200911831

發明專利說明書

（本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫）

※ 申請案號：97121268 C07K 16/22 (2006.01)

※ 申請日期：97.6.6 ※IPC 分類：~~C07K;A61K~~ A61K 39/395 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

一、發明名稱：（中文/英文）

多肽、抗體可變區域及拮抗劑

POLYPEPTIDES, ANTIBODY VARIABLE DOMAINS & ANTAGONISTS

二、申 請 人：（共 1 人）

姓名或名稱：（中文/英文）

英商多曼提斯有限公司

DOMANTIS LIMITED

代表人：（中文/英文）

彼得　約翰　吉丁斯

GIDDINGS, PETER JOHN

住居所或營業所地址：（中文/英文）

英國米德塞斯郡布蘭德福市偉西路980號

980 GREAT WEST ROAD, BRENTFORD, MIDDLESEX, TW8 9GS, UNITED KINGDOM

國　籍：（中文/英文）

英國　U.K.

三、發明人：（共 6 人）

姓　名：（中文/英文）

1. 麥可　史都華
   STEWARD, MICHAEL
2. 李爾　迪諾克　巴圖汪加拉
   BATUWANGALA, THIL DINUK
3. 羅倫　史蒂芬　安　泰瑞莎　賈斯柏
   JESPERS, LAURENT STEPHANE ANNE THERESE
4. 瑪歌札塔　普佩卡
   PUPECKA, MALGORZATA
5. 伊恩　湯林森
   TOMLINSON, IAN
6. 卡洛琳　艾諾瓦
   ENEVER, CAROLYN

國　籍：（中文/英文）

1. 英國　U.K.
2. 英國　U.K.
3. 比利時　BELGIUM
4. 波蘭　POLAND
5. 英國　U.K.
6. 英國　U.K.

四、聲明事項：

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

☑ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號　順序註記】

☑ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國；2007年06月06日；60/933,632

2. 英國；2007年12月13日；0724331.4

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號　順序註記】

☑ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料　【格式請依：寄存機構、日期、號碼　順序註記】

國外生物材料　【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼　順序註記】

☑ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於蛋白酶抗性多肽、免疫球蛋白(抗體)單一可變區域及包含其之血管內皮生長因子(VEGF)拮抗劑。本發明進一步係關於包含該等抗VEGF配位體之用途、調配物、組合物及裝置。

【先前技術】

多肽及肽已在多種應用中成為越來越重要之藥劑，包括工業應用及作為醫藥劑、治療劑及診斷劑之用途。然而，在諸如癌症及發炎狀態(例如，COPD)之特定生理狀態中，組織、器官或動物中(例如，肺中、腫瘤中或腫瘤附近)所存在之蛋白酶量會增加。該蛋白酶增加會導致內源性蛋白質及投與以治療疾病之治療肽、多肽及蛋白質加速降解及失活。因此，一些具有活體內使用(例如，用於治療、診斷或預防疾病)之潛力之藥劑僅具有有限的功效，因為其會被蛋白酶快速降解且失活。

蛋白酶抗性多肽提供數個優點。舉例而言，蛋白酶抗性多肽在活體內保留活性之時間比蛋白酶敏感劑長，且因此保留功能歷時足以產生生物效應之時間。亦對選擇抗蛋白酶降解且亦具有想要之生物活性之多肽的改良方法存在需要。

VEGF：

VEGF為歸因於初級轉錄物之替代性拼接而以數種替代形式存在之分泌型肝素結合同元二聚醣蛋白(Leung等人，

1989, Science 246: 1306)。歸因於VEGF誘導發炎中重要的過程即血管滲漏之能力其亦稱為血管滲透因子(VPF)。

促使腫瘤形成、轉移及復發之重要生理病原性過程為腫瘤血管生成。該過程藉由加工由腫瘤表現之血管生成因子(諸如VEGF)來介導，該血管生成因子誘導向腫瘤傳遞營養物之血管形成。因此，治療某些癌症之方法在於抑制由VEGF介導之腫瘤血管生成，從而使腫瘤餓死。AVASTIN(貝伐株單抗(bevacizumab)；Genetech, Inc.)為已獲批用於治療結腸直腸癌之結合人類VEGF之人化抗體。據報導，稱為抗體2C3(ATCC寄存編號PTA 1595)之抗體結合VEGF且抑制VEGF與表皮生長因子受體2之結合。

用當前可用之治療劑靶向VEGF並非在所有患者中或對所有癌症均有效。因此，對治療癌症及由VEGF介導之其他病理學病狀、例如血管增生性疾病(例如年齡相關黃斑退化(AMD))之改良藥劑存在需要。

VEGF亦牽涉發炎病症及自體免疫疾病。舉例而言，在RA患者之滑液組織中鑑別出VEGF突出VEGF在RA病理學中之潛在作用(Fava等人，1994, J. Exp. Med. 180: 341: 346；Nagashima等人，1995, J. Rheumatol. 22: 1624-1630)。在鼠類膠原誘導之關節炎(CIA)模型中投與抗VEGF抗體之研究後，VEGF在RA之病理學中之作用得到確認。在該等研究中，關節中之VEGF表現在誘導疾病後增加且投與抗VEGF抗血清可阻斷關節炎疾病之發展且改善所建立之疾病(Sone等人，2001, Biochem. Biophys. Res.

