編號356號之殘基、EU編號439號之殘基、EU編號357號之殘基、EU編號370號之殘基、EU編號399號之殘基、EU編號409號之殘基相對的區域。

【0071】更具體而言，可為：例如於包含2種H鏈CH3區之抗體，第1H鏈CH3區中之以下(1)~(3)所示之胺基酸殘基之群組選出的1組至3組胺基酸殘基有同種電荷之抗體；(1) 為H鏈CH3區所含之胺基酸殘基，且為EU編號356位及439位之胺基酸殘基、(2) 為H鏈CH3區所含之胺基酸殘基，且為EU編號357位及370位之胺基酸殘基、(3) 為H鏈CH3區所含之胺基酸殘基，且為EU編號399位及409位之胺基酸殘基。

【0072】又，可為：從和上述第1H鏈CH3區不同的第2H鏈CH3區中之前述(1)~(3)所示之胺基酸殘基之組中選出的胺基酸殘基之組且為和前述第1之H鏈CH3區中有同種電荷之前述(1)~(3)所示之胺基酸殘基之組對應的1組至3組胺基酸殘基具有和前述第1之H鏈CH3區中之對應胺基酸殘基為相反

電荷之抗體。

【0073】上述(1)~(3)記載的各胺基酸殘基於締合時會彼此靠近。該領域中通常知識者可針對所望H鏈CH3區或H鏈不變區，可利用使用市售軟體的同源建模法(Homology modeling)等發現對應於上述(1)~(3)記載之胺基酸殘基之部位，可適當將該部位之胺基酸殘基供改變。

【0074】上述抗體中，「有電荷之胺基酸殘基」宜從例如以下(a)或(b)中任一群所含之胺基酸殘基中選擇較佳；

(a) 麩胺酸(E)、天冬胺酸(D)、

(b) 離胺酸(K)、精胺酸(R)、組胺酸(H)。

【0075】上述抗體中，「有同種電荷」，係指例如，2個以上的胺基酸殘基任一者有上述(a)或(b)中任一群所含之胺基酸殘基。「有相反電荷」，係指例如：2個以上的胺基酸殘基中的至少1個胺基酸殘基有上述(a)或(b)任一群所含之胺基酸殘基時，其餘胺基酸殘基具有不同群所含之胺基酸殘基。

【0076】理想態樣中，上述抗體的第1H鏈CH3區與第2H鏈CH3區也可利用雙硫鍵交聯。

本發明中供改變之胺基酸殘基，不限於上述抗體之可變區或抗體不變區之胺基酸殘基。若為該領域中通常知識者，可針對多肽變異體或異種多聚體，利用使用市售軟體之同源建模法等找出形成界面之胺基酸殘基，並以控制締合之方式將該部位之胺基酸殘基供改變。

【0077】又，本發明之多專一性抗體之締合化也可使用其他公知技術。藉由將抗體之其中一H鏈之可變區存在的胺基酸

側鏈取代為較大側鏈（knob; 突起），並將另一 H 鏈之相對之可變區存在的胺基酸側鏈取代為較小側鏈（hole; 空隙），以將突起配置於空隙，以有效率地實施有 Fc 區之不同胺基酸之多肽彼此的締合化(WO1996/027011、Ridgway JB et al., Protein Engineering (1996) 9, 617-621、Merchant AM et al. Nature Biotechnology (1998) 16, 677-681)。

【0078】除此以外，本發明之多專一性抗體之形成還可使用其他公知技術。藉由使用抗體的其中一 H 鏈之 CH3 之一部分設為和此部分對應的 IgA 來源的序列，並於另一 H 鏈之 CH3 的互補部分導入和此部分對應的 IgA 來源的序列而得的 strand-exchange engineered domain CH3，可以有效率地利用 CH3 的互補性締合化生成有不同序列之多肽之締合化(Protein Engineering Design & Selection, 23; 195-202, 2010)。使用此公知技術也可有效率地形成目的之多專一性抗體。

【0079】另外，多專一性抗體的形成，也可使用利用 WO2011/028952 記載之抗體之 CH1 與 CL 之締合化、利用 VH、VL 之締合化之抗體製作技術、使用 WO2008/119353、WO2011/131746 記載之個別製備的單株抗體彼此而製作雙重專一性抗體之技術(Fab Arm Exchange)、WO2012/058768、WO2013/063702 記載之控制抗體重鏈之 CH3 間之締合之技術、WO2012/023053 記載之製作由 2 種輕鏈與 1 種重鏈構成之雙重專一性抗體之技術、Christoph 等人(Nature Biotechnology Vol. 31, p 753-758 (2013))記載之利用各自表現由 1 條 H 鏈與 1 條 L 鏈構成之抗體之單鏈的 2 個細菌細胞株的製作雙重專一性

抗體的技術等。又，上述締合技術以外，已知有 CrossMab 技術，係使形成結合於第 1 抗原決定位之可變區的輕鏈、及形成結合於第 2 抗原決定位之可變區的輕鏈，分別和結合於第 1 抗原決定位之可變區的重鏈、及結合於第 2 抗原決定位之可變區的重鏈締合之異種輕鏈之締合技術(Scaefer 等人(Proc.Natl. Acad.Sci.U.S.A. (2011) 108, 11187-11192))，此等技術也可用於製作本發明提供之多專一性或多抗體決定簇(paratopic)的抗原結合分子。作為使用各自製備的單株抗體彼此而製作雙重專一性抗體之技術，可列舉使重鏈 CH3 區存在之特定胺基酸經取代而得的單株抗體置於還原狀況，以促進抗體之異化，並獲得所望雙重專一性抗體之方法。該方法之理想胺基酸取代部位，例如 CH3 區之 EU 編號 392 號之殘基、EU 編號 397 號之殘基。再者，也可利用第 1 之 H 鏈 CH3 區之以下(1)~(3)所示之胺基酸殘基之組中選出的 1 組至 3 組胺基酸殘基有同種電荷之抗體來製作雙重專一性抗體；(1) 為 H 鏈 CH3 區所含之胺基酸殘基且係 EU 編號 356 位及 439 位之胺基酸殘基、(2) 為 H 鏈 CH3 區所含之胺基酸殘基且係 EU 編號 357 位及 370 位之胺基酸殘基、(3) 為 H 鏈 CH3 區所含之胺基酸殘基且係 EU 編號 399 位及 409 位之胺基酸殘基。又，也可利用和係從上述第 1 之 H 鏈 CH3 區為不同的第 2 之 H 鏈 CH3 區中的前述(1)~(3)所示之胺基酸殘基之組選出的胺基酸殘基之組且和前述第 1 之 H 鏈 CH3 區中有同種電荷之前述(1)~(3)所示之胺基酸殘基之組所對應之 1 組至 3 組胺基酸殘基具有和前述第 1H 鏈 CH3 區之對應胺基酸殘基有相反電荷的抗體，來製作雙重專一性抗體

(WO2015/046467)。

【0080】又，即使未能有效率地形成目的多專一性抗體的情形，也可藉由從產生之抗體中將目的之多專一性抗體予以分離、精製，而獲得本發明之多專一性抗體。例如有人報告：對於 2 種 H 鏈之可變區導入胺基酸取代並賦予等電點的差異，以將 2 種同形體與目的之異形抗體(heteroantibody)利用離子交換層析進行精製之方法(WO2007114325)。又，作為將異形體精製之方法，至今已有將由會結合於蛋白質 A 之小鼠 IgG2a 之 H 鏈於不結合於蛋白質 A 之大鼠 IgG2b 之 H 鏈構成的異二聚化抗體使用蛋白質 A 進行精製的方法(WO98050431, WO95033844)。又，藉由使用為 IgG 與 ProteinA 之結合部位即 EU 編號 435 號及 436 號之胺基酸殘基取代成 Tyr、His 等和 ProteinA 之結合力不同的胺基酸而得的 H 鏈，使各 H 鏈與 Protein A 間的交互作用變化，並使用 Protein A 管柱，可以有效率地只將異二聚化抗體進行精製。

【0081】該等技術可使用複數個，例如組合使用 2 個以上。又，該等技術也可對於欲締合之 2 個 H 鏈適當地分別適用。又，本發明之抗原結合分子，可以將已施加上述改變者作為基礎，另外製作有同一胺基酸序列之抗原結合分子。

【0082】胺基酸序列之改變可依該領域中公知的各種方法實施。該等方法不限於以下方法，可利用部位專一性變異誘導法(Hashimoto-Gotoh, T, Mizuno, T, Ogasahara, Y, and Nakagawa, M. (1995) An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis. Gene 152, 271-275、Zoller,

MJ, and Smith, M.(1983) Oligonucleotide- directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors.Methods Enzymol. 100, 468-500、Kramer,W, Drutsa,V, Jansen,HW, Kramer,B, Pflugfelder,M, and Fritz,HJ(1984) The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction. Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456、Kramer W, and Fritz HJ(1987) Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA Methods. Enzymol. 154, 350-367、Kunkel,TA(1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection.Proc Natl Acad Sci U S A. 82, 488-492)、PCR 變異法、匣盒(cassette)變異法等方法實施。

【0083】又，本發明之「抗原結合分子」在單一多肽鏈內包括形成本發明之「抗體之可變區」之重鏈及輕鏈兩者，但也可為缺少不變區的抗體片段。如此的抗體片段，例如：雙體抗體(diabody；Db)、單鏈抗體、sc(Fab')2。

【0084】Db 係由 2 條多肽鏈構成的二聚物(Holliger P et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)、EP404，097 號、W093/11161 號等)，各多肽鏈係利用同鏈中 L 鏈可變區(VL)及 H 鏈可變區(VH)彼此無法結合的程度之短的例如：5 個殘基左右的連結子結合。

同一多肽鏈上編碼的 VL 與 VH，因為其之間之連結子短，故無法形成單鏈可變區片段，而利用二聚物化以形成 2 個抗原結合部位。

【0085】單鏈抗體，例如 sc(Fv)2。sc(Fv)2 係 2 個 VL 與 2 s

個 VH 之 4 個可變區利用胜肽連結子等連結子連結並構成 1 條鏈之單鏈抗體(J Immunol. Methods (1999) 231 (1-2), 177-189)。此 2 個 VH 與 VL 可由不同單株抗體而來。例如：Journal of Immunology (1994) 152 (11), 5368-5374 揭示之認識在同一抗原中存在的 2 種抗原決定位之雙重專一性(bispecific sc(Fv)2)亦為理想例。sc(Fv)2 可依該領域中通常知識者公知之方法製作。例如，可將 scFv 以胜肽連結子等連結子連結以製作。

【0086】本說明書中，作為構成 sc(Fv)2 之抗原結合分域之構成，可舉 2 個 VH 及 2 個 VL 以單條鏈多肽之 N 末端側為基點，並按順序以 VH、VL、VH、VL（[VH]連結子[VL]連結子[VH]連結子[VL]）排列為特徵的抗體，但 2 個 VH 與 2 個 VL 的順序不特別限於上述構成，可依任意順序排列。例如以下順序之構成。

[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]

【0087】針對 sc(Fv)2 之分子形態，於 WO2006/132352 也有詳細記載，若為該領域中通常知識者，可基於該等記載製作用以製造本說明書揭示之抗原結合分子的適當所望的 sc(Fv)2。

【0088】本發明之抗原結合分子也可接合 PEG 等載體高分子、抗癌劑等有機化合物。又，也可插入糖鏈附加序列並使糖

鏈獲得所望效果。

【0089】將抗體之可變區結合之連結子，可使用能利用基因工程導入的任意胜肽連結子、或合成化合物連結子(例如參照：Protein Engineering, 9 (3), 299-305, 1996)揭示的連結子等，但本發明中宜為胜肽連結子為佳。胜肽連結子之長度不特別限定，可因應目的由該領域中通常知識者適當選擇，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。sc(Fv)2 包括 3 個胜肽連結子時，可使用長度全部相同的胜肽連結子，也可使用不同長度的胜肽連結子。

【0090】例如，胜肽連結子的情形：

Ser

Gly・Ser

Gly・Gly・Ser

Ser・Gly・Gly

Gly・Gly・Gly・Ser（序列辨識號：5）

Ser・Gly・Gly・Gly（序列辨識號：6）

Gly・Gly・Gly・Gly・Ser（序列辨識號：7）

Ser・Gly・Gly・Gly・Gly（序列辨識號：8）

Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Ser（序列辨識號：9）

Ser・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly（序列辨識號：10）

Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Ser（序列辨識號：11）

Ser・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly（序列辨識號：12）

(Gly・Gly・Gly・Gly・Ser（序列辨識號：7）)n

(Ser・Gly・Gly・Gly・Gly（序列辨識號：8）)n

[n 為 1 以上之整數]等。惟胜肽連結子之長度、序列可因應目的由該領域中通常知識者適當選擇。

【0091】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]碸(BSOCOES)、雙[2-(硫琥珀醯亞胺氧羰基氧)乙基]碸(硫-BSOCOES)等，該等交聯劑在市面上可購得。

將 4 個抗體可變區結合時，通常須要 3 個連結子，但可全部使用相同連結子，也可使用不同連結子。

【0092】F(ab')2，包含 2 條輕鏈，以及 2 條重鏈，以鏈間之雙硫鍵形成於 2 條重鏈間之方式，包括 CH1 分域及 CH2 分域之一部分不變區。本說明書揭示之構成多肽締合體之 F(ab')2，可藉由將具有所望抗原結合分域之全長單株抗體等以胃蛋白酶等蛋白質分解酵素予以部分消化後，使 Fc 片段吸附於蛋白質 A 管柱並除去以理想地取得。該蛋白質分解酵素只要是可藉由適當設定 pH 等酵素的反應條件而限制性地產生 F(ab')2 的方式將全長抗體予以消化者即可，無特殊限定，例如，胃蛋白酶、無花果酶(ficin)等。

【0093】本發明之抗原結合分子除了上述胺基酸之改變，可更包括附加的改變。附加的改變，例如可從胺基酸之取代、缺失、或修飾中任一者、或此等之組合選擇。

例如：在對於本發明之抗原結合分子不進一步使該分子之目的機能造成實質變化的範圍內任意施以改變。例如如此的變異可利用胺基酸殘基之保守性取代進行。又，對於本發明之抗原結合分子之目的機能造成變化的改變，只要是該機能之變化為本發明之目的之範圍內也可進行。

【0094】本發明中，胺基酸序列之改變也包括轉譯後修飾。具體的轉譯後修飾，可舉出糖鏈之附加或缺損。例如本發明之抗原結合分子有 IgG1 型不變區的情形，EU 編號之 297 號之胺基酸殘基可為經糖鏈修飾者。修飾之糖鏈結構不限定。一般，於真核細胞表現的抗體，於不變區包括糖鏈修飾。因此如以下細胞所表現之抗體，通常會以某糖鏈修飾。

・哺乳動物之抗體產生細胞

・以包括編碼抗體之 DNA 的表現載體轉形而得的真核細胞

在此所示之真核細胞包括酵母、動物細胞。例如 CHO 細胞、HEK293H 細胞，是為了以包括編碼抗體之 DNA 的表現載體轉形的代表動物細胞。另外，該位置無糖鏈修飾者也包括在本發明之抗體。不變區未經糖鏈修飾的抗體，能使編碼抗體之基因於大腸菌等原核細胞表現而得。

【0095】本發明中附加的改變，更具體而言，也可為例如 Fc 區之糖鏈附加唾液酸而得者(MAbs. 2010 Sep-Oct;2(5): 5

519-27.)。

【0096】又，本發明之抗原結合分子擁有 Fc 區部分時，亦可施加例如使對於 FcRn 之結合活性提高之胺基酸取代(J Immunol. 2006 Jan 1;176(1):346-56、J Biol Chem. 2006 Aug 18;281(33):23514-24.、Int Immunol. 2006 Dec;18(12):1759-69.、Nat Biotechnol. 2010 Feb;28(2):157-9.、WO/2006/019447、WO/2006/053301、WO/2009/086320)、用以使抗體之異質性、安定性提高的胺基酸取代((WO/2009/041613))。

【0097】再者，本發明中，「抗體」之用語係以最廣義使用，只要顯示所望之生物學的活性即包括，包括單株抗體(含全長單株抗體)、多株抗體、抗體變異體、抗體片段、多專一性抗體（例如，雙重專一性抗體）、嵌合抗體、人化抗體等各種抗體。

【0098】本發明之抗體不限定抗原種類、抗體來源等，可為各種抗體。抗體的來源不特別限定，可列舉人抗體、小鼠抗體、大鼠抗體、兔抗體等。

【0099】製作抗體的方法為該領域中通常知識者所熟知，例如單株抗體的情形，可利用融合瘤法(Kohler and Milstein, Nature 256:495 (1975))、重組方法(美國專利第 4,816,567 號)製造。又，也可從噬菌體抗體庫單離 (Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991) ; Marks et al., J.Mol.Biol. 222:581-597 (1991))。又，也可從單一之 B 細胞選殖體單離(N. Biotechnol. 28(5): 253-457 (2011))。

【0100】人化抗體也稱為再構成(reshaped)人抗體。具體而

言，將人以外動物，例如將小鼠抗體之 CDR 移植到人抗體而得之人化抗體等為公知。用以獲得人化抗體之一般基因重組手法亦為已知。具體而言，作為將小鼠抗體之 CDR 移植到人之 FR 的方法，例如 Overlap Extension PCR 為公知。

【0101】藉由將編碼為 3 個 CDR 與 4 個 FR 連結而得之抗體可變區的 DNA 和編碼為人抗體不變區之 DNA 以於讀框內融合的方式插入到表現載體中，可製成人化抗體表現用載體。將該已嵌入的載體導入到寄主並建立重組細胞後，培養該重組細胞，並使編碼為該人化抗體之 DNA 表現，能使該培養細胞之培養物中產生該人化抗體（參照歐洲專利公開 EP 239400、國際公開 WO1996/002576）。

【0102】視須要，也可將 FR 之胺基酸殘基取代，以使再構成人抗體之 CDR 能形成適當的抗原結合部位。例如可應用將小鼠 CDR 移植到人 FR 時使用的 PCR 法，於 FR 導入胺基酸序列的變異。

【0103】將擁有人抗體基因的全部庫存(repertory)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）作為免疫動物，利用 DNA 免疫可獲得所望之人抗體。

【0104】再者，使用人抗體庫，利用淘選取得人抗體之技術亦為已知。例如：將人抗體之 V 區域以單條鏈抗體(scFv)的形式利用噬菌體展示法展示在噬菌體表面。可選擇表現和抗原

結合之 scFv 之噬菌體。藉由將選擇的噬菌體的基因進行解析，能決定編碼為和抗原結合之人抗體之 V 區域的 DNA 序列。決定和抗原結合之 scFv 之 DNA 序列後，將該 V 區域序列和所望人抗體 C 區域之序列於讀框內融合，之後插入適當的表現載體，可製作表現載體。將該表現載體導入上述列舉的理想表現細胞中，並使編碼為該人抗體之基因表現，可取得該人抗體。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）。

【0105】噬菌體展示法以外，作為使用人抗體庫利用淘選取得人抗體之技術，已有使用無細胞轉譯系之技術、在細胞或病毒表面展示抗原結合分子之技術、使用乳劑的技術等為已知。例如：使用無細胞轉譯系之技術可使用：藉由去除終止密碼子等而介由核糖體形成 mRNA 與經轉譯之蛋白質之複合體的核糖體展示法、利用嘌呤黴素(puromycin)等化合物使基因序列和經轉譯之蛋白質共價鍵結之 cDNA 展示法、mRNA 展示法、使用對應核酸之結合蛋白質形成基因和轉譯之蛋白質之複合體之 CIS 展示法等。又，作為在細胞或病毒表面展示抗原結合分子之技術，可使用噬菌體展示法，除此以外可使用 E. coli 展示法、格蘭氏陽性菌展示法、酵母展示法、哺乳類細胞展示法、病毒展示法等。作為使用乳劑之技術，可使用使基因及轉譯關連分子內包在乳劑中的 *in vitro* 病毒展示法等。該等方法已為公知(Nat Biotechnol. 2000 Dec;18(12):1287-92、Nucleic Acids Res. 2006;34(19):e127、Proc Natl Acad Sci U S A. 2004

Mar 2;101(9):2806-10、Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jun 22;101(25):9193-8、Protein Eng Des Sel. 2008 Apr;21(4): 247-55、Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Sep 26;97(20): 10701-5、MAbs. 2010 Sep-Oct;2(5):508-18、Methods Mol Biol. 2012;911:183-98)。

【0106】構成本發明之抗體之可變區，可為任意認識抗原之可變區。

【0107】本說明書中，「抗原」不特別限定，可為任意抗原。抗原，例如：17-IA、4-1 BB、4Dc、6-酮-PGF1a、8-異-PGF2a、8-側氧基-dG、A1 腺苷受體、A33、ACE、ACE-2、促進素(activin)、促進素 A、促進素 AB、促進素 B、促進素 C、促進素 RIA、促進素 RIA ALK-2、促進素 RIB ALK-4、促進素 RIIA、促進素 RIIB、ADAM、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17/TACE、ADAM8、ADAM9、ADAMTS、ADAMTS4、ADAMTS5、位址素(Addressin)、脂聯素(adiponectin)、ADP 核糖環化酶(ribosyl cyclase)-1、aFGF、AGE、ALCAM、ALK、ALK-1、ALK-7、過敏原(allergen)、alpha1-抗胰凝乳蛋白酶(antichemotrypsin)、alpha1-抗胰蛋白酶(antitrypsin)、alpha-突觸核蛋白(synuclein)、alpha-V/beta-1 拮抗劑、aminin、amylin、類澱粉 beta、類澱粉免疫球蛋白重鏈可變區、類澱粉免疫球蛋白輕鏈可變區、雄激素、ANG、血管收縮素原(angiotensinogen)、血管生成素(Angiopoietin)配體-2、抗-Id、抗凝血酶 III、Anthrax、APAF-1、APE、APJ、apo A1、apo 血清類澱粉 A、Apo-SAA、APP、APRIL、AR、ARC、ART、Artemin、ASPARTIC、

心房利鈉因子(Atrial natriuretic factor)、心房利鈉胜肽(Atrial natriuretic peptide)、心房利鈉胜肽 A、心房利鈉胜肽 B、心房利鈉胜肽 C, av/b3 整合素、Axl、B7-1、B7-2、B7-H、BACE、BACE-1、炭疽桿菌(Bacillus anthracis)保護性抗原、Bad、BAFF、BAFF-R、Bag-1、BAK、Bax、BCA-1、BCAM、Bcl、BCMA、BDNF、b-ECGF、beta-2-細球蛋白、beta 內醯胺酶、bFGF、BID、Bik、BIM、BLC、BL-CAM、BLK、B-淋巴球刺激子(BIyS)、BMP、BMP-2(BMP-2a)、BMP-3(Osteogenin)、BMP-4(BMP-2b)、BMP-5、BMP-6(Vgr-1)、BMP-7(OP-1)、BMP-8(BMP-8a)、BMPR、BMPR-IA(ALK-3)、BMPR-IB(ALK-6)、BMPR-II(BRK-3)、BMPs、BOK、Bombesin、骨衍生神經滋養因子、胎牛生長激素、BPDE、BPDE-DNA、BRK-2、BTC、B-淋巴球細胞黏附分子、C10、C1-抑制子、C1q、C3、C3a、C4、C5、C5a(補體 5a)、CA125、CAD-8、黏鈣蛋白(Cadherin)-3、抑鈣素(Calcitonin)、cAMP、碳酸酐酶(Carbonic anhydrase)-IX、癌胚抗原(CEA)、癌關連抗原、心營養素(Cardiotrophin)-1、細胞自溶酶(Cathepsin)A、細胞自溶酶 B、細胞自溶酶 C/DPPI、細胞自溶酶 D、細胞自溶酶 E、細胞自溶酶 H、細胞自溶酶 L、細胞自溶酶 O、細胞自溶酶 S、細胞自溶酶 V、細胞自溶酶 X/Z/P、CBL、CCI、CCK2、CCL、CCL1/I-309、CCL11/Eotaxin、CCL12/MCP-5、CCL13/MCP-4、CCL14/HCC-1、CCL15/HCC-2、CCL16/HCC-4、CCL17/TARC、CCL18/PARC、CCL19/ELC、CCL2/MCP-1、CCL20/MIP-3-alpha、CCL21/SLC、CCL22/MDC、CCL23/MPIF-1、CCL24/

Eotaxin-2、CCL25/TECK、CCL26/Eotaxin-3、CCL27/CTACK、CCL28/MEC、CCL3/M1P-1-alpha、CCL3L1/LD-78-beta、CCL4/MIP-1-beta、CCL5/RANTES、CCL6/C10、CCL7/MCP-3、CCL8/MCP-2、CCL9/10/MTP-1-gamma、CCR、CCR1、CCR10、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CD1、CD10、CD105、CD11a、CD11b、CD11c、CD123、CD13、CD137、CD138、CD14、CD140a、CD146、CD147、CD148、CD15、CD152、CD16、CD164、CD18、CD19、CD2、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD26、CD27L、CD28、CD29、CD3、CD30、CD30L、CD32、CD33(p67 蛋白)、CD34、CD37、CD38、CD3E、CD4、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD49a、CD49b、CD5、CD51、CD52、CD54、CD55、CD56、CD6、CD61、CD64、CD66e、CD7、CD70、CD74、CD8、CD80(B7-1)、CD89、CD95、CD105、CD158a、CEA、CEACAM5、CFTR、cGMP、CGRP 受體、CINC、CKb8-1、密連蛋白(Claudin)18、CLC、肉毒桿菌(Clostridium botulinum)毒素、梭狀芽孢桿菌毒素(Clostridium difficile toxin)、產氣莢膜梭菌(Clostridium perfringens)毒素、c-Met、CMV、CMV UL、CNTF、CNTN-1、補體因子 3(C3)、補體因子 D、皮質類固醇結合球蛋白、群落刺激因子-1 受體、COX、C-Ret、CRG-2、CRTH2、CT-1、CTACK、CTGF、CTLA-4、CX3CL1/Fractalkine、CX3CR1、CXCL、CXCL1/Gro-alpha、CXCL10、CXCL11/I-TAC、CXCL12/SDF-1-alpha/beta、CXCL13/BCA-1、CXCL14/BRAK、CXCL15/Lungkine. CXCL16、CXCL16、CXCL2/Gro-beta

CXCL3/Gro-gamma、CXCL3、CXCL4/PF4、CXCL5/ENA-78、CXCL6/GCP-2、CXCL7/NAP-2、CXCL8/IL-8、CXCL9/Mig、CXCL10/IP-10、CXCR、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、cystatin C、細胞角蛋白腫瘤關聯抗原、DAN、DCC、DcR3、DC-SIGN、衰變加速因子(Decay accelerating factor)、類 Delta 蛋白配體 4、des(1-3)-IGF-1(大腦 IGF-1)、Dhh、DHICA 氧化酶、Dickkopf-1、地谷新(digoxin)、二肽肽解酶 IV、DKl、DNAM-1、Dnase、Dpp、DPPIV/CD26、Dtk、ECAD、EDA、EDA-A1、EDA-A2、EDAR、EGF、EGFR(ErbB-1)、含類 EGF 分域之蛋白質 7、彈性蛋白酶(Elastase)、彈性蛋白(elastin)、EMA、EMMPRIN、ENA、ENA-78、Endosialin、內皮素受體、內毒素、腦啡肽酶(Enkephalinase)、eNOS、Eot、伊紅趨素(Eotaxin)、Eotaxin-2、eotaxini、EpCAM、Ephrin B2/EphB4、Epha2 酪胺酸激酶受體、上皮生長因子受體(EGFR)、ErbB2 受體、ErbB3 酪胺酸激酶受體、ERCC、EREG、紅血球生成素(erythropoietin)(EPO)、紅血球生成素受體、E-選擇蛋白(selectin)、ET-1、Exodus-2、RSV 的 F 蛋白、F10、F11、F12、F13、F5、F9、第 Ia 因子、第 IX 因子、第 Xa 因子、第 VII 因子、第 VIII 因子、第 VIIIc 因子、Fas、FcalphaR、FcepsilonRI、FcgammaIIb、FcgammaRI、FcgammaRIIa、FcgammaRIIIa、FcgammaRIIIb、FcRn、FEN-1、鐵蛋白、FGF、FGF-19、FGF-2、FGF-2 受體、FGF-3、FGF-8、酸性 FGF、鹼性 FGF、FGFR、FGFR-3、纖維蛋白(Fibrin)、纖維母細胞活化蛋白(FAP)、纖維母細胞生長因子、纖維母細胞生長因子-10、纖網蛋白

(fibronectin)、FL、FLIP、Flt-3、FLT3 配體、葉酸受體、濾泡刺激激素(FSH)、Fractalkine(CX3C)、游離重鏈、游離輕鏈、FZD1、FZD10、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、G250、Gas6、GCP-2、GCSF、G-CSF、G-CSF 受體、GD2、GD3、GDF、GDF-1、GDF-15(MIC-1)、GDF-3(Vgr-2)、GDF-5(BMP-14/CDMP-1)、GDF-6(BMP-13/CDMP-2)、GDF-7(BMP-12/CDMP-3)、GDF-8(Myostatin)、GDF-9、GDNF、Gelsolin、GFAP、GF-CSF、GFR-alpha1、GFR-alpha2、GFR-alpha3、GF-β1、gH 外膜糖蛋白、GITR、升糖素、升糖素受體、類升糖素胜肽 1 受體、Glut 4、麩胺酸羧基肽解酶(Glutamate carboxypeptidase)II、糖蛋白激素受體、糖蛋白 IIb/IIIa(GP IIb/IIIa)、Glypican-3、GM-CSF、GM-CSF 受體、gp130、gp140、gp72、顆粒細胞-CSF(G-CSF)、GRO/MGSA、生長激素釋放因子、GRO-β、GRO-γ、H. pylori、半抗原(NP-cap 或 NIP-cap)、HB-EGF、HCC、HCC 1、HCMV gB 外膜糖蛋白、HCMV UL、造血生長因子(HGF)、Hep B gp120、肝素酶(heparanase)、肝素輔因子 II、肝生長因子、炭疽桿菌保護性抗原、C 型肝炎病毒 E2 糖蛋白、E 型肝炎、Hepcidin、Her1、Her2/neu(ErbB-2)、Her3(ErbB-3)、Her4(ErbB-4)、單純皰疹病毒(HSV)gB 糖蛋白、HGF、HGFA、高分子量黑色素瘤關連抗原(HMW-MAA)、HIV 外膜蛋白，例如 GP120、HIV MIB gp 120 V3 loop、HLA、HLA-DR、HM1.24、HMFG PEM、HMGB-1、HRG、Hrk、HSP47、Hsp90、HSV gD 糖蛋白、人心肌凝蛋白、人細胞巨大病毒(HCMV)、人生長激素(hGH)、人血清白蛋白、

人組織類型纖維蛋白溶酶原子活化子(t-PA)、Huntingtin、HVEM、IAP、ICAM、ICAM-1、ICAM-3、ICE、ICOS、IFN-alpha、IFN-beta、IFN-gamma、IgA、IgA 受體、IgE、IGF、IGF 結合蛋白、IGF-1、IGF-1 R、IGF-2、IGFBP、IGFR、IL、IL-1、IL-10、IL-10 受體、IL-11、IL-11 受體、IL-12、IL-12 受體、IL-13、IL-13 受體、IL-15、IL-15 受體、IL-16、IL-16 受體、IL-17、IL-17 受體、IL-18(IGIF)、IL-18 受體、IL-1alpha、IL-1beta、IL-1 受體、IL-2、IL-2 受體、IL-20、IL-20 受體、IL-21、IL-21 受體、IL-23、IL-23 受體、IL-2 受體、IL-3、IL-3 受體、IL-31、IL-31 受體、IL-3 受體、IL-4、IL-4 受體 IL-5、IL-5 受體、IL-6、IL-6 受體、IL-7、IL-7 受體、IL-8、IL-8 受體、IL-9、IL-9 受體、免疫球蛋白免疫複合體、免疫球蛋白、INF-alpha、INF-alpha 受體、INF-beta、INF-beta 受體、INF-gamma、INF-gamma 受體、IFN 第 I 類、IFN 第 I 類受體、influenza、抑制素(inhibin)、抑制素 α、抑制素 β、iNOS、胰島素、胰島素 A 鏈、胰島素 B 鏈、類胰島素生長因子 1、類胰島素生長因子 2、類胰島素生長因子結合蛋白、整合素、整合素 alpha2、整合素 alpha3、整合素 alpha4、整合素 alpha4/beta1、整合素 alpha-V/beta-3、整合素 alpha-V/beta-6、整合素 alpha4/beta7、整合素 alpha5/beta1、整合素 alpha5/beta3、整合素 alpha5/beta6、整合素 alphaσ(alphaV)、整合素 alphaθ、整合素 beta1、整合素 beta2、整合素 beta3(GPIIb-IIIa)、IP-10、I-TAC、JE、激肽釋放酶(Kallikrein)、激肽釋放酶 11、激肽釋放酶 12、激肽釋放酶 14、激肽釋放酶 15、激肽釋放酶 2、激肽釋放酶 5、激肽釋放酶 6、

激肽釋放酶 L1、激肽釋放酶 L2、激肽釋放酶 L3、激肽釋放酶 L4、kallistatin、KC、KDR、角質細胞生長因子(KGF)、角質細胞生長因子-2(KGF-2)、KGF、類殺手免疫球蛋白受體、kit 配體(KL)、Kit 酪胺酸激酶、laminin 5、LAMP、LAPP(Amylin、islet-類澱粉多肽)、LAP(TGF-1)、潛伏關聯肽(latency associated peptide)、Latent TGF-1、Latent TGF-1 bp1、LBP、LDGF、LDL、LDL 受體、LECT2、Lefty、Leptin、黃體化激素(LH)、Lewis-Y 抗原、Lewis-Y 相關抗原、LFA-1、LFA-3、LFA-3 受體、Lfo、LIF、LIGHT、脂蛋白、LIX、LKN、Lptn、L-選擇素、LT-a、LT-b、LTB4、LTBP-1、肺界面活性劑、黃體化激素、Lymphotactin、淋巴毒素 Beta 受體、溶性鞘脂(Lysosphingolipid)受體、Mac-1、巨噬體-CSF(M-CSF)、MAdCAM、MAG、MAP2、MARC、maspin、MCAM、MCK-2、MCP、MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-I(MCAF)、M-CSF、MDC、MDC(67 a.a.)、MDC(69 a.a.)、megsin、Mer、MET 酪胺酸激酶受體家族、METALLOPROTEASES、膜糖蛋白 OX2、Mesothelin、MGDF 受體、MGMT、MHC(HLA-DR)、微生物蛋白、MIF、MIG、MIP、MIP-1α、MIP-1β、MIP-3α、MIP-3β、MIP-4、MK、MMAC1、MMP、MMP-1、MMP-10、MMP-11、MMP-12、MMP-13、MMP-14、MMP-15、MMP-2、MMP-24、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、單核球吸引蛋白、單核球群落抑制子 y 因子、小鼠性腺相關胜肽、MPIF、Mpo、MSK、MSP、MUC-16、MUC18、mucin(Mud)、Muellerian 抑制物質、Mug、MuSK、髓鞘脂(Myelin)關聯糖蛋白、骨髓前身抑制因子-1(MPIF-I)、NAIP、Nanobody、NAP、

NAP-2、NCA 90、NCAD、N-鈣黏蛋白、NCAM、Neprilysin、神經細胞黏附分子、neroserpin、神經生長因子(NGF)、神經滋養素-3、神經滋養素-4、神經滋養素-6、Neuropilin 1、Neurturin、NGF-beta、NGFR、NKG20、N-甲硫胺醯基人生長激素、nNOS、NO、Nogo-A、Nogo 受體、來自 C 型肝炎病毒的非結構蛋白第 3 型(NS3)、NOS、Npn、NRG-3、NT、NT-3、NT-4、NTN、OB、OGG1、Oncostatin M、OP-2、OPG、OPN、OSM、OSM 受體、骨誘導因子、骨橋蛋白(osteopontin)、OX40L、OX40R、氧化 LDL、p150、p95、PADPr、副甲狀腺素、PARC、PARP、PBR、PBSF、PCAD、P-鈣黏蛋白、PCNA、PCSK9、PDGF、PDGF 受體、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、PDGF-D、PDK-1、PECAM、PEDF、PEM、PF-4、PGE、PGF、PGI2、PGJ2、PIGF、PIN、PLA2、胎盤生長因子、胎盤鹼性磷解酶(PLAP)、胎盤催乳激素、纖維蛋白溶酶原活化抑制子-1、血小板生長因子、plgR、PLP、不同大小的多二醇鏈(例如 PEG-20、PEG-30、PEG40)、PP14、prekallikrein、prion protein、前降鈣素(procalcitonin)、程式化細胞死亡蛋白 1、胰島素前驅體、泌乳素(prolactin)、蛋白前驅體轉換酶(Proprotein convertase)PC9、prorelaxin、前列腺專一性膜抗原(PSMA)、Protein A、Protein C、Protein D、Protein S、Protein Z、PS、PSA、PSCA、PsmAr、PTEN、PTHrp、Ptk、PTN、P-選擇素糖蛋白配體-1、R51、RAGE、RANK、RANKL、RANTES、relaxin、Relaxin A 鏈、Relaxin B 鏈、腎活素(rennin)、呼吸道合胞體病毒(RSV)F、Ret、reticulon 4、類風濕性因子(Rheumatoid factor)、RLI P76、RPA2、RPK-1、

RSK、RSV Fgp、S100、RON-8、SCF/KL、SCGF、Sclerostin、SDF-1、SDF1α、SDF1β、SERINE、血清類澱粉 P、血清白蛋白、sFRP-3、Shh、類 Shiga 毒素 II、SIGIRR、SK-1、SLAM、SLPI、SMAC、SMDF、SMOH、SOD、SPARC、sphingosine 1-phosphate 受體 1、葡萄球菌磷脂壁酸(Staphylococcal lipoteichoic acid)、Stat、STEAP、STEAP-II、幹細胞因子(SCF)、streptokinase、superoxide dismutase、syndecan-1、TACE、TACI、TAG-72(腫瘤關聯糖蛋白-72)、TARC、TB、TCA-3、T-cell 受體 alpha/beta、TdT、TECK、TEM1、TEM5、TEM7、TEM8、Tenascin、TERT、類睪丸 PLAP 鹼性磷解酶、TfR、TGF、TGF-alpha、TGF-beta、TGF-beta Pan Specific、TGF-beta RII、TGF-beta RIIb、TGF-beta RIII、TGF-beta Rl(ALK-5)、TGF-beta1、TGF-beta2、TGF-beta3、TGF-beta4、TGF-beta5、TGF-I、凝血酶、thrombopoietin(TPO)、胸腺淋巴蛋白(Thymic stromal lymphoprotein)受體、Thymus Ck-1、甲狀腺刺激激素(TSH)、甲狀腺素結合球蛋白、Tie、TIMP、TIQ、組織因子、組織因子蛋白酶抑制子、組織因子蛋白、TMEFF2、Tmpo、TMPRSS2、TNF 受體 I、TNF 受體 II、TNF-alpha、TNF-beta、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)、TNFRSF12A、TNFRSF13B(TACI)、

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

白受體、轉形生長因子(TGF)，比如 TGF-alpha 及 TGF-beta、穿膜糖蛋白 NMB、Transthyretin、TRF、Trk、TROP-2、營養層糖蛋白、TSG、TSLP、腫瘤壞死因子(TNF)、腫瘤關聯抗原 CA 125、表現腫瘤關連抗原之 Lewis Y 相關碳水化合物、TWEAK、TXB2、Ung、uPAR、uPAR-1、Urokinase、VAP-1、vascular endothelial 生長因子(VEGF)、vaspin、VCAM、VCAM-1、VECAD、VE-鈣黏蛋白、VE-鈣黏蛋白-2、VEFGR-1 (flt-1)、VEFGR-2、VEGF 受體(VEGFR)、VEGFR-3(flt-4)、VEGI、VIM、Viral 抗原、VitB12 受體、Vitronectin 受體、VLA、VLA-1、VLA-4、VNR 整合素、von Willebrand 因子(vWF)、WIF-1、WNT1、WNT10A、WNT10B、WNT11、WNT16、WNT2、WNT2B/13、WNT3、WNT3A、WNT4、WNT5A、WNT5B、WNT6、WNT7A、WNT7B、WNT8A、WNT8B、WNT9A、WNT9B、XCL1、XCL2/SCM-1-beta、XCL1/Lymphotactin、XCR1、XEDAR、XIAP、XPD 等。

【0108】作為本發明之抗原結合分子所含之抗體的可變區之中，能和「不同的 2 個抗原」結合但不能和該等抗原同時結合之可變區所結合之「第 1 抗原」及「第 2 抗原」、或能和「不同之 3 個抗原」結合但不能同時和該等抗原結合之可變區所結合之「第 1 抗原」、「第 2 抗原」及「第 4 抗原」，例如會在免疫細胞表面分子（例如，T 細胞表面分子、NK 細胞表面分子、樹狀細胞表面分子、B 細胞表面分子、NKT 細胞表面分子、MDSC 細胞表面分子、巨噬細胞類表面分子）、腫瘤細胞、腫瘤之血管、間質細胞等表現但於正常組織也會表現的抗原（整

合素、組織因子、VEGFR、PDGFR、EGFR、IGFR、MET趨化介素受體、乙醯肝素硫酸蛋白多糖、CD44、纖網蛋白、DR5、TNFRSF等）較理想。作為能和「不同之2個抗原」結合但不能同時和該等抗原結合之可變區所結合之「第1抗原」與「第2抗原」之組合，宜為第1抗原與第2抗原中任一者為例如：T細胞上專一性地表現的分子，另一抗原為在T細胞或其他免疫細胞表面表現的分子較佳。作為其他態樣，就「第1抗原」與「第2抗原」之組合而言，宜為第1抗原與第2抗原中之任一者係例如在T細胞上專一性地表現的分子，另一抗原為在免疫細胞上表現的和先前選出的抗原不同的分子較佳。具體而言，例如：在T細胞上專一性地表現的分子可列舉CD3、T細胞受體。尤其CD3較佳。本發明之抗原結合分子所結合之CD3之部位，例如：人CD3的情形，只要是構成人CD3之γ鏈、δ鏈或ε鏈序列存在的抗原決定位即可，可結合於任一抗原決定位。尤其人CD3複合體之ε鏈之細胞外區域存在之抗原決定位為較佳。構成CD3之γ鏈、δ鏈或ε鏈之結構，其多核苷酸序列記載於序列辨識號：83(NM_000073.2)、85(NM_000732.4)及87(NM_000733.3)，其多肽序列記載於序列辨識號：84(NP_000064.1)、86(NP_000723.1)及88(NP_000724.1)(括弧內顯示RefSeq註冊編號)。作為另一抗原，可列舉Fcγ受體、TLR、凝集蛋白、IgA、免疫核對點分子、TNF超級家族分子、TNFR超級家族分子、NK受體分子。

又，作為能和「不同之3個抗原」結合但不能同時和該等抗原結合之可變區所結合之「第1抗原」、「第2抗原」及「第

4抗原」之組合，宜為第1抗原、第2抗原、及第4抗原中任1者之抗原為例如：在T細胞上專一地表現之分子，其餘的2個抗原為在T細胞或其他免疫細胞表面表現之分子較佳。作為另一態樣，就「第1抗原」、「第2抗原」及「第4抗原」之組合而言，宜為第1抗原、第2抗原、及第4抗原中任1者之抗原為在例如：T細胞上專一地表現之分子，其餘2個抗原係在免疫細胞上表現之和先前選擇之抗原為不同之分子較佳。具體而言，例如就在T細胞上專一地表現之分子而言，可列舉CD3、T細胞受體。尤其CD3較佳。本發明之抗原結合分子所結合之CD3之部位，例如為人CD3情形，只要是構成人CD3之γ鏈、δ鏈或ε鏈序列存在之抗原決定位即可，可為結合在任一抗原決定位者。尤其人CD3複合體之ε鏈之細胞外域存在之抗原決定位為較佳。構成CD3之γ鏈、δ鏈或ε鏈之結構其多核苷酸序列記載於序列辨識號：83(NM_000073.2)、85(NM_000732.4)及 87(NM_000733.3)，其多肽序列記載於序列辨識號：84(NP_000064.1)、86(NP_000723.1)及88(NP_000724.1)(括弧內代表RefSeq登錄號)。又，其餘的2個抗原可列舉Fcγ受體、TLR、凝集蛋白、IgA、免疫核對點分子、TNF超級家族分子、TNFR超級家族分子、NK受體分子。

又，本發明之抗原結合分子所含之抗體之可變區中的另一可變區所結合的和先前的「第1抗原」、「第2抗原」、及「第4抗原」為不同的「第3抗原」，例如宜為腫瘤細胞專一性抗原，除了伴隨細胞之惡性化而表現的抗原以外，也包括細胞癌化時於細胞表面、蛋白質分子上出現的異常糖鏈。具體而言，s

例如：ALK 受體(pleiotrophin 受體)、pleiotrophin、KS 1/4 胰臟癌抗原、卵巢癌抗原(CA125)、前列腺酸磷酸、前列腺專一性抗原(PSA)、黑色素瘤關連抗原 p97、黑色素瘤抗原 gp75、高分子量黑色素瘤抗原(HMW-MAA)、前列腺專一性膜抗原、癌性胚抗原(CEA)、多型上皮黏蛋白抗原、人乳脂肪球抗原、CEA、TAG-72、CO17-1A、GICA 19-9、CTA-1 及 LEA 等結腸直腸腫瘤關連抗原、Burkitt 淋巴瘤抗原-38.13、CD19、人 B 淋巴瘤抗原-CD20、CD33、神經節苷脂 GD2、神經節苷脂 GD3、神經節苷脂 GM2 及神經節苷脂 GM3 等黑色素瘤專一性抗原、腫瘤專一性移植型細胞表面抗原(TSTA)、T 抗原、DNA 腫瘤病毒及 RNA 腫瘤病毒之外膜抗原等由病毒誘導的腫瘤抗原、結腸之 CEA、5T4 癌胎兒營養層糖蛋白質及膀胱腫瘤癌胎兒抗原等癌胎兒抗原 α-胎兒蛋白質、人肺癌抗原 L6 及 L20 等分化抗原、纖維肉瘤之抗原、人白血病 T 細胞抗原-Gp37、新生糖蛋白質、神經鞘脂、EGFR(上皮增殖因子受體)等乳癌抗原、NY-BR-16、NY-BR-16 及 HER2 抗原(p185HER2)、多型上皮黏蛋白(PEM)、惡性人淋巴球抗原-APO-1、胎兒紅血球中辨識到的 I 抗原等分化抗原、成人紅血球中辨識到的初期內胚葉 I 抗原、移植前之胚、胃癌中辨識到的 I(Ma)、乳腺上皮辨識到的 M18、M39、骨髓細胞中辨識到的 SSEA-1、VEP8、VEP9、Myl、VIM-D5、結腸直腸癌中辨識到的 D156-22、TRA-1-85(血液群 H)、睪丸及卵巢癌中辨識到的 SCP-1、結腸癌中辨識到的 C14、肺癌中辨識到的 F3、胃癌中辨識到的 AH6、Y 半抗原、胚性癌細胞中辨識到的 Ley、TL5(血液群 A)、A431 細胞中辨識到

的 EGF 受體、胰臟癌中辨識到的 E1 系列(血液群 B)、胚性癌細胞中辨識到的 FC10.2、胃癌抗原、腺癌中辨識到的 CO-514(血液群 Lea)、腺癌中辨識到的 NS-10、CO-43(血液群 Leb)、A431 細胞之 EGF 受體中辨識到的 G49、結腸癌中辨識到的 MH2(血液群 ALeb/Ley)、結腸癌中辨識到的 19.9、胃癌黏蛋白、骨髓細胞中辨識到的 T5A7、黑色素瘤中辨識到的 R24、胚性癌細胞中辨識到的 4.2、GD3、D1.1、OFA-1、GM2、OFA-2、GD2、及 M1:22:25:8 及 4~8 細胞階段之胚中辨識到的 SSEA-3 及 SSEA-4、皮下 T 細胞淋巴瘤抗原、MART-1 抗原、二烯丙基 Tn(STn)抗原、結腸癌抗原 NY-CO-45、肺癌抗原 NY-LU-12 變異體 A、腺癌抗原 ART1、腫瘤伴隨性關連腦-睪丸癌抗原(癌神經抗原 MA2、腫瘤伴隨性神經抗原)、神經癌腹部抗原 2(NOVA2)、血液細胞癌抗原基因 520、腫瘤關連抗原 CO-029、腫瘤關連抗原 MAGE-C1(癌/睪丸抗原 CT7)、MAGE-B1 (MAGE-XP 抗原)、MAGE-B2(DAM6)、MAGE-2、MAGE-4a、MAGE-4b 及 MAGE-X2、癌-睪丸抗原(NY-EOS-1)、YKL-40 及上述多肽中任一片段或對於此等加以修飾而得之結構等(前述修飾磷酸基、糖鏈等)、EpCAM、EREG、CA19-9、CA15-3、唾液酸基 SSEA-1(SLX)、HER2、PSMA、CEA、CLEC12A 等。

【0109】本發明之抗原結合分子可依該領域中通常知識者公知之方法製造。例如：抗體可依以下方法製作，但不限於此。將編碼為單離之多肽的基因導入適當寄主以製作抗體之寄主細胞與表現載體的許多組合為公知。該等表現系均可應用在將本發明之抗原結合分子予以單離。真核細胞使用作為寄主細胞

時，可以適當使用動物細胞、植物細胞、或真菌細胞。具體而言，動物細胞可列舉如下的細胞。

(1) 哺乳類細胞：CHO（中國倉鼠卵巢細胞株）、COS（猴腎細胞株）、骨髓瘤(Sp2/O、NS0 等)、BHK（乳倉鼠腎細胞株）、HEK293（具有減毒腺病毒(Ad)5 DNA 之人胚腎細胞株）、PER.C6 細胞（以腺病毒 Type 5 (Ad5) E1A 與 E1B 基因轉染之人胚胎視網膜細胞株 embryonic retinal cell line）、Hela、Vero 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

又，抗體也可以利用大腸菌(mAbs 2012 Mar-Apr; 4(2): 217-225.)、酵母(WO2000023579)製作。利用大腸菌製作的抗體沒有糖鏈附加。另一方面，酵母製作的抗體有糖鏈附加。

【0110】使為編碼為抗體重鏈的 DNA 且為編碼為可變區中之 1 或多數胺基酸殘基取代為目的之其他胺基酸之重鏈的 DNA、及編碼為抗體輕鏈之 DNA 表現。編碼為可變區中之 1 或多數胺基酸殘基取代為目的之其他胺基酸而得之重鏈或輕鏈的 DNA，例如可藉由取得編碼為對抗某抗原之利用公知方法製作之抗體之可變區的 DNA，導入適當取代，而可將編碼為該區域中之特定胺基酸之密碼子變成編碼為目的之其他胺基酸而得。

【0111】又，也可事先設計編碼為將對抗某抗原使用公知方法製作之抗體之可變區中之 1 或多數胺基酸殘基取代為目的

之其他胺基酸而得之蛋白質的 DNA，將該 DNA 進行化學合成，以獲得編碼為可變區中之 1 或多數胺基酸殘基取代為目的之其他胺基酸之重鏈的 DNA。胺基酸之取代部位、取代之種類無特殊限定。胺基酸改變之理想區域，可列舉可變區中之露出於溶劑之區域及迴圈區域。其中，CDR1、CDR2、CDR3、FR3 區域、及迴圈區域為較佳。具體而言，H 鏈可變區之 Kabat 編號 31~35、50~65、71~74、95~102、及 L 鏈可變區之 Kabat 編號 24~34、50~56、89~97 較佳，H 鏈可變區之 Kabat 編號 31、52a~61、71~74、97~101、及 L 鏈可變區之 Kabat 編號 24~34、51~56、89~96 更理想。

又，胺基酸改變不限於取代，也可為缺失、附加、插入、或修飾中任一者、或此等之組合。

【0112】又，編碼為可變區中之 1 或多數胺基酸殘基取代為目的之其他胺基酸而得之重鏈的 DNA，可區分為部分 DNA 製造。部分 DNA 之組合，例如：編碼為可變區之 DNA 與編碼為不變區之 DNA、或編碼為 Fab 區之 DNA 與編碼為 Fc 區之 DNA 等，但不限於此等組合。編碼為輕鏈之 DNA 也同樣可區分為部分 DNA 製造。

【0113】作為表現上述 DNA 之方法可列舉以下方法。例如：將編碼為重鏈可變區之 DNA 和編碼為重鏈不變區之 DNA 一起納入表現載體，建構重鏈表現載體。同樣，將編碼為輕鏈可變區之 DNA 和編碼為輕鏈不變區之 DNA 一起納入表現載體，並建構輕鏈表現載體。該等重鏈、輕鏈之基因也可納入到單一載體中。

【0114】當編碼為目的抗體之 DNA 納入到表現載體時，係在表現控制區域，例如：增強子、啟動子之控制下能表現的方式納入表現載體。然後，利用此表現載體將寄主細胞轉形，使抗體表現。此時，可以使用適當的寄主與表現載體的組合。

【0115】載體，例如 M13 系載體、pUC 系載體、pBR322、pBluescript、pCR-Script 等。又，為了將 cDNA 予以次選殖、切出，除了上述載體以外，可使用例如：pGEM-T、pDIRECT、pT7 等。

【0116】為了生產本發明之抗體而使用載體時，尤其表現載體為有用。表現載體，例如：寄主為 JM109、DH5α、HB101、XL1-Blue 等大腸菌時，須帶有能於大腸菌以良好效率表現的啟動子，例如：lacZ 啟動子(Ward 等, Nature (1989) 341, 544-546；FASEB J. (1992) 6, 2422-2427，全體納入本說明書中作為參考)、araB 啟動子(Better 等, Science (1988) 240, 1041-1043、全體納入本說明書中作為參考)、或 T7 啟動子等。如此的載體，除了上述載體以外，可列舉 pGEX-5X-1(Pharmacia 公司製)、「QIAexpress system」(QIAGEN 公司製)、pEGFP、或 pET（於此情形，寄主宜為表現 T7 RNA 聚合酶之 BL21 為較佳）等。

【0117】又，載體也可包括用以將多肽分泌的信號序列。作為多肽分泌之信號序列，於使其在大腸菌之細胞間質產生時，可使用 pelB 信號序列(Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4397、全體納入本說明書中作為參考)。載體向寄主細胞之導入，可使用例如脂質體(lipofectin)、磷酸鈣法、

DEAE-Dextran 法實施。

【0118】大腸菌表現載體以外，作為例如製造本發明之多肽之載體，考列舉哺乳動物來源的表現載體(例如：pcDNA3(Invitrogen 公司製)、pEGF-BOS(Nucleic Acids. Res. 1990, 18(17),p5322、全體納入本說明書中作為參考)、pEF、pCDM8)、昆蟲細胞來源的表現載體(例如「Bac-to-BAC baculovirus expression system」(GIBCO BRL 公司製)、pBacPAK8)、植物來源的表現載體(例如 pMH1、pMH2)、動物病毒來源的表現載體(例如：pHSV、pMV、pAdexLcw)、反轉錄病毒來源的表現載體(例如：pZIPneo)、酵母來源的表現載體(例如：「Pichia Expression Kit」(Invitrogen 公司製)、pNV11、SP-Q01)、枯草菌來源的表現載體(例如：pPL608、pKTH50)。

【0119】為了在 CHO 細胞、COS 細胞、NIH3T3 細胞、HEK293 細胞等動物細胞表現時，須要有在細胞內表現所必要的啟動子，例如 SV40 啟動子(Mulligan 等, Nature (1979) 277, 108、全體納入本說明書中作為參考)、MMTV-LTR 啟動子、EF1α 啟動子(Mizushima 等, Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322、全體納入本說明書中作為參考)、CAG 啟動子(Gene. (1991) 108, 193、全體納入本說明書中作為參考)、CMV 啟動子等，具有用以選拔轉形細胞之基因（例如，能利用藥劑(新黴素、G418 等)判別的藥劑耐性基因）則更佳。帶有如此特性之載體，例如：pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13 等。又，有時為了增加基因的副本數，會使 EBNA1 蛋白質共表現，於此情形，使用有複製開始點 OriP 的載體。(Biotechnol Bioeng.

2001 Oct 20;75(2):197-203.、Biotechnol Bioeng. 2005 Sep 20;91(6):670-7.)

【0120】再者，為了使基因安定表現且放大細胞內之基因副本數時，可列舉在核酸合成路徑缺損的 CHO 細胞導入具有和其互補之 DHFR 基因的載體（例如，pCHOI 等），利用胺甲喋呤(MTX)使其放大的方法，又，當為了暫時表現基因時，可列舉使用染色體上帶有表現 SV40 T 抗原之基因的 COS 細胞，以帶有 SV40 之複製起點的載體(pcD 等)轉形的方法。複製開始點也可使用多瘤病毒、腺病毒、牛乳突瘤病毒(BPV)等來源者。再者，為了以寄主細胞系將基因副本數放大，表現載體就選擇標記而言，可包括胺基糖苷轉移酶(APH)基因、胸腺嘧啶激酶(TK)基因、大腸菌黃嘌呤鳥嘌呤磷酸核糖基轉移酶(Ecogpt)基因、二氫葉酸還原酵素(dhfr)基因等。

【0121】抗體之回收，可藉由例如培養轉形的細胞後，從經分子轉形之細胞之細胞內或培養液分離以進行。抗體之分離、精製可適當組合離心分離、硫安分級、鹽析、超過濾、C1q、FcRn、蛋白質 A、蛋白質 G 管柱、親和性層析、離子交換層析、凝膠過濾層析等方法以實施。

【0122】多專一性抗體之有效率的製作方法，可適用 Knobs-into-holes 技術(WO1996/027011、Ridgway JB et al., Protein Engineering (1996) 9, 617-621、Merchant AM et al. Nature Biotechnology (1998) 16, 677-681)、導入電荷性排斥而抑制非目的之 H 鏈彼此締合的技術(WO2006/106905)等前述技術。

【0123】本發明提供一種抗原結合分子之製造方法，係製造包括能和不同的2個第1抗原與第2抗原結合之抗體之可變區且和第1抗原與第2抗原不同時結合之可變區（第1可變區）、及和與該第1抗原及第2抗原為不同之第3抗原結合之可變區（第2可變區）的抗原結合分子，包含以下步驟：製作該第1可變區之胺基酸序列為多樣之抗原結合分子庫。

【0124】例如可列舉包含以下步驟之製造方法：

(i) 製作抗原結合分子之庫，係和第1抗原或第2抗原結合之抗體之可變區中的至少1個胺基酸改變的抗原結合分子且含有該經改變之可變區之胺基酸的至少1個係彼此不同的可變區之抗原結合分子之庫；

(ii) 從製作之庫之中，選擇含有對於第1抗原及第2抗原有結合活性、但是不和該第1抗原及第2抗原同時結合之可變區之抗原結合分子；

(iii) 將包含編碼為步驟(ii)選出之抗原結合分子之該可變區的核酸與編碼為和第3抗原結合之抗原結合分子之可變區的核酸的寄主細胞進行培養，使含有會和第1抗原與第2抗原結合但是不和該第1抗原與第2抗原同時結合之抗體之可變區、及、和第3抗原結合之可變區的抗原結合分子表現；及

(iv) 從前述寄主細胞培養物回收抗原結合分子。

【0125】又，本製造方法中，步驟(ii)可為以下的選擇步驟：

(v) 從製作的庫中，選擇包含對於第1抗原及第2抗原有結合活性但不會和在各自不同的細胞上表現之第1抗原與第2抗原同時結合之可變區的抗原結合分子。

【0126】上述步驟(i)使用之抗原結合分子只要是含有抗體之可變區即不特別限定，可為 Fv、Fab、Fab'等抗體片段，也可為含有 Fc 區之抗體。

【0127】改變的胺基酸，可選擇例如和第 1 抗原或第 2 抗原結合之抗體之可變區之中不會因胺基酸改變而喪失向該抗原之結合的胺基酸。

【0128】本發明之胺基酸改變可單獨使用也可組合多數使用。

組合複數使用時，組合數不特別限定，例如：2 個以上 30 個以下，較佳為 2 個以上 25 個以下、2 個以上 22 個以下、2 個以上 20 個以下、2 個以上 15 個以下、2 個以上 10 個以下、2 個以上 5 個以下、2 個以上 3 個以下。

組合複數時，可只對於抗體之重鏈可變區或輕鏈可變區施加該胺基酸改變，也可對於重鏈可變區與輕鏈可變區兩者適當選別施加。

【0129】作為胺基酸改變的理想區域，可列舉可變區中之露出於溶劑之區域及迴圈區域。其中，CDR1、CDR2、CDR3、FR3 區域、及迴圈區域為較佳。具體而言，H 鏈可變區之 Kabat 編號 31~35、50~65、71~74、95~102、及 L 鏈可變區之 Kabat 編號 24~34、50~56、89~97 較理想，H 鏈可變區之 Kabat 編號 31、52a~61、71~74、97~101、及 L 鏈可變區之 Kabat 編號 24~34、51~56、89~96 更理想。

【0130】又，對於胺基酸殘基施加改變時，也包括將和第 1 抗原或第 2 抗原結合之抗體之可變區之中的上述區域之胺基酸

予以隨機改變、或將預先已知對於所望抗原有結合活性的胜肽插入到上述區域。藉此，從已施加改變之抗原結合分子之中選出能和第 1 抗原與第 2 抗原結合但不能和該等抗原同時結合的可變區，可獲得本發明之抗原結合分子。作為預先已知對於所望抗原有結合活性的胜肽，例如上述表 1 所示之胜肽。

【0131】是否是能和第 1 抗原與第 2 抗原結合但無法和該等抗原同時結合之可變區，又，第 1 抗原與第 2 抗原中的任一者於細胞上存在且另一者單獨存在、兩者單獨存在、或兩者存在於同一細胞上時，是否是能和第 1 抗原與第 2 抗原兩者同時結合但在各自不同的細胞上表現時不能同時結合之可變區，可依上述方法同樣地確認。

【0132】此外，本發明提供一種抗原結合分子之製造方法，係製造包含能和不同的 2 個第 1 抗原與第 2 抗原結合之抗體之可變區且不和第 1 抗原與第 2 抗原同時結合之可變區（第 1 可變區）的抗原結合分子，包含製作該第 1 可變區之胺基酸序列為多樣的抗原結合分子庫的步驟。

【0133】作為如此的抗原結合分子之製造方法，例如：包含以下步驟：

(i) 製作係和第 1 抗原或第 2 抗原結合之抗體之可變區之至少 1 個胺基酸經改變之抗原結合分子且含有該改變之可變區之胺基酸之至少 1 個彼此不同之可變區之抗原結合分子之庫；

(ii) 從製作之庫之中，選出含有對於第 1 抗原及第 2 抗原有結合活性但不和該第 1 抗原及第 2 抗原同時結合之可變區的抗原結合分子；

(iii) 將含有編碼為步驟(ii)選出之抗原結合分子之該可變區的核酸的寄主細胞進行培養，使含有能和第 1 抗原與第 2 抗原結合但不和該第 1 抗原與第 2 抗原同時結合之抗體之可變區的抗原結合分子表現；及

(iv)從前述寄主細胞培養物回收抗原結合分子。

又，用於上述胺基酸改變之理想區域可列舉重鏈可變區。更佳為例如可變區中之露出於溶劑之區域及迴圈區域。其中，CDR1、CDR2、CDR3、FR3 區域、及迴圈區域為較佳。具體而言，H 鏈可變區之 Kabat 編號 31~35、50~65、71~74、95~102、及 L 鏈可變區之 Kabat 編號 24~34、50~56、89~97 較理想，H 鏈可變區之 Kabat 編號 31、52a~61、71~74、97~101、及 L 鏈可變區之 Kabat 編號 24~34、51~56、89~96 更理想。

【0134】又，本製造方法中，上述步驟(ii)也可為以下選擇步驟：

(v) 從製作之庫之中，選擇含有對於第 1 抗原及第 2 抗原有結合活性但不和各自在不同的細胞上表現之第 1 抗原與第 2 抗原同時結合之可變區的抗原結合分子。

【0135】上述步驟(i)使用之抗原結合分子只要是含有抗體之可變區即不特別限定，可為 Fv、Fab、Fab'等抗體片段，也可為含 Fc 區之抗體。

【0136】經改變之胺基酸，可選擇例如：和第 1 抗原或第 2 抗原結合之抗體之可變區之中，不因胺基酸改變而喪失和該抗原之結合的胺基酸。

【0137】本發明之胺基酸改變可單獨使用也可使用多種。

組合複數個使用時，組合數不特別限定，如：2個以上30個以下，較佳為2個以上25個以下、2個以上22個以下、2個以上20個以下、2個以上15個以下、2個以上10個以下、2個以上5個以下、2個以上3個以下。

組合複數個時，可只對抗體之重鏈可變區或輕鏈可變區施以該胺基酸改變，也可對於重鏈可變區與輕鏈可變區兩者適當區分施加。

【0138】又，對於胺基酸殘基施加改變時，也包括將和第1抗原或第2抗原結合之抗體之可變區之中的上述區域之胺基酸予以隨機改變、或將預先已知對於所望抗原有結合活性的胜肽插入到上述區域。藉此，從已施加改變之抗原結合分子之中選出能和第1抗原與第2抗原結合但不能和該等抗原同時結合的可變區，可獲得本發明之抗原結合分子。作為預先已知對於所望抗原有結合活性的胜肽，例如上述表1所示之胜肽。

【0139】是否是能和第1抗原與第2抗原結合但無法和該等抗原同時結合之可變區，又，第1抗原與第2抗原中的任一者於細胞上存在且另一者單獨存在、兩者單獨存在、或兩者存在於同一細胞上時，是否是能和第1抗原與第2抗原兩者同時結合但在各自不同的細胞上表現時不能同時結合之可變區，可依上述方法同樣地確認。

【0140】又，依該製造方法製造之抗原結合分子也包括在本發明。

依本方法導入的胺基酸改變的種類、範圍無特殊限定。

【0141】作為本發明之庫之一非限定態樣，可列舉選擇

CD3（人 CD3 的情形，為構成人 CD3 之 γ 鏈、δ 鏈或 ε 鏈）作為第 1 抗原，由和 CD3 與任意第 2 抗原結合之抗原結合分子構成之庫。

【0142】本發明之資料庫之一理想可列舉如下：為由序列彼此不同之多數抗原結合分子為主而成，其特徵為：前述抗原結合分子中之抗原結合域，係能和第 1 抗原及與該第 1 抗原為不同之第 2 抗原結合，但不同時結合於該第 1 抗原與該第 2 抗原之抗體之可變區，前述第 1 抗原及前述第 2 抗原中之任一抗原為 CD3，另一抗原為在 T 細胞或其他免疫細胞表面表現之分子。

【0143】前述第 1 抗原及前述第 2 抗原中任一抗原為人 CD3 時，該抗原結合分子宜結合在構成人 CD3 之 γ 鏈、δ 鏈或 ε 鏈較佳。再者，前述可變區宜為不同時結合在各不同之細胞上表現之第 1 抗原及第 2 抗原之可變區較佳。在此，「在不同的細胞上表現」，只要是在各別的細胞上表現即可，如此的細胞之組合，例如：T 細胞與另一 T 細胞般為同種類細胞亦可，T 細胞與 NK 細胞般為不同種類細胞亦可。

【0144】又，本發明提供製造抗原結合分子之方法，該抗原結合分子含有能和不同之 3 個抗原（第 1 抗原、和該第 1 抗原為不同之第 2 抗原、及和該第 1 抗原及該第 2 抗原為不同之第 4 抗原）結合之抗體之可變區，係不同時結合於該 3 個抗原之可變區（第 1 可變區）、及結合於和該 3 個抗原為不同之第 3 抗原之可變區（第 2 可變區），包括以下步驟：

製作該第 1 可變區之胺基酸序列為多樣的抗原結合分子資

料庫。

【0145】例如可列舉包括以下步驟之製造方法：

(i) 製作抗原結合分子的資料庫，該抗原結合分子為會結合於不同之3個抗原（第1抗原、和該第1抗原為不同之第2抗原、及和該第1抗原及該第2抗原為不同之第4抗原）之抗體之可變區之至少1個胺基酸經改變之抗原結合分子，包括該經改變之可變區之胺基酸之至少1個係彼此不同的可變區；

(ii) 從製作之資料庫之中選擇包括對於該3個抗原有結合活性但不同時結合於該3個抗原之可變區的抗原結合分子；

(iii) 培養包括編碼為在步驟(ii)選擇之抗原結合分子之該可變區之核酸、與編碼為結合於第3抗原之抗原結合分子之可變區之核酸的寄主細胞，使包括能結合於該3個抗原但不同時結合於該3個抗原之抗體之可變區、及結合於第3抗原之可變區的抗原結合分子表現；及

(iv) 從前述寄主細胞培養物回收抗原結合分子。

【0146】又，本製造方法中，步驟(ii)也可為以下的選擇步驟：

(v) 從製作之資料庫之中，選擇包括對於前述3個抗原有結合活性但不同時結合於在各不同之細胞上表現之該3個抗原的可變區的抗原結合分子。

【0147】上述步驟(i)使用之抗原結合分子只要是包括抗體之可變區即可，不特別限定，可為Fv、Fab、Fab'等抗體片段，也可為包括Fc區之抗體。

【0148】改變之胺基酸，係選擇例如會結合於前述3個抗

原之抗體之可變區當中，不因胺基酸改變而喪失對於該抗原之結合的胺基酸。

【0149】本發明之胺基酸改變可單獨使用也可組合多個使用。

組合複數個使用時，組合數不特別限定，例如：2個以上30個以下，較佳為2個以上25個以下、2個以上22個以下、2個以上20個以下、2個以上15個以下、2個以上10個以下、2個以上5個以下、2個以上3個以下。

組合複數個時，可只對於抗體之重鏈可變區或輕鏈可變區施加該胺基酸改變，也可對於重鏈可變區與輕鏈可變區兩者適當區分施加。

【0150】胺基酸改變之理想區域可列舉可變區中之露出在溶劑之區域及迴圈區域。其中，CDR1、CDR2、CDR3、FR3區域、及迴圈區域為較佳。具體而言，宜為H鏈可變區之Kabat編號31~35、50~65、71~74、95~102、及L鏈可變區之Kabat編號24~34、50~56、89~97，更宜為H鏈可變區之Kabat編號31、52a~61、71~74、97~101、及L鏈可變區之Kabat編號24~34、51~56、89~96。

【0151】又，對於胺基酸殘基施加改變包括：將會結合於前述3個抗原之抗體之可變區之中之上述區域之胺基酸予以隨機改變，或將預先已知對於所望抗原有結合活性之胜肽插入到上述區域。以此方式，從已施加改變之抗原結合分子之中選出能和不同之3個抗原（第1抗原、和該第1抗原為不同之第2抗原、及和該第1抗原及該第2抗原為不同之第4抗原）結合

但不能同時和該等抗原結合之可變區，可藉此獲得本發明之抗原結合分子。作為預先已知對於所望抗原有結合活性之胜肽，例如上述表 1 所示之胜肽。

【0152】是否為能結合於前述 3 個抗原但不同時結合於該等抗原之可變區，進而於不同之 3 個抗原（第 1 抗原、第 2 抗原、第 4 抗原）中之任 1 者以上之抗原並非在細胞上而是單獨存在、或不同之 3 個抗原之任 2 者以上係存在於同一細胞上時，是否為關於此等抗原能同時結合但於各不同細胞上表現時則無法同時結合之可變區，可依上述方法同樣地確認。

【0153】又，本發明提供一種製造抗原結合分子之方法，該抗原結合分子包括能和不同之 3 個抗原（第 1 抗原、和該第 1 抗原為不同之第 2 抗原、及和該第 1 抗原及該第 2 抗原為不同之第 4 抗原）結合之抗體之可變區且係不同時結合於該 3 個抗原之可變區（第 1 可變區）；

包括以下步驟：

製作該第 1 可變區之胺基酸序列為多樣的抗原結合分子資料庫。

【0154】作為如此之抗原結合分子之製造方法例如包括以下步驟之製造方法：

(i) 製作抗原結合分子的資料庫，該抗原結合分子為和不同之 3 個抗原（第 1 抗原、和該第 1 抗原為不同之第 2 抗原、及和該第 1 抗原及該第 2 抗原為不同之第 4 抗原）結合之抗體之可變區之至少 1 個胺基酸經改變之抗原結合分子，且包括該經改變之可變區之至少 1 個胺基酸之係彼此不同的可變區；

(ii) 從製作之資料庫之中選擇包括對於該3個抗原有結合活性但不同時結合於該3個抗原之可變區的抗原結合分子；

(iii) 培養包括編碼為在步驟(ii)選擇之抗原結合分子之該可變區之核酸的寄主細胞，使包括能和該3個抗原結合但不同時和該3個抗原結合之抗體之可變區的抗原結合分子表現；及

(iv) 從前述寄主細胞培養物回收抗原結合分子。

又，上述胺基酸改變之理想區域可列舉重鏈可變區。更佳為例如可變區中之露出於溶劑之區域及迴圈區域。其中，CDR1、CDR2、CDR3、FR3領域、及迴圈區域為較佳。具體而言，H鏈可變區之Kabat編號31~35、50~65、71~74、95~102、及L鏈可變區之Kabat編號24~34、50~56、89~97較理想，H鏈可變區之Kabat編號31、52a~61、71~74、97~101、及L鏈可變區之Kabat編號24~34、51~56、89~96更理想。

【0155】又，本製造方法中，上述步驟(ii)也可為以下之選擇步驟：

(v) 從製作之資料庫之中選擇包括對於前述3個抗原有結合活性但不同時結合於在各不同之細胞上表現之該3個抗原之可變區之抗原結合分子。

【0156】上述步驟(i)使用之抗原結合分子只要包括抗體之可變區即可，不特別限定，可為Fv、Fab、Fab'等抗體片段，也可為包括Fc區之抗體。

【0157】改變之胺基酸，係選擇例如會結合於前述3個抗原之抗體之可變區當中，不因胺基酸改變而喪失對於該抗原之結合的胺基酸。

【0158】本發明之胺基酸改變可單獨使用也可組合多個使用。

組合複數個使用時，組合數不特別限定，例如：2個以上30個以下，較佳為2個以上25個以下、2個以上22個以下、2個以上20個以下、2個以上15個以下、2個以上10個以下、2個以上5個以下、2個以上3個以下。

組合複數個時，可只對於抗體之重鏈可變區或輕鏈可變區施加該胺基酸改變，也可對於重鏈可變區與輕鏈可變區兩者適當區分施加。

【0159】又，對於胺基酸殘基施加改變包括：將會結合於前述3個抗原之抗體之可變區之中之上述區域之胺基酸予以隨機改變，或將預先已知對於所望抗原有結合活性之胜肽插入到上述區域。以此方式，從已施加改變之抗原結合分子之中選出能和該3個抗原結合但不能同時和該等抗原結合之可變區，可藉此獲得本發明之抗原結合分子。作為預先已知對於所望抗原有結合活性之胜肽，例如上述表1所示之胜肽。

【0160】是否為能結合於前述3個抗原但不同時結合於該等抗原之可變區，進而於不同之3個抗原（第1抗原、第2抗原、第4抗原）中之任1者以上之抗原並非在細胞上而是單獨存在、或不同之3個抗原之任2者以上係存在於同一細胞上時，是否為關於此等抗原能同時結合但於各不同細胞上表現時則無法同時結合之可變區，可依上述方法同樣地確認。

【0161】依該製造方法製造之抗原結合分子也包括在本發明。

依本方法導入之胺基酸改變之種類、範圍無特殊限定。

【0162】本發明之資料庫之一非限定態樣可列舉：選擇CD3（人CD3的情形，為構成人CD3之γ鏈、δ鏈或ε鏈）作為第1抗原，由會結合於CD3與任意第2抗原及第4抗原之抗原結合分子構成的資料庫。

【0163】本發明之資料庫之一理想態樣，可列舉由序列彼此不同之多數抗原結合分子為主而成的資料庫，前述抗原結合分子中之抗原結合域為能和不同之3個抗原（第1抗原、和該第1抗原為不同之第2抗原、及和該第1抗原及該第2抗原為不同之第4抗原）結合但不同時和該3個抗原結合之抗體之可變區，前述第3個抗原中之任1者之抗原為CD3，其餘2個抗原為在T細胞或其他免疫細胞表面表現之分子。

【0164】前述3個抗原中之任1者之抗原為人CD3時，該抗原結合分子宜會結合於構成人CD3之γ鏈、δ鏈或ε鏈較佳。再者，前述可變區宜為不同時和在各不同之細胞上表現之該3個抗原結合的可變區較佳。在此，「在不同細胞上表現」只要是在各自之細胞上表現即可，如此的細胞之組合，例如：T細胞與另一T細胞般為同種類之細胞亦可，T細胞與NK細胞般為不同種類之細胞亦可。

【0165】本說明書中，「資料庫」或「資料庫」係指複數之數抗原結合分子或含抗原結合分子之多數融合多肽、或編碼為該等序列之核酸、多核苷酸。資料庫中所含之複數之數抗原結合分子或含抗原結合分子之多數融合多肽之序列，非單一序列，而是序列彼此不同之抗原結合分子或含抗原結合分子之融

合多肽。

【0166】本發明之一實施形態中，可製作本發明之抗原結合分子與異種多肽的融合多肽。在某實施形態，融合多肽，可和由病毒外殼蛋白質，例如 pIII、pVIII、pVII、pIX、Soc、Hoc、gpD、pVI 及其變異體構成之群中選出的病毒外殼蛋白質之至少一部分融合並獲得。

【0167】在某實施形態，本發明之抗原結合分子可為 ScFv、Fab 片段、$F(ab)_2$ 或 $F(ab')_2$，故於另一實施形態，可提供為該等抗原結合分子與異種多肽之融合多肽，且係主要由彼此序列不同的多數融合多肽而成的庫。具體而言，可提供係將該等抗原結合分子與選自於由病毒外殼蛋白質，例如 pIII、pVIII、pVII、pIX、Soc、Hoc、gpD、pVI 及其變異體構成之群中之病毒外殼蛋白質之至少一部分融合而得之融合多肽，且係主要由序列彼此不同的多數融合多肽而成的庫。本發明之抗原結合分子可進一步含有二聚物化分域。在某實施形態中，前述二聚物化分域可存在於抗體之重鏈或輕鏈可變區與病毒外殼蛋白質的至少一部分之間。此二聚物化分域可含有二聚物化序列之至少 1 個、及/或含 1 個或多數半胱胺酸殘基之序列。此二聚物化分域較佳為能和重鏈可變區或不變區之 C 末端連結。二聚物化分域，藉由是否製作為前述抗體可變區和病毒之外殼蛋白質成分的融合多肽成分（二聚物化分域之後不具 UAG(amber)終止密碼子）、或是否製作為前述抗體可變區主要不含病毒外殼蛋白質成分（例如，二聚物化分域之後有 UAG(amber)終止密碼子），可採取各種結構。當前述抗體可變

區係主要製作為和病毒外殼蛋白質成分之融合多肽時，可由 1 或多數雙硫鍵及/或單一之二聚物化序列進行二價展示。。

【0168】本說明書中，序列彼此不同之多數抗原結合分子的記載中，「序列彼此不同」的用語，係指資料庫中的各個抗原結合分子的序列彼此不同。亦即，資料庫中彼此不同的序列的數目反映出庫中之序列不同的獨立選殖體的數目，有時也指稱「資料庫尺寸」。通常之噬菌體展示庫為 10^6 至 10^{12}，可利用核糖體展示法等公知之技術將庫尺寸擴大到 10^{14}。但是噬菌體庫之淘選時使用之噬菌體粒子之實際數通常比起庫尺寸要大出 10 至 10,000 倍。此過剩倍數也稱為「資料庫當量數」，代表有相同胺基酸序列的各個選殖體可能有 10 至 10,000 個存在。是以本發明中「彼此序列不同」的用語，係指排除庫當量數後於資料庫中之各個抗原結合分子的序列彼此不同，更具體而言，是指彼此序列不同的抗原結合分子有 10^6 至 10^{14} 分子，較佳有 10^7 至 10^{12} 分子，更佳有 10^8 至 10^{11}，尤佳有 10^8 至 10^{10} 存在。

【0169】再者，本發明之主要由多數抗原結合分子而成的資料庫的記載中，「主要由...構成」之用語，反映出資料庫中序列不同的獨立選殖體之數中，抗原結合分子對於第 1 及/或第 2 抗原之結合活性（或抗原結合分子對於第 1、第 2、及/或第 4 抗原之結合活性）不同的抗原結合分子的數目。具體而言，顯示如此結合活性之抗原結合分子於庫中至少宜有 10^4 分子存在較佳。更佳為本發明提供顯示如此結合活性之抗原結合分子至少有 10^5 分子存在之資料庫。又更佳為本發明提供顯示如此

結合活性之抗原結合分子至少有 10^6 分子存在之資料庫。尤佳為本發明提供顯示如此結合活性之抗原結合分子至少有 10^7 分子存在之資料庫。較佳為本發明提供顯示如此結合活性之抗原結合分子至少有 10^8 分子存在之資料庫。於另一表達方式，也可利用以下方式表達：資料庫中之序列不同之獨立選殖體之數中，對於第 1 及/或第 2 抗原之抗原結合分子之結合活性（或抗原結合分子對於第 1、第 2、及/或第 4 抗原之結合活性）不同之抗原結合分子之比例。具體而言，本發明提供顯示如此結合活性之抗原結合分子的含量為庫中序列不同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%，更佳為 2%至 20%，尤佳為 4%至 10%之資料庫。融合多肽、多核苷酸分子或載體的情形亦和上述同，可以用分子數目、在分子全體的比例表達。又，病毒的情形亦上述同，可以用病毒個體的數目、在個體全體的比例表達。

【0170】就本發明之資料庫而言，包括能和第 1 抗原及與該第 1 抗原為不同之第 2 抗原結合，但不同時結合於該第 1 抗原與該第 2 抗原之抗體之可變區的多數抗原結合分子（或包括能和不同之 3 個抗原結合，但不同時和該 3 個抗原結合之抗體之可變區之多數抗原結合分子）宜在資料庫中存在至少 1 個分子、10 個分子、100 個分子、1000 個分子、10^4 個分子、10^5 個分子、10^6 個分子、10^7 個分子或 10^8 個分子較佳。提供包括能結合於第 1 抗原及與該第 1 抗原為不同之第 2 抗原但不同時結合於該第 1 抗原與該第 2 抗原之抗體之可變區的多數抗原結合分子（或包括能和不同之 3 個抗原結合，但不同時和該 3 個

抗原結合之抗體之可變區之多數抗原結合分子）之含量為資料庫中之序列不同之獨立選殖體數目之 10^{-7}%%至 80%，較佳為 10^{-6}%至 60%，更佳為 10^{-5}%至 40%、10^{-4}%至 30%、10^{-3}%至 20%、10^{-2}%至 10%、10^{-1}%至 1%的資料庫。

【0171】本發明中，就「由序列彼此不同之多數抗原結合分子為主而成之資料庫」之一態樣而言，係由(i)序列彼此不同之多數抗體之可變區、或含有該可變區之抗原結合分子、或(ii)編碼為該序列彼此不同之多數抗體之可變區、或含該可變區之抗原結合分子之核酸為主而成之資料庫。

【0172】在此，序列彼此不同之多數抗原結合分子，係包括對於資料庫之模板序列（例如，抗體之可變區）導入至少 1 個胺基酸之改變的可變區之抗原結合分子。作為為了胺基酸改變之理想區域，可列舉重鏈可變區及/或輕鏈可變區。更佳為可變區中之露出於溶劑之區域及迴圈區域。其中，CDR1、CDR2、CDR3、FR3 區域、及迴圈區域為較佳。具體而言，H 鏈可變區之 Kabat 編號 31~35、50~65、71~74、95~102、及 L 鏈可變區之 Kabat 編號 24~34、50~56、89~97 較理想，H 鏈可變區之 Kabat 編號 31、52a~61、71~74、97~101、及 L 鏈可變區之 Kabat 編號 24~34、51~56、89~96 更理想。

【0173】上述抗原結合分子只要含有抗體之可變區即可，不特別限定，可以為 Fv、Fab、Fab'等抗體片段，也可為包括 Fc 區之抗體。

【0174】改變胺基酸，可選擇例如：和第 1 抗原或第 2 抗原結合之抗體之可變區之中，不因胺基酸改變而喪失和該抗原

之結合的胺基酸。或改變之胺基酸可選擇和不同之 3 個抗原結合之抗體之可變區之中，不因胺基酸改變而喪失和該 3 個抗原之結合之胺基酸。

【0175】本發明之胺基酸改變可以單獨使用也可組合多數使用。

組合複數個使用時，組合數不特別限定，例如：2 個以上 30 個以下，較佳為 2 個以上 25 個以下、2 個以上 22 個以下、2 個以上 20 個以下、2 個以上 15 個以下、2 個以上 10 個以下、2 個以上 5 個以下、2 個以上 3 個以下。

組合複數個時，可只對於抗體之重鏈可變區或輕鏈可變區中之任一者施加該胺基酸改變，也可對於重鏈可變區與輕鏈可變區兩者適當區別施加。

【0176】又，對於胺基酸殘基施加改變，也包括：將會結合於第 1 抗原或第 2 抗原之抗體之可變區（或和第 1、第 2、或第 4 抗原結合之抗體之可變區）之中，上述區域之胺基酸予以隨機改變，或將預先已知對於所望抗原有結合活性之胜肽插入到上述區域。以此方式，從已施加改變之抗原結合分子之中選擇能和第 1 抗原與第 2 抗原結合但不能同時結合於該等抗原之可變區（或能和不同之 3 個抗原結合但不能同時和該 3 個抗原結合之可變區），藉此可獲得本發明之抗原結合分子。預先已知對於所望抗原有結合活性之胜肽，例如上述表 1 所示之胜肽。

【0177】是否為能結合於第 1 抗原與第 2 抗原但無法同時結合於該等抗原之可變區（或能結合於不同之 3 個抗原但無法

同時結合於該 3 個抗原之可變區），進而第 1 抗原與第 2 抗原中的任一者於細胞上存在且另一者單獨存在、兩者單獨存在、或兩者存在於同一細胞上時，是否是能和第 1 抗原與第 2 抗原兩者同時結合但在各自不同的細胞上表現時不能同時結合之可變區（或是否為不同之 3 個抗原之任一者以上不是在細胞上而是單獨存在時，或不同之 3 個抗原中之任 2 者以上存在於同一細胞上時，關於此等抗原能同時結合但在各不同細胞上表現時則不能同時結合之可變區），可依上述方法同樣地確認。

【0178】本說明書中，「噬菌體展示」係變異體多肽和噬菌體，例如和纖維狀噬菌體之粒子表面的外殼蛋白質的至少一部分融合而以蛋白質展示的手法。噬菌體展示的用途，在於從隨機的蛋白質變異體的大庫快速有效率地選出和對象抗原以高親和性結合的序列。噬菌體上之胜肽及蛋白質庫之展示利用在將數百萬多肽就專一性結合特性進行篩選。多價噬菌體展示方法，利用在藉由和纖維狀噬菌體之基因 III 或基因 VIII 之融合而展示無規胜肽及小蛋白質(Wells 及 Lowman(Curr.Opin. Struct.Biol. (1992) 3, 355-362)及其中的引用文獻)。一價之噬菌體展示時，蛋白質或胜肽之庫融合於基因 III 或其一部分，噬菌體粒子以展示融合蛋白質的 1 個或 0 個副本的方式，於野生型基因 III 蛋白質存在下以低水平表現。結合性(avidity)效果比起多價之噬菌體較低，所以篩選係依據內在性配體親和性，使用噬粒(phagemid)載體，此載體係將 DNA 操作簡化(Lowman 及 Wells、Methods：A Companion to Methods in Enzymology (1991) 3, 205-216)。

【0179】「噬粒」係具有細菌之複製起點，例如具有 ColE1 及細菌噬菌體之基因間區域之副本的質體載體。噬粒可適當使用各種公知之細菌噬菌體，例如纖維狀細菌噬菌體及 lambda 型細菌噬菌體。質體通常也含有抗生物質耐性之選擇標記。選殖到該等載體的 DNA 片段可增殖作為質體。導入了該等載體的細胞當具備生產噬菌體粒子所必要的全部基因時，質體之複製樣式會變化為圓周開捲(Rolling circle)複製，生成質體 DNA 之 1 條鏈的副本和噬菌體粒子包裝體。噬粒可形成感染性或非感染性噬菌體粒子。此用語包括異種多肽以在噬菌體粒子表面展示的方式就基因融合而言和此異種多肽之基因結合而得的噬菌體外殼蛋白質基因、或含其片段的噬粒。

【0180】用語「噬菌體載體」係指含有異種基因而能複製之細菌噬菌體之 2 條鏈複製型。噬菌體載體具有能實施噬菌體複製及形成噬菌體粒子的噬菌體複製起點。噬菌體較佳為纖維狀細菌噬菌體，例如 M13、f1、fd、Pf3 噬菌體或其衍生物、或 lambda 型噬菌體，例如 lambda、21、phi80、phi81、82、424、434、其他或其衍生物。

【0181】「寡核苷酸」係利用公知方法（例如：固相手法，例如利用 EP266032 記載之手法的磷酸三酯、亞磷酸鹽、或亞磷醯胺(phosphoramidite)化學、或 Froeshler 等(Nucl.Acids.Res. (1986) 14, 5399-5407)記載的去氧核苷酸 H-膦酸鹽中間體的方法）以化學合成的短的單條鏈或 2 條鏈的聚去氧核苷酸。其他方法包括以下記載之聚合酶連鎖反應及其他自動引子法(auto primer method)、及固體擔體上之寡核苷酸合成。該等方法都

記載於 Engels 等 (Agnew.Chem.Int.Ed.Engl. (1989) 28, 716-734)。若基因的全部核酸序列公知，或可利用和編碼鏈互補的核酸序列的話，則可使用該等方法。或對象胺基酸序列若為公知，可使用各胺基酸殘基之公知且理想的編碼殘基而適當推測可能的核酸序列。寡核苷酸可以利用聚丙烯醯胺凝膠或分子篩管柱、或沉澱法精製。

【0182】用語「融合蛋白質」及「融合多肽」係指帶有以共價鍵彼此鍵結的 2 個部分的多肽，為各部分有不同特性之多肽。此特性可為例如體外(*in vitro*)或體內(*in vivo*)活性等生物學的性質。又，此特性可為單一化學或物理性質，例如和對象抗原之結合、反應觸媒等。此 2 個部分可利用單一胜肽鍵直接結合，或介由含 1 或多數胺基酸殘基的胜肽連結子結合。通常此 2 個部分和連結子存在於相同讀框。較佳為多肽的 2 個部分係由異種或不同的多肽獲得。

【0183】用語「外殼蛋白質」是指蛋白質中，至少其一部分存在於病毒粒子表面。從機能上之觀點，外殼蛋白質是在寄主細胞建構病毒的過程中和病毒粒子結合的任意蛋白質，直到病毒感染其他寄主細胞為止維持和其結合。外殼蛋白質可為主要外殼蛋白質，也可為少量的外殼蛋白質。少量外殼蛋白質，是通常病毒外殼存在的外殼蛋白質，較佳為每 1 病毒粒子(virion)存在至少約 5 個，更佳為至少約 7 個，再更佳為至少約 10 個或更多蛋白質的副本。主要外殼蛋白質，每 1 病毒粒子可存在數十、數百或數千個副本。主要外殼蛋白質，例如纖維狀噬菌體之 p8 蛋白質。

【0184】本發明之一非限定態樣，製作資料庫之方法可列舉以下 6 種。

1. 對於結合第 1 抗原之抗原結合分子插入結合於第 2 抗原之胜肽(或結合於第 2 抗原之胜肽及結合於第 4 抗原之胜肽)(此用語係以包括多肽及蛋白質的方式使用)之方法

2. 製作在能將抗原結合分子中之迴圈加長改變(延長)的位置出現各種胺基酸的庫，從庫以對於抗原之結合活性作為指標，取得對於任意之第 2 抗原(或任意之第 2 抗原及任意之第 4 抗原)有結合活性之抗原結合分子之方法

3. 從已知對第 1 抗原結合的抗原結合分子之中，使用利用部位專一性變異法製作的抗體鑑定維持和第 1 抗原之結合活性的胺基酸，從出現鑑定的胺基酸的庫之中，以對於抗原之結合活性為指標，取得對於任意之第 2 抗原(或任意之第 2 抗原及任意之第 4 抗原)有結合活性之抗原結合分子之方法

4. 製作 3 之方法中能將抗原結合分子中之迴圈加長改變(延長)的位置出現各種胺基酸的抗體庫，從庫以對於抗原之結合活性作為指標，取得對於任意之第 2 抗原(或任意之第 2 抗原及任意之第 4 抗原)有結合活性之抗原結合分子之方法

5. 於 1.2.3.或 4.之方法中，進行改變使糖鏈附加序列(例如 NxS、NxT、x 為 P 以外之胺基酸)出現，並附加糖鏈受體認識之糖鏈之方法(例如附加高甘露糖型糖鏈，高甘露糖受體會認識。高甘露糖型糖鏈已知可藉由於抗體表現時添加 Kifunensine 而得(MAbs. 2012 Jul-Aug;4(4):475-87))

6. 於 1.2.3.或 4.之方法中，於迴圈部位、可改變為各種胺

基酸之部位插入或取代 Cys、Lys 或非天然胺基酸，而以共價鍵附加結合第 2 抗原之分域(或結合於第 2 抗原之分域及結合於第 4 抗原之分域)之方法(Antibody drug conjugate 為代表之方法，以共價鍵結合 Cys、Lys 或非天然胺基酸之方法(mAbs 6:1, 34-45; January/February 2014、WO2009/134891A2、Bioconjug Chem. 2014 Feb 19;25(2):351-61))

又，上述例示的 6 種庫製作方法中，抗原結合分子中之胺基酸取代處或在抗原結合分子中插入胜肽之處，宜為抗原結合分子之 Fab 或可變區部分為較佳。理想的區域例如可變區中之露出於溶劑之區域及迴圈區域。其中，CDR1、CDR2、CDR3、FR3 區域、及迴圈區域為較佳。具體而言，H 鏈可變區之 Kabat 編號 31~35、50~65、71~74、95~102、及 L 鏈可變區之 Kabat 編號 24~34、50~56、89~97 較理想，H 鏈可變區之 Kabat 編號 31、52a~61、71~74、97~101、及 L 鏈可變區之 Kabat 編號 24~34、51~56、89~96 更理想。

【0185】上述方法 1.記載的對於結合第 1 抗原之抗原結合分子插入結合第 2 抗原之胜肽（或結合於第 2 抗原之胜肽及結合於第 4 抗原之胜肽）的方法，就一態樣而言，可列舉如 Angew Chem Int Ed Engl. 2013 Aug 5;52(32):8295-8 例示般插入 G-CSF 之方法。就其他一態樣而言，插入的胜肽可從展示胜肽的庫取得，也可利用天然存在的蛋白質的全體或其一部分。

【0186】作為本發明之一態樣，提供包括以下步驟之資料庫之製造方法。

以下(a)及(b)之步驟：

(a) 將結合於第 1 抗原之抗體之可變區序列作為資料庫之模板序列，指定滿足以下之(i)至(iii)中之任一者以上之胺基酸改變；

(i) 不使對於第 1 抗原之結合能力實質上帶來變化之改變；

(ii) 不使 ECM 結合能力實質上帶來變化之改變；及

(iii) 向重鏈可變區、或輕鏈可變區之 CDR1、CDR2、CDR3 或 FR3 區域插入由 1 至 25 個殘基之胺基酸構成之胜肽；及

(b) 設計包括編碼為該模板序列之核酸、及包括編碼為該模板序列中有前述步驟(a)指定之 1 或多數胺基酸改變之彼此序列不同之可變區之核酸的資料庫。

依該製造方法可製造由序列彼此不同之多數抗原結合分子為主而成之資料庫，其特徵為：前述抗原結合分子中之抗原結合域係能結合於第 1 抗原及和該第 1 抗原為不同之第 2 抗原，但不同時結合於該第 1 抗原與該第 2 抗原之抗體之可變區，前述第 1 抗原及前述第 2 抗原中之任一抗原為 CD3，另一抗原為在 T 細胞或其他免疫細胞表面表現之分子。又，依該製造方法，可製造由序列彼此不同之多數抗原結合分子為主之資料庫，前述抗原結合分子中之抗原結合域係能結合於不同之 3 個抗原（第 1 抗原、和該第 1 抗原為不同之第 2 抗原、及和該第 1 抗原與第 2 抗原為不同的第 4 抗原），但不同時結合於該 3 個抗原之抗體之可變區，前述 3 個抗原中之任一抗原為 CD3，其餘 2 個抗原為在 T 細胞或其他免疫細胞表面表現之分子。

【0187】本發明中，「（資料庫之）模板序列」，係指成為用以製作資料庫之模板之序列的抗體胺基酸序列（例如：抗體之可變區序列、或 CDR 序列等），使用該序列指定能資料庫化之改變胺基酸（例如：由上述態樣(a)(i)、(ii)、(iii)指定），能製作抗原結合分子的資料庫。例如，第 1 抗原為 CD3 時，資料庫之模板序列可由該技術領域中有通常知識者適當選擇結合於 CD3 抗原之抗體之可變區序列。

【0188】為了上述步驟(a)(i)：指定不使對於 CD3 之結合能力實質上帶來變化之改變胺基酸（鑑定維持和第 1 抗原 CD3（人 CD3 的情形，為構成人 CD3 之 γ 鏈、δ 鏈或 ε 鏈）之結合活性的胺基酸），例如可實施據認為涉及抗原結合的部位的胺基酸改變，製作 1 胺基酸改變抗體並判斷。1 胺基酸改變抗體之 CD3 結合評價可適當選擇該領域中通常知識者公知之方法，可利用例如：ELISA、FACS(fluorescence activated cell sorting)、ALPHA screen(Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay)、利用表面電漿子共振(SPR)現象之 BIACORE 法等測定。

【0189】為了上述步驟(a)(i)：指定不使對於 CD3 之結合能力實質上帶來變化之改變胺基酸(鑑定維持與 CD3 之結合活性之胺基酸)，可使用各種改變體之結合量相對於改變前之抗體之比之結果。亦即，可使用令改變前抗體之結合量為 X、1 胺基酸改變體之結合量為 Y 時之 Z(結合量之比)＝Y/X 之值。Z(結合量之比)為 0.5 以上、0.6 以上、0.7 以上、0.8 以上、0.9 以上，較佳為 0.8 以上時，可認為相對於改變前之抗體維持結合。

可以維持該等結合之胺基酸出現的方式，製作抗體庫。

【0190】ECM(Extracellular matrix；細胞外基質)係細胞外之構成成分之一，存在於生命體內的各種部位。所以，已知和ECM 強結合的抗體於血中動態變差(半減期變短)(WO2012093704A1)。是以，就抗體庫出現的胺基酸，也宜選擇 ECM 結合未增強的胺基酸(指定不使 ECM 結合能力實質上帶來變化之改變胺基酸)較佳。

【0191】上述步驟(a)(ii)：指定不使 ECM 結合能力實質上帶來變化之改變胺基酸(選擇 ECM 結合未增強之胺基酸)時，可例如依參考實施例 2 之方法評價 ECM 結合，使用各改變體之 ECM 結合值(ECL response；ECL 反應之值)除以 MRA(H 鏈序列辨識號：57、L 鏈序列辨識號：58)之抗體 ECM 結合值而得之值。該值可考慮多數改變所獲致之 ECM 結合增強效果，以直到 5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、15 倍、20 倍、30 倍作為有效而採用，但較佳直到 10 倍作為有效而採用於庫。可依如此選擇之胺基酸出現的方法，製作抗體庫。

【0192】又，非不限於此，當向 CDR3 插入的胜肽為 6 個胺基酸時，CDR3 之伸長迴圈內若含有許多側鏈帶有正電荷的胺基酸，則向 ECM 之結合會增強，故迴圈內宜不出現 3 個以上的側鏈帶有正電荷的胺基酸較佳。

【0193】本發明之資料庫，為了增加資料庫多樣性，可於上述步驟(a)(iii)：指定被插入之改變胺基酸（於可變區插入胜肽）。胜肽插入的理想區域，例如可變區中之露出於溶劑之區域及迴圈區域。其中，CDR1、CDR2、CDR3、FR3 區域、及迴

圈區域為較佳。具體而言，H 鏈可變區之 Kabat 編號 31~35、50~65、71~74、95~102、及 L 鏈可變區之 Kabat 編號 24~34、50~56、89~97 較理想，H 鏈可變區之 Kabat 編號 31、52a~61、71~74、97~101、及 L 鏈可變區之 Kabat 編號 24~34、51~56、89~96 更理想。更佳為 H 鏈可變區之 Kabat 編號 99~100 之區域。又，胺基酸改變時，也可一併導入使和抗原之結合活性上昇之胺基酸。

【0194】作為本發明之一非限定態樣，插入胜肽之長度可例如為 1~3 個胺基酸、4~6 個胺基酸、7~9 個胺基酸、10~12 個胺基酸、13~15 個胺基酸、15~20 個胺基酸、21-25 個胺基酸，但較佳為 1~3 個胺基酸、4~6 個胺基酸、7~9 個胺基酸。

【0195】用以使庫之多樣性增強之胜肽之插入處與長度之研究，可藉由製作已插入胜肽的分子並評價該分子之 CD3 結合以實施。評價可適當選擇該領域中通常知識者公知之方法，例如可藉由 ELISA、FACS(fluorescence activated cell sorting)、ALPHA screen(Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay)、利用表面電漿子共振(SPR)現象之 BIACORE 法等測定。

【0196】作為本發明之一非限定態樣，可依以下方式設計用以取得和 CD3 與第 2 抗原（或 CD3 及第 2 抗原及第 4 抗原）結合之抗體之抗體庫。

步驟 1：選擇保持有 CD3 結合能力之胺基酸（CD3 結合量為未改變抗體之 80%以上）

例如：可依以出現步驟 1 選出之胺基酸的方式，製作用以取得和 CD3 與第 2 抗原（或 CD3 及第 2 抗原及第 4 抗原）結

合之抗體用的資料庫。

【0197】作為本發明之一非限定態樣，可依以下方式設計用以取得和 CD3 與第 2 抗原（或 CD3 及第 2 抗原及第 4 抗原）結合之抗體用的抗體庫。

步驟 1：選擇保持有 CD3 結合能力之胺基酸（CD3 結合量為未改變抗體之 80%以上）

步驟 2：將胺基酸插入 H 鏈 CDR3 之 99-100（Kabat 編號）之間

例如：除了步驟 1，尚於步驟 2 在 CDR3 區域插入胺基酸，可製作使庫之多樣性增強之用以取得和 CD3 與第 2 抗原（或 CD3 及第 2 抗原及第 4 抗原）結合之抗體之資料庫。

【0198】作為本發明之一非限定態樣，可依以下方式設計用以取得和 CD3 與第 2 抗原（或 CD3 及第 2 抗原及第 4 抗原）結合之抗體之抗體庫。

步驟 1：選擇保持有 CD3 結合能力之胺基酸（CD3 結合量為未改變抗體之 80%以上）

步驟 2：選擇 ECM 結合比起改變前，和 MRA 比較為 10 倍以內之胺基酸

步驟 3：於 H 鏈 CDR3 之 99-100（Kabat 編號）之間插入胺基酸

例如，除了步驟 1 及 3，更加入步驟 2，能針對在資料庫出現之胺基酸，也選擇 ECM 結合未增強之胺基酸，但不限於此手法。又，不經步驟 2 之資料庫設計，也能對於由資料庫取得之抗原結合分子測定 ECM 結合並進行評價。

【0199】作為本發明之一非限定態樣，當使用 VH 區域 CE115HA000（序列辨識號：52）作為 CD3(CD3ε)結合抗體之模板序列時，資料庫設計利用之改變胺基酸可列舉重鏈可變區所含之 Kabat 編號 11 位、31 位、52a 位、52b 位、52c 位、53 位、54 位、56 位、57 位、61 位、72 位、78 位、98 位、99 位、100 位、100a 位、100b 位、100c 位、100d 位、100e 位、100f 位、100g 位、101 位中任一者以上的胺基酸等。