Comm. 281: 562-568；Lu等人，2000, J. Immunol. 164: 5922-5927)。

因此，靶向VEGF亦可有益於治療RA及其他病狀，例如與發炎及/或自體免疫疾病相關之病狀。

【發明內容】

在一態樣中，本發明提供一種多肽，其包含與DOM15-26-593之胺基酸序列(展示於圖5中)至少97%一致之胺基酸序列。在一實施例中，一致性%為至少98或99%。在一實施例中，該多肽為DOM15-26-593。本發明進一步提供一種(大體上)純之DOM15-26-593單體。在一實施例中，DOM15-26-593為至少98、99、99.5%純或100%純之單體。

在一態樣中，本發明提供一種多肽(例如，具有蛋白酶抗性)且該多肽係由與DOM15-26-593之胺基酸序列(展示於圖5中)至少80%一致之胺基酸序列編碼。在一實施例中，一致性%為至少70、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%。在一實施例中，該蛋白酶抗性多肽可由本文中關於分離蛋白酶抗性多肽所述之方法獲得。

在一態樣中，本發明提供一種多肽，其係由與DOM15-26-593之核苷酸序列之核苷酸序列至少55%一致之胺基酸序列編碼且其中該多肽包含與DOM15-26-593之胺基酸序列至少97%一致之胺基酸序列。在一實施例中，核苷酸序列之一致性%為至少60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%。在一實施例中，胺

基酸序列之一致性%為至少98或99%或100%。舉例而言，核苷酸序列可為DOM15-26-593之核苷酸序列之密碼子優化形式。此項技術已知序列之密碼子優化。在一實施例中，核苷酸序列係經優化從而表現於細菌(例如，大腸桿菌(E. coli)或假單胞菌屬(Pseudomonas)，例如螢光假單胞菌(P. fluorescens))、哺乳動物(例如，CHO)或酵母宿主細胞(例如，酵母屬(Pichia)或植酵母屬(Saccharomyces)，例如馬斯德畢赤酵母(P. pastoris)或釀酒酵母(S. cerevisiae))中。

在一態樣中，本發明提供一種包含本發明之多肽之融合蛋白。

在一態樣中，本發明提供一種抗VEGF免疫球蛋白單一可變區域，其包含與DOM15-26-593之胺基酸序列至少97%一致之胺基酸序列。在一實施例中，一致性%為至少98或99%。

在一實施例中，免疫球蛋白單一可變區域在位置6處包含纈胺酸，其中編號係根據Kabat("Sequences of Proteins of Immunological Interest", US Department of Health and Human Services 1991)。

在一實施例中，免疫球蛋白單一可變區域在位置99處包含白胺酸，其中編號係根據Kabat。

在一實施例中，免疫球蛋白單一可變區域在位置30處包含離胺酸，其中編號係根據Kabat。

在一態樣中，本發明提供一種抗VEGF免疫球蛋白單一

可變區域，其包含與DOM15-26-593之胺基酸序列一致之胺基酸序列。

在一態樣中，本發明提供一種抗VEGF免疫球蛋白單一可變區域，其係由與DOM15-26-593之核苷酸序列至少80%一致之核苷酸序列編碼。在一實施例中，一致性%為至少70、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%。

在一態樣中，本發明提供一種抗VEGF免疫球蛋白單一可變區域，其係由與DOM15-26-593之核苷酸序列至少55%一致之核苷酸序列編碼且其中該可變區域包含與DOM15-26-593之胺基酸序列至少97%一致之胺基酸序列。在一實施例中，核苷酸序列之一致性%為至少60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%。在一實施例中，胺基酸序列之一致性%為至少98或99%或100%。舉例而言，核苷酸序列可為DOM15-26-593之核苷酸序列之密碼子優化形式。此項技術中已知序列之密碼子優化。在一實施例中，核苷酸序列係經優化從而表現於細菌(例如，大腸桿菌或假單胞菌屬，例如螢光假單胞菌)、哺乳動物(例如，CHO)或酵母宿主細胞(例如，酵母屬或植酵母屬，例如馬斯德畢赤酵母或釀酒酵母)中。

在一態樣中，本發明提供一種抗VEGF免疫球蛋白單一可變區域，其係由與DOM15-26-593之核苷酸序列一致之序列編碼。

在一態樣中，本發明提供一種抗VEGF拮抗劑，其包含

本發明之抗VEGF免疫球蛋白單一可變區域。在一實施例中，該拮抗劑包含第一及第二免疫球蛋白單一可變區域，其中各可變區域係根據發明。舉例而言，其中該拮抗劑包含該單一可變區域之單體或該單一可變區域之同元二聚體。在一實施例中，該單一可變區域或各單一可變區域之胺基酸序列與DOM15-26-593之胺基酸序列一致。

在一態樣中，本發明提供一種抗VEGF免疫球蛋白單一可變區域，其包含與DOM15-26-593之胺基酸序列一致或在不超過14個胺基酸位置處與DOM15-26-593之胺基酸序列不同且具有與DOM15-26-593之CDR1序列至少50%一致之CDR1序列的胺基酸序列。在一實施例中，不同之處不超過13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1個胺基酸位置。在一實施例中，CDR序列一致性為至少55、60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98或99%。

在一態樣中，本發明提供一種抗VEGF免疫球蛋白單一可變區域，其包含與DOM15-26-593之胺基酸序列一致或在不超過14個胺基酸位置處與DOM15-26-593之胺基酸序列不同且具有與DOM15-26-593之CDR2序列至少50%一致之CDR2序列的胺基酸序列。在一實施例中，不同之處不超過13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1個胺基酸位置。在一實施例中，CDR序列一致性為至少55、60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98或99%。

在一態樣中，本發明提供一種抗VEGF免疫球蛋白單一可變區域，其包含與DOM15-26-593之胺基酸序列一致或

在不超過14個胺基酸位置處與DOM15-26-593之胺基酸序列不同且具有與DOM15-26-593之CDR3序列至少50%一致之CDR3序列的胺基酸序列。在一實施例中，不同之處為不超過14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1個胺基酸位置。在一實施例中，CDR序列一致性為至少55、60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98或99%。

在一態樣中，本發明提供一種抗VEGF免疫球蛋白單一可變區域，其包含與DOM15-26-593之胺基酸序列一致或在不超過14個胺基酸位置處與DOM15-26-593之胺基酸序列不同且具有與DOM15-26-593之CDR1序列至少50%一致之CDR1序列且具有與DOM15-26-593之CDR2序列至少50%一致之CDR2序列的胺基酸序列。在一實施例中，不同之處不超過13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1個胺基酸位置。在一實施例中，一或兩個CDR序列一致性分別為至少55、60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98或99%。

在一態樣中，本發明提供一種抗VEGF免疫球蛋白單一可變區域，其包含與DOM15-26-593之胺基酸序列一致或在不超過14個胺基酸位置處與DOM15-26-593之胺基酸序列不同且具有與DOM15-26-593之CDR1序列至少50%一致之CDR1序列且具有與DOM15-26-593之CDR3序列至少50%一致之CDR3序列的胺基酸序列。在一實施例中，不同之處不超過13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1

個胺基酸位置。在一實施例中，一或兩個CDR序列一致性分別為至少55、60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98或99%。

在一態樣中，本發明提供一種抗VEGF免疫球蛋白單一可變區域，其包含與DOM15-26-593之胺基酸序列一致或在不超過14個胺基酸位置處與DOM15-26-593之胺基酸序列不同且具有與DOM15-26-593之CDR2序列至少50%一致之CDR2序列且具有與DOM15-26-593之CDR3序列至少50%一致之CDR3序列的胺基酸序列。在一實施例中，不同之處不超過13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1個胺基酸位置。在一實施例中，一或兩個CDR序列一致性分別為至少55、60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98或99%。

在一態樣中，本發明提供一種抗VEGF免疫球蛋白單一可變區域，其包含與DOM15-26-593之胺基酸序列一致或在不超過14個胺基酸位置處與DOM15-26-593之胺基酸序列不同且具有與DOM15-26-593之CDR1序列至少50%一致之CDR1序列且具有與DOM15-26-593之CDR2序列至少50%一致之CDR2序列且具有與DOM15-26-593之CDR3序列至少50%一致之CDR3序列的胺基酸序列。在一實施例中，不同之處不超過13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1個胺基酸位置。在一實施例中，一或兩個或各CDR序列一致性為至少55、60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98或99%。

在一態樣中，本發明提供一種抗VEGF拮抗劑，其具有與DOM15-26-593之CDR1序列至少50%一致之CDR1序列。在一實施例中，CDR序列一致性為至少55、60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98或99%。該拮抗劑可(例如)在一組如本文中所述之條件下對蛋白酶(例如一或多種如本文中所述之蛋白酶)具有抗性。

在一態樣中，本發明提供一種抗VEGF拮抗劑，其具有與DOM15-26-593之CDR1序列至少50%一致之CDR2序列。在一實施例中，CDR序列一致性為至少55、60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98或99%。該拮抗劑可(例如)在一組如本文中所述之條件下對蛋白酶(例如一或多種如本文中所述之蛋白酶)具有抗性。

在一態樣中，本發明提供一種抗VEGF拮抗劑，其具有與DOM15-26-593之CDR1序列至少50%一致之CDR3序列。在一實施例中，CDR序列一致性為至少55、60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98或99%。該拮抗劑可(例如)在一組如本文中所述之條件下對蛋白酶(例如一或多種如本文中所述之蛋白酶)具有抗性。

在一態樣中，本發明提供一種抗VEGF拮抗劑，其具有與DOM15-26-593之CDR1序列至少50%一致之CDR1序列及與DOM15-26-593之CDR2序列至少50%一致之CDR2序列。在一實施例中，一或兩個CDR之CDR序列一致性為至少55、60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98或99%。該拮抗劑可(例如)在一組如本文中所述之條件下對

蛋白酶(例如一或多種如本文中所述之蛋白酶)具有抗性。

在一態樣中，本發明提供一種抗VEGF拮抗劑，其具有與DOM15-26-593之CDR1序列至少50%一致之CDR1序列及與DOM15-26-593之CDR3序列至少50%一致之CDR3序列。在一實施例中，一或兩個CDR之CDR序列一致性為至少55、60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98或99%。該拮抗劑可(例如)在一組如本文中所述之條件下對蛋白酶(例如一或多種如本文中所述之蛋白酶)具有抗性。