使用對於 VH 區域 CE115HA000（序列辨識號：52）施以 V11L/L78I 之胺基酸改變而得之模板序列（序列辨識號：94）的上述資料庫為較佳，但不限定於此。再者，使用於 VH 區域 CE115HA000（序列辨識號：52）施以 V11L/A52aD/L78I 之胺基酸改變而得之模板序列（序列辨識號：95）的上述庫，或使用 CDR3 之序列延長之模板序列（序列辨識號：96）之上述資料庫為較佳，但不限定於此。例如序列辨識號：96 記載之重鏈可變區序列作為模板序列使用時，作為資料庫設計利用之改變胺基酸，可列舉重鏈可變區所含之 Kabat 編號 31 位、52b 位、52c 位、53 位、54 位、56 位、57 位、61 位、98 位、99 位、100 位、100a 位、100b 位、100c 位、100d 位、100e 位、100f 位、100g 位中之任一者以上之胺基酸等。作為其他一態樣，可使用 rCE115Hchain（序列辨識號：97）作為 CD3 結合抗體之模板序列。

【0200】作為本發明之一非限定態樣，當使用 VL 區域 GLS3000（序列辨識號：53）作為 CD3(CD3ε)結合抗體之模板序列時，作為庫設計利用之改變胺基酸，可列舉輕鏈可變區所

含之 Kabat 編號 24 位、25 位、26 位、27 位、27a 位、27b 位、27c 位、27e 位、30 位、31 位、33 位、34 位、51 位、52 位、53 位、54 位、55 位、56 位、74 位、77 位、89 位、90 位、92 位、93 位、94 位、96 位中之任一者以上的胺基酸等。

作為其他一態樣，可使用 rCE115Lchain（序列辨識號：98）作為 CD3 結合抗體之模板序列。

【0201】作為本發明之一非限定態樣，也可利用包括重鏈 CDR1（序列辨識號：99）、重鏈 CDR2（序列辨識號：100）及重鏈 CDR3（序列辨識號：101）之重鏈可變區序列作為 CD3 結合抗體之模板序列。作為另一態樣，也可利用已插入胺基酸 6 殘基之重鏈 CDR3（序列辨識號：102）。

再者，作為另一態樣，也可利用包括輕鏈 CDR1（序列辨識號：103）、輕鏈 CDR2（序列辨識號：104）及輕鏈 CDR3（序列辨識號：105）之輕鏈可變區序列作為 CD3 結合抗體之模板序列。

可變區所含之框架之胺基酸序列，可適當使用例如 IMGT(http://www.imgt.org/textes/IMGTrepertoire/)等網站包括之現在已知的完全人型框架區域之序列作為本發明之抗原結合分子所含之生殖細胞系列之序列，但不限於此。

【0202】本發明中，庫設計(設計)包括例如利用 NNK 及 TRIM Library 等(Gonzalez-Munoz A et al. MAbs 2012, Lee CV et al. J Mol Biol. 2004, Knappik A. et al. J Mol Biol. 2000, Tiller T et al. MAbs 2013)之公知之庫技術，設計含有特定部位之胺基酸改變為所望胺基酸之可變區之抗原結合分子之多數

改變體之庫，但不特別限定於此態樣。

【0203】本發明中，所謂「1或多數胺基酸」不特別限定胺基酸的數目，可為2種以上的胺基酸、5種以上的胺基酸、10種以上的胺基酸、15種以上的胺基酸或20種胺基酸。

【0204】作為本發明之一態樣，提供對於第1抗原之結合增強之可變區之選擇方法，包括以下步驟。

以下步驟(a)乃至(c)：

(a) 使本發明之資料庫和第1抗原接觸；

(b) 回收在前述步驟(a)結合於第1抗原之抗原結合分子；及

(c) 選擇在前述步驟(b)結合於第1抗原之抗原結合分子之集團之中，包括對於第1抗原之結合增強之可變區之抗原結合分子。

【0205】本態樣中，第1抗原宜為CD3較佳，但無特殊限定。

【0206】上述選擇方法使用之抗原結合分子只要是含有抗體之可變區即可，並不特別限定，可為Fv、Fab、Fab'等抗體片段，也可為包括Fc區之抗體。

【0207】上述步驟(c)中，可藉由對於該技術領域中有通常知識者公知之方法，例如：ELISA、FACS(fluorescence activated cell sorting)、ALPHAscreen(Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay)、表面電漿子共振(SPR)現象之BIACORE法等測定對於第1抗原之結合，以選擇包括對於第1抗原之結合增強之可變區之抗原結合分子。具體而言，比較包括選擇作

為上述資料庫之模板序列的可變區序列的抗原結合分子的結合活性以及在步驟(b)回收之結合於第 1 抗原之抗原結合分子之結合活性，當找到有比起包括模板之可變區序列之抗原結合分子的結合活性還高結合活性之抗原結合分子時，則可判斷該抗原結合分子為包括對於第 1 抗原之結合增強之可變區的抗原結合分子。

【0208】上述步驟(a)可使用之資料庫宜為藉由指定保持 CD3 結合能力 80%以上之胺基酸而製造之資料庫較佳，但不限於此。

【0209】作為本發明之一態樣，提供一種抗原結合分子之製造方法，包括以下步驟。

製造包括能和為 CD3 之第 1 抗原及與該第 1 抗原為不同之第 2 抗原結合但不同時結合於該第 1 抗原與該第 2 抗原之可變區之抗原結合分子之方法，包括以下步驟(a)至(c)：

(a) 使本發明之資料庫和第 2 抗原接觸；

(b) 回收在前述步驟(a)結合於第 2 抗原之抗原結合分子；及

(c) 從在前述步驟(b)回收之抗原結合分子之集團，選擇包括不同時結合於第 1 抗原與該第 2 抗原之可變區之抗原結合分子。

【0210】作為本發明之另一態樣，提供一種抗原結合分子之製造方法，包括以下步驟。

一種製造包括能結合於為 CD3 之第 1 抗原、與該第 1 抗原為不同之第 2 抗原、及與該第 1 抗原及該第 2 抗原為不同之

第 4 抗原，但不同時結合於該 3 個抗原之可變區之抗原結合分子之製造方法，包括以下步驟(a)乃至(f)：

(a) 使本發明之資料庫和第 2 抗原接觸；

(b) 回收在前述步驟(a)結合於第 2 抗原之抗原結合分子；

(c) 從在前述步驟(b)回收之抗原結合分子之集團，選擇包括不同時結合於第 1 抗原與該第 2 抗原之可變區之抗原結合分子；

(d) 使在前述步驟(c)回收之抗原結合分子之集團和第 4 抗原接觸；

(e) 回收在前述步驟(d)結合於第 4 抗原之抗原結合分子；及

(f) 從在前述步驟(e)回收之抗原結合分子之集團，選擇包括不同時結合於該第 1 抗原、該第 2 抗原、及該第 4 抗原之可變區之抗原結合分子。

【0211】於該等態樣，第 1 抗原為 CD3，第 2 抗原、第 4 抗原為在 T 細胞或其他免疫細胞表面表現之分子較佳。再者，第 2 抗原為 FcγR、TLR、凝集素、IgA、免疫檢查點分子、TNF 超級家族分子、TNFR 超級家族分子或 NK 受體分子較佳。

【0212】上述抗原結合分子只要含有抗體之可變區即不特別限定，可為 Fv、Fab、Fab'等抗體片段，也可為包括 Fc 區之抗體。

【0213】又，本製造方法中，步驟(c)也可為以下的選擇步驟：

(d) 從在前述步驟(b)回收之抗原結合分子之集團選擇包

括對於第 1 抗原及第 2 抗原有結合活性但不同時結合於在各不同細胞上表現之第 1 抗原與第 2 抗原之可變區的抗原結合分子。

又，本製造方法中，步驟(f)也可為以下的選擇步驟：

(g) 從在前述步驟(c)回收之抗原結合分子之集團，選擇包括對於第 1 抗原、第 2 抗原、及第 4 抗原有結合活性但不同時結合於在各不同細胞上表現之第 1 抗原、第 2 抗原、及第 4 抗原之可變區的抗原結合分子。

【0214】作為本發明之一態樣，提供一種包括共通 L 鏈可變區之雙專一性抗體之製造方法，包括以下步驟。

一種雙專一性抗體之製造方法，係使用如下的資料庫：

由序列彼此不同之多數抗原結合分子為主而成資料庫，前述抗原結合分子中之抗原結合域為由模板序列構成之可變區或在該模板序列中有至少 1 個胺基酸之改變之可變區，且為能結合於第 1 抗原及與該第 1 抗原為不同之第 2 抗原，但不同時結合於該第 1 抗原與該第 2 抗原之抗體之可變區；

包括以下步驟(a)至(c)：

(a) 選擇本發明之資料庫之模板序列作為結合於第 1 抗原之可變區；

(b) 選擇會結合於第 2 抗原但不會結合於第 1 抗原之可變區作為結合於第 2 抗原之可變區之步驟，包括以下的步驟(i)至(iv)；

(i) 使本發明之資料庫和所望之第 2 抗原接觸；

(ii) 回收在前述步驟(i)結合於第 2 抗原之抗原結合分子；

(iii) 使在前述步驟(ii)回收之抗原結合分子之集團接觸第1抗原；

(iv) 選擇在前述步驟(iii)不結合於第1抗原之抗原結合分子；及

(c) 製造包括在前述步驟(a)選擇之結合於第1抗原之可變區、及在前述步驟(b)選擇之結合於第2抗原之可變區的雙專一性抗體。

【0215】本態樣中，第1抗原為CD3，第2抗原為在癌組織專一性表現之分子較佳。

【0216】藉由使用本態樣製造雙專一性抗體，能有效率地取得包括例如和第1抗原CD3結合之可變區、及和在為第2抗原之癌組織專一性表現之分子結合之可變區的雙專一性抗體的共通L鏈可變區。

【0217】上述步驟(b)使用之抗原結合分子只要含有抗體之可變區，不特別限定，可以為Fv、Fab、Fab'等抗體片段，也可為包括Fc區之抗體。

【0218】關於融合多肽之展示，可將抗原結合分子之可變區之融合多肽於細胞、病毒或噬粒粒子的表面以各種態樣展示。該等態樣包括單鏈Fv片段(scFv)、F(ab)片段及該等片段之多價形態。多價之形態較佳為ScFv、Fab或F(ab')之二聚物，此等在本說明書分別指稱為(ScFv)2、F(ab)2及F(ab')2。多價形態之展示較理想的理由之一，可認為係：利用多價形態之展示，可鑑定通常低親和性之選殖體、或具有在選擇過程中更有效率地選擇稀少的選殖體之多數抗原結合部位。

【0219】在細菌噬菌體表面使含抗體片段之融合多肽展示之方法在該發明所屬之技術區域係為公知，例如 WO1992001047 及本說明書中已記載。此外，於 WO1992020791、WO1993006213、WO1993011236 及 1993019172 已記載關連的方法，該領域中通常知識者可適當使用該等方法。在其他公知文獻(H.R.Hoogenboom & G.Winter (1992) J. Mol. Biol. 227, 381-388、WO1993006213 及 WO1993011236)，揭示對於在噬菌體表面展示之各種抗原，利用人工再配置的可變區基因庫存所進行之抗體之鑑定。

【0220】為了以 scFv 態樣展示建構載體時，此載體含有編碼為抗原結合分子之輕鏈可變區及重鏈可變區的核酸序列。一般而言，編碼為抗原結合分子之重鏈可變區之核酸序列融合於病毒外殼蛋白質構成成分。編碼為抗原結合分子之輕鏈可變區的核酸序列，利用編碼為胜肽連結子之核酸序列而連結於抗原結合分子之重鏈可變區。胜肽連結子一般包括約至 15 個胺基酸。可任意地將有用於編碼為例如精製或檢測的標記的其他序列，融合在編碼為抗原結合分子之輕鏈可變區或抗原結合分子之重鏈可變區中之任一或兩者的核酸序列的 3'末端。

【0221】建構用於以 F(ab)態樣展示之載體時，此載體含有編碼為抗原結合分子之可變區及抗原結合分子之不變區之核酸序列。編碼為輕鏈可變區之核酸，融合於編碼為輕鏈不變區之核酸序列。編碼為抗原結合分子之重鏈可變區之核酸序列，融合於編碼為重鏈不變 CH1 區域之核酸序列。一般而言編碼為重鏈可變區及不變區之核酸序列，融合於編碼為病毒外殼蛋

白質的全部或一部分的核酸序列。重鏈可變區及不變區較佳為以和病毒外殼蛋白質之至少一部分的融合體的形式表現，輕鏈可變區及不變區則和重鏈病毒外殼融合蛋白質各自表現。重鏈及輕鏈彼此結合，此結合可為共價鍵也可為非共價鍵。可任意地將有用於編碼為例如精製或檢測的標記的其他序列，融合在編碼為抗原結合分子之輕鏈可變區的核酸序列的 3'末端或編碼為抗原結合分子之重鏈可變區中的核酸序列的 3'末端的任一者或兩者。

【0222】關於載體向寄主細胞之導入，以前述方式構建之載體，為了放大及/或表現而導入到寄主細胞。載體可以利用包括電穿孔、磷酸鈣沉澱等公知之轉形法而導入到寄主細胞。載體為如病毒之感染性粒子時，載體本身會侵入寄主細胞。利用插入有編碼為融合蛋白質之多核苷酸的可複製之表現載體進行寄主細胞之轉染及利用公知之手法進行噬菌體粒子之生產，可將融合蛋白質展示在噬菌體粒子表面。

【0223】可複製之表現載體，能使用各種方法導入到寄主細胞。於一非限定之實施態樣，載體可如 WO2000106717 記載，使用電穿孔法導入到細胞。將細胞於標準培養液中任意地於 37℃培養約 6 至 48 小時（或直到於 600nm 之 OD 成為 0.6 至 0.8 為止），然後將培養液離心分離，以將（例如利用傾析）培養上清取出。於精製之初期階段較佳為將細胞丸粒再懸浮於緩衝液（例如 1.0mM 之 HEPES(pH7.4)）中。然後，再度離心分離以從懸浮液取出上清。將獲得之細胞丸粒再懸浮於例如稀釋成 5-20%V/V 的甘油。再度離心分離以從懸浮液去除上清，以獲

得細胞丸粒。依藉由將該細胞丸粒再懸浮於水或稀釋的甘油之中獲得之懸浮液之菌體濃度之測定值，將最終菌體濃度使用水或稀釋甘油調整為所望濃度。

【0224】例如，作為理想接受細胞，可列舉有電穿孔回應能力的大腸菌株 SS320(Sidhu 等(Methods Enzymol. (2000) 328, 333-363))。大腸菌株 SS320，係將可孕性游離基因體(F'質體)或 XL1-BLUE 於對於移轉到 MC1061 細胞為充分的條件，使 MC1061 細胞和 XL1-BLUE 細胞交配而製備。對於在 ATCC (10801 University Boulevard, Manassas, Virginia)寄存的大腸菌株 SS320 給予寄存編號 98795。可於此菌株複製噬菌體的各種 F'游離基因體，亦可使用在本發明。適當的游離基因體可以由在 ATCC 寄存的菌株取得，或也可由市售品取得(TG1, CJ236、CSH18、DHF'、ER2738、JM101、JM103、JM105、JM107、JM109、JM110、KS1000、XL1-BLUE、71-18 等)。

【0225】若電穿孔使用更高 DNA 濃度（約 10 倍），轉形率會提高，向寄主細胞轉形之 DNA 的量增加。使用高菌體濃度也會提高效率（約 10 倍）。由於移轉的 DNA 量增加，有更大多樣性，能製作序列不同之獨立選殖體數目大的庫。轉形細胞通常可利用能否在含抗生物質之培養基增殖以選擇。

【0226】本發明提供編碼為本發明之抗原結合分子之核酸。本發明之該核酸可為 DNA、RNA 等各種形態。

【0227】本發明也提供含有上述本發明之核酸之載體。載體種類可因應導入有載體之寄主細胞由該領域中通常知識者適當選擇，例如可使用上述載體。

【0228】本發明也關於由上述本發明之載體轉形之寄主細胞。寄主細胞可由該領域中通常知識者適當選擇，例如可使用上述寄主細胞。

【0229】又，本發明提供一種醫藥組合物，含有本發明之抗原結合分子及醫學上可容許之擔體。本發明之醫藥組合物可除了本發明之抗原結合分子更導入醫藥上可容許之擔體，並以公知方法製劑化。例如：能以水或其他藥學上可容許之溶液的無菌性溶液、或懸浮液劑之注射劑之形態以非經口的使用。例如：藥理學上容許之擔體或介質，具體而言，可和滅菌水、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、黏結劑等適當組合，以一般認可的製藥實務要求的單位用量形態混合以製劑化。具體而言，可列舉輕質無水矽酸、乳糖、結晶纖維素、甘露醇、澱粉、羧甲纖維素鈣、羧甲纖維素鈉、羥丙基纖維素、羥丙基甲基纖維素、聚乙烯基縮醛二乙胺基乙酸酯、聚乙烯基吡咯烷酮、明膠、中鏈脂肪酸三酸甘油酯、聚氧乙烯硬化篦麻子油 60、白糖、羧基甲基纖維素、玉米澱粉、無機鹽類等作為擔體。此等製劑的有效成分量可設為能獲得指示之範圍的適當容量。

【0230】用以注射之無菌組合物可使用如注射用蒸餾水之運載劑依通常之製劑實務配方。注射用水溶液，例如含生理食鹽水、葡萄糖、其他輔助藥之等張液，例如 D-山梨醇、D-甘露糖、D-甘露醇、氯化鈉，也可和適當的溶解輔助劑，例如醇，具體而言，乙醇、多元醇例如丙二醇、聚乙二醇、非離子性界面活性劑例如 Polysorbate80(TM)、HCO-50 併用。

【0231】油性液可列舉麻油、黃豆油，也可和作為溶解輔助劑之苯甲酸苄酯、苯甲醇併用。又，也可摻合緩衝劑，例如磷酸鹽緩衝液、乙酸鈉緩衝液、止痛劑例如：鹽酸普卡因、安定劑例如苯甲醇、苯酚、抗氧化劑。調製的注射液通常填充在適當的安瓿。投予較佳為非經口投予，具體而言，可列舉注射劑型、經鼻投予劑型、經肺投予劑型、經皮投予型等。注射劑型，例如：利用靜脈內注射、肌肉內注射、腹腔內注射、皮下注射等以全身或局部性地投予。

【0232】又，可依患者的年齡、症狀選擇適當投予方法。含有多肽或編碼為多肽之多核苷酸之醫藥組合物之投予量，例如：可於每 1 次體重每 1kg 為 0.0001mg 至 1000mg 之範圍選擇。或例如：可於每位患者在 0.001 至 100000mg/body 之範圍的投予量選擇，可不一定限於該等數值。投予量、投予方法依患者之體重、年齡、症狀等而變動，可由該領域中通常知識者適當選擇。

【0233】又，本發明提供：包含投予本發明之抗原結合分子的步驟之癌治療方法、癌治療使用的本發明之抗原結合分子、癌治療劑製造時本發明之抗原結合分子之使用、及包含使用本發明之抗原結合分子之步驟之癌治療劑製造用的處理。

【0234】本說明書使用之胺基酸的 3 字母表示記載與單字母表示記載的對應如下。丙胺酸：Ala：A 精胺酸：Arg：R 天冬醯胺酸：Asn：N 天冬胺酸：Asp：D 半胱胺酸：Cys：C 麩醯胺酸：Gln：Q 麩胺酸：Glu：E 甘胺酸：Gly：G 組胺酸：His：H 異白胺酸：Ile：I 白胺酸：Leu：L 離胺酸：Lys：K 甲

硫胺酸：Met：M 苯丙胺酸：Phe：F 脯胺酸：Pro：P 絲胺酸：Ser：S 蘇胺酸：Thr：T 色胺酸：Trp：W 酪胺酸：Tyr：Y 纈胺酸：Val：V

【0235】該領域中通常知識者當然可理解：將本說明書記載之 1 或多數態樣任意組合者，只要和基於該領域中通常知識者之技術常識於技術上不矛盾即涵蓋於本發明。

【0236】本說明書引用的全部先前技術文獻援引於本說明書作為參照。

【0237】本發明依以下實施例進一步例示，但不限定於下列實施例。

【實施例】

【0238】[實施例 1] 和 CD3（第 1 抗原）及其他抗原（第 2 抗原）結合且不和不同的細胞上之 CD3（第 1 抗原）及該其他抗原（第 2 抗原）同時結合之改變免疫球蛋白可變(Fab)區域之概念

據認為，免疫球蛋白藉由向 2 分子以上的活性型 FcγR 同時結合、或向另一抗原與活性型 FcγR 同時結合而產生活化 FcγR 之交聯反應，則會傳達 FcγR 之 ITAM 信號，可能引起免疫細胞之活化。IgG 型之抗體 1 分子，如上述，由於僅能和 1 分子 FcγR 結合，所以只有在抗原存在下，2 分子以上的活性型 FcγR 交聯並引起免疫細胞活化。

【0239】又，IgG 型之抗體以可變區(Fab)和抗原結合時，由於能同時以 Fc 區和 1 分子 FcγR 結合，所以會發生表現該抗原之細胞與 FcγR 表現細胞間之交聯。依表現抗原表現之細

胞，有時會有抗原與 FcγR 之交聯較不理想的情形。具體而言，例如抗原為 CD3 時，藉由 T 細胞和 FcγR 表現細胞交聯，引起細胞介素釋出等免疫活化的情形(J. Immunol. (1999) Aug 1, 163(3), 1246-52)。如此的情形中，可藉由對於 Fc 區導入改變，而消除對於 FcγR 之結合活性，防止抗原與 FcγR 的交聯反應(Advanced Drug Delivery Reviews (2006) 58, 640- 656)。同樣地，IgG 型抗體之抗原為 CD40、OX40、CD27 等 TNFR 超級家族分子、CD3 與 TLR2、4、8、9 等 TLR 等的情形，亦為若介由 FcγR 發生交聯，則由於會發生全身性免疫活化，故和其他細胞表現之該等分子同時結合不理想。

【0240】另一方面，至今為止的多專一性抗體雖能和複數之抗原同時結合，但依抗原組合，有時不宜和多數抗原同時結合。例如，已知為黏著分子的整合素 αvβ3，因為在許多癌細胞及腫瘤周邊的血管表現，所以作為標靶腫瘤的目標分子為有用(R. Haubner, PLoS Med., 2,e70(2005))，但另一方面，已知在各種正常細胞也有表現(Thromb Haemost. 1998 Nov;80(5):726-34.)。因此，多專一性抗體若和 CD3 與整合素 αvβ3 的兩者同時結合，據認為正常細胞會因 T 細胞的強力細胞傷害活性而受傷害。

【0241】而作為控制如此之不宜的交聯反應的方法，有人考慮，1 個可變(Fab)區域中，其一部分和第 1 抗原結合，且未涉及此結合之該可變(Fab)區域的其他部分和第 2 抗原結合之可變區(Dual Binding Fab)(第 1 圖)。此時如第 1 圖所示，當 1 個可變(Fab)區域中靠近的 2 個部分須向各自的抗原結合時，若

第 1 抗原結合，會妨礙第 2 抗原之結合，同樣，若第 2 抗原之結合已結合的話，會妨礙第 1 抗原之結合。因此有如此的雙結合 Fab 之性質的改良抗體，無法和第 1 抗原及第 2 抗原同時結合，據認為不會引起第 1 抗原與第 2 抗原之交聯反應(第 2 圖)。又，當第 1 抗原與第 2 抗原係如可溶型蛋白質未在細胞膜上表現、或兩者係於同一細胞上存在時，雖能和第 1 抗原與第 2 抗原兩者同時結合，但於各自不同的細胞上表現時則無法同時結合，據認為 2 個細胞不交聯也是雙結合 Fab(Dual Binding Fab)(第 3 圖)。另一方面，據認為，和又另一者之可變(Fab)區域結合之抗原(第 3 抗原)會和第 1 抗原起交聯反應(第 4 圖)，又，也會和第 2 抗原起交聯反應(第 5 圖)。作為該抗體之不變區，可使用和 FcγR 結合之 Fc 區，也可使用對於 FcγR 之結合活性減低的 Fc 區。

若利用如此的雙結合 Fab 的性質，例如使利用介由抗體而重新導向 T 細胞以傷害表現癌抗原之癌細胞的技術進一步帶有標靶到癌組織中之整合素的功能，能使癌專一性更提高。

【0242】亦即，藉由將可變(Fab)區域改良成雙結合 Fab(Dual Binding Fab)，以賦予以下性質的話，能創制有第 1 圖所示之作用的抗體。

1. 對於第 1 抗原有結合活性

2. 對於第 2 抗原有結合活性

3. 對於第 1 抗原及第 2 抗原不同時結合

又，「對於第 1 抗原及第 2 抗原不同時結合」，包括：表現第 1 抗原之細胞與表現第 2 抗原之細胞的 2 個細胞不交聯、

或和在各自的細胞表現的第 1 抗原與第 2 抗原不同時結合，及，第 1 抗原與第 2 抗原為如可溶型蛋白質般未在細胞膜上表現、或兩者於同一細胞上存在時，雖能和第 1 抗原與第 2 抗原兩者同時結合，但在各自不同的細胞上表現時，無法同時結合的情形。

【0243】同樣地，藉由將可變(Fab)區域改良成雙結合 Fab，賦予以下性質的話，可創製例如有如第 6 圖之作用的抗體。

1. 對於 T 細胞上之第 1 抗原有結合活性

2. 對於抗原展示細胞上之第 2 抗原有結合活性

3. 對於第 1 抗原及第 2 抗原不同時結合

【0244】[實施例 2] 抗人、食蟹猴 CD3ε 抗體 CE115 之製作

(2-1) 使用人 CD3、食蟹猴 CD3 表現細胞免疫大鼠製作融合瘤

對於 SD 大鼠（雌、免疫開始時 6 週大、日本 Charles River），將人 CD3εγ 或食蟹猴 CD3εγ 表現 Ba/F3 細胞以下列方式免疫。若以初次免疫時為第 0 日，於第 0 日時將佛洛依德完全佐劑(Difco)和 5×10^7 個人 CD3εγ 表現 Ba/F3 細胞進行腹腔內投予。於第 14 日將佛洛依德不完全佐劑(Difco)和 5×10^7 個食蟹猴 CD3εγ 表現 Ba/F3 細胞進行腹腔內投予，之後每隔 1 週的期間將 5×10^7 個人或食蟹猴 CD3εγ 表現 Ba/F3 細胞交替地進行腹腔內投予 4 次。CD3εγ 之最終投予 1 週後(第 49 日)，將人 CD3εγ 表現 Ba/F3 細胞進行靜脈內投予作為追加(boost)，於 3 日後，將大鼠脾臟細胞與小鼠骨髓瘤細胞 SP2/0 依使用

PEG1500(Roche Diagnostics)之常法進行細胞融合。融合細胞，亦即融合瘤，係以含 10% FBS 之 RPMI1640 培養基（以下稱為 10%FBS/RPMI1640）進行培養。

【0245】融合的次日，(1) 將融合細胞懸浮於半流動培養基(StemCells)，進行融合瘤之選擇培養，同時實施融合瘤之群落化。

【0246】於融合後第 9 日或 10 日，挑取融合瘤的群落，於裝有 HAT 選擇培養基(10% FBS/RPMI1640、2 vol% HAT 50x concentrate(大日本製藥)、5 vol% BM-Condimed H1(Roche Diagnostics))的 96 井盤，每 1 井接種 1 個群落。培養 3~4 日後，回收各井之培養上清，測定培養上清中之大鼠 IgG 濃度。針對已確認大鼠 IgG 的培養上清，利用已附著人 CD3εγ 表現 Ba/F3 細胞、或不表現人 CD3εγ 之 Ba/F 的細胞-ELISA，挑選產生對於人 CD3εγ 專一性地結合的抗體的選殖體(第 7 圖)。再者，實施已附著食蟹猴 CD3εγ 表現 Ba/F3 細胞之細胞-ELISA，評價對於猴 CD3εγ 之交叉性(第 7 圖)。

【0247】(2-2) 抗人、猴 CD3ε 嵌合抗體之製作

從融合瘤細胞使用 RNeasy Mini Kits(QIAGEN)萃取總 RNA，依 SMART RACE cDNA Amplification Kit(BD Biosciences)合成 cDNA。使用製作的 cDNA，依 PCR 將抗體之可變區基因插入到選殖載體。各 DNA 片段之鹼基序列使用 BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems)，於 DNA 定序儀 ABI PRISM 3700 DNA Sequencer(Applied Biosystems)，依附帶說明書記載的方法定序。CE115 H 鏈可變區：（序列辨識號：13）

及 CE115 L 鏈可變區（序列辨識號：14）之 CDR、FR 之決定依 Kabat 編號實施。

【0248】將上述大鼠抗體 H 鏈可變區與人抗體 IgG1 鏈不變區結合而得之嵌合抗體 H 鏈、及上述大鼠抗體 L 鏈可變區與人抗體 Kappa 鏈不變區結合而得之嵌合抗體 L 鏈基因，嵌入到動物細胞表現載體。使用製作之表現載體實施 CE115 嵌合抗體之表現及精製（參考實施例 1）。

【0249】(2-3) EGFR_ERY22_CE115 之製作

然後，以對抗癌抗原(EGFR)之 IgG 作為基本骨架，製作其中一 Fab 置換為對抗 CD3ε 之結合分域的形式的分子。此時，作為基本骨架之 IgG 之 Fc，和上述情形同樣地，使用向 FcgR(Fcγ 受體)之結合性減弱的靜默型 Fc。作為對於 EGFR 之結合分域，使用 Cetuximab 之可變區 Cetuximab-VH（序列辨識號：15）、Cetuximab-VL（序列辨識號：16）。作為抗體 H 鏈不變區，使用已去除 IgG1 之 C 末端之 Gly 及 Lys 的 G1d、於 G1d 導入 D356K 及 H435R 之變異之 A5、及對於 G1d 導入 K439E 之變異的 B3，且將與各自的 Cetuximab-VH 組合而得的 Cetuximab-VH-G1d（序列辨識號：17）、Cetuximab-VH-A5（序列辨識號：18）、Cetuximab-VH-B3（序列辨識號：19）依參考實施例 1 之方法製備。又，抗體 H 鏈不變區之名稱定為 H1 時，可變區帶有 Cetuximab-VH 之抗體之 H 鏈所對應的序列如 Cetuximab-VH-H1 所示。

在此，顯示胺基酸改變的情形，如 D356K。最初的字母（相當於 D356K 之 D），意指改變前之胺基酸殘基以單字母表示記

載時的字母，接續的數字（相當於 D356K 之 356）意指其改變處之 EU 編號，最後的字母（相當於 D356K 之 K）意指改變後之胺基酸殘基以單字母表示記載時的字母。

【0250】製作對於 EGFR 之 Fab 之 VH 分域與 VL 分域置換而得的 EGFR_ERY22_CE115(第 8 圖)。亦即，使用已附加和上述方法同樣適當序列的引子的 PCR 法等該領域中通常知識者公知之方法，製作已插入各編碼為 EGFR ERY22_Hk（序列辨識號：20）、EGFR ERY22_L（序列辨識號：21）、CE115_ERY22_Hh（序列辨識號：22）、CE115_ERY22_L（序列辨識號：23）之多核苷酸的一系列的表現載體。

【0251】將以下所示組合的表現載體導入到 FreeStyle293-F 細胞，將各目的分子暫時性表現。

・目的分子：EGFR_ERY22_CE115

・由已插入到表現載體的多核苷酸編碼的多肽：EGFR _ERY22_Hk、EGFR _ERY22_L、CE115_ERY22_Hh、CE115_ERY22_L

【0252】(2-4) EGFR_ERY22_CE115 之精製

將獲得之培養上清添加到抗 FLAG M2 管柱(Sigma 公司)，將該管柱洗滌後，利用 0.1mg/mL FLAG 胜肽(Sigma 公司)實施溶出。將含目的分子之級分加到 HisTrap HP 管柱(GE Healthcare 公司)，將該管柱洗滌後，實施利用咪唑之濃度梯度所為之溶出。將含目的分子之級分以超過濾濃縮後，將該級分添加到 Superdex 200 管柱(GE Healthcare 公司)，僅回收溶出液之單體級分，藉此獲得精製的各目的分子。

【0253】(2-5) 使用人末梢血單核球測定細胞傷害活性

(2-5-1) 人末梢血單核球(PBMC：Peripheral Blood Mononuclear Cell)溶液之製備

使用已注入 1,000 單位/mL 之肝素溶液(Novo‧heparin 注 5 千單位，Novonordisk 公司)100μL 的注射器，從健康正常人自願者（成人）抽取末梢血 50mL。將以 PBS(-)稀釋 2 倍稀釋後分成 4 等分的末梢血，加到已預先注入 15mL Ficoll-Paque PLUS 並實施離心操作的 Leucosep 淋巴球分離管(Cat. No. 227290、Greiner bio-one 公司)。該分離管離心分離(2,150rpm、10 分鐘、室溫)後，分取單核球級分層。以含 10%FBS 之 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(SIGMA 公司，以下稱為 10%FBS/D-MEM)將單核球級分之細胞洗滌 1 次後，使用 10%FBS/D-MEM 調整該細胞之濃度，使細胞密度成為 4×10^6 /mL。以此方式製備的細胞溶液以人 PBMC 溶液的形式用在以後的試驗。

【0254】(2-5-2) 細胞傷害活性之測定

細胞傷害活性，依使用 xCELLigence 即時細胞分析儀(Roche Diagnostics co.)之細胞增殖抑制率評價。標的細胞使用使 SK-HEP-1 細胞株強制表現人 EGFR 而樹立的 SK-pca13a 細胞株。將 SK-pca13a 從培養皿剝離，以成為 1×10^4 cells/well 的方式，接種 100 μL/孔到 E-Plate 96 盤(Roche Diagnostics 公司)，使用 xCELLigence 即時細胞分析儀開始活細胞之測定。次日從 xCELLigence 即時細胞分析儀取出盤，於該盤添加調整為各濃度(0.004、0.04、0.4、4nM)的各抗體 50μL。於室溫使

其反應 15 分鐘後加入於(2-5-1)調製的人 PBMC 溶液 50μL(2×10^5 cells/孔)，將該盤再度安置於 xCELLigence 即時細胞分析儀，以開始活細胞之測定。反應係於 5%二氧化碳氣體、37℃的條件下實施，從人 PBMC 添加 72 小時後之 Cell Index 值，依下式求出細胞增殖抑制率(%)。又，計算使用之 Cell Index 值，使用以即將添加抗體時之 Cell Index 值成為 1 的方式常態化後的數值。

細胞增殖抑制率(%)＝(A-B)×100/(A-1)

A 代表未添加抗體之井的 Cell Index 值的平均值(只有標的細胞及人 PBMC)、B 代表各井之 Cell Index 值的平均值。試驗進行 3 重複。

【0255】將由人血液調製的 PBMC 作為效應子細胞，實施使用 CE115 測定之 EGFR_ERY22_CE115 之細胞傷害活性，結果有極強活性(第 9 圖)。

【0256】[實施例 3] 會和 CD3 及人整合素 αvβ3 結合但不同時結合之抗體之製作

如第 1~6 圖所示，雙結合 Fab 係於可變(Fab)區域會和 CD3（第 1 抗原）與目的抗原（第 2 抗原）結合，但不和 CD3（第 1 抗原）及目的抗原（第 2 抗原）同時結合之分子。當為了和第 2 抗原結合，於和 CD3（第 1 抗原）結合之抗體之 Fab 區導入胺基酸改變時，通常係於 2 個 H 鏈或 L 鏈兩者導入胺基酸改變。但是若於兩者之 H 鏈或 L 鏈導入改變，抗體的 2 個 Fab 分別和 2 個抗原結合，因此 2 個 Fab 與 CD3（第 1 抗原）及目的抗原（第 2 抗原）同時結合，可能會交聯。因此抗體之 1 個

Fab，設為和第 3 抗原結合或什麼也不結合的 Fab，而另一 Fab 設為雙結合 Fab，以不發生 CD3（第 1 抗原）及目的抗原（第 2 抗原）之交聯反應。

【0257】(3-1) 會和 CD3 及人整合素 αvβ3 結合但不同時結合之抗體之製作

就黏著分子而言已知之整合素 αvβ3 會於許多癌細胞及腫瘤的周圍血管表現，所以作為標靶腫瘤之標的分子為有用，但已知在各種正常細胞也會表現(Thromb Haemost. 1998 Nov;80(5):726-34.)。因此，若同時結合在 CD3 與整合素 αvβ3，據認為正常細胞可能會因 T 細胞的強力細胞傷害活性而受傷害。而據認為，若製作不同時結合於 CD3 與整合素 αvβ3 的分子，則不會對於正常細胞造成傷害，而能將抗 EGFR 抗體分子標靶到表現整合素 αvβ3 之腫瘤細胞。亦即，探討：以單側之可變區(Fab)結合於 EGFR，於另一可變區結合於第 1 抗原 CD3，進一步結合於第 2 抗原整合素 αvβ3，且不同時結合於 CD3 及整合素 αvβ3 之雙結合 Fab 分子之取得。

【0258】可說若能顯示以下特性：「係於整合素 αvβ3 不存在之條件，CD3 與 Fab 區結合，於 CD3 不存在之條件，整合素 αvβ3 與 Fab 區結合之分子，結合於 CD3 之分子為不結合於整合素 αvβ3 之分子、或與整合素 αvβ3 結合之分子為不結合於 CD3 之分子」，則能創製有目的之雙結合 Fab 之特性（亦即，能結合於 CD3 及第 2 抗原且不同時結合於 CD3 及第 2 抗原）的雙結合 Fab 分子。

【0259】(3-2) 帶有與整合素 αvβ3 結合之 Fab 區之抗體之

取得

作為取得雙結合 Fab 分子之方法，可考慮：利用資料庫之方法、與插入已知對於蛋白質有結合活性之胜肽的方法。作為對於整合素 αvβ3 有結合活性之胜肽，已知 RGD(Arg-Gly-Asp)胜肽。故，依參考實施例 1 製作：單側之 Fab 作為 EGFR 結合分域，另一側之 Fab 作為 CD3 結合分域及整合素 αvβ3 結合分域之異二聚化抗體，其係結合於 CD3ε 之抗體 CE115（重鏈可變區序列辨識號：13、輕鏈可變區序列辨識號：14）之重鏈迴圈部分已插入 RGD 胜肽之異二聚化抗體。亦即，製作已插入編碼為 EGFR ERY22_Hk(序列辨識號：20)、EGFR ERY22_L(序列辨識號：21）及 CE115_ERY22_L（序列辨識號：23）之多核苷酸以及編碼為以下任一者的多核苷酸的一系列表現載體：

・CE115_2 ERY22_Hh(序列辨識號：24、Kabat 編號 52b-53 各取代為 K 及 N）、

・CE115_4 ERY22_Hh(序列辨識號：25、Kabat 編號 52b-54 各取代為 S 及 N）、

・CE115_9 ERY22_Hh（序列辨識號：26、Kabat 編號 52a-52b 之間插入 RGD）、

・CE115_10 ERY22_Hh（序列辨識號：27、Kabat 編號 52b-52c 之間插入 RGD）、

・CE115_12 ERY22_Hh(序列辨識號：28、Kabat 編號 72-73 之間插入 RGD）、

・CE115_17 ERY22_Hh（序列辨識號：29、Kabat 編號 52b-52c 各取代為 K 及 S）、

・CE115_47 ERY22_Hh(序列辨識號：30、Kabat 編號 98-99 之間插入 RGD）、

・CE115_48 ERY22_Hh（序列辨識號：31、Kabat 編號 99-100 之間插入 RGD）、

・CE115_49 ERY22_Hh（序列辨識號：32、Kabat 編號 100-100a 之間插入 RGD）。

又，作為對照，依參考實施例 1 製作：在 J. Biotech, 155, 193-202, 2011 報告的抗體的 CH3 區插入有 RGD(Arg-Gly-Asp)胜肽的抗體（EH240-Kn125 /EH240-Hl076/L73；序列辨識號 33/34/35）。據認為，介由 CH3 區和整合素 αvβ3 結合的此分子，能同時結合於 CD3 與整合素 αvβ3。

【0260】(3-3) 整合素 αvβ3 與抗體之結合確認

Fab 區已插入 RGD(Arg-Gly-Asp)胜肽的分子是否與整合素 αvβ3 結合可依電化學發光法(ECL 法)判定。具體而言，將以含 0.1%BSA 及 0.1g/L 氯化鈣及 0.1g/L 氯化鎂之 TBS 溶液(表達為稀釋(+)溶液)稀釋而得的生物素-抗人 IgG Ab(Southern biotech)、調整為 5μg/mL 或 1μg/mL 之抗體溶液、已附加 sulfo-tag 之整合素 αvβ3(R&D Systems)，各添加 25μL 到 Nunc-Immuno^{Tm} MicroWell^{TM}96 井圓盤(Nunc)的各井並混合後，於 4℃溫育一晚，使抗體抗原複合體形成。將含 0.5%BSA 及 0.1g/L 氯化鈣及 0.1g/L 氯化鎂之 TBS 溶液(記載為阻斷(bloking)(+)溶液)各加 150μL 到鏈黴抗生物素蛋白盤(MSD)的各井，於 4℃溫育 1 晚。去除阻斷溶液後，以含 0.1g/L 氯化鈣及 0.1g/L 氯化鎂之 TBS 溶液(記載為 TBS(+)溶液)250μL 洗滌 3

次。將抗體抗原複合體溶液各添加 75μL 到各井，於室溫溫育 2 小時，使生物素-抗人 IgG Ab 結合於鏈黴抗生物素蛋白盤。去除抗體抗原複合體溶液後，以 TBS(+)溶液洗滌 3 次，將 READ 緩衝液(MSD)各加 150μL 到各井，以 Sector Imager 2400(MSD)檢測 sulfo-tag 的發光信號。

【0261】其結果示於第 11 圖。為親代抗體之 EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L 對於整合素 αvβ3 完全未顯示結合活性，相對地，EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_2 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_4 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_9 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_10 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_12 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_17 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_47 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_48 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_49 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L 均觀察到與整合素 αvβ3 之結合。

【0262】(3-4) CD3(CD3ε)與抗體之結合確認

然後，以 ECL 法判定於前項製作之和整合素 αvβ3 於 Fab 區結合之抗體是否保持對 CD3 之結合活性。具體而言，將以含 0.1%BSA 之 TBS 溶液(記載為稀釋(-)溶液)稀釋成的生物素-抗人 IgG Ab(Southern biotech)、調整為 5μg/mL 或 1μg/mL 之

抗體溶液、與已附加 sulfo-tag 之 CD3ε 均二聚物蛋白質，各加 25μL 到 Nunc-ImmunoTm MicroWellTm 96 井圓盤(Nunc)的各井並混合後，於 4℃ 溫育一晚，使抗體抗原複合體形成。將含 0.5%BSA 之 TBS 溶液(記載為阻斷(-)溶液)各加 150μL 到鏈黴抗生物素蛋白盤(MSD)的各井，於 4℃ 溫育 1 晚。去除阻斷溶液後，以 TBS 溶液(-)溶液 250μL 洗滌 3 次。將抗體抗原複合體溶液各加 75μL 到各井，於室溫溫育 2 小時，使生物素-抗人 IgG Ab 結合於鏈黴抗生物素蛋白盤。去除抗體抗原複合體溶液後，以 TBS(-)溶液洗滌 3 次，將 READ 緩衝液(MSD)各加 150μL 到各井，以 Sector Imager 2400(MSD)檢測 sulfo-tag 的發光信號。

【0263】其結果示於第 12 圖。為親代抗體之 EGFR ERY22_Hk/ EGFR ERY22_L /CE115 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L 以外，EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_2 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_4 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L / CE115_9 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/ EGFR ERY22_L /CE115_10 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_12 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_17 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L / CE115_47 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/ EGFR ERY22_L /CE115_48 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_49 ERY22_Hh/

CE115_ERY22_L 也都觀察到與 CD3 之結合。

【0264】(3-5) 利用 ECL 法確認整合素 αvβ3 與 CD3 不同時結合於 Fab 區

由直到前項之結果，獲得對於整合素 αvβ3 有結合活性且對於 CD3 有結合活性的分子。然後，判定是否直到前項製作的 Fab 區會同時結合於 CD3(CD3ε)及整合素 αvβ3。

【0265】Fab 區已插入 RGD(Arg-Gly-Asp)胜肽的分子當同時結合於整合素 αvβ3 與 CD3 時，若於抗體溶液加入整合素 αvβ3 及已附加生物素的 CD3，會結合於兩者之抗原，所以能以 ECL 法檢驗。具體而言，將經稀釋(+)溶液稀釋之已附著生物素的人 CD3ε 均聚二聚物蛋白質、調整成 10μg/mL 或 5μg/mL 之抗體溶液、已附加 sulfo-tag 之整合素 αvβ3(R&D Systems)，各加入 25μL 到 Nunc-Immuno^{Tm} MicroWell^{Tm} 96 井圓盤(Nunc)的各井並混合後，於 4℃ 溫育 1 晚，使抗體抗原複合體形成。將阻斷(+)溶液加 150μL 到鏈黴抗生物素蛋白盤(MSD)各井，於 4℃ 溫育 1 晚。去除阻斷溶液後，以含 0.1g/L 氯化鈣及 0.1g/L 氯化鎂之 TBS(+)溶液 250μL 洗滌 3 次。將抗體抗原複合體溶液各加 75μL 到各井，於室溫溫育 2 小時，使生物素-抗人 IgG Ab 與鏈黴抗生物素蛋白盤結合。去除抗體抗原複合體溶液後，以 TBS(+)溶液洗滌 3 次，將 READ 緩衝液(MSD)各加 150μL 到各井，以 Sector Imager 2400(MSD)檢測 sulfo-tag 的發光信號。

【0266】其結果示於第 13 圖、第 14 圖。Fab 區已插入 RGD(Arg-Gly-Asp)胜肽之 EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L

/CE115_2 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_12 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_17 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L，因為同時結合於整合素 αvβ3 與 CD3，於 ECL 測定檢測到強信號。而，EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_9 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L 與 EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_48 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L，此信號微弱(第 13 圖)。又，EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_4 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_10 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_47 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_49 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L 在 ECL 測定均幾乎未檢測到信號(第 14 圖)。亦即，啟示：該等抗體若與 CD3 結合，則不與整合素 αvβ3 結合。

【0267】(3-6) 利用 ECL 法考察整合素 αvβ3 與 CD3 不同時結合於 Fab 區

由以上的結果，可製備有以 1 個 Fab 分別結合於 CD3(CD3ε)、整合素 αvβ3 且不同時結合於 CD3(CD3ε)及整合素 αvβ3 之雙結合 Fab 分子特性的抗體。本實施例中，藉由對於具有結合於第 1 抗原 CD3 之可變區的抗體，將於該可變區結合於第 2 抗原整合素 αvβ3 之 RGD 胜肽插入 Fab，而賦予對於第 2 抗原之結合活性，且能取得不同時結合於 CD3 與第 2 抗原之分子。以同方法，藉由將對於 WO2006036834 例示之蛋

白質有結合活性之胜肽插入到 Fab 中之迴圈，可取得對於任意第 2 抗原有結合活性之雙結合 Fab 分子。此外，對於蛋白質顯示結合活性之胜肽，可使用該領域中通常知識者公知之方法製作胜肽庫，並選擇有所望活性之胜肽以取得(Pasqualini R., Nature, 1996, 380 (6572) :364-6)。再者，藉由使用將如實施例 5 記載之 Fab 中之迴圈加長改變（延長）的抗原結合分子的資料庫，據認為能製作對於任意第 2 抗原有結合活性之雙結合 Fab 分子。對抗第 1 抗原之可變區可以利用該領域中通常知識者公知之各種方法取得，所以使用如此的資料庫，可說能製作對於任意第 1 抗原與任意第 2 抗原有結合活性且無法同時結合於該第 1 抗原及該第 2 抗原之雙結合 Fab 分子。

【0268】由以上的結果，顯示 EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_4 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_10 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_47 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_49 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L 結合於 CD3 及整合素 αvβ3 且不同時結合於 CD3 與整合素 αvβ3。亦即 EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_4 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_10 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_47 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_49 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L 是有雙結合 Fab 的分子，可知能製作如此的分子。

【0269】[實施例4] 結合於CD3及人toll-like受體2(TLR2)但不同時結合之抗體之製作

(4-1) 結合於CD3及人TLR2但不同時結合之抗體之製作

已知為圖案認識受體的TLR2主要表現於巨噬細胞、樹狀細胞、B細胞等免疫細胞，作為活化免疫細胞的標的分子為有用。又，TLR2已知於上皮細胞、內皮細胞等免疫細胞以外的正常細胞也表現。藉由同時結合於癌抗原與CD3，會補充腫瘤環境中表現CD3的T細胞，由T細胞傷害癌細胞，但據認為因為同時結合於癌抗原與TLR2，腫瘤環境中表現TLR2之免疫細胞也會補充並能活化。被T細胞傷害的癌細胞被納入因TLR2而補充的免疫細胞，處理抗原，並展示於HLA，藉此能活化T細胞，故能更強力地活化T細胞，且同時也可能能誘導獲得免疫。但是若同時結合於CD3與TLR2，據認為免疫細胞及正常細胞會因T細胞的強力細胞傷害活性而可能受傷害。而若能製作不同時結合於CD3與TLR2的分子，據認為能對於表現TLR2之免疫細胞及正常細胞不造成傷害，而能補充該等細胞。亦即，研究：以單側之可變區(Fab)結合於EGFR，並以另一可變區結合於第1抗原CD3，進一步結合於第2抗原TLR2且不和CD3及TLR2同時結合之雙結合Fab分子的取得。

【0270】若能顯示以下特性：「係於TLR2不存在的條件，CD3與Fab區結合，於CD3不存在的條件，TLR2與Fab區結合之分子，且結合於CD3之分子為不結合於TLR2之分子、或與TLR2結合之分子為不結合於CD3之分子」，則可說能製作有目的雙結合Fab之特性（亦即，能結合於CD3及第2抗原、

且不同時結合於 CD3 及第 2 抗原）的雙結合 Fab 分子。

【0271】(4-2) 帶有和 TLR2 結合之 Fab 區之抗體之取得

已知 RWGYHLRDRKYKGVRSHKGVPR 胜肽（序列辨識號：36）係對於人 TLR2 有結合活性的胜肽。依參考實施例 1 製作：以單側 Fab 作為 EGFR 結合分域，將另一側 Fab 作為 CD3 結合分域及 TLR2 結合分域之異二聚化抗體，其係結合於 CD3ε 之抗體 CE115（重鏈可變區序列辨識號：13、輕鏈可變區序列辨識號：14）之重鏈迴圈部分插入有 TRL2 結合胜肽的異二聚化抗體抗體。亦即，製作插入有編碼為 EGFR ERY22_Hk（序列辨識號：20）、EGFR ERY22_L（序列辨識號：21）、及 CE115_ERY22_L（序列辨識號：23）之多核苷酸以及編碼為以下任一者的多核苷酸的一系列表現載體：

・CE115_DU21 ERY22_Hh（序列辨識號：37、Kabat 編號 52b-52c 之間插入 TRL2 結合胜肽）、

・CE115_DU22 ERY22_Hh（序列辨識號：38、Kabat 編號 52b-52c 之間插入 TRL2 結合胜肽）、

・CE115_DU26 ERY22_Hh（序列辨識號：39、Kabat 編號 72-73 之間插入 TRL2 結合胜肽）、

・CE115_DU27 ERY22_Hh（序列辨識號：40、Kabat 編號 72-73 之間插入 TRL2 結合胜肽）。

又，作為對照，依參考實施例 1 製作將 TLR2 結合胜肽附加於 CH3 區 C 末端而得的抗體（CE115_ERY22_DU42_Hh, 序列辨識號：41）、及將 TLR2 結合胜肽兩端帶有 Cys 殘基的胜肽附加到 CH3 區 C 末端而得的抗體（CE115_ERY22_DU43_Hh,