在一態樣中，本發明提供一種抗VEGF拮抗劑，其具有與DOM15-26-593之CDR2序列至少50%一致之CDR2序列及與DOM15-26-593之CDR3序列至少50%一致之CDR3序列。在一實施例中，一或兩個CDR之CDR序列一致性為至少55、60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98或99%。該拮抗劑可(例如)在一組如本文中所述之條件下對蛋白酶(例如一或多種如本文中所述之蛋白酶)具有抗性。

在一態樣中，本發明提供一種抗VEGF拮抗劑，其具有與DOM15-26-593之CDR1序列至少50%一致之CDR1序列及與DOM15-26-593之CDR2序列至少50%一致之CDR2序列及與DOM15-26-593之CDR3序列至少50%一致之CDR3序列。在一實施例中，一或兩個或各CDR之CDR序列一致性為至少55、60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98或99%。該拮抗劑可(例如)在一組如本文中所述之條件下對蛋白酶(例如一或多種如本文中所述之蛋白酶)具有抗性。

在一態樣中，本發明提供一種抗VEGF拮抗劑，其包含

免疫球蛋白單一可變區域，該免疫球蛋白單一可變區域包含DOM15-26-593之CDR1、CDR2及/或CDR3(例如，CDR1、CDR2、CDR3、CDR1及CDR2、CDR1及CDR3、CDR2及CDR3或CDR1、CDR2及CDR3)之序列。該拮抗劑可(例如)在一組如本文中所述之條件下對蛋白酶(例如一或多種如本文中所述之蛋白酶)具有抗性。

在一態樣中，本發明提供一種抗VEGF拮抗劑，其與DOM15-26-593競爭以結合VEGF。因此，該拮抗劑可結合與DOM15-26-593相同之抗原決定基或重疊抗原決定基。在一實施例中，拮抗劑包含具有與DOM15-26-593之胺基酸序列至少97%一致之胺基酸序列的免疫球蛋白單一可變區域。在一實施例中，一致性%為至少98或99%。在一實施例中，該可變區域為DOM15-26-593。該拮抗劑可(例如)在一組如本文中所述之條件下對蛋白酶(例如一或多種如本文中所述之蛋白酶)具有抗性。在一實施例中，拮抗劑為對VEGF具有結合特異性之抗體或其抗原結合片段，諸如單價抗原結合片段(例如，scFv、Fab、Fab'、dAb)。拮抗劑之其他實例為本文中所述之結合VEGF之配位體。配位體可包含合適格式之對VEGF具有結合特異性之免疫球蛋白單一可變區域或區域抗體(dAb)或該dAb之互補判定區。在一些實施例中，配位體為基本上由對VEGF具有結合特異性之免疫球蛋白單一可變區域或dAb組成或由其組成之dAb單體。在其他實施例中，配位體為包含合適格式(諸如抗體格式)之dAb(或dAb之CDR)的多肽。

該等VEGF配位體(例如dAb)可經編排格式以具有較大流體動力學尺寸，例如藉由連接PEG基團、血清白蛋白、轉鐵蛋白、轉鐵蛋白受體或至少其轉鐵蛋白結合部分、抗體Fc區或藉由接合抗體區域。舉例而言，(i)結合VEGF，(ii)拮抗VEGF介導之信號轉導之激活及(iii)不抑制VEGF與其受體(諸如dAb單體)之結合的藥劑(例如，多肽、可變區域或拮抗劑)可編排格式為抗體之較大抗原結合片段(例如，經編排格式為Fab、Fab'、$F(ab)_2$、$F(ab')_2$、IgG、scFv)。亦可藉由使VEGF結合劑(拮抗劑、可變區域)與結合如本文中所述之增加活體內半衰期之抗原或抗原決定基的結合區域(例如，抗體或抗體片段)接合或連接來增加配位體之流體動力學尺寸及其血清半衰期(參見，WO2006038027之附錄1，其整體係以引用之方式併入本文中)。舉例而言，可使VEGF結合劑(例如，多肽，例如dAb)與抗血清白蛋白或抗新生兒Fc受體抗體或抗體片段(例如，抗SA或抗新生兒Fc受體dAb、Fab、Fab'或scFv)或抗SA親和體(affibody)或抗新生兒Fc受體親和體接合或連接。

用於本發明之VEGF結合配位體之合適白蛋白、白蛋白片段或白蛋白變異體的實例係描述於WO 2005/077042A2及WO2006038027中，其整體係以引用之方式併入本文中。

在貫穿該揭示內容所述之本發明之其他實施例中，代替在本發明之拮抗劑或配位體中使用"dAb"，涵蓋熟練的使用者(addressee)可使用的區域包含結合VEGF之dAb之

CDR(例如，接枝於合適蛋白質骨架或骨幹上之CDR，該骨架或骨幹例如親和體、SpA骨架、LDL受體A類區域或EGF區域)或可為包含VEGF結合位點之蛋白質區域(例如其中該區域係選自親和體、SpA區域、LDL受體A類區域或EGF區域)。因此，揭示內容整體應解釋為提供使用該等區域代替dAb之拮抗劑、配位體及方法之揭示內容。