序列辨識號：42）。介由 CH3 區而和 TLR2 結合的此分子，據認為能同時結合於 CD3 與 TLR2。

【0272】(4-3) TLR2 與抗體之結合確認

於 Fab 區已插入 TLR2 結合胜肽的分子是否會和 TLR2 結合，係以電化學發光法(ECL 法)判定。具體而言，將經含 0.1%BSA 之 TBS 溶液(記載為稀釋(-)溶液)稀釋的生物素-抗人 IgG Ab(Southern biotech)、調整為 5μg/mL 或 1μg/mL 之抗體溶液、已附加 sulfo-tag 之 TLR2(abnova)，各加 25μL 到 Nunc-Immuno^{Tm} MicroWell^{Tm} 96 井圓盤(Nunc)之各井並混合後，於 4℃溫育 1 晚，使抗體抗原複合體形成。將含 0.5%BSA 之 TBS 溶液(記載為阻斷(-)溶液)各加 150μL 到鏈黴抗生物素蛋白盤(MSD)各井，於 4℃溫育 1 晚。去除阻斷溶液後以 TBS(-)溶液 250μL 洗滌 3 次。將抗體抗原複合體溶液各加 75μL 到各井，於室溫溫育 2 小時，使生物素-抗人 IgG Ab 與鏈黴抗生物素蛋白盤結合。去除抗體抗原複合體溶液後以 TBS(-)溶液洗滌 3 次，加 READ 緩衝液(MSD)各 150μL 到各井，以 Sector Imager 2400(MSD)檢測 sulfo-tag 的發光信號。

【0273】其結果示於第 15 圖。親代抗體 EGFR ERY22_Hk/ EGFR ERY22_L /CE115 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L 對於 TLR2 完全未顯示結合活性，相對地，EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L / CE115_DU21 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/ EGFR ERY22_L /CE115_DU22 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_DU26 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_DU27 s

ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L 均觀察到與 TLR2 之結合。

【0274】(4-4) CD3(CD3ε)與抗體之結合確認

然後以 ECL 法判定是否前項製作的會和 TLR2 於 Fab 區結合的抗體是否保持對於 CD3(CD3ε)的結合活性。具體而言，將經含 0.1%BSA 之 TBS 溶液(記載為稀釋(-)溶液)稀釋的生物素-抗人 IgG Ab(Southern biotech)、調整為 5μg/mL 或 1μg/mL 之抗體溶液、及已附加 sulfo-tag 之 CD3ε 均二聚物蛋白質，各加 25μL 到 Nunc-ImmunoTm MicroWellTm 96 井圓盤(Nunc)之各井，混合後於 4℃溫育 1 晚，使抗體抗原複合體形成。將含 0.5%BSA 之 TBS 溶液(記載為阻斷(-)溶液)各加 150μL 到鏈黴抗生物素蛋白盤(MSD)各井，於 4℃溫育 1 晚。去除阻斷溶液後，以 TBS 溶液(-)溶液 250μL 洗滌 3 次。各加抗體抗原複合體溶液 75μL 到各井，於室溫溫育 2 小時，使生物素-抗人 IgG Ab 與鏈黴抗生物素蛋白盤結合。去除抗體抗原複合體溶液後，以 TBS(-)溶液洗滌 3 次，各加 150μL READ 緩衝液(MSD)到各井，以 Sector Imager 2400(MSD)檢測 sulfo-tag 的發光信號。

【0275】其結果示於第 16 圖。除了親代抗體 EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L，EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_DU21 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L 、 EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_DU22 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/ EGFR ERY22_L /CE115_DU26 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_DU27 ERY22_Hh/

CE115_ERY22_L 也均觀察到和 CD3 之結合。

【0276】(4-5) 利用 ECL 法確認 TLR2 與 CD3 不同時結合於 Fab 區

由直到前項之結果，獲得對於 TLR2 有結合活性且對於 CD3 有結合活性的分子。然後判定是否直到前項製作的 Fab 區會同時結合於 CD3 及 TLR2。

【0277】當於 Fab 區已插入 TLR2 結合胜肽的分子會同時結合於 TLR2 與 CD3 時，若於抗體溶液加入 TLR2 與已附加生物素的 CD3，會與兩者之抗原結合，故能以 ECL 法檢測。具體而言，將經稀釋(-)溶液稀釋之已附加生物素的人 CD3ε 均二聚物蛋白質、調整為 10μg/mL 或 5μg/mL 之抗體溶液、及已附加 sulfo-tag 之 TLR2(R&D Systems)，各加 25μL 到 Nunc-Immuno^{Tm} MicroWell^{Tm} 96 井圓盤(Nunc)之各井並混合後，於 4℃ 溫育 1 晚，使抗體抗原複合體形成。各加阻斷(-)溶液 150μL 到鏈黴抗生物素蛋白盤(MSD)各井，於 4℃ 溫育 1 晚。去除阻斷溶液後，以含 0.1g/L 氯化鈣及 0.1g/L 氯化鎂之 TBS(-)溶液 250μL 洗滌 3 次。將抗體抗原複合體溶液各加 75μL 到各井並於室溫溫育 2 小時，使生物素-抗人 IgG Ab 與鏈黴抗生物素蛋白盤結合。去除抗體抗原複合體溶液後以 TBS(-)溶液洗滌 3 次，各加 READ 緩衝液(MSD)150μL 到各井，以 Sector Imager 2400(MSD)檢測 sulfo-tag 的發光信號。

【0278】其結果示於第 17 圖。於 CH3 區已附加 TLR2 結合胜肽之 EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_DU42 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_DU43

ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L，因同時結合於 TLR2 與 CD3，於 ECL 測定檢測出強信號。另一方面，EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_DU21 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_DU22 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_DU26 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L / CE115_DU27 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L 均於 ECL 測定幾乎未檢測到信號。亦即啟示：該等抗體若與 CD3 結合則不與 TLR2 結合。

【0279】(4-6) 利用 ECL 法考察 TLR2 與 CD3 不同時結合於 Fab 區

由以上的結果，可知能製作有以 1 個 Fab 分別結合於 CD3、TLR2 且不同時結合於 CD3 及 TLR2 之雙結合 Fab 分子特性的抗體。本實施例中，藉由對於具有結合於第 1 抗原 CD3 之可變區的抗體，在該可變區將結合第 2 抗原 TLR2 之 RWGYHLRDRKYKGVRSHKGVPR 胜肽插入到 Fab，而能取得賦予對於第 2 抗原之結合活性且不會同時結合於 CD3 與第 2 抗原之分子。以同方法，藉由將對於如 WO2006036834 例示之蛋白質有結合活性之胜肽插入到 Fab 中之迴圈，能取得對於任意第 2 抗原有結合活性的雙結合 Fab 分子。此外，對於蛋白質顯示結合活性之胜肽，可使用該領域中通常知識者公知之方法製作胜肽庫並選擇有所望活性之胜肽以取得(Pasqualini R., Nature, 1996, 380 (6572) :364-6))。再者，藉由使用如實施例 5 記載之 Fab 中之迴圈加長改變（延長）的抗原結合分子的資料

庫，據認為可製作對於任意第 2 抗原有結合活性的雙結合 Fab 分子。對抗第 1 抗原之可變區可依該領域中通常知識者公知之各種方法取得，故藉由使用如此的資料庫，可說能製作對於任意第 1 抗原與任意第 2 抗原有結合活性且無法同時結合於該第 1 抗原及該第 2 抗原之雙結合 Fab 分子。

【0280】由以上的結果，顯示，EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_DU21 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_DU22 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_DU26 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L / CE115_DU27 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L 會結合於 CD3 及 TLR2 且不同時結合於 CD3 與 TLR2。亦即 EGFR ERY22_Hk/ EGFR ERY22_L /CE115_DU21 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_DU22 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_DU26 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L、EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L / CE115_DU27 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L 係有雙結合 Fab，且解明可製作如此的分子。

【0281】[實施例 5] 用以製作結合於 CD3 及第 2 抗原之抗體的抗體改變

(5-1)能結合於第 2 抗原之胜肽之插入處與長度之探討

探討以單側之可變區(Fab)結合於癌抗原，以另一可變區結合於第 1 抗原 CD3，並且結合於第 2 抗原但不同時結合於 CD3 及第 2 抗原之雙結合 Fab 分子之取得。依參考實施例 1 製作：

係以單側 Fab 作為 EGFR 結合分域，以另一側之 Fab 作為 CD3 結合分域之異二聚化抗體，其係結合於 CD3ε 之抗體 CE115 之重鏈迴圈部分插入有 GGS 胜肽之異二聚化抗體。

【0282】亦即，製作 CDR2 中之 K52B 與 S52c 之間插入有 GGS 之 EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_CE31 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L：（序列辨識號：20/21/43/23）、插入有 GGSGGS 胜肽（序列辨識號：90）之 EGFR ERY22_Hk/ EGFR ERY22_L /CE115_CE32 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L（序列辨識號：20/21/44/23）、插入有 GGSGGSGGS 胜肽（序列辨識號：91）之 EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_CE33 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L：（序列辨識號：20/21/45/23）。同樣地，製作框架 3 中之迴圈狀部位 D72 與 D73 之間插入 GGS 之 EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_CE34 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L:（序列辨識號：20/21/46/23）、插入有 GGSGGS 胜肽（序列辨識號：90）之 EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_CE35 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L（序列辨識號：20/21/47/23）、插入有 GGSGGSGGS 胜肽（序列辨識號：91）之 EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_CE36 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L：（序列辨識號：20/21/48/23）。又，製作在 CDR3 中之 A99 與 Y100 之間插入有 GGS 之 EGFR ERY22_Hk/ EGFR ERY22_L /CE115_CE37 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L：（序列辨識號：20/21/49/23）、插入有 GGSGGS 胜肽之 EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_CE38 ERY22_Hh/ CE115_ERY22_L（序列辨識號：20/21/50/23）、插入有 GGSGGSGGS 胜肽之

EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L /CE115_CE39 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L：（序列辨識號：20/21/51/23）。

【0283】(5-2) 已插入 GGS 胜肽之 CE115 抗體向 CD3ε 之結合確認

利用 BiacoreT100 確認製作的各種抗體是否維持向 CD3ε 之結合性。於 CM5 晶片介由鏈黴抗生物素蛋白使生物素化 CD3ε 抗原決定位胜肽結合，使製作的抗體作為分析物流過，解析結合親和性。

【0284】其結果示於表 2。CE35、CE36、CE37、CE38、CE39 向 CD3ε 之結合親和性，與親代抗體 CE115 為同等。由此顯示：該等迴圈中能插入結合於第 2 抗原之胜肽。又，已插入 GGSGGSGGS 的 CE36、CE39，結合親和性也未降低，故顯示該等處至少插入 9 個胺基酸為止的胜肽，不影響向 CD3ε 之結合性。

【0285】【表 2】

樣本	ka	kd	KD	插入位置	連結子
CE115_M	1.5E+05	9.8E-03	6.7E-08		
CE31	2.3E+05	3.5E-02	1.5E-07	K52b-S52c	GS3
CE32	8.5E+04	1.8E-02	2.1E-07	K52b-S52c	GS6
CE33	4.9E+05	1.1E-01	2.3E-07	K52b-S52c	GS9
CE34	1.1E+05	1.3E-02	1.2E-07	D72-D73	GS3
CE35	1.3E+05	1.1E-02	8.7E-08	D72-D73	GS6
CE36	1.2E+05	1.2E-02	9.9E-08	D72-D73	GS9
CE37	2.2E+05	2.0E-02	9.4E-08	A99-Y100	GS3
CE38	2.0E+05	1.7E-02	8.7E-08	A99-Y100	GS6
CE39	1.6E+05	1.4E-02	9.1E-08	A99-Y100	GS9

【0286】亦即，顯示：藉由使用如此的胜肽插入 CE115 以取得對於第 2 抗原結合之抗體，能製作會結合於 CD3 與第 2 抗原但不同時結合之抗體。

在此，藉由將插入或取代的胜肽的胺基酸序列依部位專一性變異誘發法(Kunkel 等(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1985) 82, 488-492))、Overlap extension PCR 等公知方法隨機改變，並依上述方法比較各改變體之結合活性等，並改變胺基酸序列，以決定能顯示目的活性之插入、取代處、其胺基酸種類、長度，可製作資料庫。

【0287】[實施例 6] 用以取得結合於 CD3 及第 2 抗原之抗體之資料庫設計

(6-1) 針對取得結合於 CD3 及第 2 抗原之抗體之抗體庫(也稱為雙 Fab 資料庫)

選擇 CD3(CD3ε)作為第 1 抗原，取得結合於 CD3(CD3ε)與任意第 2 抗原之抗體的方法可列舉以下 6 種方法。

1. 在結合於第 1 抗原之 Fab 分域插入結合於第 2 抗原之胜肽或多肽的方法（實施例 3 與 4 所示之胜肽插入以外，尚有如 Angew Chem Int Ed Engl. 2013 Aug 5;52(32):8295-8 例示之插入 G-CSF 之方法。）結合之胜肽或多肽，可從展示胜肽或多肽之資料庫取得，也可進一步利用天然存在蛋白質之全體或其一部分。

2. 製作如實施例 5 所示，Fab 中之迴圈能加長改變(延長)之位置出現各種胺基酸的抗體庫，而以從抗體庫向抗原之結合活性為指標取得對於任意第 2 抗原有結合活性之 Fab 之方法

3. 使用從預先已知對於 CD3 結合的 Fab 分域利用部位專一性變異法製得的抗體，鑑定維持與 CD3 之結合活性之胺基酸，從會出現已鑑定之胺基酸的抗體庫，以抗體庫向抗原之結

合活性為指標，取得對於任意第 2 抗原有結合活性之 Fab 的方法

4. 製作 3 之方法能進一步將 Fab 中之迴圈加長改變（延長）之位置有各種胺基酸出現的抗體庫，以抗體庫向抗原之結合活性為指標，取得對於任意第 2 抗原有結合活性之 Fab 的方法

5. 於 1.2.3.或 4.之方法中，進行改變使糖鏈附加序列(例如 NxS, NxT、x 為 P 以外之胺基酸)出現，並附加糖鏈受體認識之糖鏈之方法(例如附加高甘露糖型糖鏈，高甘露糖受體會認識。高甘露糖型糖鏈已知可藉由於抗體表現時添加 Kifunensine 而得(MAbs. 2012 Jul-Aug;4(4):475-87))

6. 於 1.2.3.或 4.之方法中，於迴圈部位、可改變為各種胺基酸之部位插入或取代 Cys、Lys 或非天然胺基酸，而以共價鍵附加結合於第 2 抗原之分域之方法(Antibody drug conjugate 為代表之方法，以共價鍵結合 Cys、Lys 或非天然胺基酸之方法、記載於 mAbs 6:1, 34-45; January/February 2014、WO2009/134891A2、Bioconjug Chem. 2014 Feb 19;25(2):351-61))

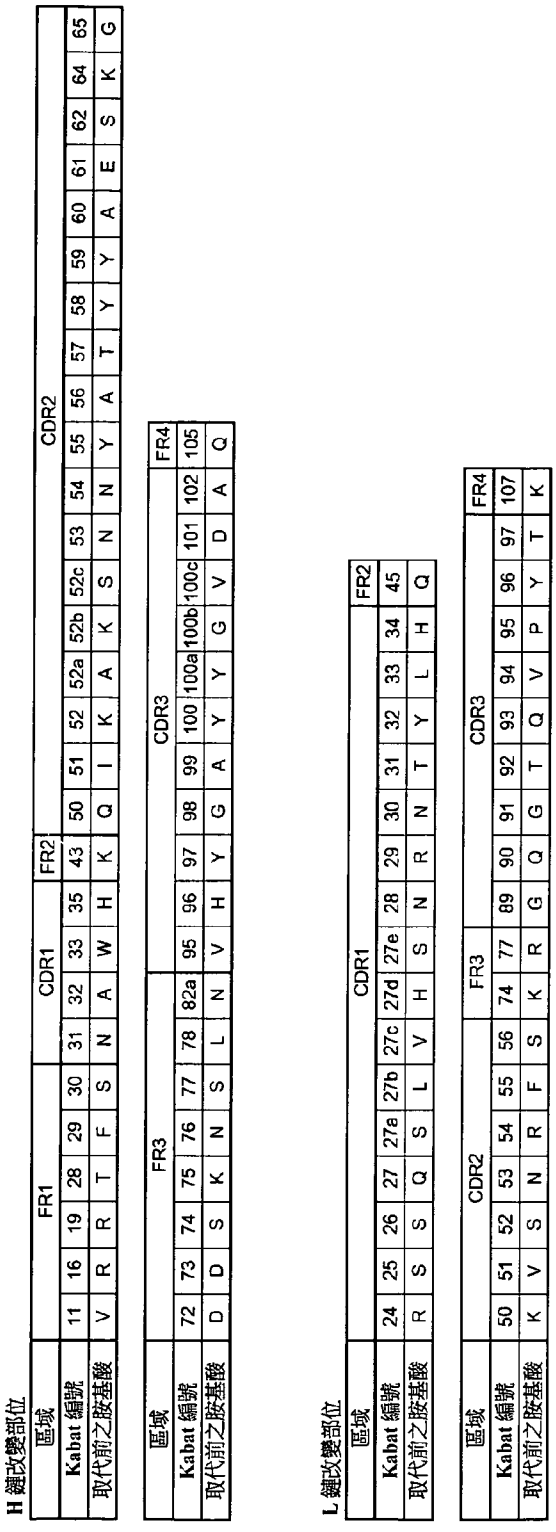
使用上述方法，可獲得與第 1 抗原與第 2 抗原結合且彼此不同時結合的雙結合 Fab，且與任意第 3 抗原結合之分域（稱為另一可變區，記載於實施例 1）可依該領域中通常知識者公知之方法，例如利用共通 L 鏈、Cross mab、Fab arm exchange 法組合。

【0288】(6-2) 使用部位專一性變異法製作 CD3(CD3ε)結合抗體之 1 胺基酸改變抗體

作為 CD3(CD3ε)結合抗體之模板序列之 VH 區域選擇 CE115HA000（序列辨識號：52）、VL 區域選擇 GLS3000（序列辨識號：53）。各對於認為涉及抗原結合的部位，參考實施例 1 實施胺基酸改變。又，H 鏈之不變區使用 pE22Hh（對於天然 IgG1 之 CH1 以後的序列施加 L234A, L235A, N297A, D356C, T366S, L368A, Y407V 的改變，使 C 末端之 GK 序列缺失而附加 DYKDDDDK 序列（序列辨識號：89）之序列，序列辨識號：54），L 鏈不變區使用 Kappa 鏈（序列辨識號：55）。已實施改變的部位示於表 3。為了實施 CD3(CD3ε)結合活性評價，取得單臂抗體（天然型 IgG 的其中一 Fab 分域缺損的抗體）作為 1 胺基酸改變抗體。具體而言，H 鏈改變的情形，使用經改變之 H 鏈和不變區 pE22Hh 連結而得者以及 Kn010G3（對於天然型 IgG1 之 216 號以後的胺基酸序列施以 C220S, Y349C, T366W、H435R 之改變者，序列辨識號：56）與 kappa 鏈連結於 3'側而得之 GLS3000，L 鏈改變的情形使用於經改變之 L 鏈之 3'側連結有 Kappa 鏈之序列、與就 H 鏈而言於 3'側有 pE22Hh 連結之 CE115HA000 與 Kn010G3，以 FreeStyle293 細胞實施表現・精製（使用參考實施例 1 之方法）。

【0289】

【表 3】



H 鏈改變部位

區域	FR1										CDR1					FR2	CDR2															
Kabat 編號	11	16	19	28	29	30	31	32	33	35	43	50	51	52	52a	52b	52c	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	64	65
取代前之胺基酸	V	R	R	T	F	S	N	A	W	H	K	Q	I	K	A	K	S	N	N	Y	A	T	Y	Y	A	E	S	K	G

區域	FR3																							FR4	
Kabat 編號	72	73	74	75	76	77	78	82a	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	101	102	105					
取代前之胺基酸	D	D	S	K	N	S	L	N	V	H	Y	G	A	Y	Y	G	V	D	A	Q					

L 鏈改變部位

區域	CDR1													FR2	
Kabat 編號	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	28	29	30	31	32	33	34	45
取代前之胺基酸	R	S	S	Q	S	L	V	H	S	N	R	N	T	Y	L	H	Q

區域	CDR2						FR3																				FR4	
Kabat 編號	50	51	52	53	54	55	56	74	77	89	90	91	92	93	94	95	96	97	107									
取代前之胺基酸	K	V	S	N	R	F	S	K	R	G	Q	G	T	Q	V	P	Y	T	K									

【0290】(6-3) 1 胺基酸改變抗體之 CD3 結合評價

於(6-2)構建及表現精製而得之 1 胺基酸改變體使用 BiacoreT200(GE Healthcare)評價。在 Sensor chip CM4(GE Healthcare)上以胺基偶聯法將 CD3ε 均二聚物蛋白質予以固定化適當量後，注入作為分析物的適當濃度的抗體，使其與感應晶片上之 CD3ε均二聚物蛋白質交互作用。之後，注入 10mmol/L Glycine-HCl(pH1.5)，將感應晶片予以再生。測定於 25℃進行，運行緩衝液使用 HBS-EP+(GE Healthcare)。測定結果係對於結合量與測定獲得之感應圖，使用 single-cycle kinetics model (1:1binding RI=0)計算解離常數 KD(M)。各參數的計算使用 Biacore T200 Evaluation Software(GE Healthcare)。

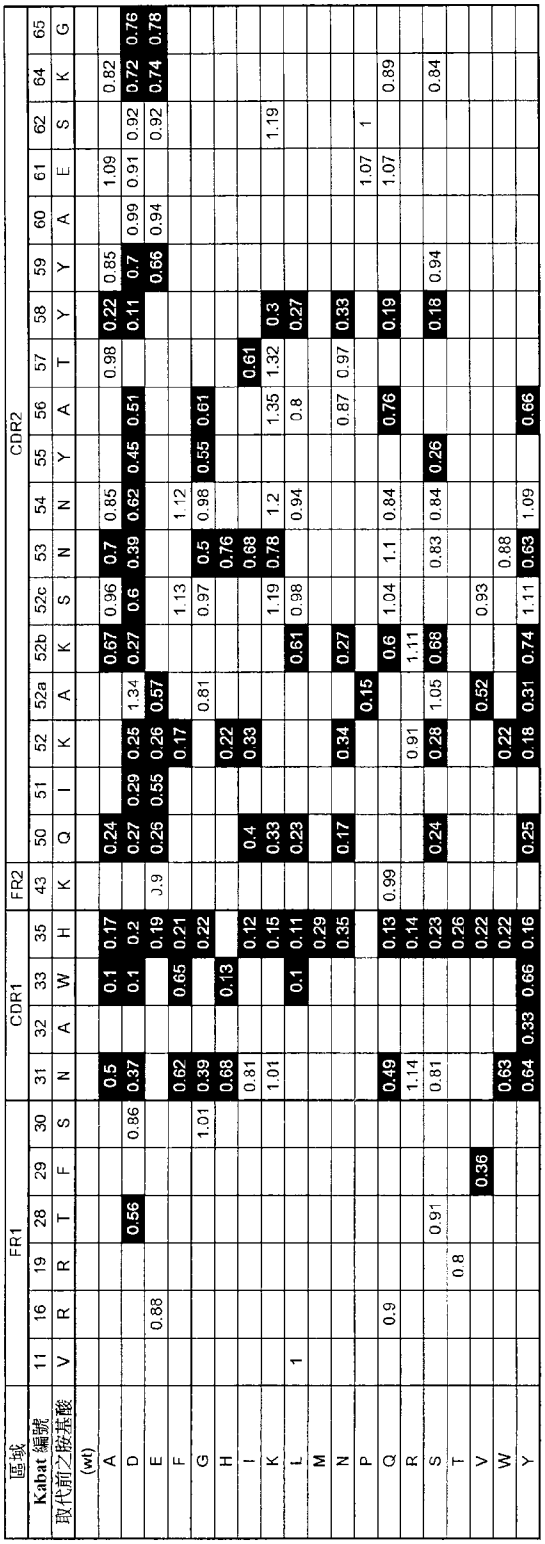
【0291】(6-3-1) H 鏈之改變

各種 H 鏈改變體之結合量相對於改變前抗體 CE115HA000 之比之結果示於表 4。亦即，令含 CE115HA000 之抗體之結合量為 X、H 鏈 1 胺基酸改變體之結合量為 Y 時之 Z(結合量之比)＝Y/X 之值。此時如第 18 圖所示，Z 未達 0.8 的情形，可知由感應圖得出的結合量非常少，啟示無法正確第計算解離常數 K_D(M)。然後，各種 H 鏈改變體相對於 CE115HA000 之解離常數 K_D(M)之比（＝CE115HA000 之 KD 值/改變體之 KD 值）示於表 5。

如表 4 所示之 Z 為 0.8 以上時，據認為對於改變前之抗體 CE115HA000 維持結合，故以出現該等胺基酸的方式設計的抗體庫可成為雙 Fab 資料庫。

【0292】

【表 4】

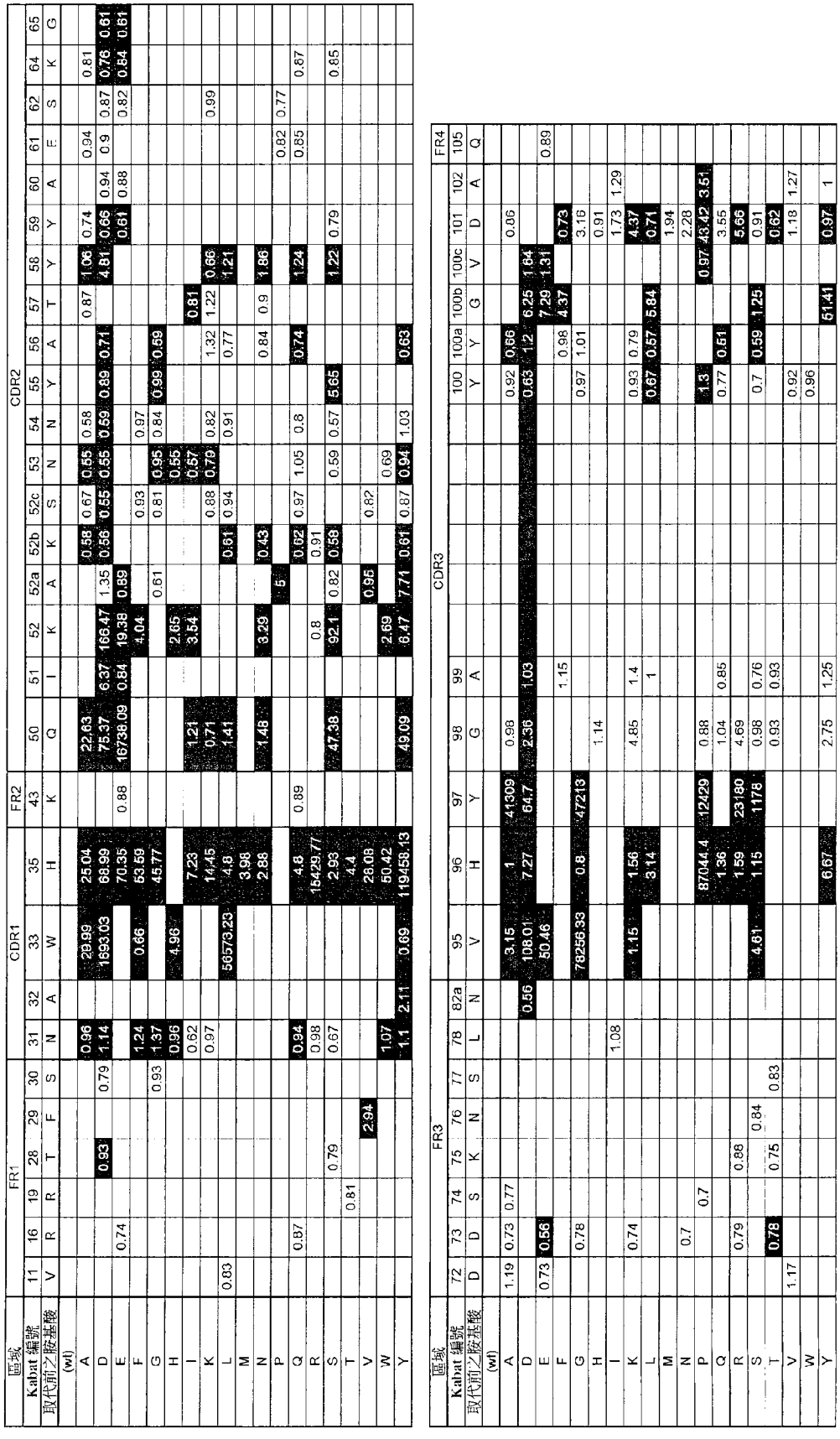


區域	FR1						CDR1			FR2	CDR2																				
Kabat 編號	11	16	19	28	29	30	31	32	33	35	43	50	51	52	52a	52b	52c	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	64	65
取代前之胺基酸	V	R	R	T	F	S	N	A	W	H	K	Q	I	K	A	K	S	N	N	Y	A	T	Y	Y	A	E	S	K	G
(wt)																													
A							0.5		0.1	0.17		0.24				0.67	0.96	0.7	0.85			0.98	0.22	0.85		1.09		0.82	
D				0.56		0.86	0.37		0.1	0.2		0.27	0.29	0.25	1.34	0.27	0.6	0.39	0.62	0.45	0.51		0.11	0.7	0.99	0.91	0.92	0.72	0.76
E		0.88								0.19	J.9	0.26	0.55	0.26	0.57									0.66	0.94		0.92	0.74	0.78
F							0.62		0.65	0.21				0.17			1.13		1.12										
G						1.01	0.39			0.22					0.81		0.97	0.5	0.98	0.55	0.61								
H							0.68		0.13					0.22				0.76											
I							0.81			0.12		0.4		0.33				0.68				0.61							
K							1.01			0.15		0.33					1.19	0.78	1.2		1.35	1.32	0.3			1.19			
L	1								0.1	0.11		0.23				0.61	0.98		0.94		0.8		0.27						
M										0.29																			
N										0.35		0.17		0.34		0.27					0.87	0.97	0.33						
P															0.15											1.07	1		
Q		0.9					0.49			0.13	0.99					0.6	1.04	1.1	0.84		0.76		0.19			1.07		0.89	
R							1.14			0.14				0.91		1.11													
S				0.91			0.81			0.23		0.24		0.28	1.05	0.68		0.83	0.84	0.26			0.18	0.94				0.84	
T			0.8							0.26																			
V					0.36					0.22					0.52		0.93												
W							0.63			0.22				0.22				0.88											
Y							0.64	0.33	0.66	0.16		0.25		0.18	0.31	0.74	1.11	0.63	1.09		0.66								

區域	FR3								CDR3											FR4	
Kabat 編號	72	73	74	75	76	77	78	82a	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	101	102	105	
取代前之胺基酸	D	D	S	K	N	S	L	N	V	H	Y	G	A	Y	Y	G	V	D	A	Q	
(wt)																					
A	1.41	0.83	1.05						0.11	0.35	0.16	1.1		0.9	0.62			1.26			
D								0.73	0.24	0.09	0.24	0.26	0.28	0.52	0.31	0.27	0.44				
E	1.05	0.73							0.24							0.26	0.46			0.94	
F													1.43		0.87	0.3		0.75			
G		1.07							0.19	0.43	0.18			1.07	1.23			1.38			
H												1.58						1.21			
I								1.34										1.18	1.48		
K		0.87							0.64	0.35		2.83	1.48	1.07	0.9			0.63			
L										0.14			1.13	0.7	0.48	0.27		0.62			
M																		1.2			
N		0.94																2.02			
P			0.91							0.12	0.11	1.02		0.48			0.2	0.2	0.14		
Q										0.42		1.22	0.91	0.8	0.56			2.35			
R		1.04		1.01						0.46	0.27	2.96						0.24			
S					0.92				0.22	0.44	0.18	1.01	0.82	0.81	0.64	0.52		1.16			
T		0.63		0.84		0.9						1.05	0.84					0.79			
V	1.43													0.6				1.33	1.43		
W														1.03							
Y										0.17		2.22	1.59			0.23		0.49	0.91		

【0293】

【表 5】



| 區域 | FR1 | | | | | | | | | CDR1 | | | | | FR2 | CDR2 | | | | | | | | |

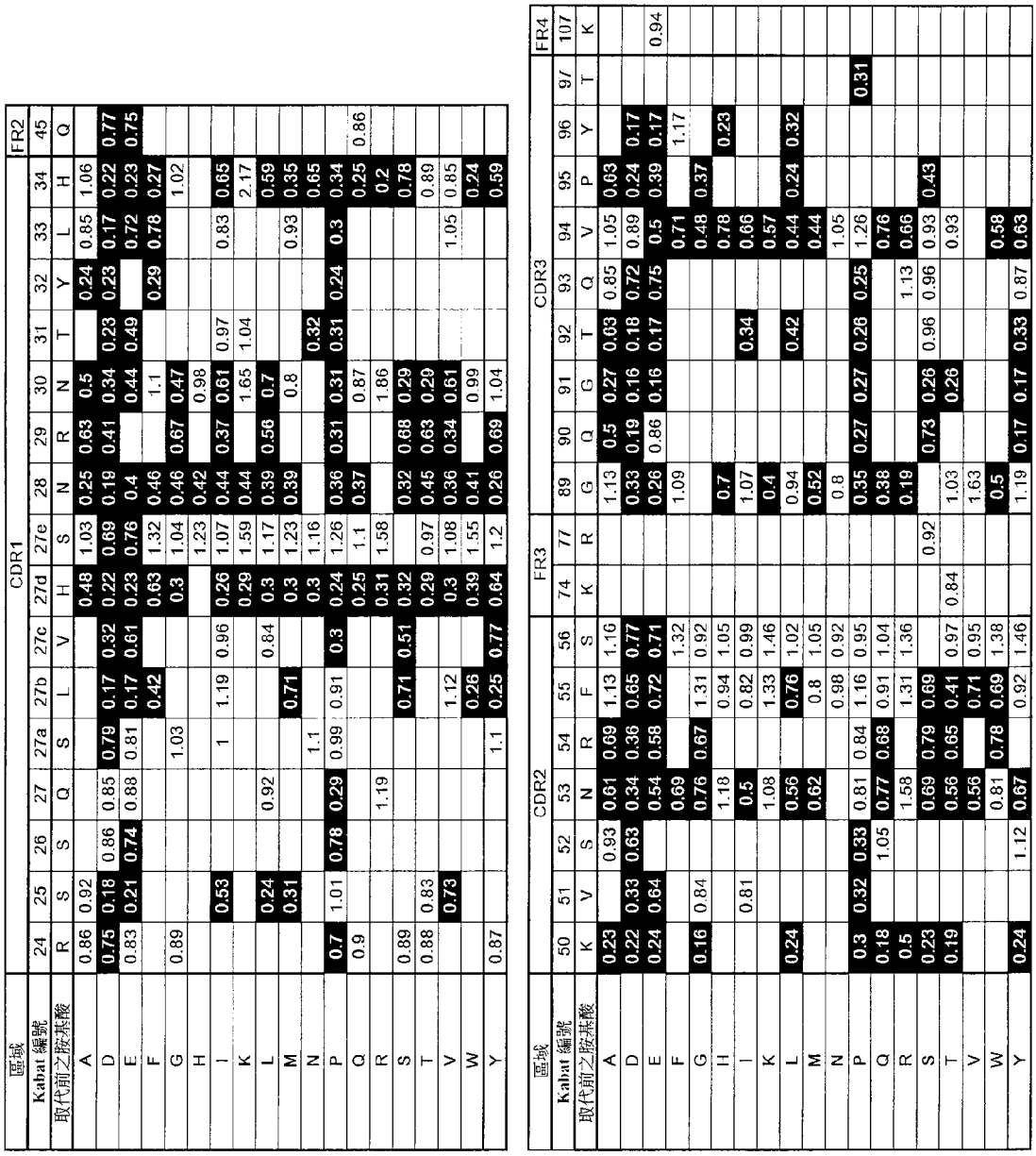
【0294】(6-3-2) L 鏈之改變

各種 L 鏈改變體之結合量相對於改變前抗體 GLS3000 之比之結果示於表 6。亦即，令含 GLS3000 之抗體之結合量為 X、L 鏈 1 胺基酸改變體之結合量為 Y 時，Z(結合量之比)＝Y/X 之值。此時如第 18 圖所示，Z 未達 0.8 的情形，由感應圖可知結合量非常少，啟示無法正確計算解離常數 K_D(M)。然後，各種 L 鏈改變體對於 GLS3000 之解離常數 K_D(M)之比示於表 7。

表 6 所示之 Z 為 0.8 以上時，考量對改變前之抗體 GLS3000 維持結合，故以該等胺基酸出現的方式設計的抗體庫可成為雙 Fab 資料庫。

【0295】

【表 6】

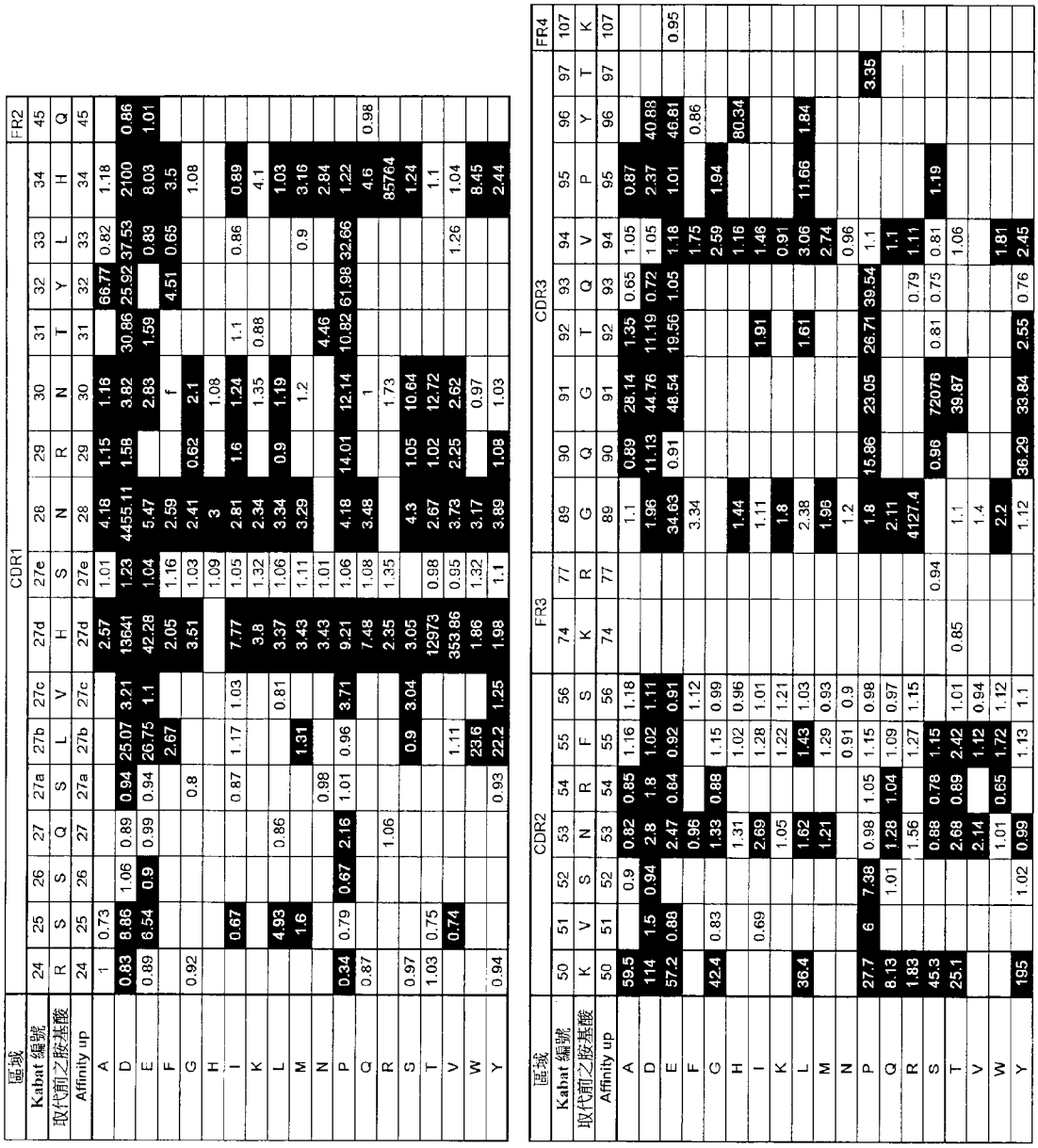


區域	CDR1																										FR2	
Kabat 編號	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	28	29	30	31	32	33	34	45	
取代前之胺基酸	R	S	S	Q	S	L	V	H	S	N	R	N	T	Y	L	H	Q	
A	0.86	0.92						0.48	1.03	0.25	0.63	0.5		0.24	0.85	1.06		
D	0.75	0.18	0.86	0.85	0.79	0.17	0.32	0.22	0.69	0.19	0.41	0.34	0.23	0.23	0.17	0.22	0.77	
E	0.83	0.21	0.74	0.88	0.81	0.17	0.61	0.23	0.76	0.4		0.44	0.49		0.72	0.23	0.75	
F						0.42		0.63	1.32	0.46		1.1		0.29	0.78	0.27		
G	0.89				1.03			0.3	1.04	0.46	0.67	0.47				1.02		
H									1.23	0.42		0.98						
I		0.53			1	1.19	0.96	0.26	1.07	0.44	0.37	0.61	0.97		0.83	0.65		
K								0.29	1.59	0.44		1.65	1.04			2.17		
L		0.24		0.92			0.84	0.3	1.17	0.39	0.56	0.7				0.59		
M		0.31				0.71		0.3	1.23	0.39		0.8			0.93	0.35		
N					1.1			0.3	1.16				0.32			0.65		
P	0.7	1.01	0.78	0.29	0.99	0.91	0.3	0.24	1.26	0.36	0.31	0.31	0.31	0.24	0.3	0.34		
Q	0.9							0.25	1.1	0.37		0.87				0.25	0.86	
R				1.19				0.31	1.58			1.86				0.2		
S	0.89					0.71	0.51	0.32		0.32	0.68	0.29				0.78		
T	0.88	0.83						0.29	0.97	0.45	0.63	0.29				0.89		
V		0.73				1.12		0.3	1.08	0.36	0.34	0.61			1.05	0.85		
W						0.26		0.39	1.55	0.41		0.99				0.24		
Y	0.87				1.1	0.25	0.77	0.64	1.2	0.26	0.69	1.04				0.59		

區域	CDR2							FR3		CDR3								FR4	
Kabat 編號	50	51	52	53	54	55	56	74	77	89	90	91	92	93	94	95	96	97	107
取代前之胺基酸	K	V	S	N	R	F	S	K	R	G	Q	G	T	Q	V	P	Y	T	K
A	0.23		0.93	0.61	0.69	1.13	1.16			1.13	0.5	0.27	0.63	0.85	1.05	0.63			
D	0.22	0.33	0.63	0.34	0.36	0.65	0.77			0.33	0.19	0.16	0.18	0.72	0.89	0.24	0.17		
E	0.24	0.64		0.54	0.58	0.72	0.71			0.26	0.86	0.16	0.17	0.75	0.5	0.39	0.17		0.94
F				0.69			1.32			1.09					0.71		1.17		
G	0.16	0.84		0.76	0.67	1.31	0.92								0.48	0.37			
H				1.18		0.94	1.05			0.7					0.78		0.23		
I		0.81		0.5		0.82	0.99			1.07			0.34		0.66				
K				1.08		1.33	1.46			0.4					0.57				
L	0.24			0.56		0.76	1.02			0.94			0.42		0.44	0.24	0.32		
M				0.62		0.8	1.05			0.52					0.44				
N						0.98	0.92			0.8					1.05				
P	0.3	0.32	0.33	0.81	0.84	1.16	0.95			0.35	0.27	0.27	0.26	0.25	1.26		0.31		
Q	0.18		1.05	0.77	0.68	0.91	1.04			0.38					0.76				
R	0.5			1.58		1.31	1.36			0.19				1.13	0.66				
S	0.23			0.69	0.79	0.69			0.92		0.73	0.26	0.96	0.96	0.93	0.43			
T	0.19			0.56	0.65	0.41	0.97	0.84		1.03		0.26			0.93				
V				0.56		0.71	0.95			1.63									
W				0.81	0.78	0.69	1.38			0.5					0.58				
Y	0.24		1.12	0.67		0.92	1.46			1.19	0.17	0.17	0.33	0.87	0.63				

【0296】

【表 7】



區域	CDR1																										FR2	
Kabat 編號	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	28	29	30	31	32	33	34	45	
取代前之胺基酸	R	S	S	Q	S	L	V	H	S	N	R	N	T	Y	L	H	Q	
Affinity up	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	28	29	30	31	32	33	34	45	
A	1	0.73						2.57	1.01	4.18	1.15	1.16		66.77	0.82	1.18		
D	0.83	8.86	1.06	0.89	0.94	25.07	3.21	13641	1.23	4455.11	1.58	3.82	30.86	25.52	37.53	2100	0.86	
E	0.89	6.54	0.9	0.99	0.94	26.75	1.1	42.28	1.04	5.47		2.83	1.59		0.83	8.03	1.01	
F						2.67		2.05	1.16	2.59		f		4.51	0.65	3.5		
G	0.92				0.8			3.51	1.03	2.41	0.62	2.1				1.08		
H									1.09	3		1.08						
I		0.67			0.87	1.17	1.03	7.77	1.05	2.81	1.6	1.24	1.1		0.86	0.89		
K								3.8	1.32	2.34		1.35	0.88			4.1		
L		4.93		0.86			0.81	3.37	1.06	3.34	0.9	1.19				1.03		
M		1.6				1.31		3.43	1.11	3.29		1.2			0.9	3.16		
N					0.98			3.43	1.01				4.46			2.84		
P	0.34	0.79	0.67	2.16	1.01	0.96	3.71	9.21	1.06	4.18	14.01	12.14	10.82	61.98	32.66	1.22		
Q	0.87							7.48	1.08	3.48		1				4.6	0.98	
R				1.06				2.35	1.35			1.73				85764		
S	0.97					0.9	3.04	3.05		4.3	1.05	10.64				1.24		
T	1.03	0.75						12973	0.98	2.67	1.02	12.72				1.1		
V		0.74				1.11		353.86	0.95	3.73	2.25	2.62			1.26	1.04		
W						23.6		1.86	1.32	3.17		0.97				8.45		
Y	0.94				0.93	22.2	1.25	1.98	1.1	3.89	1.08	1.03				2.44		

區域	CDR2							FR3																					CDR3																FR4	
Kabat 編號	50	51	52	53	54	55	56	74	77	89	90	91	92	93	94	95	96	97	107	
取代前之胺基酸	K	V	S	N	R	F	S	K	R	G	Q	G	T	Q	V	P	Y	T	K	
Affinity up	50	51	52	53	54	55	56	74	77	89	90	91	92	93	94	95	96	97	107	
A	59.5		0.9	0.82	0.85	1.16	1.18			1.1	0.89	28.14	1.35	0.65	1.05	0.87				
D	114	1.5	0.94	2.8	1.8	1.02	1.11			1.96	11.13	44.76	11.19	0.72	1.05	2.37	40.88			
E	57.2	0.88		2.47	0.84	0.92	0.91			34.63	0.91	46.54	19.56	1.05	1.18	1.01	46.81		0.95	
F				0.96			1.12			3.34					1.75		0.86			
G	42.4	0.83		1.33	0.88	1.15	0.99								2.59	1.94				
H				1.31		1.02	0.96			1.44					1.16		80.34			
I		0.69		2.69		1.28	1.01			1.11			1.91		1.46					
K				1.05		1.22	1.21			1.8					0.91					
L	36.4			1.62		1.43	1.03			2.38			1.61		3.06	11.66	1.84			
M				1.21		1.29	0.93			1.96					2.74					
N						0.91	0.9			1.2					0.96					
P	27.7	6	7.38	0.98	1.05	1.15	0.98			1.8	15.86	23.05	26.71	39.54	1.1		3.35			
Q	8.13		1.01	1.28	1.04	1.09	0.97			2.11					1.1					
R	1.83			1.56		1.27	1.15			4127.4				0.79	1.11					
S	45.3			0.68	0.78	1.15			0.94		0.96	72076	0.81	0.75	0.81	1.19				
T	25.1			2.68	0.89	2.42	1.01	0.85		1.1		39.87			1.06					
V				2.14		1.12	0.94			1.4										
W				1.01	0.65	1.72	1.12			2.2					1.81					
Y	195		1.02	0.99		1.13	1.1			1.12	36.29	33.84	2.55	0.76	2.45					

【0297】(6-4) 1 胺基酸改變抗體之 ECM（Extracellular matrix；細胞外基質）結合評價

ECM（Extracellular matrix；細胞外基質）係細胞外之構成成分之一，存於生命體內的各種部位。所以，已知和 ECM 強結合的抗體於血中動態變差（半衰期縮短）(WO2012093704A1)。而，針對在抗體庫出現的胺基酸，宜選擇 ECM 結合不增強的

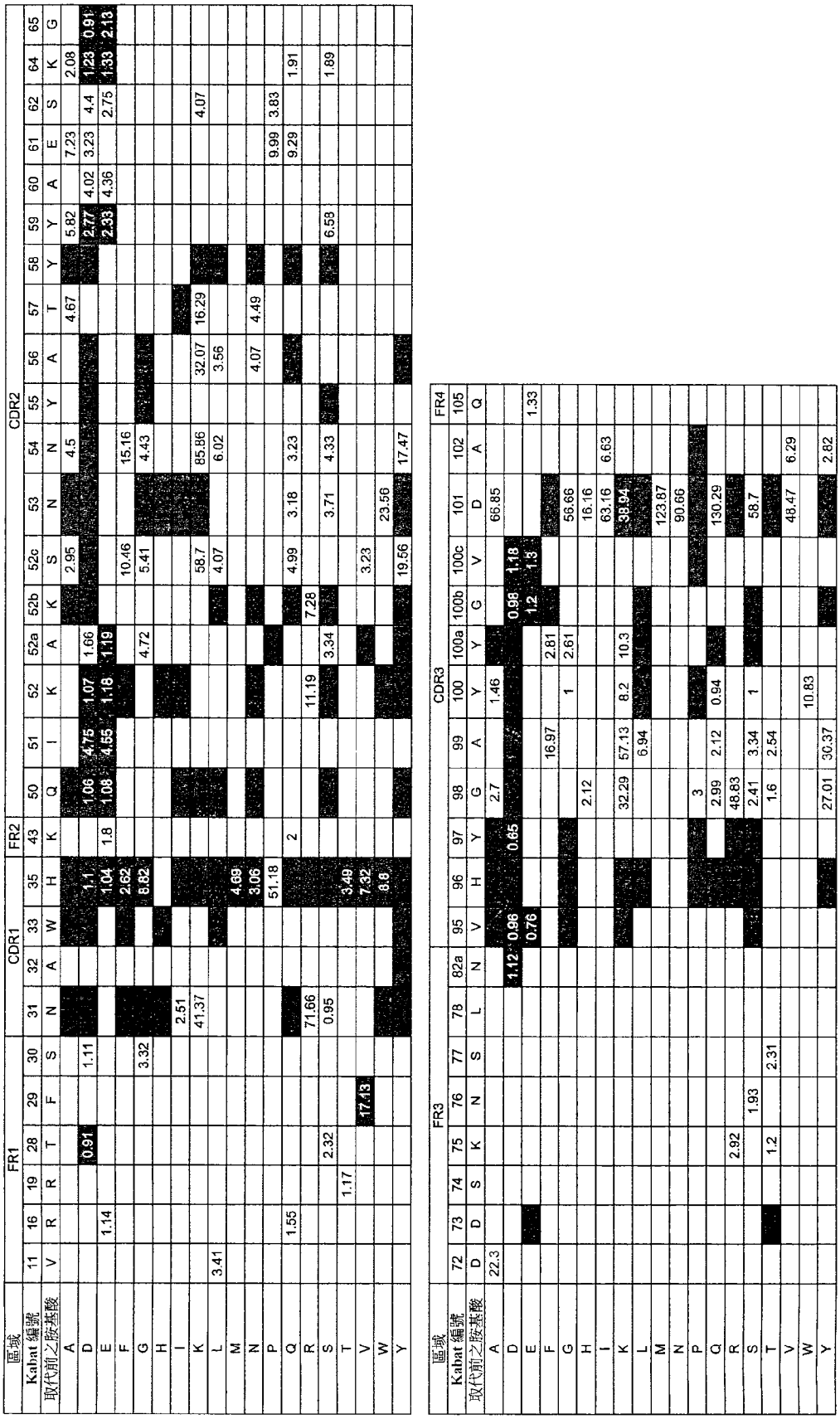
胺基酸較佳。

【0298】各 H 鏈或 L 鏈改變體依(6-2)所示方法取得抗體。然後依參考實施例 2 之方法評價 ECM 結合。各改變體之 ECM 結合值(ECL response；ECL 反應之值)除以同一盤內或同一實施日之 MRA（H 鏈序列辨識號：57、L 鏈序列辨識號：58）之抗體 ECM 結合值而得之值示於表 8(H 鏈)、表 9(L 鏈)。如表 8 及 9 所示，在一些改變可觀察到 ECM 結合增強的傾向。

表 8(H 鏈)、表 9(L 鏈)所示值之中，考慮多數改變所致 ECM 結合增強之效果，以直到 10 倍為有效而採用於雙 Fab 資料庫。

【0299】

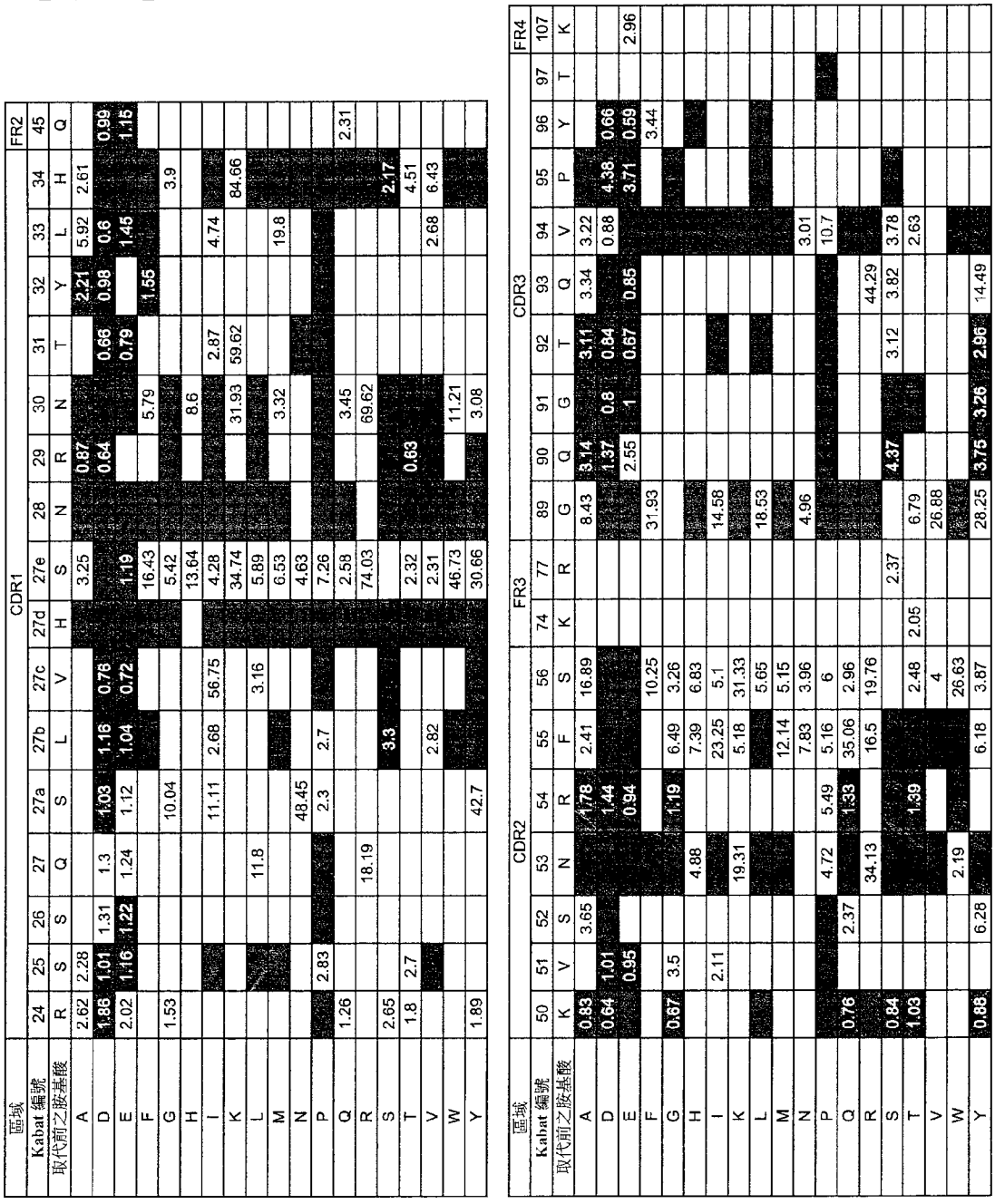
【表 8】



| 區域 | FR1 | | | | | | | | | | CDR1 | | | | | | | | | | FR2 | CDR2 | | | | | | | | | |

【0300】

【表 9】



【0301】(6-5) 用以增強庫多樣性之胜肽之插入處與長度的探討

實施例 5 中，顯示能在各處使用 GGS 序列而不喪失向 CD3(CD3ε)之結合地插入胜肽。雙 Fab 資料庫中，只要迴圈能延長，據認為能成為含有更多種類的分子(也表達為多樣性大)

的資料庫，可取得和多樣第 2 抗原結合的 Fab 分域。而預測由於胜肽插入會使結合活性降低，所以對於 CE115HA000 序列施加 V11L/D72A/L78I/D101Q 改變以使向 CD3ε 之結合活性增高並連結 pE22Hh 之序列，和實施例 5 同樣地插入 GGS 連結子，製作此分子並進行 CD3 結合的評價。GGS 序列插入於 Kabat 編號的 99-100 之間。抗體分子表達為單臂抗體。具體而言，採用含 GGS 連結子之前述 H 鏈與 Kn010G3（序列辨識號：56）及作為 L 鏈之 GLS3000（序列辨識號：53）與 Kappa 序列（序列辨識號：55）連結成的序列，依參考實施例 1 實施表現精製。

【0302】(6-6) 已插入 GGS 胜肽之 CE115 抗體向 CD3 之結合確認

已插入 GGS 胜肽之改變抗體向 CD3ε 之結合，係使用實施例 6 記載的方法使用 Biacore 實施。其結果，可知如表 10 所示，可向迴圈部位插入 GGS 連結子。尤其可在對於抗原結合為重要的 H 鏈 CDR3 區域插入 GGS 連結子，3,6,9 個胺基酸的任一均維持向 CD3ε 之結合。在本項研究使用 GGS 連結子進行研究，但據認為也可為不是出現 GGS 而是出現各種胺基酸的抗體庫。

【0303】

【表 10】

插入胺基酸序列(99-100)	CD3_KD[M]
GGS	6.31E-08
GGSGGS(序列編號：90)	3.46E-08
GGSGGS(序列編號：90)	3.105E-08
GGSGGGS(序列編號：92)	4.352E-08
GGSGGGS(序列編號：92)	3.429E-08
GGGSGGGS(序列編號：93)	4.129E-08
GGGSGGGS(序列編號：93)	3.753E-08
GGSGGSGGS(序列編號：91)	4.39E-08
GGSGGSGGS(序列編號：91)	3.537E-08
無插入	6.961E-09
CE115HA000	1.097E-07

【0304】(6-7) 使用 NNS 鹼基向 H 鏈 CDR3 進行庫插入之研究

於(6-6)可使用 GGS 連結子插入 3,6,9 個胺基酸，據認為製作插入有 3、6、9 個胺基酸的庫，使用通常之噬菌體展示(Phage display)法所代表的抗體取得法的話，則能取得結合於第 2 抗原的抗體。而，於向 CDR3 之插入為 6 個胺基酸時，使用 NNS 鹼基（出現各種胺基酸），探討是否於插入 6 個胺基酸的部位出現各種胺基酸仍保持和 CD3 之結合。因預測結合活性降低，所以使用 NNS 鹼基設計引子，使比起 CE115HA000 有更高 CD3ε 結合活性之 CE115HA340 序列(序列辨識號：59)之 CDR3 中之 99-100（Kabat 編號）之間插入 6 個胺基酸。抗體分子表現作為單臂抗體。具體而言，採用含前述改變之前述 H 鏈與 Kn010G3(序列辨識號：56)與作為 L 鏈之 GLS3000（序列辨識號：53）與 Kappa 序列（序列辨識號：55）連結而得之序列，依參考實施例 1 實施表現精製。取得之改變抗體依(6-3)記載的方法評價結合。其結果示於表 11。可知：即使於胺基酸延長的

部位出現各種胺基酸，仍保持向 CD3(CD3ε)之結合性。再者，依參考實施例 2 所示之方法評價非專一性結合是否增強的結果示於表 12。其結果，若 CDR3 之伸長迴圈內有多數側鏈帶正電荷的胺基酸，則向 ECM 之結合增強，所以不希望於迴圈內出現 3 個以上於側鏈帶有正電荷的胺基酸。

【0305】

【表 11】

		CDR3																			
VH	CD3_KD[M]	95					100														
		5	6	7	8	9	0	a	b	c	d	e	f	g	h	i	k	1	1	2
CE115HA340	2.0E-08	V	H	Y	A	A	X	X	X	X	X	X	Y	Y	G	V	-	-	D	A
CE115HA340	2.7E-08	.	.	.	.	.	W	G	E	G	V	V	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f17	7.4E-08	.	.	.	.	.	V	W	G	S	V	W	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f27	3.8E-08	.	.	.	.	.	I	Y	Y	P	T	N	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f29	9.0E-08	.	.	.	.	.	H	F	M	W	W	G	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f47	3.1E-08	.	.	.	.	.	L	T	G	G	L	G	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f50	7.1E-08	.	.	.	.	.	G	F	L	V	L	W	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f51	3.1E-08	.	.	.	.	.	Y	M	L	G	L	G	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f52	5.2E-08	.	.	.	.	.	F	E	W	V	G	W	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f54	2.9E-08	.	.	.	.	.	A	G	R	W	L	A	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f55	3.1E-08	.	.	.	.	.	R	E	A	T	R	W	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f56	2.1E-08	.	.	.	.	.	S	W	Q	V	S	R	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f58	4.4E-08	.	.	.	.	.	L	L	V	Q	E	G	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f59	2.0E-07	.	.	.	.	.	N	G	G	T	R	H	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f62	6.1E-08	.	.	.	.	.	G	G	G	G	W	V	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f63	6.9E-08	.	.	.	.	.	L	V	S	L	T	V	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f64	7.8E-08	.	.	.	.	.	G	L	L	R	A	A	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f67	3.6E-08	.	.	.	.	.	V	E	W	G	R	W	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f68	4.5E-08	.	.	.	.	.	G	W	V	L	G	S	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f71	5.1E-08	.	.	.	.	.	E	G	I	W	W	G	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f72	1.5E-07	.	.	.	.	.	W	V	V	G	V	R	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f73	2.6E-08	.	.	.	.	.															

【0306】

【表 12】

				CDR3																			
H鏈	ECL反應		比	95					100														
	ECM 3 μg/ml	MRA	ECM vs MRA	5	6	7	8	9	0	a	b	c	d	e	f	g	h	i	k	1	1	2
CE115HA340	394	448	0.9	V	H	Y	A	A	X	X	X	X	X	X	Y	Y	G	V	-	-	D	A
NNS6f17	409	448	0.9	.	.	.	.	.	W	G	E	G	V	V	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f27	3444	448	7.7	.	.	.	.	.	V	W	G	S	V	W	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f29	481	448	1.1	.	.	.	.	.	I	Y	Y	P	T	N	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f47	94137	448	210.3	.	.	.	.	.	H	F	M	W	W	G	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f50	385	564	0.7	.	.	.	.	.	L	T	G	G	L	G	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f51	20148	564	35.7	.	.	.	.	.	G	F	L	V	L	W	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f52	790	564	1.4	.	.	.	.	.	Y	M	L	G	L	G	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f54	1824	564	3.2	.	.	.	.	.	F	E	W	V	G	W	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f55	14183	564	25.1	.	.	.	.	.	A	G	R	W	L	A	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f56	6534	564	11.6	.	.	.	.	.	R	E	A	T	R	W	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f58	2700	564	4.8	.	.	.	.	.	S	W	Q	V	S	R	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f59	388	564	0.7	.	.	.	.	.	L	L	V	Q	E	G	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f62	554	564	1.0	.	.	.	.	.	N	G	G	T	R	H	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f63	624	564	1.1	.	.	.	.	.	G	G	G	G	W	V	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f64	603	564	1.1	.	.	.	.	.	L	V	S	L	T	V	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f67	1292	564	2.3	.	.	.	.	.	G	L	L	R	A	A	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f68	2789	564	4.9	.	.	.	.	.	V	E	W	G	R	W	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f71	618	564	1.1	.	.	.	.	.	G	W	V	L	G	S	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f72	536	564	0.9	.	.	.	.	.	E	G	I	W	W	G	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f73	2193	564	3.9	.	.	.	.	.	W	V	V	G	V	R	.	.	.	.	.	.	.	.

【0307】(6-7) 雙 Fab 資料庫之設計及構建

由實施例 6 記載之研究，依以下方式設計用以取得結合於 CD3 與第 2 抗原之抗體的抗體庫(雙 Fab 資料庫)。

步驟 1：選擇保持 CD3(CD3ε)結合能力的胺基酸（CD3 結合量為 CE115HA000 之 80%以上）

步驟 2：選擇 ECM 結合較改變前，比起 MRA 為 10 倍以內的胺基酸

步驟 3：在 H 鏈 CDR3 之 99-100（Kabat 編號）之間插入 6 個胺基酸

又，僅步驟 1 也能使 Fab 之抗原結合部位多樣化，所以可成為鑑定結合於第 2 抗原之抗原結合分子之庫。又，僅步驟 1

與 3 也能使 Fab 之抗原結合部位多樣化，所以可成為鑑定結合於第 2 抗原之抗原結合分子之庫。不經步驟 2 之庫設計也能測定對於取得之分子的 ECM 結合並進行評價。

【0308】由以上，雙 Fab 資料庫之 H 鏈係對於 CE115HA000 之 FR(框架)施加 V11L/ L78I 變異而得的序列，就 CDR 而言以表 13 所示多樣化，L 鏈係將 GLS3000 之 CDR 以表 14 所示多樣化。該等抗體庫片段可以用該領域中通常知識者公知之 DNA 合成方法合成該庫片段。作為雙 Fab 資料庫(Dual Fab library)，可製作：(1)將 H 鏈以表 13 所示多樣化，L 鏈固定為原序列 GLS3000 或實施例 6 所記載之 CD3ε 結合增強的 L 鏈的庫、(2) H 鏈固定為原序列(CE115HA000)或實施例 6 記載之 CD3ε 結合增強的 H 鏈，L 鏈為如表 14 所示多樣化之庫、(3) H 鏈如表 13 所示多樣化，L 鏈如表 14 所示多樣化之庫。將 H 鏈係對於 CE115HA000 之 FR（框架）施加 V11L/L78I 變異之序列就 CDR 而言依表 13 所示多樣化而得的庫序列委託 DNA2.0 的 DNA 合成公司，取得抗體庫片段(DNA 片段)。將取得之抗體庫片段插入到經 PCR 法放大的噬菌體展示用噬粒。於此時，L 鏈選擇 GLS3000。再將構建的噬菌體展示用噬粒以電穿孔法導入到大腸菌，製作保有抗體庫片段的大腸菌。

【0309】

【表 13】

	CDR1					CDR2																	CDR3																			
Kabat	3					5	5											6					9								1	0										
編號	1	2	3	4	5	0	1	2	a	b	c	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	5	6	7	8	9	0	a	b	c	d	e	f	g	h	i	1	1	2
取代前	N	A	W	M	H	Q	I	K	D	K	S	N	N	Y	A	T	Y	Y	A	E	S	V	K	G	V	H	Y	G	A	x	x	x	x	x	x	Y	Y	G	V	D	A
	I	A	W	M	H	Q	I	K	D	R	A	Q	A	Y	L	A	Y	Y	A	P	S	V	K	G	V	H	Y	A	A	A	A	G	A	L	P	A	Y	G	V	D	A
	N									K	G	S	G		N	N				E									G	L	V	V	S	V	G	G	S	F				
	S										L	N	L		A	T													P	S	G	G	T	L	S	S	Q	G				
資料庫											Q		Q																S	Q	S	S	Y	G	Y	Y	K				
											V		S																T	T	T	T	F	S	F	F	Y				
											S		N																Q		Y	Y	D	Y			G				
																													H		F	F		F							
																																D										

【0310】

【表 14】

| 區域 | CDR1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | FR2 | | | CDR2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | FR3 | | | | | | | | | | | | CDR3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

2 抗原(IL6R)之 Fab 分域

(7-1) 結合於人 IL6R 之 Fab 分域之取得

從實施例 6 設計及構建之雙 Fab 資料庫鑑定對人 IL6R 結合之 Fab 分域(抗體片段)。作為抗原，使用經生物素標記之人 IL6R，並實施帶有對人 IL6R 之結合能力的抗體片段的濃縮。

從保持著構建之噬菌體展示用噬粒的大腸菌實施噬菌體產生。於已實施噬菌體產生的大腸菌培養液添加 2.5M NaCl/10%PEG，將沉澱的噬菌體的集團以 TBS 稀釋，而獲得噬菌體庫液。然後，於噬菌體庫液添加 BSA，使終濃度成為 4%BSA。淘選方法可參照一般方法，即使用固定於磁性珠粒的抗原的淘選方法(J. Immunol. Methods. (2008) 332 (1-2), 2-9、J. Immunol. Methods. (2001) 247 (1-2), 191-203、Biotechnol. Prog. (2002) 18 (2) 212-20、Mol. Cell Proteomics (2003) 2 (2), 61-9)。磁性珠粒可使用 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated)或包覆了鏈黴親合素之珠粒(Dynabeads M-280 Streptavidin)。

【0312】具體而言，於製備的噬菌體庫液中加入 250pmol 的生物素標記抗原，使該噬菌體庫液於室溫和抗原接觸 60 分鐘。加入經 BSA 阻斷的磁性珠粒，使抗原與噬菌體之複合體和磁性珠粒於室溫進行 15 分鐘結合。珠粒以含 TBST (0.1%Tween20 之 TBS, TBS 為 TaKaRa 公司製)洗滌 3 次後，以 1mL TBS 再洗滌 2 次。之後，將已加入 0.5mL 之 1mg/mL 的胰蛋白酶的珠粒於室溫懸浮 15 分鐘後，立即使用磁座將珠粒分離，回收噬菌體溶液。將回收的噬菌體溶液加到成為對數增殖

期(OD600 為 0.4-0.5)的 10mL 的大腸菌株 ER2738。於 37℃緩慢進行 1 小時上述大腸菌的攪拌培養，以使噬菌體感染大腸菌。將已感染的大腸菌接種到 225mm x 225mm 的盤。然後從已接種大腸菌的培養液回收噬菌體，製備噬菌體庫液。此循環稱為淘選，重複多次。又，第 2 次後的淘選，使用 40pmol 之生物素標記抗原。又，於第 4 次淘選，以向 CD3 之結合性做為指標，實施噬菌體的濃縮。具體而言，於製備的噬菌體庫液加入 250pmol 的生物素標記 CD3ε 胜肽抗原（胺基酸序列序列辨識號：60），使噬菌體庫於室溫和抗原接觸 60 分鐘。加入經 BSA 阻斷的磁性珠粒，使抗原與噬菌體之複合體和磁性珠粒於室溫結合 15 分鐘。珠粒以含 1mL 之 0.1% Tween20 的 TBS 與 TBS 洗滌。將已加入 0.5mL 之 1mg/mL 之胰蛋白酶的珠粒於室溫懸浮 15 分鐘後，立即使用磁座將珠粒分離，回收噬菌體溶液。從經胰蛋白酶處理之噬菌體溶液回收的噬菌體加到成為對數增殖期(OD600 為 0.4-0.7)的 10mL 的大腸菌株 ER2738。於 37℃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。將已感染的大腸菌接種在 225mm x 225mm 的盤。然後從已接種大腸菌的培養液回收噬菌體，以回收噬菌體庫液。

再者，為了防止對一個大腸菌有多數噬菌體感染，針對由第 5 次淘選回收的已感染噬菌體的大腸菌製備的噬菌體庫液，再度以稀釋 100,000 倍的噬菌體液感染大腸菌，獲得單一群落。

【0313】(7-2) 展示噬菌體之 Fab 分域與 CD3 或 IL6R 之結合(噬菌體 ELISA 法)

從以上述方法獲得之大腸菌之單一群落依常法(Methods

Mol. Biol. (2002) 178, 133-145)，回收含噬菌體之培養上清。將加入 BSA 使終濃度成為 4%BSA 的含噬菌體的培養上清依以下程序供 ELISA。將 StreptaWell 96 微滴定盤(Roche)於含生物素標記抗原(生物素化 CD3ε 胜肽或生物素化人 IL6R)之 100μLPBS 於 4℃包覆一晚或於室溫包覆 1 小時。將該盤之各井以 PBST 洗滌以去除抗原後，將該井以 250μL 之 4%BSA-TBS 阻斷 1 小時以上。在已去除 4%BSA-TBS 之各井加有製備的培養上清的該盤於室溫靜置 1 小時，使展示噬菌體之抗體和各井存在的抗原結合。將各井以 TBST 洗滌後，添加以終濃度 4%之 BSA 的 TBS 稀釋的 HRP 結合抗 M13 抗體(Amersham Pharmacia Biotech)，溫育 1 小時。以 TBST 洗滌後，以添加硫酸使已加有 TMB single 溶液(ZYMED)之各井中之溶液之發色反應停止，之後以 450nm 之吸光度測定該發色。其結果示於第 19 圖。#50 及#62 選殖體顯示對於 CD3ε 及人 IL6R 有結合性。亦即，藉由使用雙 Fab 資料庫，可選擇對於第 2 抗原(實施例 7 中為人 IL6R)顯示結合性之選殖體。進一步增加評價數，選擇顯示結合性之選殖體，進行 IgG 化（選殖體帶有之 VH 及 VL 序列分別與人 H 鏈或 L 鏈不變區連結），可評價向 CD3ε 與第 2 抗原(人 IL6R)之結合性。再者，是否同時與 CD3ε 及第 2 抗原(人 IL6R)結合，可利用實施例 3、4 記載之方法、競爭法檢查。競爭法中，例如向 CD3ε 之結合，在比起抗體單獨時，於第 2 抗原存在時較減少，顯示未同時結合。

【0314】[實施例 8] 從雙 Fab 資料庫取得結合於 CD3 及第 2 抗原(人 IgA)之 Fab 分域

(8-1) 結合於人 IgA 之 Fab 分域之取得

IgA 為體內豐富存在的抗體的，已知是在腸、黏膜面的生命體防禦相關的分子，已知會結合於 FcαR(Fc alpha 受體)(J. Pathol. 208: 270 -282, 2006)。

從實施例 6 設計及構建之雙 Fab 資料庫鑑定對於人 IgA 結合的 Fab 分域（抗體片段）。抗原使用經生物素標記之人 IgA（記載於參考實施例 3），進行帶有對人 IgA 之結合能力的抗體片段的濃縮。

從保持了構建的噬菌體展示用噬粒的大腸菌進行噬菌體產生。於已實施噬菌體產生之大腸菌的培養液添加 2.5M NaCl/10%PEG，將沉澱的噬菌體的集團以 TBS 稀釋，獲得噬菌體庫液。然後於噬菌體庫液加入 BSA，使終濃度成為 4%BSA。淘選方法參照一般方法，即使用固定有磁性珠粒之抗原的淘選方法(J. Immunol. Methods. (2008) 332 (1-2), 2-9、J. Immunol. Methods. (2001) 247 (1-2), 191-203、Biotechnol. Prog. (2002) 18 (2) 212-20、Mol. Cell Proteomics (2003) 2 (2), 61-9)。磁性珠粒可使用 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated)或包覆了鏈黴親合素之珠粒(Dynabeads M-280 Streptavidin)。

具體而言，於製備的噬菌體庫液中加入 250pmol 的生物素標記抗原，使該噬菌體庫液於室溫和抗原接觸 60 分鐘。加入經 BSA 阻斷的磁性珠粒，使抗原與噬菌體之複合體和磁性珠粒於室溫進行 15 分鐘結合。珠粒以含 TBST(0.1%Tween20 之 TBS, TBS 為 TaKaRa 公司製)洗滌 3 次後，以 1mL TBS 再洗滌

2次。之後，將已加入0.5mL之1mg/mL的胰蛋白酶的珠粒於室溫懸浮15分鐘後，立即使用磁座將珠粒分離，回收噬菌體溶液。將回收的噬菌體溶液加到成為對數增殖期(OD600為0.4-0.5)的10mL的大腸菌株ER2738。於37℃緩慢進行1小時上述大腸菌的攪拌培養，以使噬菌體感染大腸菌。將已感染的大腸菌接種到225mm x 225mm的盤。然後從已接種大腸菌的培養液回收噬菌體，製備噬菌體庫液。此循環稱為淘選，重複4次。又，第2次後的淘選，人IgA設為40pmol。

【0315】(8-2) 噬菌體展示的Fab分域與CD3或人IgA之結合

從以上述方法獲得之大腸菌的單一群落依常法(Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145)回收含噬菌體之培養上清。將加入BSA使終濃度成為4%BSA的含噬菌體的培養上清依以下程序供ELISA。將StreptaWell 96微滴定盤(Roche)於含生物素標記抗原(生物素標記CD3ε胜肽或生物素標記人IgA,參考實施例3)之100μL PBS於4℃包覆一晚或於室溫包覆1小時。將該盤之各井以PBST洗滌以去除抗原後，將該井以250μL之0.1xTBS/150mM NaCl/0.02% Skim Milk阻斷1小時以上。在已去除0.1xTBS/150mM NaCl/0.02% Skim Milk之各井加有製備的培養上清的該盤於室溫靜置1小時，使展示噬菌體之抗體和各井存在的抗原結合。將各井以0.1xTBS/150mM NaCl/0.01% Tween20洗滌後，添加以0.1xTBS/150mM NaCl/0.01% Tween20稀釋的HRP結合抗M13抗體(Amersham Pharmacia Biotech)，溫育1小時。以TBST洗滌後，以添加硫酸使已加有TMB single s

溶液(ZYMED)之各井中之溶液之發色反應停止，之後以 450nm 之吸光度測定該發色。其結果示於第 20 圖。如第 20 圖所示，顯示存在結合於 CD3 及人 IgA 之選殖體，藉由使用雙 Fab 資料庫，可選擇對於第 2 抗原（實施例 8 中為人 IgA）顯示結合性的選殖體。

【0316】(8-3) 具有取得之 Fab 分域之 IgG 之和 CD3 或人 IgA 之結合

對於(8-2)顯示結合於 CD3 與人 IgA 之選殖體，由具此序列之大腸菌使用對於雙 Fab 資料庫之 H 鏈專一性地結合的引子依 PCR 法放大 VH 片段。放大的 VH 片段依參考實施例 1 的方法嵌入已嵌入有 pE22Hh 的動物細胞表現用質體，和實施例 6(6-2)同樣表現、精製為單臂抗體。選殖體名稱及 H 鏈序列之序列辨識號顯示於表 15。亦即，採用表 15 所示之 H 鏈與 Kn010G3（序列辨識號：56）與作為 L 鏈之 GLS3000（序列辨識號：53）與 Kappa 序列（序列辨識號：55）連結成的序列，依參考實施例 1 實施表現精製。

【0317】【表 15】

樣本名	序列編號
IGAR4C09#1	61
IGAR4C12#4	62
IGAR6(2)B02#1	63

【0318】帶有取得之 Fab 區之抗體分子是否會和 CD3ε、人 IgA 結合，以電化學發光法(ECL 法)判定。具體而言，將經 TBST 溶液(TaKaRa 公司製 TBS 中加有 0.1% Tween20 者)稀釋之生物素標記 CD3ε 胜肽(實施例 7 記載)或生物素標記人 IgA(參考實

施例 3)、調整為 2μg/mL 之抗體溶液、及已附加 sulfo-tag 之抗人 IgG 抗體(Invitrogen #628400)，各添加 25μL 到 Nunc-Immuno™ MicroWell™ 96 井圓盤(Nunc)之各井並混合後，於遮光狀態於室溫溫育 1 小時以上，使抗體抗原複合體形成。將含 0.5%BSA 之 TBST 溶液(記載為阻斷溶液)各加 150μL 到鏈黴抗生物素蛋白盤(MSD)各井，於室溫溫育 1 小時以上。去除阻斷溶液後，以 TBS(-)溶液 250μL 洗滌 3 次。各加 50μL 抗體抗原複合體溶液到各井，於室溫溫育 1 小時，使生物素化抗原-抗體-檢測用 sulfo-tag 抗體之複合體溶液介由生物素化抗原結合於鏈黴抗生物素蛋白盤。去除抗體抗原複合體溶液後，以 TBST 溶液洗滌 3 次，將 4xREAD 緩衝液(MSD)以水稀釋 2 倍而成的溶液各加 150μL 到各井，以 Sector Imager 2400(MSD)檢測 sulfo-tag 的發光信號。

【0319】其結果示於第 21 圖。從於噬菌體 ELISA 認為結合的選殖體，將包括一部分胺基酸變異者進行 IgG 化，結果即使於噬菌體 ELISA 認為結合的序列是 IgG，仍顯示會和 CD3ε 及人 IgA 結合。

由此結果顯示：從雙 Fab 資料庫可取得和第 2 抗原結合之抗體，在通常使用噬菌體庫之淘選，雖只有 Fab 分域，但能將成為含 Fc 區之 IgG 仍認為有結合的選殖體進行濃縮。因此雙 Fab 資料庫，可說是能取得保持和 CD3 之結合能力且有和第 2 抗原結合之能力的 Fab 分域的庫。

【0320】(8-4) 具有取得之 Fab 分域之 IgG 之和 CD3(CD3ε)及人 IgA 之同時結合之評價

(8-3)中，雖由雙 Fab 資料庫獲得之選殖體成為 IgG 仍顯示有結合。然後，以競爭法（電化學發光法(ECL 法)）判定獲得之 IgG 是否會與 CD3(CD3ε)及人 IgA 同時結合。和 CD3(CD3ε)及人 IgA 同時結合時，即使在會和 IgA 結合之抗體加入 CD3(CD3ε)，ECL 信號仍不變化，但無法同時結合時，若加入 CD3(CD3ε)，應有一部分抗體與 CD3(CD3ε)，而 ECL 信號降低。

【0321】具體而言，將經 TBST 溶液稀釋之生物素化人 IgA 25μL、調整為 1μg/mL 之抗體溶液 12.5μL、TBST 或用以競爭之 CD3ε 均二聚物蛋白質(9.4pmol/μL)12.5μL、及已附加 sulfo-tag 之抗人 IgG 抗體(Invitrogen #628400)25μL，加到 Nunc-Immuno^{Tm} MicroWell^{TM} 96 井圓盤(Nunc)的各井並混合後，於遮光狀態於室溫溫育 1 小時以上，使抗體抗原複合體形成。將含 0.5%BSA 之 TBST 溶液(記載為阻斷溶液。TBST 溶液係於 TaKaRa 公司製 TBS 加有 0.1%Tween20 者)各加 150μL 到鏈黴抗生物素蛋白盤(MSD)之各井，於室溫溫育 1 小時以上。去除阻斷溶液後以 TBST 溶液 250μL 洗滌 3 次。各加 50μL 抗體抗原複合體溶液到各井，於室溫溫育 1 小時，使生物素化抗原—抗體—檢測用 sulfo-tag 抗體之複合體溶液介由生物素化抗原結合於鏈黴抗生物素蛋白盤。去除抗體抗原複合體溶液後以 TBST 溶液洗滌 3 次，將 4xREAD 緩衝液(MSD)以水稀釋為 2 倍的溶液各加 150μL 到各井，以 Sector Imager 2400(MSD)檢測 sulfo-tag 的發光信號。

【0322】其結果示於第 22 圖。加入用以競爭之 CD3ε 均二聚物蛋白質時，比起加入 TBST 時，認為 ECL 信號較低。由此

結果，顯示本研究找出的結合於 CD3 與人 IgA 之分子是若結合於 CD3 則無法結合於人 IgA 之雙 Fab 分子。由此結果顯示：可從雙 Fab 資料庫取得和第 2 抗原有結合能力之抗體，其中，可取得若與 CD3 結合則無法與第 2 抗原結合（或若與第 2 抗原結合則無法與 CD3 結合）的無法與多種抗原同時結合之雙 Fab 分子。

【0323】該領域中通常知識者可明白：若於(8-2)能由使用噬菌體之結合活性評價找出結合分子，可藉由增多評價數而增加結合分子之序列的多樣性，由以上可說：雙 Fab 資料庫是可取得保持著對於 CD3 之結合能力且同時具有和第 2 抗原結合之能力的 Fab 分域的資料庫。又，本實施例使用只將 H 鏈多樣化的雙 Fab 資料庫，但通常較大資料庫尺寸（也稱為多樣性，係指資料庫中含有的多樣序列）者能更取得抗原結合分子，所以使 L 鏈也多樣化的雙 Fab 資料庫也和本實施例所示同樣地可用於雙 Fab 分子取得。

【0324】若依實施例 8 所示方式製作雙 Fab 分子，能使用該領域中通常知識者公知之方法，例如融合瘤法、從抗體庫選出結合抗體（或結合分域）的方法鑑定結合於第 3 抗原之 Fab、抗原結合分域，帶有鑑定之結合於第 3 抗原之抗原結合分域（例如 Fab）與雙 Fab 分子之 Fab 分域的抗體可依該領域中通常知識者公知之多專一性抗體之製作方法，例如將 L 鏈共通化而製作 2 條 H 鏈不同之抗體的方法（控制 Fc 區之各分域之界面之技術）、Cross Mab 法、Fab Arm Exchange 法取得多專一性抗體。亦即，若能鑑定雙 Fab 分子，能利用該領域中通常知識者

公知之方法將結合於第3抗原之Fab與實施例8所示之結合於第1與第2抗原之雙Fab予以組合而取得所望之多專一性抗體。

【0325】(8-5) 針對CD3/人IgA雙Fab分子

實施例8中，顯示可獲得結合於CD3ε及人IgA且不同時結合於CD3ε與人IgA之雙Fab分子。進一步附加與第3抗原結合之抗原結合分域，也可依該領域中通常知識者公知之方法實施。

近年來，已有人揭示以結合於癌抗原之一即EGFR的方式改變而得的IgA分子會誘導表現EGFR之癌細胞的細胞死(J Immunol 2007; 179:2936-2943)。就其機轉而言，據報告係IgA之受體FcαR於多形核細胞(Polymorphonuclear cell)表現，在癌細胞誘導自體吞噬(J Immunol 2011; 187:726-732)。本實施例解明能建構結合於CD3與IgA的雙Fab分子，但若以該領域中通常知識者公知之方法(例如ELISA、ECL法)尋找介由IgA而與FcαR結合的分子，則能期待介由FcαR的抗腫瘤效果。亦即，本雙Fab，能誘導表現任意第3抗原之細胞中利用與CD3ε之結合引起的T細胞所致的細胞傷害活性、以及介由與IgA結合而引起的表現FcαR之細胞所致之細胞傷害活性兩者，能期待強細胞傷害活性。

【0326】[實施例9] 從雙Fab資料庫取得結合於CD3及第2抗原(人CD154)之Fab分域

(9-1)結合於人CD154之Fab分域之取得

從實施例6設計及構建的雙Fab資料庫鑑定對於人CD154結合之Fab分域（抗體片段）。抗原使用經生物素標記之人

CD154，並進行帶有對於人 CD154 之結合能力之抗體片段之濃縮。

從保持著構建之噬菌體展示用噬粒的大腸菌實施噬菌體產生。將藉由於已實施噬菌體產生的大腸菌培養液添加 2.5M NaCl/10%PEG 而沉澱的噬菌體的集團，以 TBS 稀釋，而獲得噬菌體庫液。然後於噬菌體庫液添加 BSA 使成為終濃度 4%BSA。可參照一般方法，即使用固定於磁性珠粒的抗原的淘選方法(J. Immunol. Methods. (2008) 332 (1-2), 2-9、J. Immunol. Methods. (2001) 247 (1-2), 191-203、Biotechnol. Prog. (2002) 18 (2) 212-20、Mol. Cell Proteomics (2003) 2 (2), 61-9)。作為磁性珠粒可列舉 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated)或包覆了鏈黴親合素之珠粒(Dynabeads M-280 Streptavidin)。

具體而言，於製備的噬菌體庫液中加入 250pmol 的生物素標記抗原，使該噬菌體庫液於室溫和抗原接觸 60 分鐘。加入經 BSA 阻斷的磁性珠粒，使抗原與噬菌體之複合體和磁性珠粒於室溫進行 15 分鐘結合。珠粒以含 TBST(0.1%Tween20 之 TBS, TBS 為 TaKaRa 公司製)洗滌 3 次後，以 1mLTBS 再洗滌 2 次。之後，將已加入 0.5mL 之 1mg/mL 的胰蛋白酶的珠粒於室溫懸浮 15 分鐘後，立即使用磁座將珠粒分離，回收噬菌體溶液。將回收的噬菌體溶液加到成為對數增殖期(OD600 為 0.4-0.5)的 10mL 的大腸菌株 ER2738。於 37℃緩慢進行 1 小時上述大腸菌的攪拌培養，以使噬菌體感染大腸菌。將已感染的大腸菌接種到 225mm x 225mm 的盤。然後從已接種大腸菌的

培養液回收噬菌體，製備噬菌體庫液。此循環稱為淘選，重複5次。又，第2次後的淘選，使用40pmol之人CD154。

【0327】(9-2) 展示噬菌體之Fab分域與CD3或人CD154之結合

從以上述方法獲得之大腸菌之單一群落依常法(Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145)回收含噬菌體之培養上清。將加入BSA使終濃度成為4%BSA的含噬菌體的培養上清依以下程序供ELISA。將StreptaWell 96微滴定盤(Roche)於含生物素標記抗原(生物素標記CD3ε胜肽、生物素標記CD154)之100μL PBS於4℃包覆一晚或於室溫包覆1小時。將該盤之各井以PBST洗滌以去除抗原後，將該井以250μL之0.1xTBS/150mM NaCl/0.02% Skim Milk阻斷1小時以上。在已去除0.1xTBS/150mM NaCl /0.02% Skim Milk之各井加有製備的培養上清的該盤於室溫靜置1小時，使展示噬菌體之抗體和各井存在的抗原結合。將各井以0.1xTBS/150mM NaCl/0.01% Tween20洗滌後，添加以0.1xTBS/150mM NaCl/0.01% Tween20稀釋的HRP結合抗M13抗體(Amersham Pharmacia Biotech)，溫育1小時。以TBST洗滌後，以添加硫酸使已加有TMB single溶液(ZYMED)之各井中之溶液之發色反應停止，之後以450nm之吸光度測定該發色。其結果示於第23圖。如第23圖，顯示存在結合於CD3及CD154之選殖體，可藉由使用雙Fab資料庫，選擇顯示對於第2抗原(實施例9中為人CD154)有結合性的選殖體。又，能取得對於實施例7、8、9所示不同的3個抗原為結合之Fab分域，顯示雙Fab資料庫作為用以取得和第2抗原

結合之分子之庫的機能。

【0328】(9-3) 具有取得之 Fab 分域之 IgG 之 CD3 或人 CD154 之結合

對於在(9-2)顯示結合於 CD3 與人 CD154 之選殖體，從具有此序列之大腸菌使用對於雙 Fab 資料庫之 H 鏈專一性地結合的引子，利用 PCR 將 VH 片段放大。將放大的 VH 片段以參考實施例 1 的方法納入已有 pE22Hh 之動物細胞表現用質體，和實施例 6(6-2)同樣地表現、精製為單臂抗體。取得之序列名與 H 鏈序列之序列辨識號記載於表 16。具體而言，採用表 16 記載之 H 鏈與 Kn010G3(序列辨識號：56)與作為 L 鏈之 GLS3000（序列辨識號：53）與 Kappa 序列（序列辨識號：55）連結成的序列，依參考實施例 1 實施表現精製。

【0329】【表 16】

樣本名	序列編號	樣本名	序列編號
154R3A01#1	64	154R4B07#1	72
154R3A01#2	65	154R4F08#1	73
154R3A01#3	66	154R5A02#1	74
154R3A01#4	67	154R5A02#2	75
154R3B01#1	68	154R5F08#1	76
154R3F02#2	69	154R5F08#3	77
154R4B03#1	70	154R5E11#3	78
154R4B03#4	71		

【0330】以電化學發光法(ECL 法)判定於(9-2)在噬菌體 ELISA 法顯示帶有結合於 CD3 與人 CD154 的 Fab 區的抗體分子是否結合於 CD3、人 CD154。具體而言，將經 TBST 溶液稀釋之生物素化 CD3 或生物素化人 CD154 25μL、調整為 2μg/mL

之抗體溶液 25μL、已附加 sulfo-tag 之抗人 IgG 抗體(Invitrogen #628400)25μL 添加到 Nunc-Immuno^{Tm} MicroWell^{Tm} 96 井圓盤(Nunc)的各井並混合後，於遮光狀態於室溫溫育 1 小時以上，使抗體抗原複合體形成。將含 0.5%BSA 之 TBST 溶液(記載為阻斷溶液。TBST 溶液係於 TaKaRa 公司製 TBS 加有 0.1%Tween20 者)各加 150μL 到鏈黴抗生物素蛋白盤(MSD)各井，於室溫溫育 1 小時以上。去除阻斷溶液後，以 TBST 溶液 250μL 洗滌 3 次。將抗體抗原複合體溶液各加 50μL 到各井，於室溫溫育 1 小時，將生物素化抗原—抗體—檢測用 sulfo-tag 抗體之複合體溶液介由生物素化抗原而結合於鏈黴抗生物素蛋白盤。去除抗體抗原複合體溶液後以 TBST 溶液洗滌 3 次，把將 4xREAD 緩衝液(MSD)以水稀釋成 2 倍的溶液各加 150μL 到各井，以 Sector Imager 2400(MSD)檢測 sulfo-tag 的發光信號。

【0331】其結果示於第 24 圖。從噬菌體 ELISA 認為有結合之選殖體，將包含一部分胺基酸變異者進行 IgG 化，結果在噬菌體 ELISA 認為有結合之序列即使成為 IgG 也顯示與 CD3ε及人 CD154 結合。

由此結果顯示：由雙 Fab 資料庫可取得和第 2 抗原結合的抗體，通常使用噬菌體庫之淘選只有 Fab 分域，但即使成為含 Fc 區之 IgG 也認為結合之選殖體之濃縮，不只在人 IgA，在人 CD154 也可進行。因此雙 Fab 資料庫可說是能取得保持和 CD3 之結合能力且具有和第 2 抗原之結合能力的 Fab 分域的資料庫。

【0332】(9-4) 具有取得之 Fab 分域之 IgG 之和 CD3ε 及人 CD154 同時結合之評價

(9-3)中，由雙 Fab 資料庫獲得之選殖體即使成為 IgG 也顯示結合。然後，以競爭法（電化學發光法(ECL 法)）判定獲得之 IgG 是否與 CD3 及人 CD154 同時結合。若和 CD3 及人 CD154 同時結合，則即使對於和 CD154 結合之抗體加入 CD3，ECL 信號仍不變化，但不能同時結合時，則若加入 CD3，一部分抗體會與 CD3 結合，ECL 信號應降低。

【0333】具體而言，將經 TBST 溶液稀釋之生物素化人 CD154 25μL、調整為 1μg/mL 之抗體溶液 12.5μL、TBST 或用以競爭之 CD3ε 均二聚物蛋白質(9.4pmol/μL)12.5μL、及已附加 sulfo-tag 之抗人 IgG 抗體(Invitrogen #628400)25μL 加到 Nunc-Immuno^{Tm} MicroWell^{Tm} 96 井圓盤(Nunc)的各井，混合後於遮光狀態於室溫溫育 1 小時以上，使抗體抗原複合體形成。將含有 0.5%BSA 之 TBST 溶液(記載為阻斷溶液。TBST 溶液係於 TaKaRa 公司製 TBS 加入 0.1%Tween20 者)各加 150μL 到鏈黴抗生物素蛋白盤(MSD)各井，於室溫溫育 1 小時以上。去除阻斷溶液後以 TBST 溶液 250μL 洗滌 3 次。各加抗體抗原複合體溶液 50μL 到各井，於室溫溫育 1 小時，使生物素化抗原—抗體—檢測用 sulfo-tag 抗體之複合體溶液介由生物素化抗原結合於鏈黴抗生物素蛋白盤。去除抗體抗原複合體溶液後以 TBST 溶液洗滌 3 次，把將 4xREAD 緩衝液(MSD)以水稀釋 2 倍的溶液各加 150μL 到各井，以 Sector Imager 2400(MSD)檢測 sulfo-tag 的發光信號。

【0334】其結果示於第 25 圖。加入用以競爭的 CD3ε 均二聚物蛋白質時，比起加入 TBST，觀測到 ECL 信號降低。由此結果顯示：本研究找出的結合於 CD3ε 與人 CD154 之分子係若結合於 CD3 則無法結合於人 CD154 之雙 Fab 分子。由此結果顯示，可從雙 Fab 資料庫取得和第 2 抗原結合之抗體，其中，可取得若和 CD3 結合則不能和第 2 抗原結合（或若與第 2 抗原結合則無法與 CD3 結合）的無法和多數種抗原同時結合的雙 Fab 分子。

【0335】該領域中通常知識者可明白：若於(9-2)使用噬菌體之結合活性評價找到結合分子，可藉由增多評價數而增加結合分子的序列多樣性，所以，由以上可說：雙 Fab 資料庫是可取得保持和 CD3 之結合能力且同時具有與第 2 抗原之結合能力的 Fab 分域的庫。又，本實施例使用只使 H 鏈多樣化的雙 Fab 資料庫，但通常庫尺寸（也稱為多樣性，係指資料庫中含有多樣序列）較大則更能取得抗原結合分子，所以 L 鏈也多樣化的雙 Fab 資料庫也可用於和本實施例所示同樣地取得雙 Fab 分子。

【0336】若能如實施例 9 所示製作雙 Fab 分子，則可將結合於第 3 抗原之 Fab、抗原結合分域使用該領域中通常知識者公知之方法，例如融合瘤法、從抗體庫選擇結合抗體、抗原結合分域之選擇方法鑑定，鑑定之結合於第 3 抗原之抗原結合分域(例如 Fab)與帶有雙 Fab 分子之 Fab 分域之抗體，可依該領域中通常知識者公知之多專一性抗體之製作方法，例如製作 L 鏈共通化而 2 條 H 鏈不同的抗體的方法(控制 Fc 區之各分域界

面之技術)、Cross Mab 法、Fab Arm Exchange 法，而取得多專一性抗體。亦即，若能鑑定雙 Fab 分子，能依該領域中通常知識者公知之方法將結合於第 3 抗原之 Fab 與結合於實施例 9 所示之第 1 與第 2 抗原的雙 Fab 組合而取得所望多專一性抗體。由以上的實施例顯示，藉由使雙 Fab 資料庫適應多種抗原，能取得結合於 CD3ε 與第 2 抗原之分子，進一步，於實施例 8 與 9 可知：能取得結合於第 1 抗原(CD3ε)及第 2 抗原但不同時結合於第 1 抗原與第 2 抗原之分子。如前述，鑑定結合於第 3 抗原之 Fab 能以該領域中通常知識者公知之方法進行，故可藉由使用雙 Fab 資料庫以獲得實施例 1 記載之所望抗體。

【0337】(9-5) 針對 CD3/人 CD154 雙 Fab 分子

實施例 9 中，顯示可獲得結合於 CD3ε 及人 CD154 且不同時結合於 CD3ε 與人 CD154 之雙 Fab 分子。且附加和第 3 抗原結合之抗原結合分域，也可依該領域中通常知識者公知之方法實施。

近年來，有人揭示 CD154 之受體即 CD40 之致效劑抗體在移入癌抗原反應性之 T 細胞的方法會增強抗腫瘤活性(J Immunother. 2012 Apr;35(3):276-82.)。本實施例明白能建構結合於 CD3 與 CD154 之雙 Fab 分子，但若能選擇介由 CD154 而對於 CD40 顯示致效劑活性的抗體，則能期待介由 CD40 的抗腫瘤效果。亦即，本雙 Fab，能期待：在表現任意第 3 抗原之細胞以和 CD3ε 之結合而獲得 T 細胞所致之細胞傷害活性、及介由與 CD154 之結合而引起的 CD40 之致效劑信號獲致之抗腫瘤效果之增強。

【0338】[實施例 10] 關於來自抗人 CD3 抗體之抗體資料庫

CD3 係在人 T 細胞上表現之蛋白質，近年已明白 CD3 與 EpCAM 之雙專一性抗體 Catumaxomab 藉由將癌細胞與 T 細胞交聯，而呈現強抗腫瘤效果。

若能建構維持了 CD3 結合性之抗體資料，則能以例如以下的態樣利用。

・取得和 CD3 及其他抗原結合，且增加 CD3 所致之抗腫瘤效果之免疫球蛋白可變區(Fab)。具有以一個 Fab 和 2 個抗原結合之能力。

・取得和 CD3 及其他 2 個抗原結合，且增強 CD3 所致之抗腫瘤效果之免疫球蛋白可變區(Fab)。具有以一個 Fab 和 3 個抗原結合之能力。

・增強向 CD3 之結合性。

製作分別認識 CD3 與癌抗原之雙專一性抗體時，製作認識癌抗原之抗原結合部位。

【0339】[實施例 11] 增強和 CD3 之結合之方法

(11-1)增強 CD3 結合之方法

作為利用實施例 10 記載之來自抗 CD3 抗體之抗體資料庫之方法，有人考慮獲得增大向 CD3 之結合之抗體之方法。一般而言，增強結合力之方法(Affinity maturation)可列舉：對於取得之抗體序列利用部位專一性變異法而改變胺基酸並測定結合力之方法，及使用噬菌體展示為主之試管內展示(In vitro display)法之方法。試管內展示係將對於取得之序列利用 Error

prone PCR 法等而導入了變異之多種抗體序列作為資料庫，選擇結合力強之序列。

向 CD3 之結合，據認為使用選擇習知抗 CD3 抗體（例如：有上述模板序列之 CD3 結合抗體）之 80%以上胺基酸的雙 Fab 資料庫，能以良好效率找到向 CD3 之結合強之序列。

【0340】(11-2) 對於人 CD3 之結合增強之 Fab 分域之取得

從實施例 6 設計及建構之雙 Fab 資料庫鑑別對於 CD3 結合之 Fab 分域(抗體片段)。就抗原而言，使用經生物素標記之 CD3 胜肽，進行對於人 CD3 帶有結合能力之抗體片段之濃縮。

從保持著建構之噬菌體展示用噬粒的大腸菌產生噬菌體。將藉由於實施噬菌體產生之大腸菌之培養液添加 2.5M NaCl/10%PEG 而沉澱之噬菌體之集團以 TBS 稀釋，獲得噬菌體資料庫液。然後，在噬菌體資料庫液添加 BSA 使終濃度成為 4%BSA。淘選方法係參考一般方法，即使用固定於磁珠之抗原的淘選方法(J. Immunol. Methods. (2008) 332 (1-2), 2-9、J. Immunol. Methods. (2001) 247 (1-2), 191-203、Biotechnol. Prog. (2002) 18 (2) 212-20、Mol. Cell Proteomics (2003) 2 (2), 61-9)。磁珠可使用包覆了 NeutrAvidin 之珠粒(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated)或包覆了鏈黴親合素之珠粒(Dynabeads M-280 Streptavidin)。

具體而言，在製備的噬菌體資料庫液中加入 250pmol 之生物素標記抗原，使該噬菌體資料庫液於室溫和抗原接觸 60 分鐘。加入經 BSA 阻斷的磁珠，使抗原與噬菌體之複合體於室溫和磁珠結合 15 分鐘。將珠粒以 TBST(含有 0.1%Tween20 之

TBS，TBS 為 TaKaRa 公司製)洗滌 3 次後，以 1mLTBS 再洗滌 2 次。之後使 0.5mL 之已添加 1mg/mL 之胰蛋白酶之珠粒於室溫懸浮 15 分鐘後，立即使用磁座將珠粒分離，回收噬菌體溶液。將回收之噬菌體溶液添加到成為對數增殖期(OD600 為 0.4-0.5)之 10mL 之大腸菌株 ER2738。於 37℃緩慢地進行 1 小時上述大腸菌之攪拌培養，使噬菌體感染大腸菌。將已感染之大腸菌接種於 225mm x 225mm 之盤。然後，從已接種之大腸菌之培養液回收噬菌體，製備噬菌體資料庫液。此循環稱為淘選，總共重複 7 次。又，於第 2 回合以後之淘選，人 CD3 設為 40、10、10、1、1、0.1pmol。又，第 5 回合以後，在添加人 CD3 時，各加入 1000 倍量之人 CD3e 同二元體。