本發明之多肽、免疫球蛋白單一可變區域及拮抗劑可抗一或多種以下蛋白酶：絲胺酸蛋白酶、半胱胺酸蛋白酶、天冬胺酸蛋白酶、硫醇蛋白酶、基質金屬蛋白酶、羧基肽酶(例如，羧基肽酶A、羧基肽酶B)、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、彈性蛋白酶、白血球酶(leukozyme)、胰酶、凝血酶、纖溶酶、組織蛋白酶(例如組織蛋白酶G)、蛋白酶(例如，蛋白酶1、蛋白酶2、蛋白酶3)、嗜熱菌蛋白酶、凝乳酶、腸激酶、卡斯蛋白酶(caspase)(例如卡斯蛋白酶1、卡斯蛋白酶2、卡斯蛋白酶4、卡斯蛋白酶5、卡斯蛋白酶9、卡斯蛋白酶12、卡斯蛋白酶13)、鈣激活蛋白酶、無花果蛋白酶、梭菌蛋白酶、獼猴桃蛋白酶、鳳梨蛋白酶及分離酶。在特定實施例中，蛋白酶為胰蛋白酶、彈性蛋白酶或白血球酶。蛋白酶亦可由生物提取物、生物組織勻漿或生物製劑提供。在一實施例中，蛋白酶為可見於一或多種以下各物中之蛋白酶：痰、黏液(例如胃黏液、鼻黏液、支氣管黏液)、支氣管肺泡灌洗液、肺組織勻漿、肺提取物、胰腺提取物、胃液、唾液。在一實施例中，蛋白酶為眼睛及/或眼淚中可見之

蛋白酶。眼睛中可見之該等蛋白酶之實例包括卡斯蛋白酶、鈣激活蛋白酶、基質金屬蛋白酶、去整合素、金屬蛋白酶(ADAM)及具有血小板反應蛋白基元之ADAM、蛋白體、組織型纖溶酶原激活劑、分泌酶、組織蛋白酶B及D、胱蛋白酶C、絲胺酸蛋白酶PRSS1、泛素蛋白體通路(UPP)。在一實施例中，蛋白酶為非細菌性蛋白酶。在一實施例中，蛋白酶為動物，例如哺乳動物，例如人類蛋白酶。在一實施例中，蛋白酶為GI道蛋白酶或肺組織蛋白酶，例如人類中可見之GI道蛋白酶或肺組織蛋白酶。此處所列之該蛋白酶亦可用於本文中所述之包括將庫之譜系暴露於蛋白酶中之方法中。

在一態樣中，本發明提供一種包含VEGF結合位點之蛋白酶抗性免疫球蛋白單一可變區域，其中該可變區域在以下情況下對蛋白酶具有抗性：

(i)在37℃下與至少10微克/毫升之濃度(c)之蛋白酶一起培養至少1小時之時間(t)；或

(ii)在30℃下與至少40微克/毫升之濃度(c')之蛋白酶一起培養至少1小時之時間(t)。在一實施例中，蛋白酶(例如胰蛋白酶)與可變區域之比率(以莫耳/莫耳計)為8,000比80,000蛋白酶：可變區域，例如當C為10微克/毫升時，比率為800比80,000蛋白酶：可變區域；或當C或C'為100微克/毫升時，比率為8,000比80,000蛋白酶：可變區域。在一實施例中，蛋白酶(例如胰蛋白酶)與可變區域之比率(以重量/重量、例如微克/微克計)為16,000比160,000蛋白酶：可變

區域，例如當C為10微克/毫升時，比率為1,600比160,000蛋白酶：可變區域；或當C或C'為100微克/毫升時，比率為16,000比160,000蛋白酶：可變區域。在一實施例中，濃度(c或c')為至少100或1000微克/毫升蛋白酶。在一實施例中，濃度(c或c')為至少100或1000微克/毫升蛋白酶。當與肽或多肽之譜系或庫一起作用時，參考本文中之適於所使用之蛋白酶蛋白水解活性之條件的描述(例如，w/w參數)。該等條件可供測定特定免疫球蛋白單一可變區域之蛋白酶抗性之條件使用。在一實施例中，時間(t)為或約為1、3或24小時或隔夜(例如，約12-16小時)。在一實施例中，該可變區域在條件(i)下具抗性且濃度(c)為或約為10或100微克/毫升蛋白酶且時間(t)為1小時。在一實施例中，該可變區域在條件(ii)下具抗性且濃度(c')為或約為40微克/毫升蛋白酶且時間(t)為或約為3小時。在一實施例中，該蛋白酶係選自胰蛋白酶、彈性蛋白酶、白血球酶及胰酶。在一實施例中，該蛋白酶為胰蛋白酶。在一實施例中，蛋白酶為可見於一或多種以下各物中之蛋白酶：痰、黏液(例如胃黏液、鼻黏液、支氣管黏液)、支氣管肺泡灌洗液、肺組織勻漿、肺提取物、胰腺提取物、胃液、唾液或眼淚或眼睛。在一實施例中，蛋白酶為眼睛及/或眼淚中可見之蛋白酶。在一實施例中，蛋白酶為非細菌性蛋白酶。在一實施例中，蛋白酶為動物、例如哺乳動物、例如人類蛋白酶。在一實施例中，蛋白酶為GI道蛋白酶或肺組織蛋白酶，例如人類中可見之GI道蛋白酶或肺組織蛋白

酶。此處所列之該蛋白酶亦可用於本文中所述之包括將庫之譜系暴露於蛋白酶中之方法中。

在一實施例中，該可變區域對胰蛋白酶及/或至少一種選自彈性蛋白酶、白血球酶及胰酶之其他蛋白酶具有抗性。舉例而言，抗性係針對胰蛋白酶及彈性蛋白酶；胰蛋白酶及白血球酶；胰蛋白酶及胰酶；胰蛋白酶、彈性蛋白酶及白血球酶；胰蛋白酶、彈性蛋白酶及胰酶；胰蛋白酶、彈性蛋白酶、胰酶及白血球酶；或胰蛋白酶、胰酶及白血球酶。

在一實施例中，可變區域當在條件(i)或(ii)下培養時(例如)以10^6至10^{13}、例如10^8至10^{12}個複製單位(傳染性病毒體)之噬菌體庫規模呈現於噬菌體上。

在一實施例中，該可變區域在條件(i)或(ii)下培養後特異性結合VEGF，例如，使用BiaCore™或ELISA(例如，噬菌體ELISA或單株噬菌體ELISA)評估。

在一實施例中，本發明之可變區域特異性結合蛋白質A或蛋白質L。在一實施例中，在條件(i)或(ii)下培養後，出現與蛋白質A或L之特異性結合。

在一實施例中，本發明之可變區域(例如)在條件(i)或(ii)下培養後在ELISA(例如噬菌體ELISA或單株噬菌體ELISA)中可具有至少0.404之OD_{450}讀數。

在一實施例中，本發明之可變區域(例如)在條件(i)或(ii)下培養後在凝膠電泳中展現(大體上)單一條帶。

在某些實施例中，本發明提供一種VEGF拮抗劑，其為

包含結合VEGF之本發明之第一dAb及具有與第一dAb相同或不同結合特異性之第二dAb的雙特異性配位體。第二dAb可結合選自以下各之靶：ApoE、Apo-SAA、BDNF、心營養素-1、CEA、CD40、CD40配位體、CD56、CD38、CD138、EGF、EGF受體、ENA-78、嗜酸性粒細胞趨化因子、嗜酸性粒細胞趨化因子-2、次級淋巴組織趨化因子(Exodus)-2、FAPα、FGF-酸性、FGF-鹼性、纖維母細胞生長因子-10、FLT3配位體、弗拉塔凱(Fractalkine)(CX3C)、GDNF、G-CSF、GM-CSF、GF-β1、人類血清白蛋白、胰島素、IFN-γ、IGF-I、IGF-II、IL-1α、IL-1β、IL-1受體、IL-1受體1型、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8(72 a.a.)、IL-8(77 a.a.)、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18(IGIF)、抑制素α、抑制素β、IP-10、角化細胞生長因子-2(KGF-2)、KGF、瘦體素、LIF、淋巴細胞趨化因子、穆勒氏抑制物質(Mullerian inhibitory substance)、單核細胞集落抑制因子、單核細胞引誘蛋白、M-CSF、MDC(67 a.a.)、MDC(69 a.a.)、MCP-1(MCAF)、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MDC(67 a.a)、MDC(69 a.a.)、MIG、MIP-1α、MIP-1β、MIP-3α、MIP-3β、MIP-4、骨髓祖細胞抑制劑因子-1(MPIF-1)、NAP-2、神經營養因子、神經生長因子、β-NGF、NT-3、NT-4、制瘤素M、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、PF-4、RANTES、SDF1α、SDF1β、SCF、SCGF、幹細胞因子(SCF)、TARC、TGF-α、TGF-β、TGF-β2、TGF-β3、腫瘤

壞死因子(TNF)、TNF-α、TNF-β、TNF受體I、TNF受體II、TNIL-1、TPO、VEGF、VEGF A、VEGF B、VEGF C、VEGF D、VEGF受體1、VEGF受體2、VEGF受體3、GCP-2、GRO/MGSA、GRO-β、GRO-γ、HCC1、1-309、HER 1、HER 2、HER 3、HER 4、血清白蛋白、vWF、澱粉樣蛋白(例如，澱粉樣α)、MMP12、PDK1、IgE、IL-13Rα1、IL-13Ra2、IL-15、IL-15R、IL-16、IL-17R、IL-17、IL-18、IL-18R、IL-23、IL-23R、IL-25、CD2、CD4、CD11α、CD23、CD25、CD27、CD28、CD30、CD40、CD40L、CD56、CD138、ALK5、EGFR、FcER1、TGFb、CCL2、CCL18、CEA、CR8、CTGF、CXCL12(SDF-1)、凝乳酶、FGF、弗林蛋白酶(Furin)、內皮素-1、嗜酸性粒細胞趨化因子(例如，嗜酸性粒細胞趨化因子、嗜酸性粒細胞趨化因子-2、嗜酸性粒細胞趨化因子-3)、GM-CSF、ICAM-1、ICOS、IgE、IFNα、I-309、整合素、L-選擇素、MIF、MIP4、MDC、MCP-1、MMP、嗜中性彈性蛋白酶、骨橋蛋白、OX-40、PARC、PD-1、RANTES、SCF、SDF-1、siglec8、TARC、TGFb、凝血酶、Tim-1、TNF、TRANCE、類胰蛋白酶、VEGF、VLA-4、VCAM、α4β7、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR8、αvβ6、αvβ8、cMET、CD8、vWF、澱粉樣蛋白(例如，澱粉樣α)、MMP12、PDK1及IgE。