【0341】(11-3) 具有取得之 Fab 分域之 IgG 之製備

(11-2)獲得之帶有 CD3 結合能力之抗體片段之集團只由 Fab 分域構成。而進行向 IgG 型(Fab 及 Fc 之結合體)之變換。從具有帶 CD3 結合能力之抗體片段之大腸菌，使用專一性結合於雙 Fab 資料庫之 H 鏈之引子，以 PCR 將 VH 片段放大。將已放大的 VH 片段以參考實施例 1 之方法嵌入已嵌入了 pE22Hh 之動物細胞表現用質體，和實施例 6(6-2)同樣地表現並精製為單臂抗體。取得之序列名與 H 鏈序列之序列辨識號記載於表 17。具體而言，採用表 17 記載之 H 鏈與 Kn010G3（序列辨識號：56）與作為 L 鏈之 GLS3000（序列辨識號：53）與 Kappa 序列（序列辨識號：55）連結成的序列，依參考實施例 1 實施表現精製。

【0342】

【表 17】

樣本名	H鏈可變區序列編號	H鏈不變區序列編號
CE115_1	97	54
C3D(2)_i099	106	54
C3D(2)_i100	107	54
C3D(2)_i101	108	54
C3D(2)_i102	109	54
C3D(2)_i103	110	54
C3D(2)_i104	111	54
C3D(2)_i110	112	54
C3D(2)_i112	113	54
C3D(2)_i119	114	54
C3D(2)_i121	115	54
C3D(2)_i129	116	54
C3D(2)_i136	117	54
C3D(2)_i143	118	54
C3D(2)_i144	119	54
C3D(2)_i145	120	54
C3D(2)_i150	121	54
C3D(2)_i192	122	54
C3D(2)_i197	123	54
C3D(2)_i199	124	54
C3D(2)_i233	125	54
C3D(2)_i290	126	54
C3D(2)_i291	127	54
C3D(2)_i385	128	54
C3D(2)_i387	129	54
C3D(2)_i393	130	54
C3D(2)_i395	131	54
C3D(2)_i542	132	54
C3D(2)_i669	133	54
C3D(2)_i736	134	54
C3D(2)_i863	135	54

【0343】(11-4) 具有取得之 Fab 分域之 IgG 之結合評價

(11-3)獲得之 IgG 與人 CD3 之結合利用 BiacoreT200 確認。使 CM4 晶片介隔鏈黴親和素和生物素化 CD3 結合，將製作之抗體作為分析物流過，於 37℃解析結合親和性。其結果示於表 18。

【0344】【表 18】

樣本名	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
CE115_1	1.09E+05	4.19E-02	3.83E-07
C3D(2)_i099	9.55E+04	1.83E-03	1.92E-08
C3D(2)_i100	4.91E+04	8.31E-04	1.69E-08
C3D(2)_i101	9.61E+04	1.66E-03	1.73E-08
C3D(2)_i102	9.21E+04	9.48E-04	1.03E-08
C3D(2)_i103	6.77E+04	6.82E-04	1.01E-08
C3D(2)_i104	6.01E+04	2.10E-03	3.49E-08
C3D(2)_i110	8.84E+04	1.59E-03	1.79E-08
C3D(2)_i112	9.49E+04	9.55E-04	1.01E-08
C3D(2)_i119	6.28E+04	3.02E-04	4.82E-09
C3D(2)_i121	1.00E+05	7.85E-04	7.82E-09
C3D(2)_i129	6.89E+04	1.38E-03	2.00E-08
C3D(2)_i136	1.79E+05	2.49E-03	1.39E-08
C3D(2)_i143	2.08E+05	2.21E-03	1.06E-08
C3D(2)_i144	1.08E+05	2.33E-03	2.15E-08
C3D(2)_i145	8.67E+04	1.94E-03	2.24E-08
C3D(2)_i150	1.09E+05	2.35E-03	2.16E-08
C3D(2)_i192	1.22E+05	4.44E-03	3.65E-08
C3D(2)_i197	1.68E+05	1.30E-03	7.74E-09
C3D(2)_i199	3.47E+05	4.32E-02	1.25E-07
C3D(2)_i233	6.47E+04	1.45E-03	2.24E-08
C3D(2)_i290	6.76E+04	1.09E-03	1.62E-08
C3D(2)_i291	9.26E+04	1.46E-03	1.57E-08
C3D(2)_i385	8.60E+04	1.66E-03	1.93E-08
C3D(2)_i387	6.37E+04	1.68E-03	2.63E-08
C3D(2)_i393	6.27E+04	1.06E-03	1.69E-08
C3D(2)_i395	1.46E+05	5.81E-03	3.97E-08
C3D(2)_i542	1.54E+05	1.57E-03	1.02E-08
C3D(2)_i669	1.56E+05	1.00E-03	6.43E-09
C3D(2)_i736	1.87E+05	3.31E-03	1.77E-08
C3D(2)_i863	1.27E+05	4.75E-03	3.74E-08

【0345】如表 18 所示，能取得比起 CE115 有更強結合力之抗體。由此結果顯示：本發明之雙 Fab 資料庫能使用在取得對於 CD3 之結合能力增強之 CD3 結合抗體之方法。

【0346】[實施例 12] 取得認識癌抗原之可變區(Fab)之方

法

(12-1) 針對認識癌抗原之可變區(Fab)

作為利用實施例 10 之記載之來自抗 CD3 抗體之抗體資料庫之方法，可列舉取得針對癌抗原之結合抗體之方法。

認識癌抗原之可變區之輕鏈也可作為認識 CD3 之可變區之輕鏈，故從對於 CD3 有結合性之雙 Fab 資料庫取得認識癌抗原之可變區所含之輕鏈係為有效率的。

【0347】(12-2) 對於人 CD154 結合之 Fab 分域之取得

如實施例 9 所記載，從將人 CD154 作為模型癌抗原之雙 Fab 資料庫，鑑別對於人 CD154 結合之 Fab 分域(抗體片段)。使用經生物素標記之人 CD154 作為抗原，進行帶有對於人 CD154 之結合能力之抗體片段之濃縮。

從實施例 6 構建之保持著噬菌體展示用噬粒之大腸菌進行噬菌體產生。將藉由在進行噬菌體產生之大腸菌之培養液添加 2.5M NaCl/10%PEG 而使沉澱之噬菌體之集團以 TBS 稀釋，獲得噬菌體資料庫液。然後，在噬菌體資料庫液添加 BSA 使終濃度成為 4%BSA。淘選方法參考一般方法，即使用固定於磁珠之抗原之淘選方法(J. Immunol. Methods. (2008) 332 (1-2), 2-9、J. Immunol. Methods. (2001) 247 (1-2), 191-203、Biotechnol. Prog. (2002) 18 (2) 212-20、Mol. Cell Proteomics (2003) 2 (2), 61-9)。磁珠使用包覆了 NeutrAvidin 之珠粒(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated)或包覆了鏈黴親合素之珠粒(Dynabeads M-280 Streptavidin)。

具體而言，對於製備之噬菌體資料庫液加入 250pmol 之生

物素標記抗原，使該噬菌體資料庫液在室溫和抗原接觸 60 分鐘。加入經 BSA 阻斷的磁珠，使抗原與噬菌體之複合體和磁珠於室溫結合 15 分鐘。珠粒以 TBST(含有 0.1%Tween20 之 TBS，TBS 為 TaKaRa 公司製)洗滌 3 次後，以 1mL 之 TBS 再洗滌 2 次。之後將 0.5mL 之已加入 1mg/mL 之胰蛋白酶的珠粒於室溫懸浮 15 分鐘後，立即使用磁座分離珠粒，將噬菌體溶液回收。將回收的噬菌體溶液添加到成為對數增殖期(OD600 為 0.4-0.5)之 10mL 之大腸菌株 ER2738。於 37℃緩慢地進行 1 小時上述大腸菌之攪拌培養，使噬菌體感染大腸菌。將已感染的大腸菌接種在 225mm x 225mm 之盤。然後，從已接種的大腸菌培養液回收噬菌體，以製備噬菌體資料庫液。此循環稱為淘選，重複 5 次。又第 2 回合之後的淘選中，人 CD154 設為 40pmol。

【0348】(12-3) 噬菌體所展示之 Fab 分域與 CD3 或人 CD154 之結合

從依上述方法獲得之大腸菌之單一群落，依常法(Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145)回收含噬菌體之培養上清。將添加 BSA 使終濃度成為 4%BSA 的含有噬菌體之培養上清依以下程序供 ELISA。將 StreptaWell 96 微滴定盤(Roche)以含有生物素標記抗原(生物素標記 CD3ε 胜肽、生物素標記 CD154)之 100μL 之 PBS 於 4℃包覆一晚或於室溫包覆 1 小時。將該盤之各井以 PBST 洗滌以去除抗原後，將該井以 250μL 之 0.1xTBS/150mM NaCl/0.02% Skim Milk 阻斷 1 小時以上。在已去除 0.1xTBS/150mM NaCl /0.02% Skim Milk 之各井加入製備

的培養上清，之後將該盤於室溫靜置 1 小時，使展示噬菌體之抗體結合於各井存在之抗原。將各井以 0.1xTBS/150mM NaCl/0.01% Tween20 洗滌後，添加經 0.1xTBS/150mM NaCl/0.01% Tween20 稀釋之 HRP 結合抗 M13 抗體(Amersham Pharmacia Biotech)，培育 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利用添加硫酸停止後，以 450nm 之吸光度測定該發色。其結果示於第 23 圖。如第 23 圖，呈現存在結合於 CD3 及 CD154 之選殖體，可藉由使用雙 Fab 資料庫，選擇對於第 2 抗原(實施例 9 中為人 CD154)呈結合性之選殖體。該等選殖體之中，對於 CD154 呈結合性但對於 CD3 之結合性降低之選殖體係只和 CD154(癌抗原)結合之可變區(Fab)，可利用其獲得 CD154 結合抗體。

又，於對於 CD154 與 CD3 皆有結合性時，藉由利用實施例 6 探討之部位專一性變異法導入 CD3 結合減弱之胺基酸改變、實施例 6 未探討之胺基酸，可獲得 CD3 結合減弱且只結合於癌抗原之可變區(Fab)。

再者，可利用本實施例製造之只和癌抗原結合之可變區(Fab)、及包括和該可變區為共通之 L 鏈可變區序列之只和第 1 抗原(CD3)結合之可變區，而依該技術領域中有通常知識者公知之方法製造雙專一性抗體。

【0349】[實施例 13] 認識不同之 3 個抗原但不同時結合於該 3 個抗原之可變區(Multi Fab)

直到實施例 12，可製作認識 CD3 與 IgA、或 CD3 與 CD154 此類不同之 2 個抗原且不同時彼此結合之可變區(Dual Fab)。

再者，若改良成認識第 1 與第 2 抗原且彼此不同時結合之可變區能夠和第 4 抗原結合，第 1、第 2、第 4 抗原彼此不同時結合，則成為多專一性抗體 Multi Fab。但是至今尚未知有能和不同之 3 個以上之多數抗原結合但彼此不同時結合之可變區。

【0350】(13-1) 認識 3 個抗原之可變區(Fab)之取得

認識 3 個抗原之可變區之取得，可列舉對於本說明書明白之雙專一性抗體 Dual Fab，進一步進行：

1. 改變胺基酸而使和抗原結合之方法

2. 探尋已知和抗原結合、或會於該技術領域中有通常知識者公知之方法結合之胜肽，而插入抗原結合胜肽之方法

3. 使用本說明書明白之抗體資料庫，選擇結合於和 DualFab 為不同之抗原之可變區之方法。

又，也可使用本說明書明白之抗體資料庫，預先探尋對於不同之多數抗原會結合之分子，可於探索過程選擇會和各分子結合且不同時和不同之多數抗原結合之抗原結合分子。

【0351】(13-2) 認識 CD3、人 IgA 及整合素 αvβ3 之可變區(Multi Fab)之製作

利用 PCR 法製作在認識實施例 8 取得之 CD3 與人 IgA 之 Dual Fab 分子 IGAR6(2)B02（重鏈序列辨識號：63）之第 72 號（Kabat 編號）與第 73 號（Kabat 編號）之間插入了已知會和整合素 αvβ3 結合之胜肽的 IGAR6(2)B02H1（重鏈序列辨識號：136）。將製作之 DNA 片段嵌入到動物細胞表現用質體，和實施例 8 同樣地，採用 IGAR6(2)B02 或 IGAR6(2)B02H1 作為 H 鏈可變區，並採用該 H 鏈可變區與 Kn010G3（序列辨識

號：56）與作為 L 鏈之 GLS3000（序列辨識號：53）與 Kappa 序列（序列辨識號：55）連結成的序列，依參考實施例 1 進行表現精製。

【0352】(13-3) 認識 CD3、人 IgA 及整合素 αvβ3 之可變區(Multi Fab)之 CD3 或人 IgA 之結合性之確認

然後以電化學發光法(ECL 法)判定是否取得之帶有 Fab 區之試驗抗體分子會和人 IgA 與 CD3 結合且彼此同時結合。具體而言，將經 TBST 溶液稀釋之生物素化人 IgA 12.5μL、製備成 2μg/mL 之試驗抗體溶液 25μL、與 TBST 或為了競爭之 CD3ε 同二元體蛋白質(3.5pmol/μL)12.5μL、附加了 sulfo-tag 之抗人 IgG 抗體(Invitrogen #628400)25μL，添加在 Nunc-Immuno™ MicroWell™ 96 井圓底盤(Nunc)之各井，混合後於 4℃於遮光狀態培育一晚以上，使抗體抗原複合體形成。將含有 0.5%BSA 之 TBST 溶液(記載為阻斷溶液。TBST 溶液係在 TaKaRa 公司製之 TBS 添加了 0.1%Tween20 者)在鏈黴親和素盤(MSD)之各井各添加 150μL，於 4℃培育一晚以上。去除阻斷溶液後，將抗體抗原複合體溶液在各井各添加 50μL，於室溫培育 1 小時，使生物素化抗原-試驗抗體-檢測用 sulfo-tag 抗體之複合體溶液介隔生物素化抗原而結合於鏈黴親和素盤。去除抗體抗原複合體溶液後，把將 4xREAD 緩衝液(MSD)以水稀釋成 2 倍之溶液在各井各添加 150μL，以 Sector Imager 2400(MSD)檢測 sulfo-tag 之發光信號(ECL 信號)。其結果示於表 19。

【0353】【表 19】

樣本	ECL 信號				和未添加抗原之井比較之值				
	hIgA	hIgA + CD3ε 同二元體蛋白質	CD3 胜肽	無抗原	hIgA	hIgA + CD3ε 同二元體蛋白質	CD3 胜肽	無抗原	因 CD3 減弱之向 hIgA 之結合量
IGA6(2)B02	20675	884	959436	1054	20	1	910	1	23.4
IGAR6(2)B02H1	5564	755	933057	663	8	1	1407	1	7.4
TBST	976	1144	1204	715	1	2	2	1	0.9

【0354】如表 19，IGAR6(2)B02H1 會結合於 hIgA(人 IgA)或 CD3。在測定人 IgA 之結合時，若使 CD3ε 同二元體蛋白質共存，結合信號會減弱，顯示：和實施例 6 所示之 IGAR6(2)B02 同樣，IGAR6(2)B02H1 亦為和 IgA 與 CD3 結合但彼此不同時同時結合。

【0355】(13-4) 認識 CD3、人 IgA 及整合素 αvβ3 之可變區(Multi Fab)之和整合素 αvβ3 之結合性之確認

然後，以電化學發光法(ECL 法)判定(13-2)取得之帶有 Fab 區域之試驗抗體分子是否和整合素 αvβ3 結合、是否和整合素 αvβ3 與 CD3ε 同時結合。具體而言，使整合素 αvβ3(R&D systems)溶於 0.1M $NaHCO_3$, pH9.6 之溶液使成為 1μg/mL，各加 50μL 於 MULTI-ARRAY 96 井盤(Meso Scale Diagnostics)。於沒有整合素 αvβ3 之井，各加 50μL 0.1M $NaHCO_3$, pH9.6 之溶液。於 4℃靜置 2 日。然後，將 TBST 溶液(在 TaKaRa 公司製 TBS 添加了 0.1% Tween20 者)或經 TBST 稀釋之 CD3ε 同二元體蛋白質、與製備成 2μg/mL 之試驗抗體溶液、與附加了 sulfo-tag 之抗人 IgG 抗體(Invitrogen #628400)，各加 25μL 於 Nunc-Immuno™ MicroWell™ 96 井圓盤(Nunc)之各井並混合，之後於遮光狀態在 4℃培育 2 日，形成試驗抗體與抗人 IgG 抗

體之複合體。將已固定抗原之 MULTI-ARRAY 96 井盤(Meso Scale Diagnostics)以 TBST 洗滌 3 次。之後於各井各添加含 0.5%BSA 之 TBST 溶液(記載為阻斷溶液)150μL，於室溫培育 1 小時以上。去除阻斷溶液後，於各井各添加(包括 CD3ε 同二元體蛋白質或 TBST)試驗抗體與抗人 IgG 抗體之複合體溶液 50μL，於室溫振盪 1 小時，使盤上之抗原和試驗抗體-檢測用 sulfo-tag 抗體之複合體結合。去除抗體複合體溶液後，於各井添加 150μL 之 4xREAD 緩衝液(MSD)以水稀釋 2 倍而得之溶液，以 Sector Imager 2400(MSD)檢測 sulfo-tag 之發光信號。其結果示於表 20。

【0356】【表 20】

	ECL 信號				和未添加整合素 αvβ3 之井比較之值		
樣本	整合素 αvβ3	整合素 αvβ3+CD3ε 同二元體蛋白質	無整合素 αvβ3	無整合素 αvβ3+CD3ε 同二元體蛋白質	整合素 αvβ3	整合素 αvβ3+CD3ε 同二元體蛋白質	因 CD3 減弱之向整合素 αvβ3 之結合量
IGA6(2)B02	456	452	570	557	0.8	0.8	1.0
IGAR6(2)B02H1	549380	98552	1253	533	438.5	184.9	2.4
TBST	540	497	480	552	1.1	1.0	1.1

【0357】如表 20，IGAR6(2)B02H1，比起無整合素 αvβ3、TBST 之樣本，ECL 信號增加，可知已和整合素 αvβ3 結合。進而，若添加 CD3ε 同二元體則信號減弱，顯示 GAR6(2)B02H1 雖和整合素 αvβ3 結合，但若有 CD3ε 同二元體蛋白質共存，則和 CD3ε 同二元體蛋白質結合而不和整合素 αvβ3 結合。

【0358】(13-5) 認識 CD3、人 IgA 及整合素 αvβ3 之可變區(Multi Fab)之結合特性之確認

(13-3)顯示不和 IgA 與 CD3 同時結合，(13-4)顯示不和整合素 αvβ3 與 CD3 同時結合。其次以電化學發光法(ECL 法)判

定是否彼此和人 IgA 與整合素 αvβ3 同時結合。具體而言，將經 TBST 溶液稀釋之生物素化人 IgA 12.5μL、製備成 1μg/mL 之試驗抗體溶液 25μL、及 TBST 或為了競爭之整合素 αvβ3 (R&D systems)(250pmol/μL)12.5μL、及附加了 sulfo-tag 之抗人 IgG 抗體(Invitrogen #628400)25μL 添加到 Nunc-Immuno™ MicroWell™ 96 井圓盤(Nunc)之各井，混合後於遮光狀態於 4℃培育一晚以上，形成抗體抗原複合體。將含有 0.5%BSA 之 TBST 溶液(記載為阻斷溶液。TBST 溶液係於 TaKaRa 公司製 TBS 添加了 0.1%Tween20 者)各加 150μL 到鏈黴親合素盤(MSD)各井，於室溫培育 1 小時以上。去除阻斷溶液後，各加抗體抗原複合體溶液 50μL 到各井，於室溫培育 1 小時，使生物素化抗原-抗體-檢測用 sulfo-tag 抗體之複合體溶液介隔生物素化抗原和鏈黴親和素盤結合。去除抗體抗原複合體溶液後，於各井各添加 4xREAD 緩衝液(MSD)以水稀釋成 2 倍之溶液 150μL，以 Sector Imager 2400(MSD)檢測出 sulfo-tag 之發光信號(ECL 信號)。其結果示於表 21。

【0359】【表 21】

	ECL 信號			和未添加抗原之井比較之值			
樣本	hIgA	hIgA + 整合素 αvβ3	無抗原	hIgA	hIgA + 整合素 αvβ3	無抗原	因整合素 αvβ3 減弱之向 hIgA 之結合量
IGA6(2)B02	6356	6460	408	15.6	15.9	1.0	1.0
IGAR6(2)B02H1	2796	1121	718	3.9	1.6	1.0	2.5
TBST	582	567	624	0.9	0.9	1.0	1.0

【0360】如表 21，藉由整合素 αvβ3 共存，針對人 IgA 之結合信號減弱 2.5 倍，顯示 IGAR6(2)B02H1 不同時結合於人 IgA

與整合素 αvβ3。

由以上之結果，顯示：IGAR6(2)B02H1 是會和人 IgA、CD3、整合素 αvβ3 結合，但彼此不同時結合之分子(Multi Fab)。

【0361】如本實施例所示，若能製作會和不同之 3 個抗原（第 1 抗原、第 2 抗原、及第 4 抗原）結合但不同時結合於該 3 個抗原之可變區(Multi Fab)，則能使用該技術領域中有通常知識者公知之方法，例如融合瘤法、從抗體資料庫挑選結合抗體、抗原結合分域之方法，來鑑別會結合於第 3 抗原之 Fab、抗原結合分域，帶有鑑別出之會結合於第 3 抗原之抗原結合分域(例如 Fab)與 multi Fab 分子之 Fab 分域之抗體能利用上述該技術領域中有通常知識者公知之多專一性抗體之製作方法(控制 Fc 區之各分域之界面技術、Cross Mab 法、Fab Arm Exchange 法等)製作。亦即，若能鑑別本實施例所示之和不同之 3 個抗原結合之 Multi Fab 分子，則可將該分子依該技術領域中有通常知識者公知之方法和結合於第 3 抗原之 Fab 組合，而取得所望之多專一性抗體。

【0362】[參考實施例]

[參考實施例 1] 抗體之表現載體之製作及抗體之表現與精製

胺基酸取代之導入係使用 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit(Stratagene)、PCR 或 In fusion Advantage PCR cloning kit (TAKARA)等依該領域中通常知識者公知之方法進行，並建構表現載體。獲得之表現載體之鹼基序列依該領域中通常知識者公知之方法決定。將製作的質體暫時性導入人胎兒

腎癌細胞來源 HEK293H 株(Invitrogen)、或 FreeStyle293 細胞(Invitrogen 公司)並實施抗體表現。從獲得之培養上清使用 rProtein A Sepharose™ Fast Flow(GEhealthcare)，以該領域中通常知識者公知之方法精製抗體。精製抗體濃度係使用分光光度計測定於 280nm 之吸光度，從獲得之值使用依 PACE 法算出的吸光係數計算抗體濃度(Protein Science 1995；4：2411-2423)。

【0363】[參考實施例 2] 抗體之 ECM(Extracellular matrix、細胞外基質)結合評價

抗體向 ECM(Extracellular matrix)之結合評價係參考 WO2012093704A1，依以下程序實施。將 ECM Phenol red free(BD Matrigel #356237)以 TBS 稀釋為 2mg/mL，於在冰上冷確的 ECL 測定用盤(L15XB-3、MSD high bind)的各井的正中滴加 5μL。之後，以盤密封件加蓋，於 4℃靜置一晚。使已固定 ECM 的盤回到室溫，於各井加入 ECL 阻斷緩衝液(PBS 中加有 0.5%BSA 及 0.05%Tween 20 者)150μL，於室溫靜置 2 小時以上或於 4℃靜置一晚。然後使用 PBS-T(PBS 中加有 0.05%Tween 20 者)將抗體樣本稀釋為 9μg/mL。將 2 次抗體以 ECLDB(PBS 中加有 0.1%BSA 及 0.01%Tween 20 者)稀釋為 2μg/mL，於各加 ECLDB10μL 在各井的圓底盤中加入抗體溶液 20μL、2 次抗體溶液 30μL，於遮光下於室溫攪拌 1 小時。從已裝有 ECL Bloking 緩衝液的 ECM 盤倒出 ECL 阻斷緩衝液，並於此盤各加 50μL 前述抗體・二次抗體之混合溶液。之後於遮光下於室溫靜置 1 小時。將樣本倒掉後，各加 READ 緩衝液(MSD)150μL 於各井，

以 Sector Imager 2400(MSD)檢測 sulfo-tag 的發光信號。

【0364】[參考實施例 3] 人 IgA 之製備

作為人 IgA，使用天然存在的人 IgA 序列中的 Fc 部分(人 IgA-Fc)。為了於人 IgA-Fc 之 C 末端附加生物素，利用生物素連接酶將編碼為附加生物素之專一性序列(AviTag 序列、序列辨識號：79)的基因片段介由連結子連結。將編碼為已連結人 IgA-Fc 與 AviTag 序列的蛋白質(序列辨識號：80)的基因片段納入動物細胞表現用載體，將構建的質體載體使用 293Fectin (Invitrogen)導入到 FreeStyle293 細胞(Invitrogen)。此時將表現 EBNA1(序列辨識號：81)之基因及表現生物素連接酶(BirA、序列辨識號：82)的基因同時導入，進一步為了將人 IgA-Fc 進行生物素標記而添加生物素。將依前述程序導入有基因的細胞於 37℃、8% CO_2 培養 6 日，使目的蛋白質分泌到培養上清中。

將含有目的之人 IgA-Fc 之細胞培養液以 0.22μm 瓶頂濾器過濾，獲得培養上清。於經 20mM Tris-HCl, pH7.4 平衡化的 HiTrap Q HP(GEhealthcare)加入以同溶液稀釋的培養上清，利用 NaCl 之濃度梯度使目的之人 IgA-Fc 溶出。然後於經 50mM Tris-HCl, pH8.0 平衡化之 SoftLink Avidin 管柱(Promega)加入以同溶液稀釋的前述 HiTrap Q HP 溶出液，以 5mM 生物素, 150mM NaCl, 50mM Tris-HCl, pH8.0 使目的之人 IgA-Fc 溶出。之後，利用使用 Superdex200(GEhealthcare)之凝膠過濾層析，去除係目的外雜質之締合體，獲得緩衝液取代成 20mM Histidine-HCl, 150mM NaCl, pH6.0 的精製人 IgA-Fc。

【0365】[產業利用性]

依本發明可提供一種適於作為醫藥品之多肽，能使利用抗原結合分子產生之活性增強，而且可避免據認為成為副作用原因之由於向在不同的細胞上表現之抗原之結合導致之該不同的細胞間之交聯。

【符號說明】

無。

序列表

<110> 中外製藥股份有限公司

<120> 包含經改變之抗體可變區之抗原結合分子的資料庫

<130> C11309PY1-TW

<150> PCT/JP2014/079785
<151> 2014-11-11

<150> JP 2015-097884
<151> 2015-05-13

<160> 136

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 330
<212> PRT
<213> 智人

<400> 1

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


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


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


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


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


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

```
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225                 230                 235                 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270

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

```
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325                 330
```

<210> 2
<211> 326
<212> PRT
<213> 智人

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 3
<211> 377
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3

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

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

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

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

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

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

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
115 120 125

```
Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
    130                 135                 140

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
145                 150                 155                 160

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
                165                 170                 175

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
            180                 185                 190

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
        195                 200                 205

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
    210                 215                 220

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
225                 230                 235                 240

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
                245                 250                 255

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
            260                 265                 270

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
        275                 280                 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
    290                 295                 300

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
305                 310                 315                 320
```

```
Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
                325                 330                 335

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
            340                 345                 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
        355                 360                 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    370                 375
```

<210> 4
<211> 327
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4

```
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> 5
<211> 4
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 5

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 6
<211> 4
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 6

Ser Gly Gly Gly
1

<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 7

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 8

Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 9
<211> 6
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 9

Gly Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 10
<211> 6
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 10

Ser Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 11

<211> 7
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 11

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 12

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 13
<211> 122
<212> PRT
<213> 大鼠

<400> 13

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

```
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Asn
65                  70                  75                  80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Glu Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                85                  90                  95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 14
<211> 112
<212> PRT
<213> 大鼠

<400> 14

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

Gly Gln Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Asn
            20                  25                  30

Asn Gly Asn Thr Tyr Val Ser Trp Tyr Ile Gln Lys Pro Ser Gln Ser
        35                  40                  45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ile Ser
    50                  55                  60

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

Ser Arg Val Glu Pro Asp Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly
                85                  90                  95
```

Thr Gln Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 15
<211> 119
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 15

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
50 55 60

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

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 16
<211> 107
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 16

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

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 17
<211> 447
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 17

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
    50                  55                  60

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

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

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

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

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

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

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

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

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220
```

```
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

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

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

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

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

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

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415
```

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

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

<210> 18
<211> 447
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 18

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
50 55 60

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

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

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

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

115 120 125

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

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

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

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

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

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

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

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

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

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

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

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

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

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

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

<210> 19
<211> 447
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 19

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

S

```
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
            20                  25                  30

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

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
    50                  55                  60

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

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

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

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

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

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

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

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

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205
```

```
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

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

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

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

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

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

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 20
<211> 445
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 20

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

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Ser Ser Ala Ser Thr

100 105 110

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

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
130 135 140

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
145 150 155 160

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

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

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

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
210 215 220

Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
225 230 235 240

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
245 250 255

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
260 265 270

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
275 280 285

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

290 295 300

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
305 310 315 320

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
325 330 335

Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
340 345 350

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
355 360 365

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

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
385 390 395 400

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

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser
420 425 430

Leu Ser Leu Ser Pro His His His His His His His His
435 440 445

<210> 21
<211> 226
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 21

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
            20                  25                  30

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

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
    50                  55                  60

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

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
        115                 120                 125

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
    130                 135                 140

Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp
145                 150                 155                 160

Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr
                165                 170                 175

Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
            180                 185                 190
```

Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
195 200 205

Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly
210 215 220

Glu Cys
225

<210> 22
<211> 458
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 22

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Asn
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Glu Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

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

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

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

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

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

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

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr

290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

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

Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
450 455

<210> 23
<211> 219
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 23

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

Gly Gln Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Asn
            20                  25                  30

Asn Gly Asn Thr Tyr Val Ser Trp Tyr Ile Gln Lys Pro Ser Gln Ser
        35                  40                  45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ile Ser
    50                  55                  60

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

Ser Arg Val Glu Pro Asp Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly
                85                  90                  95

Thr Gln Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
            100                 105                 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
        115                 120                 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
    130                 135                 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145                 150                 155                 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
                165                 170                 175
```

S

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> 24
<211> 462
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 24

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gln Ile Lys Ala Gly Cys Arg Gly Asp Cys Leu Asn Tyr Ala Thr
50 55 60

Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp
65 70 75 80

Ser Lys Ser Asn Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Glu Glu Asp
85 90 95

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly

100 105 110

Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser 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 Ala Ala 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 Ala 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 Cys Glu Leu Thr
355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala 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 Val
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 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
450 455 460

<210> 25
<211> 462
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 25

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
            20                  25                  30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Gly Cys Arg Gly Asp Cys Leu Tyr Ala Thr
    50                  55                  60

Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp
65                  70                  75                  80

Ser Lys Ser Asn Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Glu Glu Asp
                85                  90                  95

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly
            100                 105                 110

Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser 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 Ala Ala 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 Ala 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 Cys Glu Leu Thr
        355                 360                 365
```

```
Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala 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 Val
                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 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
    450                 455                 460
```

<210> 26
<211> 465
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 26

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
            20                  25                  30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Gln Ile Lys Ala Gly Cys Arg Gly Asp Cys Leu Lys Ser Asn Asn
```

50 55 60

Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
65 70 75 80

Arg Asp Asp Ser Lys Ser Asn Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys
85 90 95

Glu Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala
100 105 110

Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
115 120 125

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

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
145 150 155 160

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
165 170 175

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
195 200 205

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
210 215 220

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
225 230 235 240

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

245 250 255

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
260 265 270

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
275 280 285

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
290 295 300

Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
305 310 315 320

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
325 330 335

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
340 345 350

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys
355 360 365

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe
370 375 380

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
385 390 395 400

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
405 410 415

Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
420 425 430

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

435 440 445

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
450 455 460

Lys
465

<210> 27
<211> 465
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 27

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Gly Cys Arg Gly Asp Cys Leu Ser Asn Asn
50 55 60

Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
65 70 75 80

Arg Asp Asp Ser Lys Ser Asn Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys
85 90 95

Glu Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala
100 105 110

```
Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
        115                 120                 125

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

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
145                 150                 155                 160

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
                165                 170                 175

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
            180                 185                 190

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
        195                 200                 205

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
    210                 215                 220

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
225                 230                 235                 240

Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
                245                 250                 255

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
            260                 265                 270

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
        275                 280                 285

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
    290                 295                 300
```

Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
305 310 315 320

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
325 330 335

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
340 345 350

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys
355 360 365

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe
370 375 380

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
385 390 395 400

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
405 410 415

Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
420 425 430

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
435 440 445

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
450 455 460

Lys
465

<210> 28
<211> 465
<212> PRT

<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 28

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
            20                  25                  30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
    50                  55                  60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Cys Arg Gly Asp
65                  70                  75                  80

Cys Leu Asp Ser Lys Ser Asn Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys
                85                  90                  95

Glu Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala
            100                 105                 110

Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
        115                 120                 125

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

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
145                 150                 155                 160

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

165 170 175

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
195 200 205

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
210 215 220

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
225 230 235 240

Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
245 250 255

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
260 265 270

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
275 280 285

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
290 295 300

Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
305 310 315 320

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
325 330 335

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
340 345 350

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys

355 360 365

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe
370 375 380

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
385 390 395 400

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
405 410 415

Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
420 425 430

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
435 440 445

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
450 455 460

Lys
465

<210> 29
<211> 463
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 29

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

```
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Gln Ile Lys Ala Gly Cys Arg Gly Asp Cys Leu Asn Asn Tyr Ala
    50                  55                  60

Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
65                  70                  75                  80

Asp Ser Lys Ser Asn Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Glu Glu
                85                  90                  95

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Tyr Tyr
            100                 105                 110

Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala
        115                 120                 125

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

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
145                 150                 155                 160

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
                165                 170                 175

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
            180                 185                 190

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
        195                 200                 205

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
    210                 215                 220
```

```
Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
225                 230                 235                 240

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
                245                 250                 255

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
            260                 265                 270

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
        275                 280                 285

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
    290                 295                 300

Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
305                 310                 315                 320

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
                325                 330                 335

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
            340                 345                 350

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu Leu
        355                 360                 365

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
    370                 375                 380

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
385                 390                 395                 400

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
                405                 410                 415
```

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
420 425 430

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
435 440 445

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
450 455 460

<210> 30
<211> 465
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 30

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Asn
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Glu Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Asp Cys Leu Ala

100 105 110

Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
115 120 125

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

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
145 150 155 160

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
165 170 175

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
195 200 205

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
210 215 220

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
225 230 235 240

Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
245 250 255

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
260 265 270

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
275 280 285

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg

290 295 300

Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
305 310 315 320

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
325 330 335

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
340 345 350

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys
355 360 365

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe
370 375 380

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
385 390 395 400

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
405 410 415

Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
420 425 430

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
435 440 445

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
450 455 460

Lys
465

<210> 31

<211> 465
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 31

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
            20                  25                  30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
    50                  55                  60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Asn
65                  70                  75                  80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Glu Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                85                  90                  95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Gly Cys Arg Gly Asp Cys Leu
            100                 105                 110

Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
        115                 120                 125

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

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
145                 150                 155                 160
```

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
165 170 175

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
195 200 205

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
210 215 220

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
225 230 235 240

Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
245 250 255

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
260 265 270

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
275 280 285

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
290 295 300

Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
305 310 315 320

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
325 330 335

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
340 345 350

```
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys
        355                 360                 365

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe
    370                 375                 380

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
385                 390                 395                 400

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
                405                 410                 415

Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
            420                 425                 430

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
        435                 440                 445

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
    450                 455                 460

Lys
465
```

<210> 32
<211> 465
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 32

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
```

20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Asn
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Glu Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Tyr Gly Cys Arg Gly Asp Cys
100 105 110

Leu Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
115 120 125

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

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
145 150 155 160

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
165 170 175

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
195 200 205

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp

210 215 220

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
225 230 235 240

Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
245 250 255

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
260 265 270

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
275 280 285

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
290 295 300

Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
305 310 315 320

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
325 330 335

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
340 345 350

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys
355 360 365

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe
370 375 380

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
385 390 395 400

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

405 410 415

Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
420 425 430

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
435 440 445

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
450 455 460

Lys
465

<210> 33
<211> 444
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 33

Gln Asp 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 Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Leu Arg Lys Gln Thr Lys Tyr Arg Glu Lys Phe
50 55 60

Glu Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn 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

Val Arg Ser Gly Arg Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
    210                 215                 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Tyr Gln Trp Gly Pro Met Val Phe
225                 230                 235                 240

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

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

S

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

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

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

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

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro
340 345 350

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

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

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

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

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

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

<210> 34
<211> 444
<212> PRT

<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 34

```
Gln Asp 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 Phe Asn Ile Lys Asp Thr
            20                  25                  30

Tyr Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Arg Ile Asp Pro Leu Arg Lys Gln Thr Lys Tyr Arg Glu Lys Phe
    50                  55                  60

Glu Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn 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

Val Arg Ser Gly Arg Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

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

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

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

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

```
                165                 170                 175

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

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

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
    210                 215                 220

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

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

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

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

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
    290                 295                 300

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

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

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

Ser Arg Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val
```

355 360 365

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

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

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

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

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

<210> 35
<211> 213
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 35

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 His Lys Tyr
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Glu Gln Leu Arg Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val 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> 36
<211> 22
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 36

Arg Trp Gly Tyr His Leu Arg Asp Arg Lys Tyr Lys Gly Val Arg Ser
1 5 10 15

His Lys Gly Val Pro Arg
20

<210> 37
<211> 480
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 37

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Arg Trp Gly Tyr His Leu Arg Asp Arg Lys
50 55 60

Tyr Lys Gly Val Arg Ser His Lys Gly Val Pro Arg Ser Asn Asn Tyr
65 70 75 80

Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
85 90 95

Asp Asp Ser Lys Ser Asn Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Glu
100 105 110

```
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Tyr
        115                 120                 125

Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
    130                 135                 140

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
145                 150                 155                 160

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
                165                 170                 175

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
            180                 185                 190

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
        195                 200                 205

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
    210                 215                 220

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
225                 230                 235                 240

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
                245                 250                 255

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
            260                 265                 270

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
        275                 280                 285

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
    290                 295                 300
```

```
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
305                 310                 315                 320

Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
                325                 330                 335

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
            340                 345                 350

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
        355                 360                 365

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu
    370                 375                 380

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
385                 390                 395                 400

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
                405                 410                 415

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
            420                 425                 430

Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
        435                 440                 445

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
    450                 455                 460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
465                 470                 475                 480
```

<210> 38
<211> 482
<212> PRT

<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 38

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
            20                  25                  30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Cys Arg Trp Gly Tyr His Leu Arg Asp Arg
    50                  55                  60

Lys Tyr Lys Gly Val Arg Ser His Lys Gly Val Pro Arg Cys Ser Asn
65                  70                  75                  80

Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
                85                  90                  95

Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Asn Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
            100                 105                 110

Lys Glu Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly
        115                 120                 125

Ala Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val
    130                 135                 140

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
145                 150                 155                 160

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
```

165 170 175

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
180 185 190

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
195 200 205

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
210 215 220

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
225 230 235 240

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
245 250 255

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
260 265 270

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
275 280 285

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
290 295 300

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
305 310 315 320

Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
325 330 335

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
340 345 350

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala

355 360 365

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
370 375 380

Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly
385 390 395 400

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
405 410 415

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
420 425 430

Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
435 440 445

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
450 455 460

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp
465 470 475 480

Asp Lys

<210> 39
<211> 480
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 39

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

```
Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
            20                  25                  30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
    50                  55                  60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Arg Trp Gly Tyr His
65                  70                  75                  80

Leu Arg Asp Arg Lys Tyr Lys Gly Val Arg Ser His Lys Gly Val Pro
                85                  90                  95

Arg Asp Ser Lys Ser Asn Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Glu
            100                 105                 110

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Tyr
        115                 120                 125

Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
    130                 135                 140

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
145                 150                 155                 160

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
                165                 170                 175

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
            180                 185                 190

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
        195                 200                 205
```

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
210 215 220

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
225 230 235 240

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
245 250 255

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
260 265 270

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
275 280 285

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
290 295 300

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
305 310 315 320

Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
325 330 335

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
340 345 350

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
355 360 365

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu
370 375 380

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
385 390 395 400

```
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
                405                 410                 415

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
            420                 425                 430

Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
        435                 440                 445

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
    450                 455                 460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
465                 470                 475                 480
```

<210> 40
<211> 482
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 40

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
            20                  25                  30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
    50                  55                  60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Cys Arg Trp Gly Tyr
```

65 70 75 80

His Leu Arg Asp Arg Lys Tyr Lys Gly Val Arg Ser His Lys Gly Val
85 90 95

Pro Arg Cys Asp Ser Lys Ser Asn Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
100 105 110

Lys Glu Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly
115 120 125

Ala Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val
130 135 140

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
145 150 155 160

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
165 170 175

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
180 185 190

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
195 200 205

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
210 215 220

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
225 230 235 240

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
245 250 255

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

260 265 270

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
275 280 285

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
290 295 300

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
305 310 315 320

Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
325 330 335

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
340 345 350

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
355 360 365

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
370 375 380

Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly
385 390 395 400

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
405 410 415

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
420 425 430

Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
435 440 445

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

450 455 460

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp
465 470 475 480

Asp Lys

<210> 41
<211> 477
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 41

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Asn
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Glu Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp
100 105 110

```
Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
        115                 120                 125

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

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

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

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

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
        195                 200                 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
    210                 215                 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225                 230                 235                 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
                245                 250                 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
            260                 265                 270

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

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
    290                 295                 300
```

```
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305                 310                 315                 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Asp Ala Leu Pro Met Pro
                325                 330                 335

Ile Glu Glu Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
            340                 345                 350

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

Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
    370                 375                 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385                 390                 395                 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr
                405                 410                 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
            420                 425                 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
        435                 440                 445

Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser Arg Trp Gly Tyr His Leu Arg Asp Arg
    450                 455                 460

Lys Tyr Lys Gly Val Arg Ser His Lys Gly Val Pro Arg
465                 470                 475
```

<210> 42
<211> 479
<212> PRT

<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 42

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
            20                  25                  30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
    50                  55                  60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Asn
65                  70                  75                  80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Glu Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                85                  90                  95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
        115                 120                 125

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

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

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

165 170 175

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

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

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

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Asp Ala Leu Pro Met Pro
325 330 335

Ile Glu Glu Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val

355 360 365

Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser Cys Arg Trp Gly Tyr His Leu Arg Asp
450 455 460

Arg Lys Tyr Lys Gly Val Arg Ser His Lys Gly Val Pro Arg Cys
465 470 475

<210> 43
<211> 461
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 43

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

```
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Gly Gly Ser Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
    50                  55                  60

Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
65                  70                  75                  80

Lys Ser Asn Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Glu Glu Asp Thr
                85                  90                  95

Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly Val
            100                 105                 110

Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
        115                 120                 125

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

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

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

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

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
        195                 200                 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
    210                 215                 220
```

```
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225                 230                 235                 240

Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
                245                 250                 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
            260                 265                 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
        275                 280                 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
    290                 295                 300

Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305                 310                 315                 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
                325                 330                 335

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
            340                 345                 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu Leu Thr Lys
        355                 360                 365

Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
    370                 375                 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385                 390                 395                 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser
                405                 410                 415
```

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
450 455 460

<210> 44
<211> 464
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 44

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asn Tyr
50 55 60

Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
65 70 75 80

Asp Asp Ser Lys Ser Asn Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Glu
85 90 95

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Tyr

100 105 110

Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
145 150 155 160

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
180 185 190

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
195 200 205

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
210 215 220

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
225 230 235 240

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
245 250 255

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
260 265 270

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
275 280 285

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

290 295 300

Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
305 310 315 320

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
325 330 335

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
340 345 350

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu
355 360 365

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
370 375 380

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385 390 395 400

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
405 410 415

Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
420 425 430

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
435 440 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
450 455 460

<210> 45
<211> 467
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 45

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ser
50 55 60

Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
65 70 75 80

Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Asn Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser
85 90 95

Leu Lys Glu Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr
100 105 110

Gly Ala Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
115 120 125

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
145 150 155 160

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
165 170 175

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
180 185 190

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
195 200 205

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
210 215 220

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
225 230 235 240

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
245 250 255

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
260 265 270

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
275 280 285

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
290 295 300

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
305 310 315 320

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
325 330 335

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
340 345 350

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
355 360 365

```
Arg Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys
    370                 375                 380

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
385                 390                 395                 400

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
                405                 410                 415

Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
            420                 425                 430

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
        435                 440                 445

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp
    450                 455                 460

Asp Asp Lys
465
```

<210> 46
<211> 461
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 46

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
            20                  25                  30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
```

35 40 45

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Gly Ser Asp Ser
65 70 75 80

Lys Ser Asn Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Glu Glu Asp Thr
85 90 95

Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly Val
100 105 110

Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125

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

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

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

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

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
195 200 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
210 215 220

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

225 230 235 240

Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
245 250 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
260 265 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
290 295 300

Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
325 330 335

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
340 345 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu Leu Thr Lys
355 360 365

Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385 390 395 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser
405 410 415

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

420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
450 455 460

<210> 47
<211> 464
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 47

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Gly Ser Gly Gly
65 70 75 80

Ser Asp Ser Lys Ser Asn Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Glu
85 90 95

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Tyr
100 105 110

```
Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
145                 150                 155                 160

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
            180                 185                 190

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
        195                 200                 205

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
    210                 215                 220

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
225                 230                 235                 240

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
                245                 250                 255

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
            260                 265                 270

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
        275                 280                 285

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
    290                 295                 300
```

Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
305 310 315 320

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
325 330 335

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
340 345 350

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu
355 360 365

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
370 375 380

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385 390 395 400

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
405 410 415

Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
420 425 430

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
435 440 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
450 455 460

<210> 48
<211> 467
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 48

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
            20                  25                  30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
    50                  55                  60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Gly Ser Gly Gly
65                  70                  75                  80

Ser Gly Gly Ser Asp Ser Lys Ser Asn Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser
                85                  90                  95

Leu Lys Glu Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr
            100                 105                 110

Gly Ala Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
        115                 120                 125

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
145                 150                 155                 160

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
                165                 170                 175

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

180 185 190

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
195 200 205

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
210 215 220

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
225 230 235 240

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
245 250 255

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
260 265 270

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
275 280 285

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
290 295 300

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
305 310 315 320

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
325 330 335

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
340 345 350

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
355 360 365

Arg Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys

370 375 380

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
385 390 395 400

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
405 410 415

Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
420 425 430

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
435 440 445

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp
450 455 460

Asp Asp Lys
465

<210> 49
<211> 461
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 49

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Asn
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Glu Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Gly Gly Ser Tyr Tyr Gly Val
100 105 110

Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125

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

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

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

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

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
195 200 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
210 215 220

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225 230 235 240

```
Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
                245                 250                 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
            260                 265                 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
        275                 280                 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
    290                 295                 300

Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305                 310                 315                 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
                325                 330                 335

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
            340                 345                 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu Leu Thr Lys
        355                 360                 365

Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
    370                 375                 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385                 390                 395                 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser
                405                 410                 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
            420                 425                 430
```

```
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
        435                 440                 445

Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
    450                 455                 460
```

<210> 50
<211> 464
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 50

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
            20                  25                  30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
    50                  55                  60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Asn
65                  70                  75                  80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Glu Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                85                  90                  95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Tyr
            100                 105                 110

Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
```

115 120 125

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
145 150 155 160

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
180 185 190

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
195 200 205

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
210 215 220

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
225 230 235 240

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
245 250 255

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
260 265 270

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
275 280 285

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
290 295 300

Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

305 310 315 320

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
325 330 335

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
340 345 350

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu
355 360 365

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
370 375 380

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385 390 395 400

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
405 410 415

Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
420 425 430

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
435 440 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
450 455 460

<210> 51
<211> 467
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 51

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
            20                  25                  30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
    50                  55                  60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Asn
65                  70                  75                  80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Glu Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                85                  90                  95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110

Gly Ser Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
        115                 120                 125

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
145                 150                 155                 160

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
                165                 170                 175

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
            180                 185                 190
```

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
195 200 205

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
210 215 220

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
225 230 235 240

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
245 250 255

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
260 265 270

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
275 280 285

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
290 295 300

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
305 310 315 320

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
325 330 335

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
340 345 350

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
355 360 365

Arg Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys
370 375 380

```
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
385                 390                 395                 400

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
                405                 410                 415

Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
            420                 425                 430

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
        435                 440                 445

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp
    450                 455                 460

Asp Asp Lys
465
```

<210> 52
<211> 122
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 52

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
            20                  25                  30

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

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
```

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

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

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 53
<211> 112
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 53

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Thr Gln Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 54
<211> 336
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 54

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

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

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

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

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

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

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

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

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

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
325 330 335

<210> 55
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 55

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> 56
<211> 230
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>

<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 56

```
Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1               5                  10                  15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
            20                  25                  30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
        35                  40                  45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
    50                  55                  60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65                  70                  75                  80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
                85                  90                  95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
            100                 105                 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
        115                 120                 125

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

Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145                 150                 155                 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
                165                 170                 175
```

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro
225 230

<210> 57
<211> 449
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 57

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

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

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

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

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

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

```
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

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

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

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

Lys
```

<210> 58
<211> 214

<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 58

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 59
<211> 458
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 59

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

```
Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Ala Ala Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
        115                 120                 125

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

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

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

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

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
        195                 200                 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
    210                 215                 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
225                 230                 235                 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
                245                 250                 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
            260                 265                 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
        275                 280                 285
```

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

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

Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
450 455

<210> 60
<211> 15

<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 60

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

<210> 61
<211> 467
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 61

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ala
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Gly Asn Gly Tyr Asn Ala Tyr Tyr Ala Pro
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Thr Thr Ser Tyr Phe Gly Leu Phe Gly
100 105 110

```
Gly Gly Gly Gly Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
        115                 120                 125

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
145                 150                 155                 160

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
                165                 170                 175

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
            180                 185                 190

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
        195                 200                 205

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
    210                 215                 220

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
225                 230                 235                 240

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
                245                 250                 255

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
            260                 265                 270

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
        275                 280                 285

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
    290                 295                 300
```

```
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
305                 310                 315                 320

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
                325                 330                 335

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
            340                 345                 350

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
        355                 360                 365

Arg Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys
    370                 375                 380

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
385                 390                 395                 400

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
                405                 410                 415

Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
            420                 425                 430

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
        435                 440                 445

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp
    450                 455                 460

Asp Asp Lys
465
```

<210> 62
<211> 467

<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 62

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ala
            20                  25                  30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Gly Asn Gly Tyr Asn Ala Tyr Tyr Ala Pro
    50                  55                  60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65                  70                  75                  80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                85                  90                  95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Thr Thr Ser Tyr Phe Gly Leu Phe Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Gly Gly Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
        115                 120                 125

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
145                 150                 155                 160
```

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
165 170 175

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
180 185 190

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
195 200 205

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
210 215 220

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
225 230 235 240

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
245 250 255

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
260 265 270

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
275 280 285

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
290 295 300

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
305 310 315 320

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
325 330 335

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
340 345 350

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
355 360 365

Arg Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys
370 375 380

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
385 390 395 400

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
405 410 415

Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
420 425 430

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
435 440 445

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp
450 455 460

Asp Asp Lys
465

<210> 63
<211> 464
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 63

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Gly Gln Gln Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ala Pro
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gln Thr Tyr Ser Asp Gly Ser Phe Tyr
100 105 110

Phe Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
145 150 155 160

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
180 185 190

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
195 200 205

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
210 215 220

```
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
225                 230                 235                 240

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
                245                 250                 255

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
            260                 265                 270

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
        275                 280                 285

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
    290                 295                 300

Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
305                 310                 315                 320

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
                325                 330                 335

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
            340                 345                 350

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu
        355                 360                 365

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
    370                 375                 380

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385                 390                 395                 400

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
                405                 410                 415
```

Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
420 425 430

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
435 440 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
450 455 460