在一實例中，雙特異性配位體包含結合VEGF上之第一抗原決定基之第一dAb及結合不同靶上之抗原決定基之第

二dAb。在另一實例中，第二dAb結合血清白蛋白上之抗原決定基。

在其他實施例中，該配位體為多特異性配位體，其包含對VEGF具有結合特異性之第一抗原決定基結合區域及具有不同於第一抗原決定基結合區域之結合特異性之至少另一抗原決定基結合區域。舉例而言，第一抗原決定基結合區域可為結合VEGF之dAb或可為包含結合VEGF之dAb之CDR(例如，接枝於合適蛋白質骨架或骨幹之CDR，該骨架或骨幹例如親和體、SpA骨架、LDL受體A類區域或EGF區域)的區域或可為結合VEGF之區域，其中該區域係選自親和體、SpA區域、LDL受體A類區域或EGF區域。

在某些實施例中，多肽、拮抗劑、配位體或抗VEGF dAb單體之特徵在於一或多個以下特徵：1)以如由表面電漿共振所測定50 nM至20 pM之解離常數(K_d)及5×10^{-1}至1×10^{-7} s^{-1}之K_{off}速率常數自人類VEGF解離；2)以500 nM至50 pM之IC50抑制VEGF與VEGFR2之結合；3)在標準HUVEC細胞檢定中以500 nM至50pM之ND50中和人類VEGF；4)在標準細胞檢定中以≤100 nM之ND_{50}拮抗VEGF之活性；5)在小鼠異種移植模型中抑制或降低腫瘤生長；6)抗聚集；7)當表現於大腸桿菌或畢赤酵母屬物種(例如，馬斯德畢赤酵母)或諸如CHO之哺乳動物細胞表現系統中時，以至少約0.5 mg/L之量分泌；8)顯露可逆性；或9)在治療、抑止或預防發炎性疾病中具有功效。關於適用於條件(1)至(9)之檢定及測試及參數之詳情，參考WO 2006038027

及WO 2006059108及WO 2007049017，且該等專利以引用之方式併入本文中。

在特定實施例中，多肽、拮抗劑、配位體或dAb單體以如由表面電漿共振所測定50 nM至20 pM之解離常數(K_d)及5×10^{-1}至1×10^{-7} s^{-1}之K_{off}速率常數自人類VEGF解離；以500 nM至50 pM之IC50抑制VEGF與VEGFR2(VEGF受體2)之結合；在標準HUVEC細胞檢定中以500 nM至50pM之ND50中和人類VEGF。在其他特定實施例中，多肽、拮抗劑、配位體或dAb單體以如由表面電將共振所測定50 nM至20 pM之解離常數(K_d)及5×10^{-1}至1×10^{-7} s^{-1}之K_{off}速率常數自人類VEGF解離；以500 nM至50 pM之IC50抑制VEGF與VEGFR2之結合。

本發明之蛋白酶抗性多肽、免疫球蛋白單一可變區域及拮抗劑在治療、預防及診斷例如人類之哺乳動物之疾病或病狀中具有效用。其尤其具有作為向諸如人類之患者投與時很可能會遇到蛋白酶之藥物之基質的效用。舉例而言，當向GI道投與(例如，經口、舌下、直腸投與)多肽、免疫球蛋白單一可變區域及拮抗劑時，在此狀況下，其可能在上胃腸道、下胃腸道、口腔、胃、小腸及大腸中之一或多處受蛋白酶侵襲。因此，一個實施例提供一種待以經口、舌下或直腸方式向患者之GI道投與以治療及/或預防患者之疾病或病狀的蛋白酶抗性多肽、免疫球蛋白單一可變區域或拮抗劑。舉例而言，經口向患者(例如，人類患者)投與以治療及/或預防VEGF介導之病症或疾病，諸如癌症，

例如實體腫瘤、發炎及/或自體免疫疾病。

在另一實例中，當向肺組織(例如，肺或氣管)投與(例如，藉由吸入或鼻內方式)多肽、可變區域或拮抗劑時其很可能會遇到蛋白酶。因此，一個實施例提供藉由吸入或鼻內向患者(例如人類)之肺組織投與之方式向該患者投與蛋白酶抗性多肽、免疫球蛋白單一可變區域或拮抗劑以治療及/或預防患者之疾病或病狀。該病狀可為哮喘(例如，過敏性哮喘)、COPD、流感或WO2006038027中所揭示之任何其他肺疾病或病狀，WO2006038027係以引用之方式併入本文中。在另一實例中，當向患者之眼睛投與(例如，以眼球內注射方式或以滴眼劑形式)多肽、可變區域或拮抗劑時很可能會遇到蛋白酶。因此，一個實施例提供以眼睛方式向患者(例如人類)投與蛋白酶抗性多肽、免疫球蛋白單一可變區域或拮抗劑以治療及/或預防患者之疾病或病狀(例如，眼睛之疾病或病狀)。投藥可為以滴眼劑形式或藉由注射至眼睛、例如玻璃體液中而局部向眼睛投與。