<210> 64
<211> 464
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 64

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Val Asn Gln Tyr Ala Asn Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

```
Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Leu Thr Gly Tyr Phe Ser Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
145                 150                 155                 160

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
            180                 185                 190

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
        195                 200                 205

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
    210                 215                 220

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
225                 230                 235                 240

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
                245                 250                 255

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
            260                 265                 270

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
        275                 280                 285
```

```
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
    290                 295                 300

Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
305                 310                 315                 320

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
                325                 330                 335

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
            340                 345                 350

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu
        355                 360                 365

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
    370                 375                 380

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385                 390                 395                 400

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
                405                 410                 415

Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
            420                 425                 430

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
        435                 440                 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
    450                 455                 460
```

<210> 65
<211> 464
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 65

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
            20                  25                  30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Val Asn Gln Tyr Ala Asn Tyr Tyr Ala Glu
    50                  55                  60

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

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                85                  90                  95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Leu Thr Gly Tyr Phe Ser Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
145                 150                 155                 160

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
                165                 170                 175
```

```
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
            180                 185                 190

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
        195                 200                 205

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
    210                 215                 220

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
225                 230                 235                 240

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
                245                 250                 255

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
            260                 265                 270

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
        275                 280                 285

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
    290                 295                 300

Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
305                 310                 315                 320

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
                325                 330                 335

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
            340                 345                 350

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu
        355                 360                 365
```

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
370 375 380

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385 390 395 400

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
405 410 415

Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
420 425 430

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
435 440 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
450 455 460

<210> 66
<211> 464
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 66

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

```
Ala Gln Ile Lys Asp Arg Val Asn Gln Tyr Ala Asn Tyr Tyr Ala Glu
    50                  55                  60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65                  70                  75                  80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                85                  90                  95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Leu Thr Gly Tyr Phe Ser Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
145                 150                 155                 160

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
            180                 185                 190

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
        195                 200                 205

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
    210                 215                 220

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
225                 230                 235                 240
```

```
Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
               245                 250                 255

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
            260                 265                 270

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
        275                 280                 285

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
    290                 295                 300

Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
305                 310                 315                 320

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
               325                 330                 335

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
            340                 345                 350

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu
        355                 360                 365

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
    370                 375                 380

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385                 390                 395                 400

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
               405                 410                 415

Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
            420                 425                 430
```

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
435 440 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
450 455 460

<210> 67
<211> 464
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 67

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Val Asn Gln Tyr Ala Asn Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

Cys Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Leu Thr Gly Tyr Phe Ser Gly Gln
100 105 110

Gly Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
    130                 135                 140

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
145                 150                 155                 160

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
            180                 185                 190

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
        195                 200                 205

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
    210                 215                 220

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
225                 230                 235                 240

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
                245                 250                 255

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
            260                 265                 270

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
        275                 280                 285

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
    290                 295                 300

Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
305                 310                 315                 320
```

```
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
                325                 330                 335

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
            340                 345                 350

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu
        355                 360                 365

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
    370                 375                 380

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385                 390                 395                 400

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
                405                 410                 415

Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
            420                 425                 430

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
        435                 440                 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
    450                 455                 460
```

<210> 68
<211> 464
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 68

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ala
            20                  25                  30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Gln Asn Gln Tyr Asn Ala Tyr Tyr Ala Glu
    50                  55                  60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65                  70                  75                  80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                85                  90                  95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Ala Thr Ser Asp Gly Phe Leu Pro Tyr
            100                 105                 110

Phe Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
145                 150                 155                 160

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
            180                 185                 190
```

S

```
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
        195                 200                 205

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
    210                 215                 220

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
225                 230                 235                 240

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
                245                 250                 255

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
            260                 265                 270

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
        275                 280                 285

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
    290                 295                 300

Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
305                 310                 315                 320

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
                325                 330                 335

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
            340                 345                 350

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu
        355                 360                 365

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
    370                 375                 380
```

```
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385                 390                 395                 400

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
                405                 410                 415

Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
            420                 425                 430

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
        435                 440                 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
    450                 455                 460
```

<210> 69
<211> 464
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 69

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
            20                  25                  30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Ala Ser Gly Tyr Asn Asn Tyr Tyr Ala Glu
    50                  55                  60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65                  70                  75                  80
```

```
Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                85                  90                  95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Ala Gln Ser Val Ser Ala Phe Phe Gln
            100                 105                 110

Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
145                 150                 155                 160

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
            180                 185                 190

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
        195                 200                 205

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
    210                 215                 220

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
225                 230                 235                 240

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
                245                 250                 255

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
            260                 265                 270
```

```
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
        275                 280                 285

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
    290                 295                 300

Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
305                 310                 315                 320

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
                325                 330                 335

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
            340                 345                 350

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu
        355                 360                 365

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
    370                 375                 380

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385                 390                 395                 400

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
                405                 410                 415

Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
            420                 425                 430

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
        435                 440                 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
    450                 455                 460
```

S

<210> 70
<211> 464
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 70

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
            20                  25                  30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Gln Ser Gln Tyr Ala Asn Tyr Tyr Ala Pro
    50                  55                  60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65                  70                  75                  80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                85                  90                  95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gln Ser Thr Ser Tyr Ser Phe Tyr Gln
            100                 105                 110

Gly Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
    130                 135                 140
```

```
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
145                 150                 155                 160

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
            180                 185                 190

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
        195                 200                 205

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
    210                 215                 220

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
225                 230                 235                 240

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
                245                 250                 255

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
            260                 265                 270

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
        275                 280                 285

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
    290                 295                 300

Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
305                 310                 315                 320

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
                325                 330                 335
```

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
340 345 350

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu
355 360 365

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
370 375 380

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385 390 395 400

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
405 410 415

Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
420 425 430

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
435 440 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
450 455 460

<210> 71
<211> 464
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 71

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

```
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Gln Ser Gln Tyr Ala Asn Tyr Tyr Ala Pro
    50                  55                  60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
65                  70                  75                  80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                85                  90                  95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gln Ser Thr Ser Tyr Ser Phe Tyr Gln
            100                 105                 110

Gly Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
145                 150                 155                 160

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
            180                 185                 190

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
        195                 200                 205

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
    210                 215                 220
```

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
225 230 235 240

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
245 250 255

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
260 265 270

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
275 280 285

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
290 295 300

Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
305 310 315 320

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
325 330 335

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
340 345 350

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu
355 360 365

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
370 375 380

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385 390 395 400

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
405 410 415

Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
420 425 430

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
435 440 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
450 455 460

<210> 72
<211> 464
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 72

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Gly Asn Asn Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

```
Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ser Tyr Phe Phe Ala Ser Phe Tyr
            100                 105                 110

Phe Gly Val Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
145                 150                 155                 160

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
            180                 185                 190

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
        195                 200                 205

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
    210                 215                 220

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
225                 230                 235                 240

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
                245                 250                 255

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
            260                 265                 270

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
        275                 280                 285
```

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
290 295 300

Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
305 310 315 320

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
325 330 335

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
340 345 350

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu
355 360 365

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
370 375 380

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385 390 395 400

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
405 410 415

Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
420 425 430

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
435 440 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
450 455 460

<210> 73
<211> 464
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 73

```
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly His
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
            20                  25                  30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Gly Asn Asn Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ala Glu
    50                  55                  60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65                  70                  75                  80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                85                  90                  95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ser Tyr Phe Phe Ala Ser Phe Tyr
            100                 105                 110

Phe Gly Val Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
145                 150                 155                 160

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
                165                 170                 175
```

```
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
            180                 185                 190

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
        195                 200                 205

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
    210                 215                 220

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
225                 230                 235                 240

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
                245                 250                 255

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
            260                 265                 270

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
        275                 280                 285

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
    290                 295                 300

Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
305                 310                 315                 320

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
                325                 330                 335

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
            340                 345                 350

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu
        355                 360                 365
```

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
370 375 380

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385 390 395 400

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
405 410 415

Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
420 425 430

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
435 440 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
450 455 460

<210> 74
<211> 464
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 74

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

```
Ala Gln Ile Lys Asp Arg Gly Asn Asn Tyr Asn Thr Tyr Tyr Ala Pro
    50                  55                  60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65                  70                  75                  80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                85                  90                  95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ser Tyr Phe Phe Ser Gly Ser Ser
            100                 105                 110

Phe Gly Val Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
145                 150                 155                 160

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
            180                 185                 190

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
        195                 200                 205

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
    210                 215                 220

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
225                 230                 235                 240
```

```
Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
               245                 250                 255

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
            260                 265                 270

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
        275                 280                 285

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
    290                 295                 300

Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
305                 310                 315                 320

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
               325                 330                 335

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
            340                 345                 350

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu
        355                 360                 365

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
    370                 375                 380

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385                 390                 395                 400

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
               405                 410                 415

Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
            420                 425                 430
```

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
435 440 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
450 455 460

<210> 75
<211> 464
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 75

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Gly Asn Asn Tyr Asn Thr Tyr Tyr Ala Pro
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Arg Tyr Ala His Tyr Gly Ser Tyr Phe Phe Ser Gly Ser Ser
100 105 110

Phe Gly Val Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
    130                 135                 140

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
145                 150                 155                 160

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
            180                 185                 190

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
        195                 200                 205

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
    210                 215                 220

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
225                 230                 235                 240

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
                245                 250                 255

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
            260                 265                 270

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
        275                 280                 285

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
    290                 295                 300

Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
305                 310                 315                 320
```

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
325 330 335

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
340 345 350

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu
355 360 365

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
370 375 380

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385 390 395 400

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
405 410 415

Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
420 425 430

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
435 440 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
450 455 460

<210> 76
<211> 464
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 76

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
            20                  25                  30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Gly Asn Gln Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
    50                  55                  60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65                  70                  75                  80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                85                  90                  95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Thr Tyr Phe Phe Ala Leu Pro Ala
            100                 105                 110

Phe Gly Val Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
145                 150                 155                 160

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
            180                 185                 190
```

```
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
        195                 200                 205

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
    210                 215                 220

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
225                 230                 235                 240

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
                245                 250                 255

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
            260                 265                 270

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
        275                 280                 285

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
    290                 295                 300

Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
305                 310                 315                 320

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
                325                 330                 335

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
            340                 345                 350

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu
        355                 360                 365

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
    370                 375                 380
```

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385 390 395 400

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
405 410 415

Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
420 425 430

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
435 440 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
450 455 460

<210> 77
<211> 464
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 77

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Gly Asn Gln Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

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

```
Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                85                  90                  95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Thr Tyr Phe Phe Ala Leu Pro Ala
            100                 105                 110

Phe Gly Val Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
145                 150                 155                 160

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
            180                 185                 190

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
        195                 200                 205

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
    210                 215                 220

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
225                 230                 235                 240

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
                245                 250                 255

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
            260                 265                 270
```

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
275 280 285

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
290 295 300

Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
305 310 315 320

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
325 330 335

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
340 345 350

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu
355 360 365

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
370 375 380

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385 390 395 400

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
405 410 415

Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
420 425 430

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
435 440 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
450 455 460

<210> 78
<211> 464
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 78

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
            20                  25                  30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Gly Asn Asn Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ala Glu
    50                  55                  60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65                  70                  75                  80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                85                  90                  95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ser Tyr Phe Phe Ala Ser Phe Tyr
            100                 105                 110

Phe Gly Val Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Ala Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
    130                 135                 140
```

```
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
145                 150                 155                 160

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
            180                 185                 190

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
        195                 200                 205

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
    210                 215                 220

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
225                 230                 235                 240

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
                245                 250                 255

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
            260                 265                 270

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
        275                 280                 285

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
    290                 295                 300

Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
305                 310                 315                 320

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
                325                 330                 335
```

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
340 345 350

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu
355 360 365

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
370 375 380

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385 390 395 400

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
405 410 415

Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
420 425 430

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
435 440 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
450 455 460

<210> 79
<211> 15
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 79

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
1 5 10 15

<210> 80
<211> 233

<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 80

```
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> 81
<211> 641
<212> PRT
<213> Human herpesvirus 4

<400> 81

```
Met Ser Asp Glu Gly Pro Gly Thr Gly Pro Gly Asn Gly Leu Gly Glu
1               5                   10                  15

Lys Gly Asp Thr Ser Gly Pro Glu Gly Ser Gly Gly Ser Gly Pro Gln
            20                  25                  30

Arg Arg Gly Gly Asp Asn His Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly
        35                  40                  45

Arg Gly Gly Gly Arg Pro Gly Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ser Gly Pro
    50                  55                  60

Arg His Arg Asp Gly Val Arg Arg Pro Gln Lys Arg Pro Ser Cys Ile
65                  70                  75                  80

Gly Cys Lys Gly Thr His Gly Gly Thr Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly
```

85 90 95

Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly
100 105 110

Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly
115 120 125

Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala
130 135 140

Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly
145 150 155 160

Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly
165 170 175

Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly
180 185 190

Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly
195 200 205

Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala
210 215 220

Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala
225 230 235 240

Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly
245 250 255

Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly
260 265 270

Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly

275 280 285

Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly
290 295 300

Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly
305 310 315 320

Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Gly Arg Gly Arg Gly Gly Ser Gly Gly
325 330 335

Arg Gly Arg Gly Gly Ser Gly Gly Arg Gly Arg Gly Gly Ser Gly Gly
340 345 350

Arg Arg Gly Arg Gly Arg Glu Arg Ala Arg Gly Gly Ser Arg Glu Arg
355 360 365

Ala Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Glu Lys Arg Pro Arg Ser Pro
370 375 380

Ser Ser Gln Ser Ser Ser Ser Gly Ser Pro Pro Arg Arg Pro Pro Pro
385 390 395 400

Gly Arg Arg Pro Phe Phe His Pro Val Gly Glu Ala Asp Tyr Phe Glu
405 410 415

Tyr His Gln Glu Gly Gly Pro Asp Gly Glu Pro Asp Val Pro Pro Gly
420 425 430

Ala Ile Glu Gln Gly Pro Ala Asp Asp Pro Gly Glu Gly Pro Ser Thr
435 440 445

Gly Pro Arg Gly Gln Gly Asp Gly Gly Arg Arg Lys Lys Gly Gly Trp
450 455 460

Phe Gly Lys His Arg Gly Gln Gly Gly Ser Asn Pro Lys Phe Glu Asn

465 470 475 480

Ile Ala Glu Gly Leu Arg Ala Leu Leu Ala Arg Ser His Val Glu Arg
485 490 495

Thr Thr Asp Glu Gly Thr Trp Val Ala Gly Val Phe Val Tyr Gly Gly
500 505 510

Ser Lys Thr Ser Leu Tyr Asn Leu Arg Arg Gly Thr Ala Leu Ala Ile
515 520 525

Pro Gln Cys Arg Leu Thr Pro Leu Ser Arg Leu Pro Phe Gly Met Ala
530 535 540

Pro Gly Pro Gly Pro Gln Pro Gly Pro Leu Arg Glu Ser Ile Val Cys
545 550 555 560

Tyr Phe Met Val Phe Leu Gln Thr His Ile Phe Ala Glu Val Leu Lys
565 570 575

Asp Ala Ile Lys Asp Leu Val Met Thr Lys Pro Ala Pro Thr Cys Asn
580 585 590

Ile Arg Val Thr Val Cys Ser Phe Asp Asp Gly Val Asp Leu Pro Pro
595 600 605

Trp Phe Pro Pro Met Val Glu Gly Ala Ala Ala Glu Gly Asp Asp Gly
610 615 620

Asp Asp Gly Asp Glu Gly Gly Asp Gly Asp Glu Gly Glu Glu Gly Gln
625 630 635 640

Glu

<210> 82

<211> 321
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 82

```
Met Lys Asp Asn Thr Val Pro Leu Lys Leu Ile Ala Leu Leu Ala Asn
1               5                  10                  15

Gly Glu Phe His Ser Gly Glu Gln Leu Gly Glu Thr Leu Gly Met Ser
            20                  25                  30

Arg Ala Ala Ile Asn Lys His Ile Gln Thr Leu Arg Asp Trp Gly Val
        35                  40                  45

Asp Val Phe Thr Val Pro Gly Lys Gly Tyr Ser Leu Pro Glu Pro Ile
    50                  55                  60

Gln Leu Leu Asn Ala Lys Gln Ile Leu Gly Gln Leu Asp Gly Gly Ser
65                  70                  75                  80

Val Ala Val Leu Pro Val Ile Asp Ser Thr Asn Gln Tyr Leu Leu Asp
                85                  90                  95

Arg Ile Gly Glu Leu Lys Ser Gly Asp Ala Cys Ile Ala Glu Tyr Gln
            100                 105                 110

Gln Ala Gly Arg Gly Arg Arg Gly Arg Lys Trp Phe Ser Pro Phe Gly
        115                 120                 125

Ala Asn Leu Tyr Leu Ser Met Phe Trp Arg Leu Glu Gln Gly Pro Ala
    130                 135                 140

Ala Ala Ile Gly Leu Ser Leu Val Ile Gly Ile Val Met Ala Glu Val
145                 150                 155                 160

Leu Arg Lys Leu Gly Ala Asp Lys Val Arg Val Lys Trp Pro Asn Asp
                165                 170                 175
```

```
Leu Tyr Leu Gln Asp Arg Lys Leu Ala Gly Ile Leu Val Glu Leu Thr
            180                 185                 190

Gly Lys Thr Gly Asp Ala Ala Gln Ile Val Ile Gly Ala Gly Ile Asn
        195                 200                 205

Met Ala Met Arg Arg Val Glu Glu Ser Val Val Asn Gln Gly Trp Ile
    210                 215                 220

Thr Leu Gln Glu Ala Gly Ile Asn Leu Asp Arg Asn Thr Leu Ala Ala
225                 230                 235                 240

Met Leu Ile Arg Glu Leu Arg Ala Ala Leu Glu Leu Phe Glu Gln Glu
                245                 250                 255

Gly Leu Ala Pro Tyr Leu Ser Arg Trp Glu Lys Leu Asp Asn Phe Ile
            260                 265                 270

Asn Arg Pro Val Lys Leu Ile Ile Gly Asp Lys Glu Ile Phe Gly Ile
        275                 280                 285

Ser Arg Gly Ile Asp Lys Gln Gly Ala Leu Leu Leu Glu Gln Asp Gly
    290                 295                 300

Ile Ile Lys Pro Trp Met Gly Gly Glu Ile Ser Leu Arg Ser Ala Glu
305                 310                 315                 320

Lys
```

<210> 83
<211> 549
<212> DNA
<213> 智人

<400> 83

atggaacagg ggaagggcct ggctgtcctc atcctggcta tcattcttct tcaaggtact 60

ttggcccagt caatcaaagg aaaccacttg gttaaggtgt atgactatca agaagatggt 120

tcggtacttc tgacttgtga tgcagaagcc aaaaatatca catggtttaa agatgggaag 180

atgatcggct tcctaactga agataaaaaa aaatggaatc tgggaagtaa tgccaaggac 240

cctcgaggga tgtatcagtg taaaggatca cagaacaagt caaaaccact ccaagtgtat 300

tacagaatgt gtcagaactg cattgaacta aatgcagcca ccatatctgg ctttctcttt 360

gctgaaatcg tcagcatttt cgtccttgct gttggggtct acttcattgc tggacaggat 420

ggagttcgcc agtcgagagc ttcagacaag cagactctgt tgcccaatga ccagctctac 480

cagcccctca aggatcgaga agatgaccag tacagccacc ttcaaggaaa ccagttgagg 540

aggaattga 549

<210> 84
<211> 182
<212> PRT
<213> 智人

<400> 84

Met Glu Gln Gly Lys Gly Leu Ala Val Leu Ile Leu Ala Ile Ile Leu
1 5 10 15

Leu Gln Gly Thr Leu Ala Gln Ser Ile Lys Gly Asn His Leu Val Lys
20 25 30

Val Tyr Asp Tyr Gln Glu Asp Gly Ser Val Leu Leu Thr Cys Asp Ala
35 40 45

Glu Ala Lys Asn Ile Thr Trp Phe Lys Asp Gly Lys Met Ile Gly Phe
50 55 60

Leu Thr Glu Asp Lys Lys Lys Trp Asn Leu Gly Ser Asn Ala Lys Asp
65 70 75 80

Pro Arg Gly Met Tyr Gln Cys Lys Gly Ser Gln Asn Lys Ser Lys Pro
85 90 95

Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met Cys Gln Asn Cys Ile Glu Leu Asn Ala
100 105 110

Ala Thr Ile Ser Gly Phe Leu Phe Ala Glu Ile Val Ser Ile Phe Val
115 120 125

Leu Ala Val Gly Val Tyr Phe Ile Ala Gly Gln Asp Gly Val Arg Gln
130 135 140

Ser Arg Ala Ser Asp Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr
145 150 155 160

Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly
165 170 175

Asn Gln Leu Arg Arg Asn
180

<210> 85
<211> 516
<212> DNA
<213> 智人

<400> 85
atggaacata gcacgtttct ctctggcctg gtactggcta cccttctctc gcaagtgagc 60

cccttcaaga tacctataga ggaacttgag gacagagtgt ttgtgaattg caataccagc 120

atcacatggg tagagggaac ggtgggaaca ctgctctcag acattacaag actggacctg 180

ggaaaacgca tcctggaccc acgaggaata tataggtgta atgggacaga tatatacaag 240

gacaaagaat ctaccgtgca agttcattat cgaatgtgcc agagctgtgt ggagctggat 300

ccagccaccg tggctggcat cattgtcact gatgtcattg ccactctgct ccttgctttg 360

ggagtcttct gctttgctgg acatgagact ggaaggctgt ctggggctgc cgacacacaa 420

gctctgttga ggaatgacca ggtctatcag cccctccgag atcgagatga tgctcagtac 480

agccaccttg gaggaaactg ggctcggaac aagtga 516

<210> 86
<211> 171
<212> PRT
<213> 智人

<400> 86

Met Glu His Ser Thr Phe Leu Ser Gly Leu Val Leu Ala Thr Leu Leu
1 5 10 15

Ser Gln Val Ser Pro Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg
20 25 30

Val Phe Val Asn Cys Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val
35 40 45

Gly Thr Leu Leu Ser Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile
50 55 60

Leu Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys
65 70 75 80

Asp Lys Glu Ser Thr Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Gln Ser Cys
85 90 95

Val Glu Leu Asp Pro Ala Thr Val Ala Gly Ile Ile Val Thr Asp Val
100 105 110

Ile Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Gly Val Phe Cys Phe Ala Gly His
115 120 125

Glu Thr Gly Arg Leu Ser Gly Ala Ala Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg
130 135 140

Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr
145 150 155 160

Ser His Leu Gly Gly Asn Trp Ala Arg Asn Lys
165 170

<210> 87
<211> 624
<212> DNA
<213> 智人

<400> 87
atgcagtcgg gcactcactg gagagttctg ggcctctgcc tcttatcagt tggcgtttgg 60

gggcaagatg gtaatgaaga aatgggtggt attacacaga caccatataa agtctccatc 120

tctggaacca cagtaatatt gacatgccct cagtatcctg gatctgaaat actatggcaa 180

cacaatgata aaaacatagg cggtgatgag gatgataaaa acataggcag tgatgaggat 240

cacctgtcac tgaaggaatt ttcagaattg gagcaaagtg gttattatgt ctgctacccc 300

agaggaagca aaccagaaga tgcgaacttt tatctctacc tgagggcaag agtgtgtgag 360

aactgcatgg agatggatgt gatgtcggtg gccacaattg tcatagtgga catctgcatc 420

actgggggct tgctgctgct ggtttactac tggagcaaga atagaaaggc caaggccaag 480

cctgtgacac gaggagcggg tgctggcggc aggcaaaggg gacaaaacaa ggagaggcca 540

ccacctgttc ccaacccaga ctatgagccc atccggaaag gccagcggga cctgtattct 600

ggcctgaatc agagacgcat ctga 624

<210> 88
<211> 207
<212> PRT
<213> 智人

<400> 88

Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
1 5 10 15

```
Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr
            20                  25                  30

Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
        35                  40                  45

Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys
    50                  55                  60

Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp
65                  70                  75                  80

His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr
                85                  90                  95

Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu
            100                 105                 110

Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met
        115                 120                 125

Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu
    130                 135                 140

Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys
145                 150                 155                 160

Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn
                165                 170                 175

Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg
            180                 185                 190

Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile
        195                 200                 205
```

<210> 89
<211> 8
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 89

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 90
<211> 6
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 90

Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 91
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 91

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 92
<211> 7
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>

<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 92

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 93
<211> 8
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 93

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 94
<211> 122
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 94

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 95
<211> 122
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 95

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 96
<211> 128
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 96

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Tyr
100 105 110

Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 97
<211> 122
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 97

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Asn
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Glu Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 98
<211> 112

<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 98

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

Gly Gln Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Asn
            20                  25                  30

Asn Gly Asn Thr Tyr Val Ser Trp Tyr Ile Gln Lys Pro Ser Gln Ser
        35                  40                  45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ile Ser
    50                  55                  60

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

Ser Arg Val Glu Pro Asp Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly
                85                  90                  95

Thr Gln Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
            100                 105                 110
```

<210> 99
<211> 5
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 99

```
Asn Ala Trp Met His
1               5
```

<210> 100
<211> 19
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 100

Gln Ile Lys Asp Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 101
<211> 11
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 101

Val His Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly Val Asp Ala
1 5 10

<210> 102
<211> 17
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 102

Val His Tyr Gly Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Tyr Tyr Gly Val Asp
1 5 10 15

Ala

<210> 103
<211> 16
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 103

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 104
<211> 7
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 104

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 105
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 105

Gly Gln Gly Thr Gln Val Pro Tyr Thr
1 5

<210> 106
<211> 128

<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 106

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Ala Asn Gly Tyr Asn Thr Tyr Tyr Ala Pro
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Thr Thr Tyr Tyr Tyr Ala Ser Gly Ser
100 105 110

Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 107
<211> 128
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 107

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Ser Asn Gly Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Thr Thr Phe Thr Gly Val Ser Phe Gln
100 105 110

Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 108
<211> 128
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 108

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

```
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
            20                  25                  30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Ala Ser Gly Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Pro
    50                  55                  60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65                  70                  75                  80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                85                  90                  95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Thr Thr Tyr Val Asp Gly Leu Tyr Ser
            100                 105                 110

Phe Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 109
<211> 128
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 109

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
            20                  25                  30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
```

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Ala Asn Gly Tyr Asn Thr Tyr Tyr Ala Pro
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Thr Leu Tyr Phe Gly Gly Tyr Tyr Gln
100 105 110

Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 110
<211> 128
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 110

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Ala Asn Gly Tyr Asn Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Thr Thr Phe Gly Gly Phe Gly Phe Ser
100 105 110

Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 111
<211> 128
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 111

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Gln Asn Gly Tyr Asn Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Thr Thr Thr Tyr Gly Ser Tyr Tyr Gln
100 105 110

Phe Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 112
<211> 128
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 112

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Gln Asn Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Arg Thr Phe Thr Gly Leu Ser Pro Lys
100 105 110

Phe Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 113
<211> 128
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 113

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Gln Asn Ser Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Thr Thr Tyr Ser Gly Gly Phe Phe Ser
100 105 110

Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 114
<211> 128

<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 114

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
            20                  25                  30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Ala Asn Ser Tyr Asn Thr Tyr Tyr Ala Glu
    50                  55                  60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65                  70                  75                  80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                85                  90                  95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Thr Thr Tyr Ala Gly Ser Ser Phe Ser
            100                 105                 110

Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 115
<211> 128
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 115

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Ala Asn Gly Tyr Asn Ala Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Thr Thr Tyr Ala Gly Phe Ser Tyr Lys
100 105 110

Phe Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 116
<211> 128
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 116

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

```
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
            20                  25                  30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Gly Asn Gly Tyr Asn Thr Tyr Tyr Ala Glu
    50                  55                  60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65                  70                  75                  80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                85                  90                  95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Thr Thr Phe Gly Asp Gly Phe Tyr Lys
            100                 105                 110

Phe Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 117
<211> 126
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 117

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
            20                  25                  30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
```

```
Ala Gln Ile Lys Asp Arg Ser Asn Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ala Pro
    50                  55                  60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65                  70                  75                  80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                85                  90                  95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Thr Thr Phe Leu Ser Phe Ala Tyr Gly
            100                 105                 110

Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 118
<211> 128
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 118

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
            20                  25                  30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Gly Asn Gly Tyr Asn Thr Tyr Tyr Ala Pro
    50                  55                  60
```

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Arg Thr Ser Ser Tyr Gly Gly Phe Lys
100 105 110

Phe Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 119
<211> 128
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 119

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Ser Asn Gly Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Thr Ser Phe Ala Phe Phe Phe Gly Gln
100 105 110

Phe Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 120
<211> 126
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 120

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Gly Asn Gln Tyr Asn Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Thr Gln Tyr Ser Phe Gly Gln Tyr Gly
100 105 110

Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 121
<211> 128
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 121

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Gly Asn Gln Tyr Asn Ala Tyr Tyr Ala Pro
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Val Ser Ser Ser Ser Gly Ser Tyr Gln
100 105 110

Phe Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 122
<211> 128

<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 122

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Gly Ser Ala Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Thr Ser Gly Tyr Phe Gly Tyr Phe Gln
100 105 110

Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 123
<211> 128
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 123

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Gly Asn Asn Tyr Leu Thr Tyr Tyr Ala Pro
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Thr Thr Tyr Tyr Gly Gly Phe Tyr Ser
100 105 110

Phe Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 124
<211> 127
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 124

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

```
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
            20                  25                  30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Ser Ser Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ala Pro
    50                  55                  60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65                  70                  75                  80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                85                  90                  95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Ser Arg Pro Phe Phe Gly Gly Lys Tyr
            100                 105                 110

Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 125
<211> 128
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 125

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
            20                  25                  30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
```

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Ala Asn Gln Tyr Asn Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Thr Thr Ser Phe Gly Phe Phe Tyr Ser
100 105 110

Phe Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 126
<211> 128
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 126

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Ser Ser Gly Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Thr Thr Phe Val Gly Gly Tyr Pro Ser
100 105 110

Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 127
<211> 127
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 127

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Gly Asn Ser Tyr Asn Ala Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

```
Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Thr Thr Thr Tyr Ser Gly Tyr Gln Tyr
            100                 105                 110

Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 128
<211> 127
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 128

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
            20                  25                  30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Gln Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
    50                  55                  60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65                  70                  75                  80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                85                  90                  95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Thr Thr Tyr Phe Gly Gly Ser Tyr Gly
            100                 105                 110
```

Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 129
<211> 128
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 129

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Gln Asn Gln Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Thr Ser Phe Ala Gly Ser Gly Ser Ser
100 105 110

Phe Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 130
<211> 128

<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 130

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
            20                  25                  30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Gln Gln Gly Tyr Ala Asn Tyr Tyr Ala Pro
    50                  55                  60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65                  70                  75                  80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                85                  90                  95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Thr Thr Ser Phe Asp Gly Ser Tyr Gln
            100                 105                 110

Tyr Gly Val Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 131
<211> 128
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 131

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Ala Asn Gly Tyr Asn Ala Tyr Tyr Ala Pro
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Thr Thr Phe Gly Phe Gly Leu Ser Tyr
100 105 110

Gly Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 132
<211> 128
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 132

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Gln Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Ala Thr Tyr Phe Ser Gly Leu Tyr Lys
100 105 110

Phe Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 133
<211> 128
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 133

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Gln Asn Gly Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Pro
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Thr Thr Tyr Tyr Gly Gly Tyr Phe Gln
100 105 110

Phe Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 134
<211> 128
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 134

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Gly Asn Ser Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Pro
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Thr Thr Val Ser Phe Leu Gly Phe Lys
100 105 110

Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 135
<211> 128
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 135

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Gly Asn Ala Tyr Asn Ala Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Ala Ser Tyr Ala Phe Gly Phe Phe Ser
100 105 110

Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 136
<211> 471
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人工合成的胜肽序列

<400> 136

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Gly Gln Gln Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ala Pro
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Cys Arg Gly Asp
65 70 75 80

Cys Leu Asp Ser Lys Asn Ser Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys
85 90 95

Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gln Thr
100 105 110

```
Tyr Ser Asp Gly Ser Phe Tyr Phe Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly
        115                 120                 125

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
    130                 135                 140

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
145                 150                 155                 160

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
                165                 170                 175

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
            180                 185                 190

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
        195                 200                 205

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
    210                 215                 220

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
225                 230                 235                 240

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
                245                 250                 255

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
            260                 265                 270

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
        275                 280                 285

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
    290                 295                 300
```

```
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val
305                 310                 315                 320

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
                325                 330                 335

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
            340                 345                 350

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
        355                 360                 365

Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser
    370                 375                 380

Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
385                 390                 395                 400

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
                405                 410                 415

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
            420                 425                 430

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
        435                 440                 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp
    450                 455                 460

Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
465                 470
```

申請專利範圍

1. 一種資料庫，係由序列彼此不同之複數的抗原結合分子為主而成，

其特徵為：

該抗原結合分子中之抗原結合域，係能和第 1 抗原及與該第 1 抗原為不同之第 2 抗原結合但不同時和該第 1 抗原與該第 2 抗原結合之抗體之可變區，

該第 1 抗原及該第 2 抗原中之任一抗原為 CD3，另一抗原為在 T 細胞或其他之免疫細胞表面表現之分子，

其中，該可變區係被導入至少 1 個胺基酸之改變的可變區，且被改變之胺基酸為抗體之可變區之 CDR1、CDR2、CDR3 或 FR3 區域的胺基酸，其中該至少 1 個胺基酸之改變係對於由序列辨識號：96 記載之重鏈可變區序列及/或序列辨識號：53 記載之輕鏈可變區序列所構成之模板序列導入，且該被改變之胺基酸係選自於以下任一者以上之位置的胺基酸：

H 鏈：31、52b、52c、53、54、56、57、61、98、99、100、100a、100b、100c、100d、100e、100f、100g（Kabat 編號）；以及

L 鏈：24、25、26、27、27a、27b、27c、27e、30、31、33、34、51、52、53、54、55、56、74、77、89、90、92、93、94、96（Kabat 編號）。

2. 如申請專利範圍第 1 項之資料庫，其中，不同時和第 1 抗原與第 2 抗原結合之該可變區，係不同時和在各不同之細

胞上表現之第 1 抗原與第 2 抗原結合之可變區。

3. 如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之資料庫，其中，該另一抗原係 FcγR、TLR、凝集素、IgA、免疫檢查點分子、TNF 超級家族分子、TNFR 超級家族分子或 NK 受體分子。

4. 如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之資料庫，其中，該抗原結合分子係抗體之可變區與病毒外殼蛋白質之至少一部分的融合多肽。

5. 一種如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之資料庫之製造方法，包括以下的步驟(a)及(b)：

(a) 將和第 1 抗原結合之抗體之可變區序列作為資料庫之模板序列，指定滿足以下的(i)至(iii)中之任一者以上之胺基酸改變的步驟；

(i) 不使對於第 1 抗原之結合能力實質上帶來變化的改變；

(ii) 不使 ECM 結合能力實質上帶來變化之改變；及

(iii) 向重鏈可變區之 CDR1、CDR2、CDR3 或 FR3 區域插入由 1 至 25 個殘基胺基酸構成之胜肽；及

(b) 設計包括編碼為該模板序列之核酸、及編碼為在該模板序列中具有該步驟(a)指定之 1 或多數胺基酸改變之彼此序列不同之可變區之核酸的資料庫的步驟；其中，使用序列辨識號：96 記載之重鏈可變區序列及/或序列辨識號：53 記載之輕鏈可變區序列作為該資料庫之模板序列而製造資料庫。

6. 一種抗原結合分子之製造方法，該抗原結合分子包括能和為 CD3 之第 1 抗原及與該第 1 抗原為不同之第 2 抗原結合，

但不同時和該第 1 抗原與該第 2 抗原結合之可變區；

包括以下的步驟(a)至(c)：

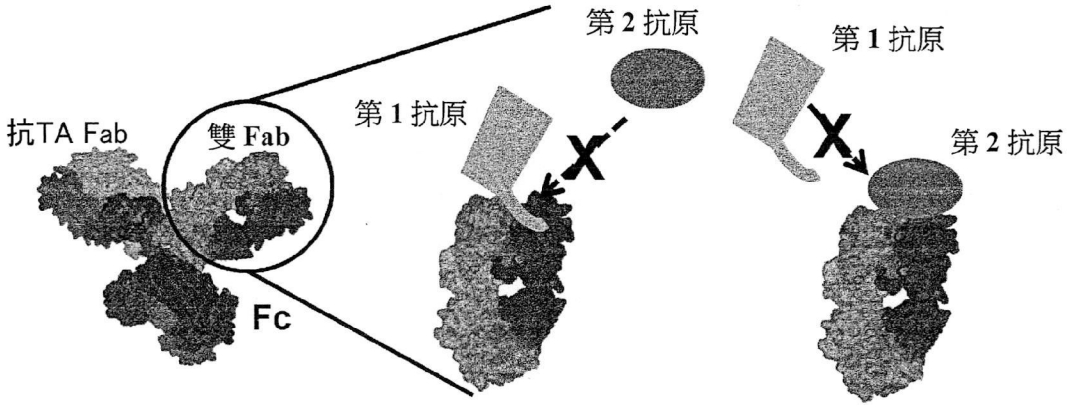
(a) 使如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項之資料庫接觸第 2 抗原的步驟；

(b) 回收在該步驟(a)和第 2 抗原結合之抗原結合分子的步驟；

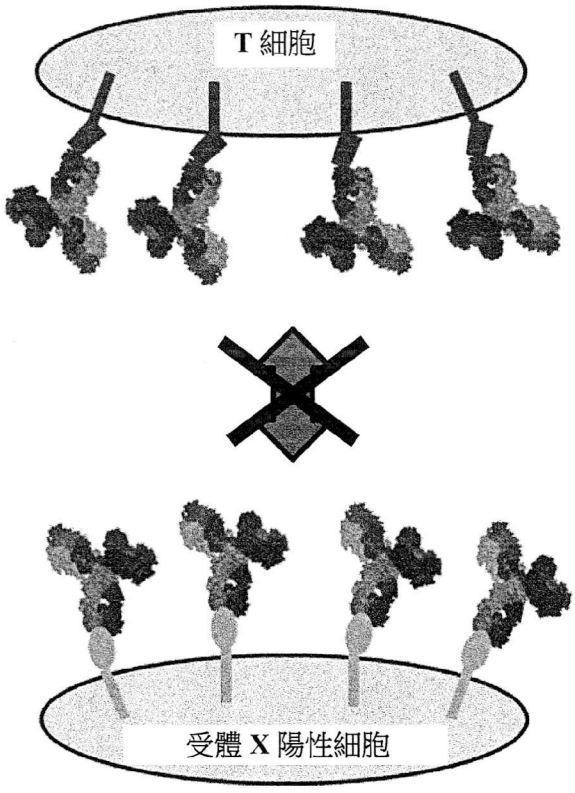
(c) 從該步驟(b)回收之抗原結合分子之集團選擇包括不同時和第 1 抗原與該第 2 抗原結合之可變區之抗原結合分子的步驟。

7. 如申請專利範圍第 6 項之抗原結合分子之製造方法，其中，該第 2 抗原為 FcγR、TLR、凝集素、IgA、免疫檢查點分子、TNF 超級家族分子、TNFR 超級家族分子或 NK 受體分子。

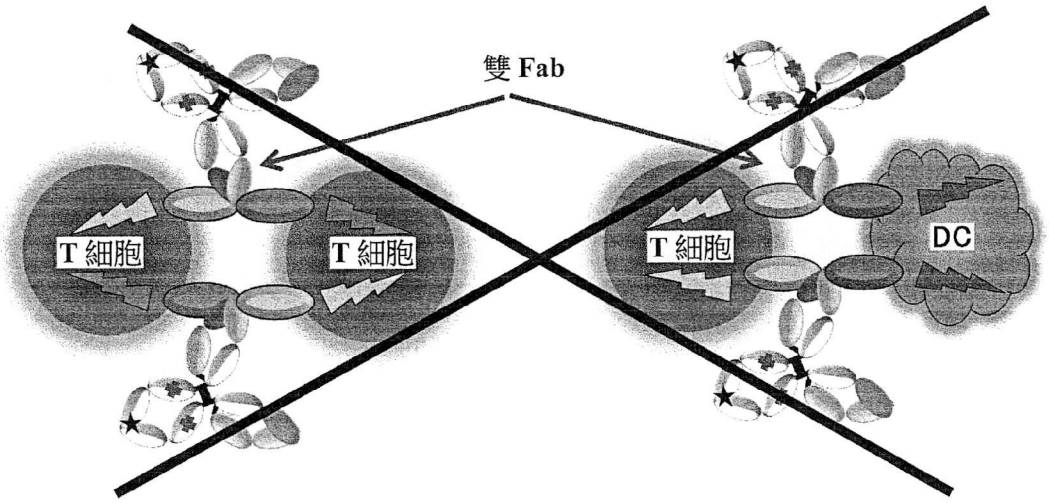
圖式



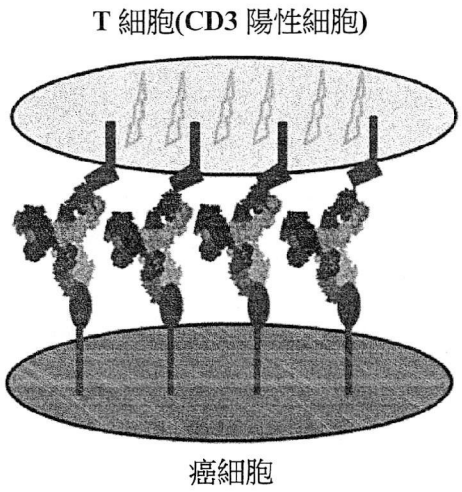
第 1 圖



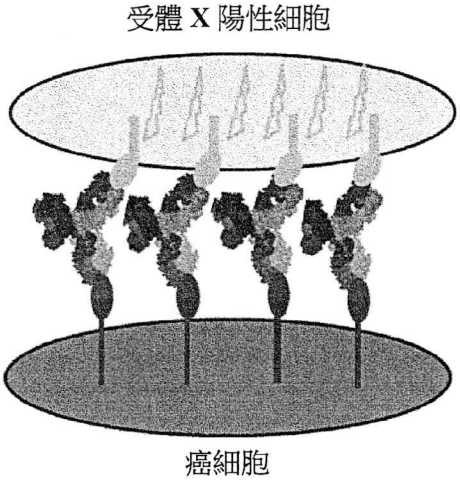
第 2 圖



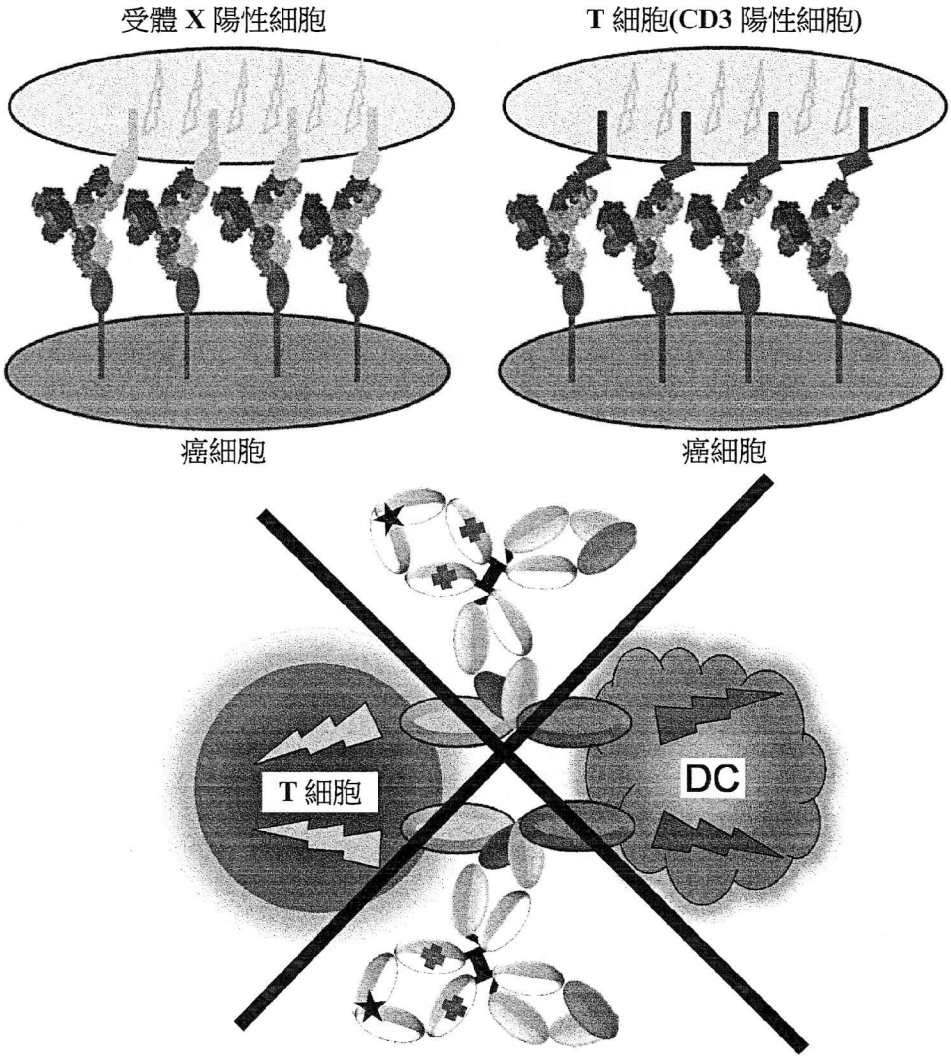
第 3 圖



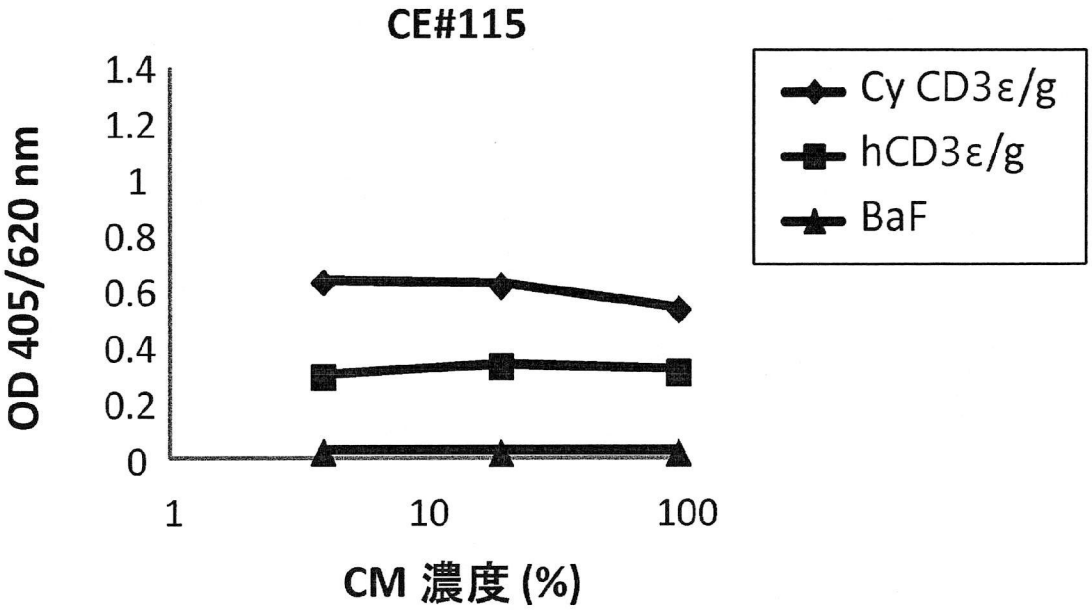
第 4 圖



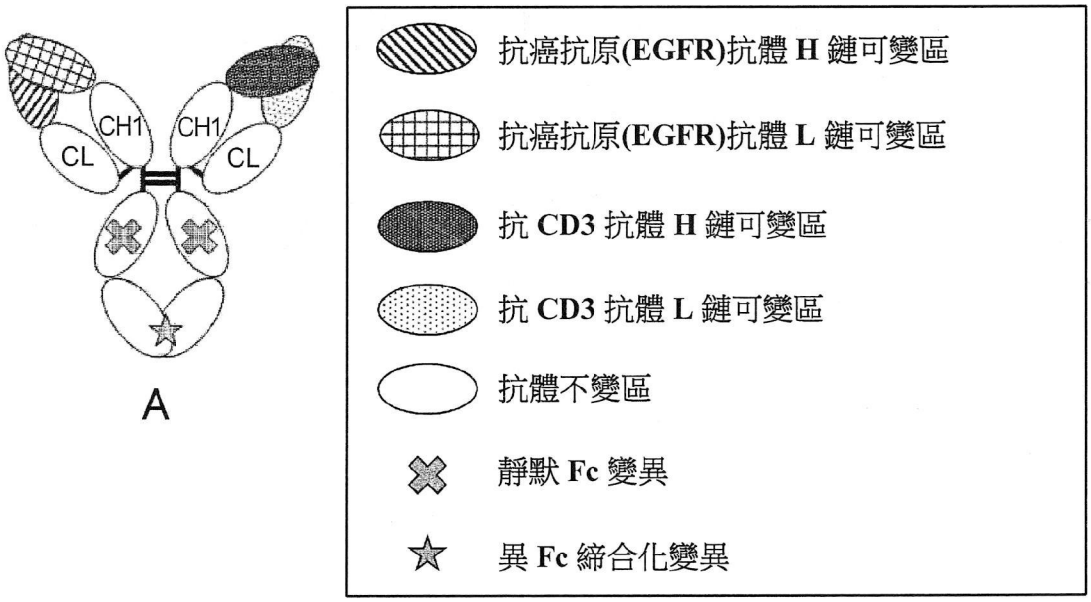
第 5 圖



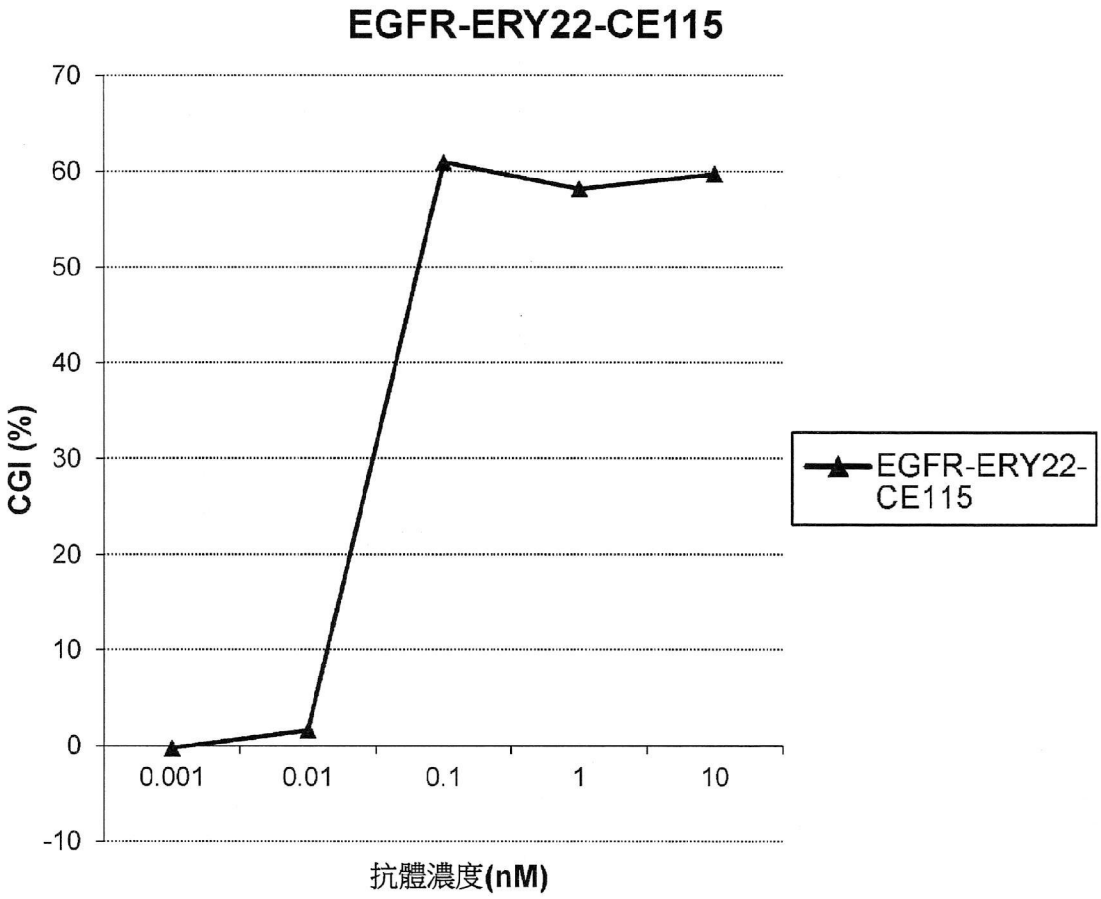
第 6 圖


CE#115
OD 405/620 nm
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
1
10
100
CM 濃度 (%)
Cy CD3ε/g
hCD3ε/g
BaF

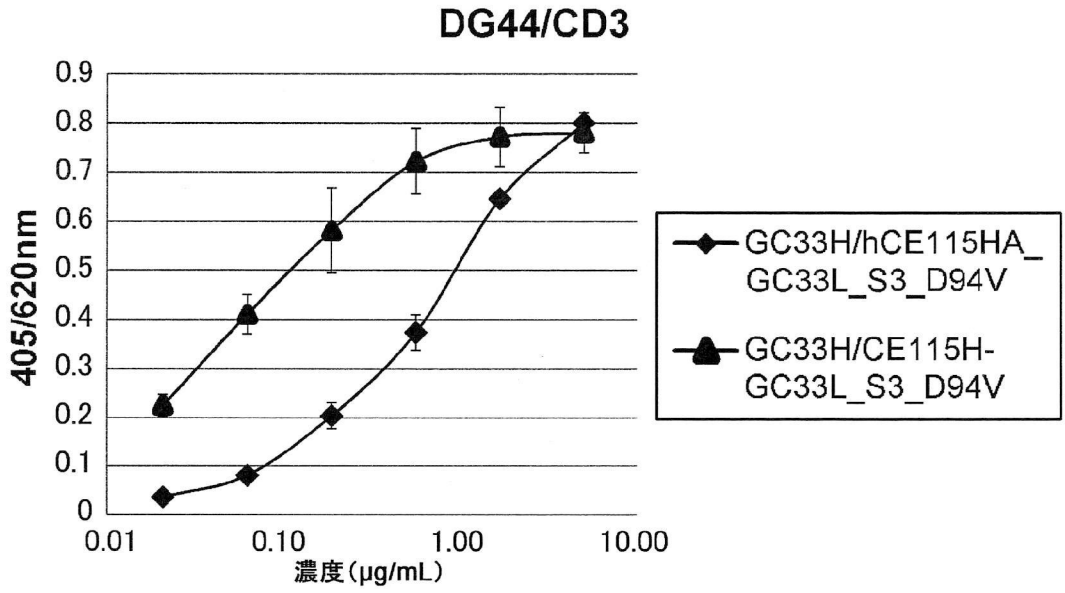
第 7 圖


CH1
CH1
CL
CL
A
抗癌抗原(EGFR)抗體 H 鏈可變區
抗癌抗原(EGFR)抗體 L 鏈可變區
抗 CD3 抗體 H 鏈可變區
抗 CD3 抗體 L 鏈可變區
抗體不變區
靜默 Fc 變異
異 Fc 締合化變異

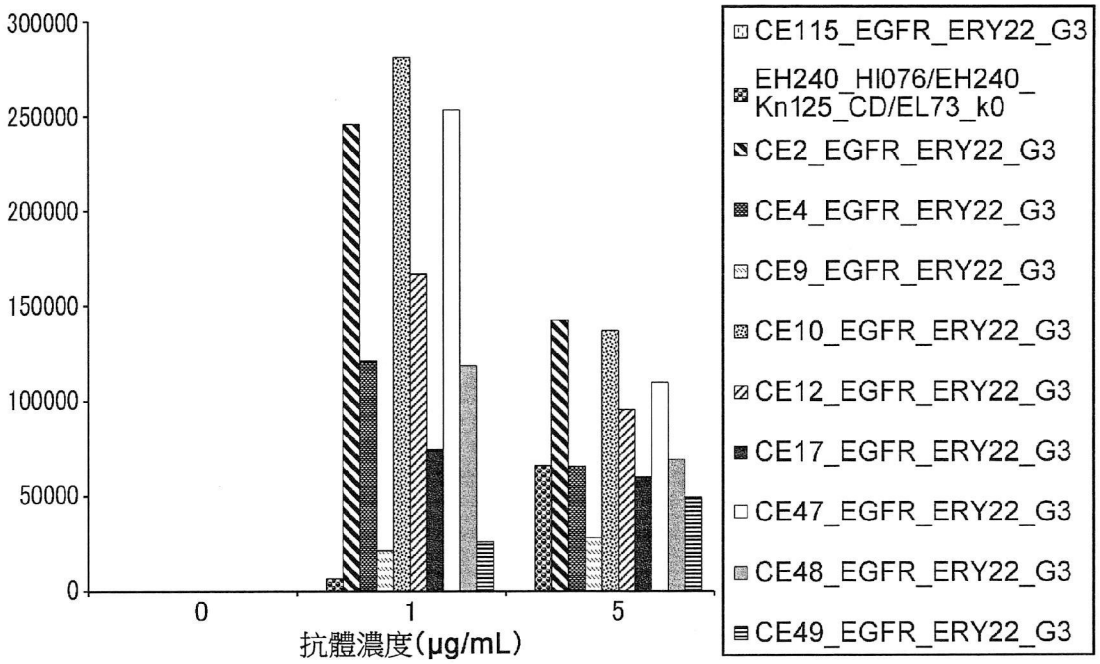
第 8 圖


EGFR-ERY22-CE115
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
CGI (%)
0.001
0.01
0.1
1
10
抗體濃度(nM)
EGFR-ERY22-CE115

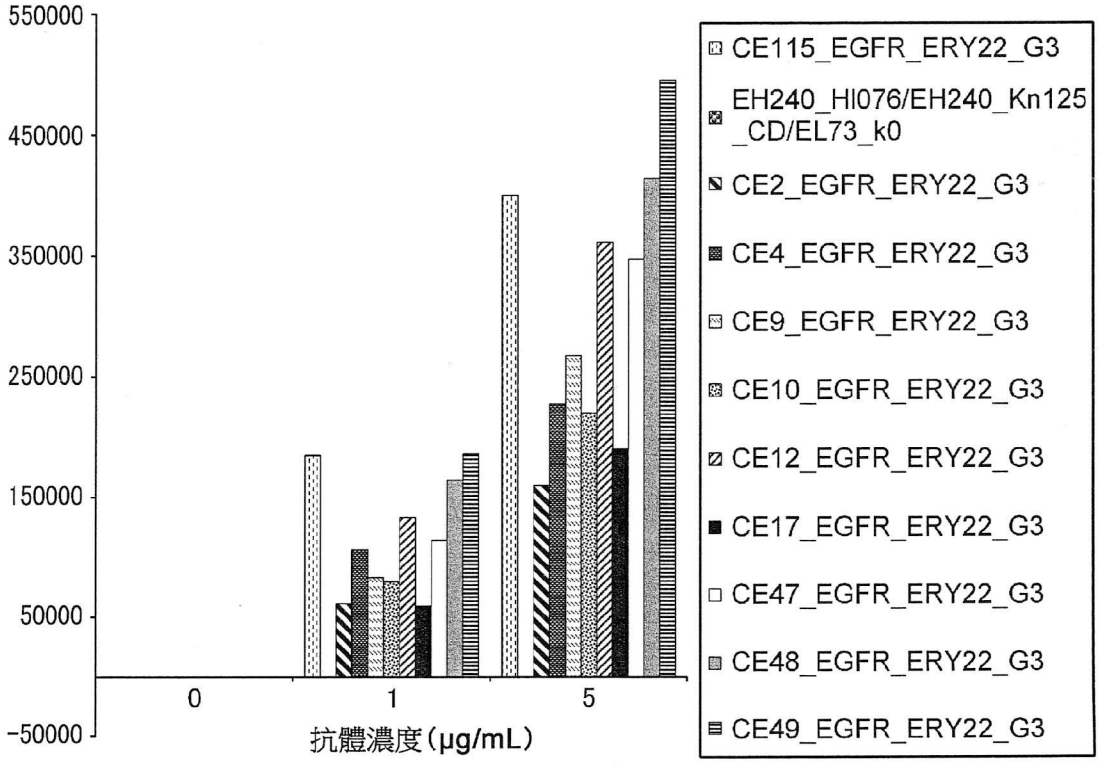
第 9 圖


DG44/CD3
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
405/620nm
0.01
0.10
1.00
10.00
濃度(μg/mL)
GC33H/hCE115HA_GC33L_S3_D94V
GC33H/CE115H-GC33L_S3_D94V

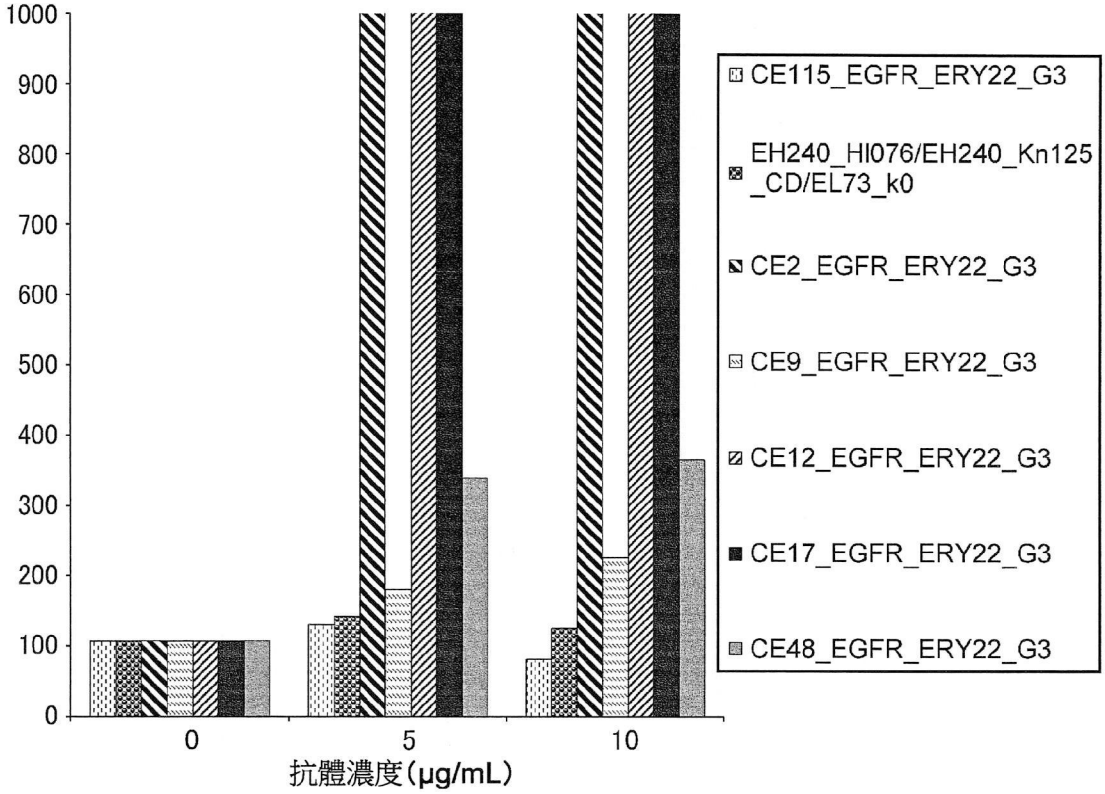
第 10 圖


300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
0
1
5
抗體濃度(μg/mL)
CE115_EGFR_ERY22_G3
EH240_HI076/EH240_Kn125_CD/EL73_k0
CE2_EGFR_ERY22_G3
CE4_EGFR_ERY22_G3
CE9_EGFR_ERY22_G3
CE10_EGFR_ERY22_G3
CE12_EGFR_ERY22_G3
CE17_EGFR_ERY22_G3
CE47_EGFR_ERY22_G3
CE48_EGFR_ERY22_G3
CE49_EGFR_ERY22_G3

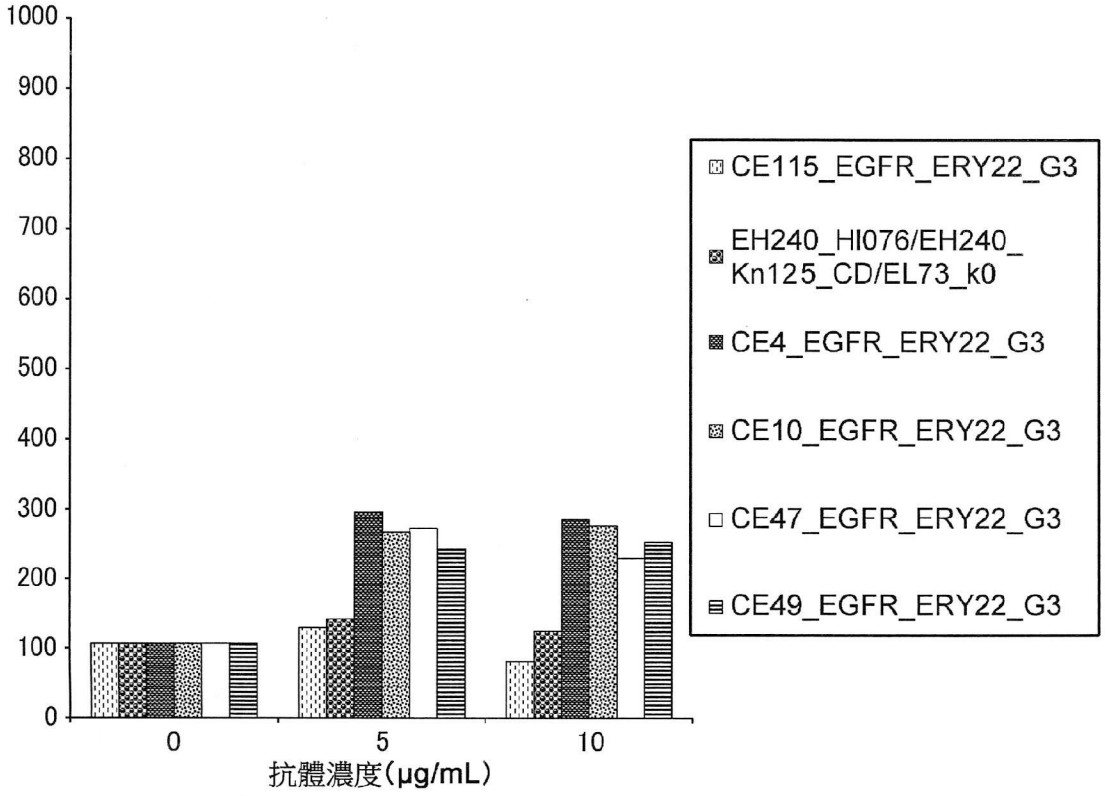
第 11 圖


550000
450000
350000
250000
150000
50000
-50000
0
1
5
抗體濃度(μg/mL)
CE115_EGFR_ERY22_G3
EH240_HI076/EH240_Kn125_CD/EL73_k0
CE2_EGFR_ERY22_G3
CE4_EGFR_ERY22_G3
CE9_EGFR_ERY22_G3
CE10_EGFR_ERY22_G3
CE12_EGFR_ERY22_G3
CE17_EGFR_ERY22_G3
CE47_EGFR_ERY22_G3
CE48_EGFR_ERY22_G3
CE49_EGFR_ERY22_G3

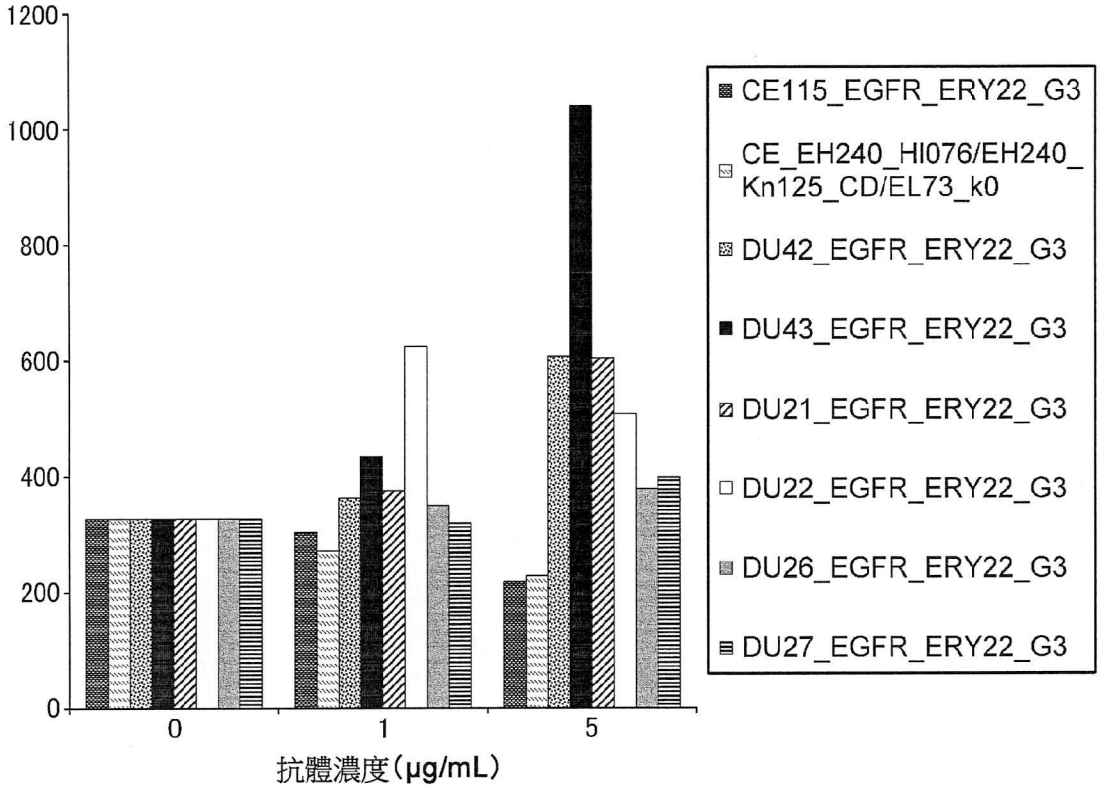
第 12 圖


1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
5
10
抗體濃度(μg/mL)
CE115_EGFR_ERY22_G3
EH240_HI076/EH240_Kn125_CD/EL73_k0
CE2_EGFR_ERY22_G3
CE9_EGFR_ERY22_G3
CE12_EGFR_ERY22_G3
CE17_EGFR_ERY22_G3
CE48_EGFR_ERY22_G3

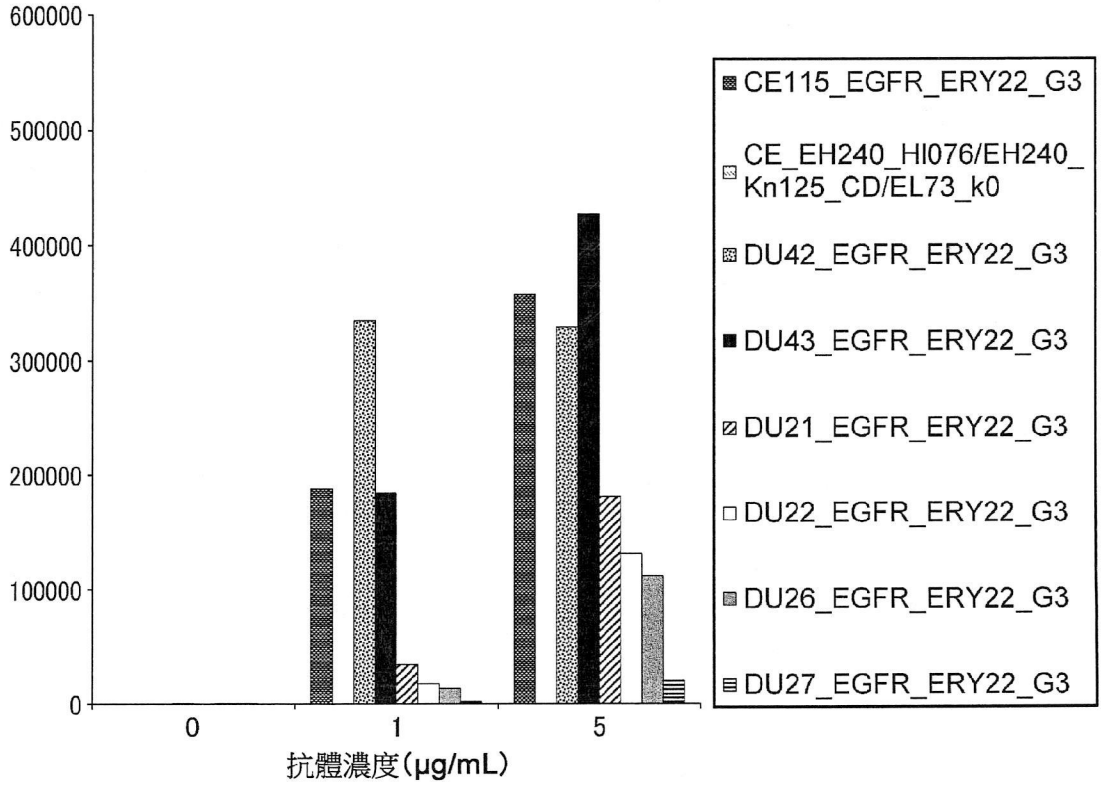
第 13 圖


1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
5
10
抗體濃度(μg/mL)
CE115_EGFR_ERY22_G3
EH240_HI076/EH240_Kn125_CD/EL73_k0
CE4_EGFR_ERY22_G3
CE10_EGFR_ERY22_G3
CE47_EGFR_ERY22_G3
CE49_EGFR_ERY22_G3

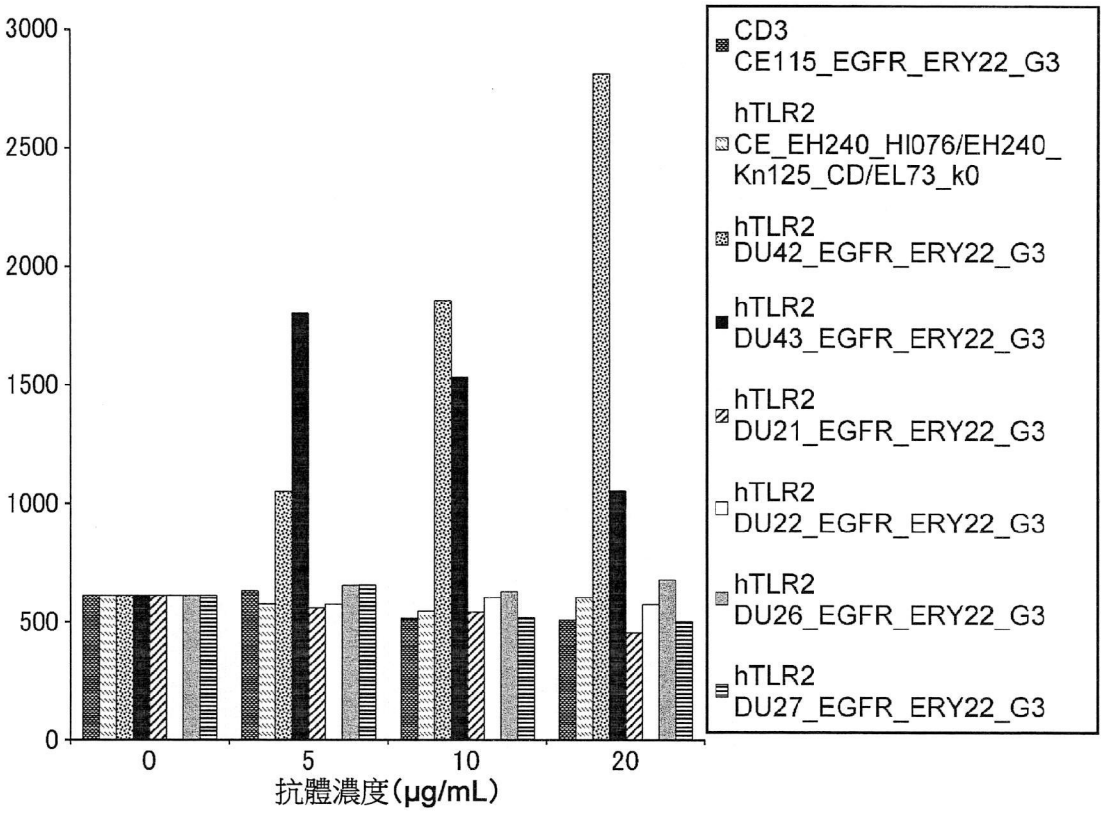
第 14 圖


1200
1000
800
600
400
200
0
0
1
5
抗體濃度(μg/mL)
CE115_EGFR_ERY22_G3
CE_EH240_HI076/EH240_Kn125_CD/EL73_k0
DU42_EGFR_ERY22_G3
DU43_EGFR_ERY22_G3
DU21_EGFR_ERY22_G3
DU22_EGFR_ERY22_G3
DU26_EGFR_ERY22_G3
DU27_EGFR_ERY22_G3

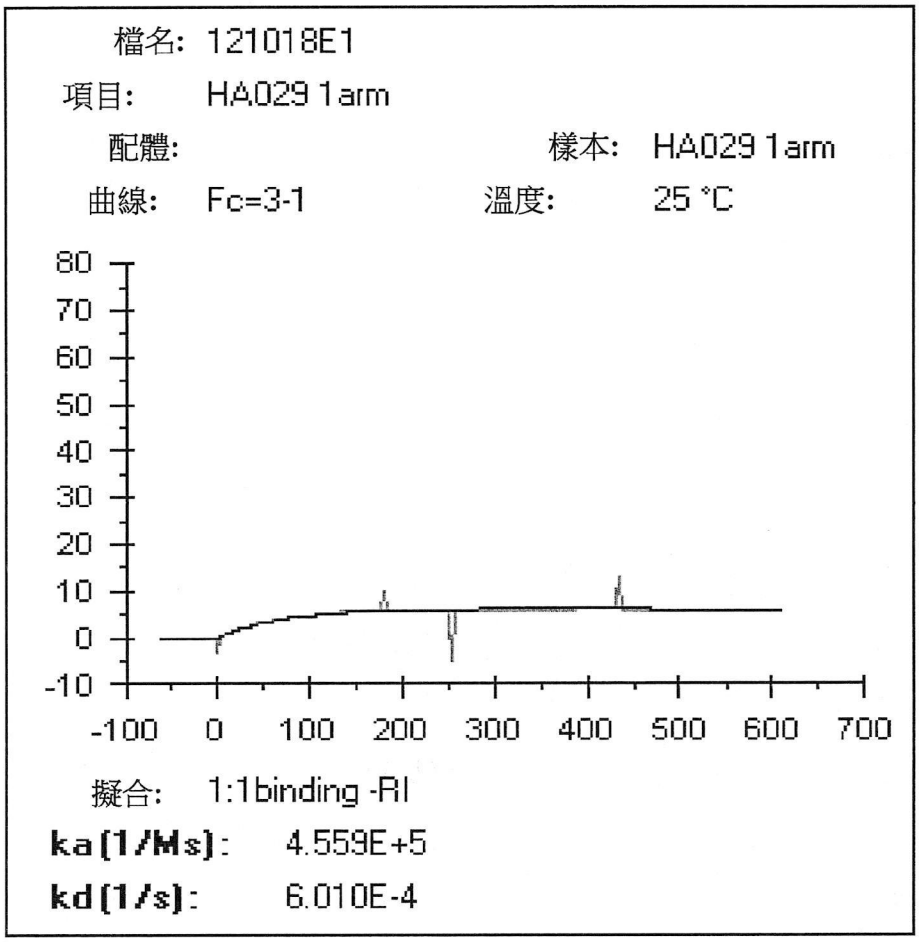
第 15 圖


600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
0
1
5
抗體濃度(μg/mL)
CE115_EGFR_ERY22_G3
CE_EH240_HI076/EH240_Kn125_CD/EL73_k0
DU42_EGFR_ERY22_G3
DU43_EGFR_ERY22_G3
DU21_EGFR_ERY22_G3
DU22_EGFR_ERY22_G3
DU26_EGFR_ERY22_G3
DU27_EGFR_ERY22_G3

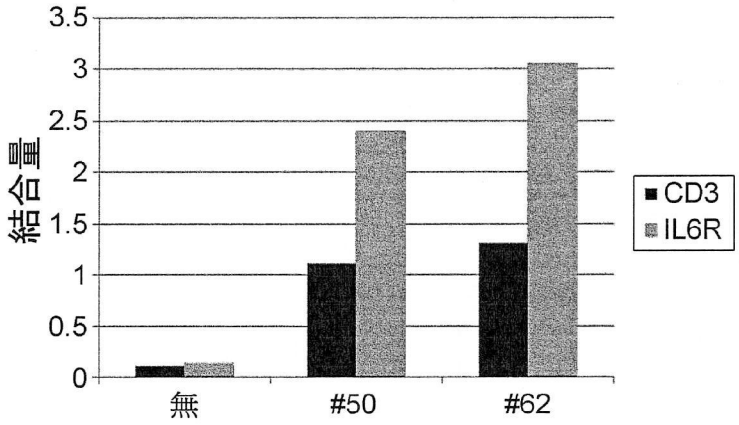
第 16 圖


3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
20
抗體濃度(μg/mL)
CD3
CE115_EGFR_ERY22_G3
hTLR2
CE_EH240_HI076/EH240_
Kn125_CD/EL73_k0
hTLR2
DU42_EGFR_ERY22_G3
hTLR2
DU43_EGFR_ERY22_G3
hTLR2
DU21_EGFR_ERY22_G3
hTLR2
DU22_EGFR_ERY22_G3
hTLR2
DU26_EGFR_ERY22_G3
hTLR2
DU27_EGFR_ERY22_G3

第 17 圖


檔名: 121018E1
項目: HA029 1arm
配體:
樣本: HA029 1arm
曲線: Fc=3-1
溫度: 25 °C
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
-100
0
100
200
300
400
500
600
700
擬合: 1:1binding -RI
ka(1/Ms): 4.559E+5
kd(1/s): 6.010E-4

第 18 圖


3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
結合量
CD3
IL6R
無
#50
#62

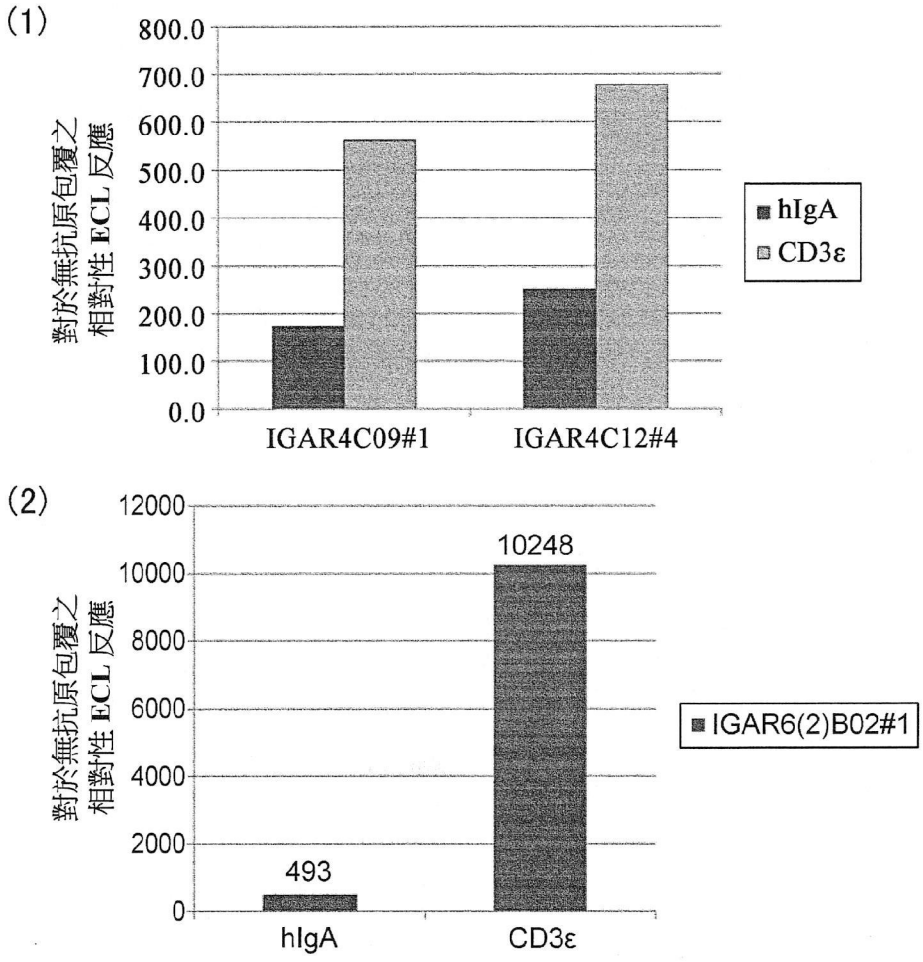
第 19 圖

hIADHB2b-4

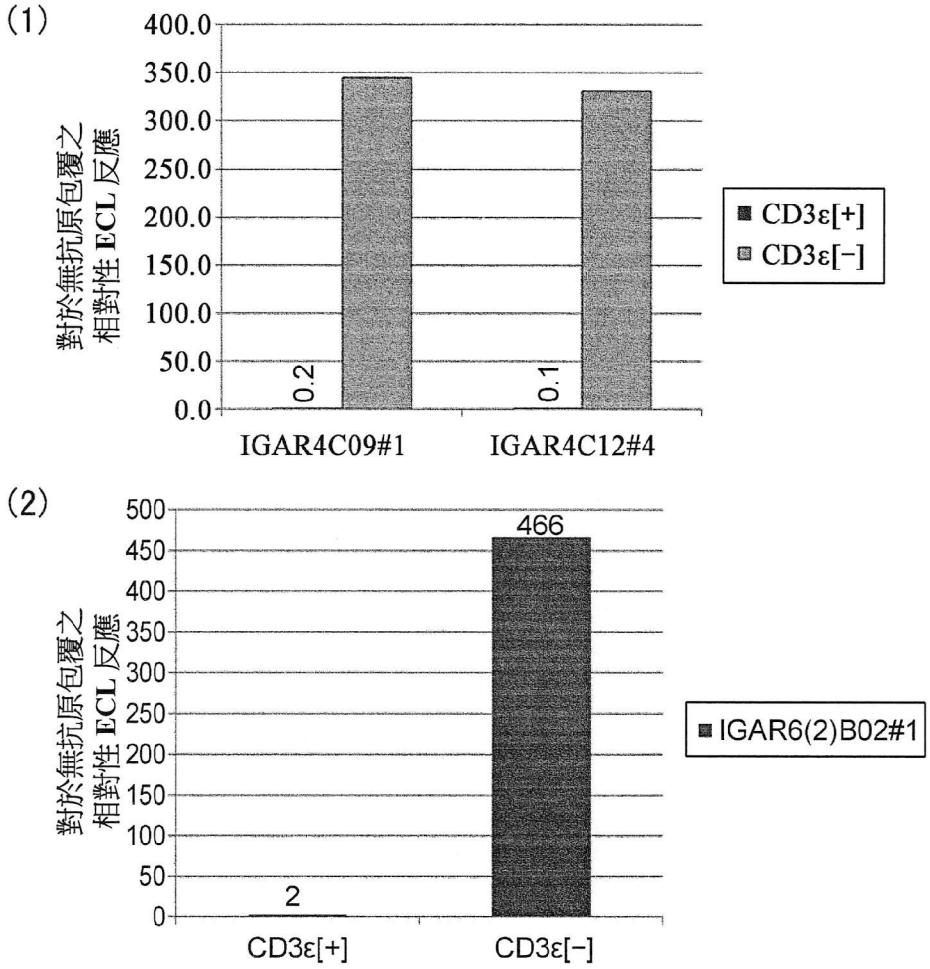
#	ELISA 之值(450nm 吸光度)			與 NC 之比	
	hIgA	CD3	NC	hIgA之 S/N	CD3之 S/N
1	0.069	0.049	0.065	1.1	0.8
2	0.064	0.053	0.061	1.0	0.9
3	0.058	0.057	0.056	1.0	1.0
4	0.066	0.053	0.064	1.0	0.8
5	0.067	0.061	0.065	1.0	0.9
6	0.102	0.545	0.056	1.8	**9.7**
7	0.110	0.624	0.054	**2.0**	**11.6**
8	0.077	0.075	0.077	1.0	1.0
9	0.123	0.806	0.052	**2.4**	**15.5**
10	0.051	0.372	0.051	1.0	**7.3**
11	0.056	0.055	0.053	1.1	1.0
12	0.054	0.053	0.052	1.0	1.0
13	0.056	0.052	0.056	1.0	0.9
14	0.063	0.059	0.062	1.0	1.0
15	0.069	0.060	0.062	1.1	1.0
16	0.066	0.062	0.063	1.0	1.0
17	0.067	0.057	0.061	1.1	0.9
18	0.061	0.055	0.057	1.1	1.0
19	0.067	0.060	0.067	1.0	0.9
20	0.058	0.526	0.057	1.0	**9.2**
21	0.059	0.051	0.054	1.1	0.9
22	0.064	0.059	0.061	1.0	1.0
23	0.067	0.063	0.069	1.0	0.9
24	0.065	0.062	0.062	1.0	1.0
25	0.068	0.056	0.062	1.1	0.9
26	0.055	0.051	0.053	1.0	1.0
27	0.061	0.061	0.060	1.0	1.0
28	0.065	0.063	0.063	1.0	1.0
29	0.065	0.061	0.063	1.0	1.0
30	0.067	0.060	0.062	1.1	1.0
31	0.066	0.060	0.064	1.0	0.9
32	0.071	0.070	0.067	1.1	1.0
33	0.071	0.061	0.063	1.1	1.0
34	0.053	0.063	0.052	1.0	1.2
35	0.051	0.049	0.048	1.1	1.0
36	0.121	0.794	0.049	**2.5**	**16.2**
37	0.050	0.346	0.049	1.0	**7.1**
38	0.071	0.061	0.060	1.2	1.0
39	0.063	0.059	0.061	1.0	1.0
40	0.069	0.067	0.067	1.0	1.0
41	0.075	0.067	0.071	1.1	0.9
42	0.051	0.391	0.048	1.1	**8.1**
43	0.121	0.820	0.048	**2.5**	**17.1**
44	0.126	0.816	0.053	**2.4**	**15.4**
45	0.054	0.050	0.052	1.0	1.0
46	0.067	0.063	0.063	1.1	1.0
47	0.054	0.051	0.053	1.0	1.0
48	0.083	0.081	0.092	0.9	0.9

#	ELISA 之值(450nm 吸光度)			與 NC 之比	
	hIgA	CD3	NC	hIgA之 S/N	CD3之 S/N
49	0.062	0.055	0.061	1.0	0.9
50	0.106	0.807	0.048	**2.2**	**16.8**
51	0.061	0.059	0.059	1.0	1.0
52	0.063	0.060	0.060	1.1	1.0
53	0.063	0.061	0.061	1.0	1.0
54	0.070	0.063	0.064	1.1	1.0
55	0.122	0.821	0.049	**2.5**	**16.8**
56	0.126	0.889	0.052	**2.4**	**17.1**
57	0.060	0.050	0.053	1.1	0.9
58	0.052	0.048	0.050	1.0	1.0
59	0.068	0.064	0.067	1.0	1.0
60	0.062	0.070	0.055	1.1	1.3
61	0.063	0.061	0.061	1.0	1.0
62	0.065	0.062	0.061	1.1	1.0
63	0.134	0.832	0.050	**2.7**	**16.6**
64	0.061	0.058	0.055	1.1	1.1
65	0.075	0.067	0.074	1.0	0.9
66	0.063	0.057	0.060	1.1	1.0
67	0.083	0.672	0.050	1.7	**13.4**
68	0.064	0.060	0.063	1.0	1.0
69	0.055	0.050	0.053	1.0	0.9
70	0.069	0.071	0.070	1.0	1.0
71	0.053	0.050	0.053	1.0	0.9
72	0.059	0.056	0.055	1.1	1.0
73	0.102	0.785	0.051	2.0	**15.4**
74	0.060	0.055	0.058	1.0	0.9
75	0.061	0.057	0.059	1.0	1.0
76	0.061	0.058	0.058	1.1	1.0
77	0.063	0.062	0.069	0.9	0.9
78	0.054	0.073	0.049	1.1	1.5
79	0.143	0.844	0.054	**2.6**	**15.6**
80	0.068	0.068	0.063	1.1	1.1
81	0.059	0.056	0.058	1.0	1.0
82	0.061	0.056	0.059	1.0	0.9
83	0.064	0.059	0.059	1.1	1.0
84	0.068	0.060	0.064	1.1	0.9
85	0.065	0.061	0.064	1.0	1.0
86	0.058	0.051	0.052	1.1	1.0
87	0.055	0.052	0.052	1.1	1.0
88	0.062	0.060	0.056	1.1	1.1
89	0.067	0.131	0.061	1.1	**2.1**
90	0.065	0.060	0.058	1.1	1.0
91	0.133	0.826	0.049	**2.7**	**16.9**
92	0.080	0.087	0.083	1.0	1.0
93	0.060	0.054	0.053	1.1	1.0
94	0.076	0.069	0.068	1.1	1.0
95	0.088	0.089	0.082	1.1	1.1
96	0.076	0.069	0.071	1.1	1.0

第 20 圖


(1)
對於無抗原包覆之相對性 ECL 反應
800.0
700.0
600.0
500.0
400.0
300.0
200.0
100.0
0.0
IGAR4C09#1
IGAR4C12#4
hIgA
CD3ε
(2)
對於無抗原包覆之相對性 ECL 反應
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
10248
493
hIgA
CD3ε
IGAR6(2)B02#1

第 21 圖


(1)
對於無抗原包覆之相對性 ECL 反應
400.0
350.0
300.0
250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0.0
0.2
0.1
IGAR4C09#1
IGAR4C12#4
CD3ε[+]
CD3ε[−]
(2)
對於無抗原包覆之相對性 ECL 反應
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
466
2
CD3ε[+]
CD3ε[−]
IGAR6(2)B02#1

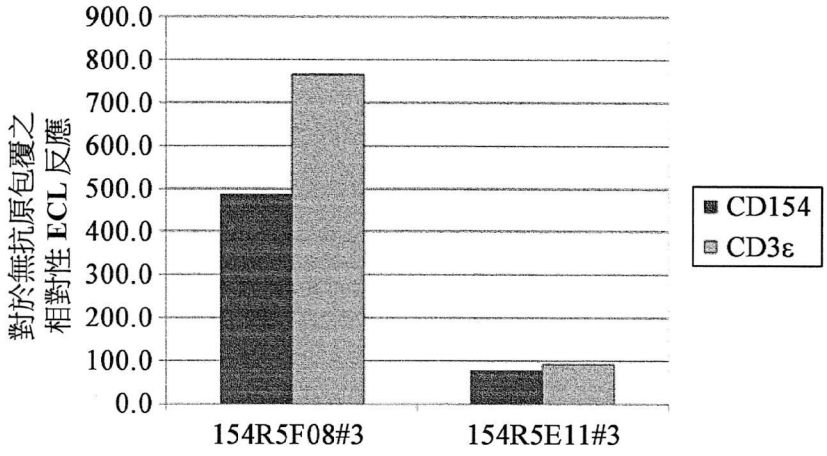
第 22 圖

154DHB2b-4

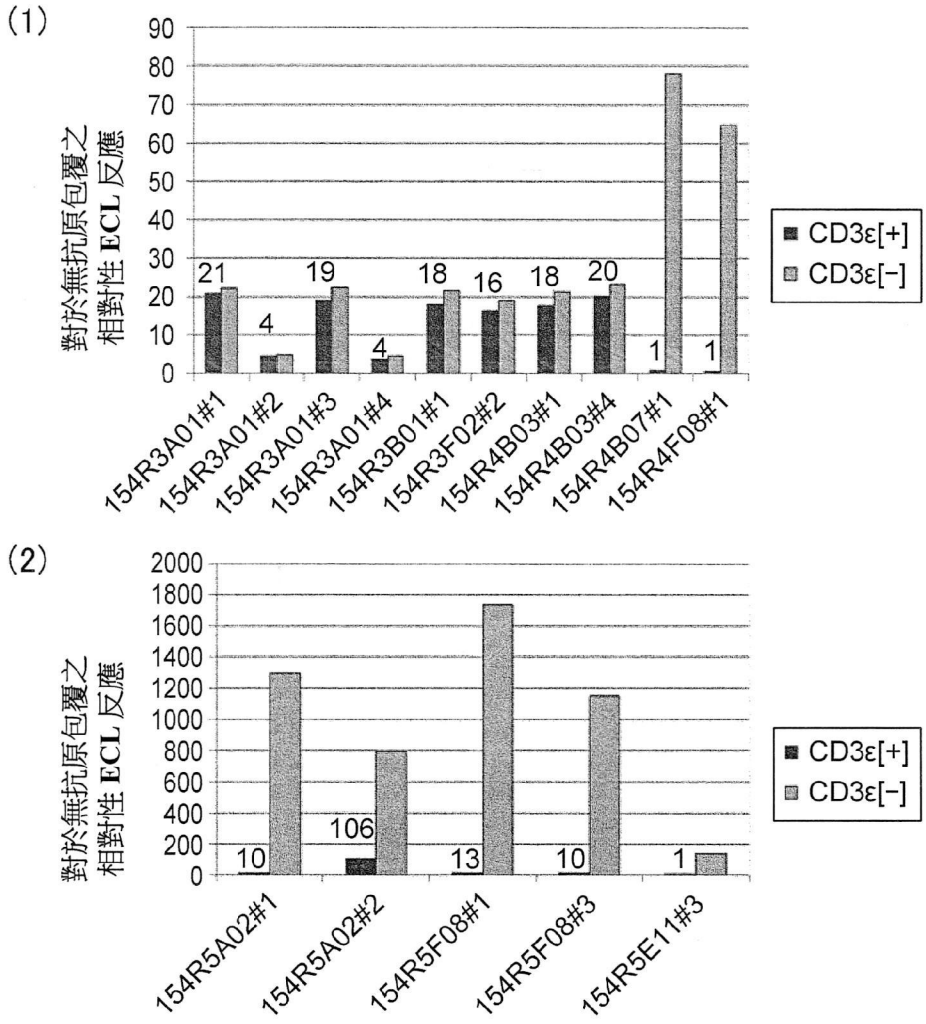
#	ELISA 之值(450nm 吸光度)			與 NC 之比	
	CD154	CD3	NC	CD154之 S/N	CD3之 S/N
1	0.077	0.061	0.062	1.2	1.0
2	0.060	0.114	0.050	1.2	**2.3**
3	0.053	0.048	0.050	1.1	1.0
4	0.048	0.045	0.049	1.0	0.9
5	0.053	0.050	0.057	0.9	0.9
6	0.057	0.052	0.054	1.1	1.0
7	0.086	0.075	0.079	1.1	0.9
8	0.060	0.059	0.059	1.0	1.0
9	0.053	0.062	0.060	0.9	1.0
10	0.048	0.047	0.048	1.0	1.0
11	0.049	0.062	0.052	0.9	1.2
12	0.059	0.047	0.047	1.3	1.0
13	0.058	0.292	0.052	1.1	**5.6**
14	0.059	0.110	0.059	1.0	1.9
15	0.053	0.053	0.058	0.9	0.9
16	0.061	0.117	0.064	1.0	1.8
17	0.064	0.058	0.058	1.1	1.0
18	0.163	0.255	0.083	2.0	**3.1**
19	0.054	0.067	0.059	0.9	1.1
20	0.057	0.179	0.049	1.2	**3.7**
21	0.051	0.051	0.053	1.0	1.0
22	0.050	0.680	0.054	0.9	**12.6**
23	0.058	0.094	0.063	0.9	1.5
24	0.059	0.234	0.061	1.0	**3.8**
25	0.056	0.050	0.051	1.1	1.0
26	0.050	0.057	0.049	1.0	1.2
27	0.046	0.046	0.048	1.0	1.0
28	0.054	0.169	0.051	1.1	**3.3**
29	0.049	0.183	0.047	1.0	**3.9**
30	0.051	0.052	0.050	1.0	1.0
31	0.045	0.045	0.046	1.0	1.0
32	0.051	0.050	0.053	1.0	0.9
33	0.073	0.125	0.074	1.0	1.7
34	0.052	0.050	0.053	1.0	0.9
35	0.067	0.121	0.072	0.9	1.7
36	0.055	0.648	0.053	1.0	**12.2**
37	0.051	0.381	0.053	1.0	**7.2**
38	0.050	0.047	0.051	1.0	0.9
39	0.051	0.047	0.051	1.0	0.9
40	0.072	0.104	0.070	1.0	1.5
41	0.052	0.051	0.051	1.0	1.0
42	0.054	0.055	0.058	0.9	0.9
43	0.052	0.086	0.052	1.0	1.7
44	0.061	0.050	0.055	1.1	0.9
45	0.049	0.047	0.048	1.0	1.0
46	0.043	0.043	0.046	0.9	0.9
47	0.056	0.217	0.058	1.0	**3.7**
48	0.073	0.115	0.073	1.0	1.6

#	ELISA 之值(450nm 吸光度)			與 NC 之比	
	CD154	CD3	NC	CD154之 S/N	CD3之 S/N
49	0.069	0.210	0.066	1.0	**3.2**
50	0.110	0.751	0.049	**2.2**	**15.3**
51	0.046	0.044	0.049	0.9	0.9
52	0.050	0.178	0.052	1.0	**3.4**
53	0.050	0.048	0.059	0.8	0.8
54	0.063	0.057	0.064	1.0	0.9
55	0.053	0.975	0.054	1.0	**18.1**
56	0.056	0.057	0.061	0.9	0.9
57	0.050	0.052	0.049	1.0	1.1
58	0.050	0.045	0.049	1.0	0.9
59	0.062	0.067	0.059	1.1	1.1
60	0.060	0.067	0.052	1.2	1.3
61	0.057	0.065	0.058	1.0	1.1
62	0.109	0.749	0.052	**2.1**	**14.4**
63	0.062	0.068	0.069	0.9	1.0
64	0.049	0.052	0.051	1.0	1.0
65	0.065	0.059	0.059	1.1	1.0
66	0.054	0.055	0.058	0.9	0.9
67	0.049	0.045	0.048	1.0	0.9
68	0.065	0.175	0.064	1.0	**2.7**
69	0.055	0.052	0.057	1.0	0.9
70	0.047	0.046	0.048	1.0	1.0
71	0.059	0.058	0.061	1.0	1.0
72	0.057	0.090	0.059	1.0	1.5
73	0.059	0.077	0.057	1.0	1.4
74	0.052	0.192	0.057	0.9	**3.4**
75	0.059	0.130	0.071	0.8	1.8
76	0.055	0.046	0.048	1.1	1.0
77	0.049	0.054	0.050	1.0	1.1
78	0.054	0.052	0.054	1.0	1.0
79	0.054	0.056	0.054	1.0	1.0
80	0.125	0.816	0.057	**2.2**	**14.3**
81	0.048	0.046	0.049	1.0	0.9
82	0.052	0.056	0.051	1.0	1.1
83	0.053	0.410	0.054	1.0	**7.6**
84	0.065	0.057	0.064	1.0	0.9
85	0.054	0.048	0.053	1.0	0.9
86	0.053	0.102	0.056	0.9	1.8
87	0.051	0.050	0.054	0.9	0.9
88	0.054	0.054	0.053	1.0	1.0
89	0.065	0.087	0.070	0.9	1.2
90	0.047	0.072	0.051	0.9	1.4
91	0.062	0.047	0.052	1.2	0.9
92	0.052	0.052	0.052	1.0	1.0
93	0.048	0.047	0.048	1.0	1.0
94	0.056	0.803	0.058	1.0	**13.8**
95	0.059	0.183	0.058	1.0	**3.2**
96	0.074	0.069	0.067	1.1	1.0

第 23 圖


900.0
800.0
700.0
600.0
500.0
400.0
300.0
200.0
100.0
0.0
對於無抗原包覆之相對性 ECL 反應
CD154
CD3ε
154R5F08#3
154R5E11#3

第 24 圖


(1)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
對於無抗原包覆之相對性 ECL 反應
CD3ε[+]
CD3ε[−]
21
4
19
4
18
16
18
20
1
1
154R3A01#1
154R3A01#2
154R3A01#3
154R3A01#4
154R3B01#1
154R3F02#2
154R4B03#1
154R4B03#4
154R4B07#1
154R4F08#1
(2)
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
對於無抗原包覆之相對性 ECL 反應
CD3ε[+]
CD3ε[−]
10
106
13
10
1
154R5A02#1
154R5A02#2
154R5F08#1
154R5F08#3
154R5E11#3

第 25 圖