本發明之一實施例提供一種待(例如)以滴眼劑或凝膠形式或(例如)以植入物之形式向眼睛投與(例如)以治療及/或預防眼睛之VEGF介導之病症或疾病(諸如AMD(年齡相關黃斑退化))的蛋白酶抗性多肽、免疫球蛋白單一可變區域或拮抗劑。

在另一實例中，當向肺組織(例如，肺或氣管)投與(例如，藉由吸入或鼻內方式)多肽、可變區域或拮抗劑時很

可能會遇到蛋白酶。因此，一個實施例提供藉由吸入或鼻內向患者(例如人類)之肺組織投與之方式向該患者投藥來治療及/或預防患者之疾病或病狀。該病狀可為癌症(例如，實體腫瘤，例如肺癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、胰腺癌、乳癌、前列腺癌或卵巢癌)、哮喘(例如，過敏性哮喘)、COPD或WO2006038027中所揭示之任何其他肺疾病或病狀，WO2006038027係以引用之方式併入本文中。本發明之拮抗劑、多肽及免疫球蛋白單一可變區域可展現升高或相對較高之熔融溫度(Tm)，從而提供增強之穩定性。高親和力靶結合亦可為或另外為拮抗劑、多肽及可變區域之特徵。該等特徵中之一或多個以及蛋白酶抗性使得拮抗劑、可變區域及多肽可承擔作為諸如人類之哺乳動物之藥物的用途，(例如)對於GI道或肺組織投藥或向眼睛的投藥情況而言，尤其可能會遇到蛋白酶。

因此，在一態樣中，本發明提供一種用於經口傳遞之VEGF拮抗劑。在一態樣中，本發明提供一種用於向患者之GI道傳遞之VEGF拮抗劑。在一態樣中，本發明提供一種VEGF拮抗劑在製造用於經口傳遞之藥物中的用途。在一態樣中，本發明提供一種VEGF拮抗劑在製造用於向患者之GI道傳遞之藥物中的用途。在一實施例中，該可變區域對胰蛋白酶及/或至少一種選自彈性蛋白酶、白血球酶及胰酶之其他蛋白酶具有抗性。舉例而言，抗性係針對胰蛋白酶及彈性蛋白酶；胰蛋白酶及白血球酶；胰蛋白酶及胰酶；胰蛋白酶、彈性蛋白酶及白血球酶；胰蛋白酶、彈

性蛋白酶及胰酶；胰蛋白酶、彈性蛋白酶、胰酶及白血球酶；或胰蛋白酶、胰酶及白血球酶。

在一態樣中，本發明提供一種用於肺傳遞之VEGF拮抗劑。在一態樣中，本發明提供一種VEGF拮抗劑在製造用於肺傳遞之藥物中的用途。在一態樣中，本發明提供一種VEGF拮抗劑在製造用於向患者之肺傳遞之藥物中的用途。在一實施例中，該可變區域對白血球酶具有抗性。

在一態樣中，本發明提供一種經口傳遞藥物或向患者之GI道或患者之肺或肺組織或眼睛傳遞藥物的方法，其中該方法包含向該患者投與醫藥學有效量之本發明之VEGF拮抗劑。

在一態樣中，本發明提供一種用於治療及/或預防例如實體腫瘤之癌症的本發明之VEGF拮抗劑。在一實施例中，實體腫瘤係選自由肺癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、胰腺癌、乳癌、前列腺癌或卵巢癌組成之群。

在一態樣中，本發明提供一種用於治療及/或預防血管增生性疾病的本發明之VEGF拮抗劑，該疾病例如為血管生成、動脈粥樣硬化及眼睛中之血管增生性疾病，諸如AMD(年齡相關黃斑退化)。

在一態樣中，本發明提供一種用於治療及/或預防發炎性病狀之本發明之VEGF拮抗劑。在一態樣中，本發明提供一種VEGF拮抗劑在製造用於治療及/或預防發炎性病狀之藥物中的用途。在一實施例中，該病狀係選自由關節炎、多發性硬化症、發炎性腸疾病及慢性阻塞性肺病組成

之群。舉例而言，在一態樣中，本發明提供一種用於治療及/或預防呼吸道疾病之VEGF拮抗劑。在一態樣中，本發明提供一種VEGF拮抗劑在製造用於治療及/或預防呼吸道疾病之藥物中的用途。舉例而言，該呼吸道疾病係選自由以下各病組成之群：肺發炎、慢性阻塞性肺病、哮喘、肺炎、過敏性肺炎、與嗜伊紅血球增多相關之肺浸潤、環境肺病、肺炎、支氣管擴張、囊性纖維化、間質肺病、原發性肺動脈高壓、肺血栓栓塞、胸膜紊亂、縱隔紊亂、隔膜紊亂、換氣不足、換氣過度、睡眠呼吸暫停、急性呼吸窘迫症候群、間皮瘤、肉瘤、移植排斥、移植物抗宿主疾病、肺癌、過敏性鼻炎、過敏症、石棉沉著病、曲黴菌腫、曲黴菌病、支氣管擴張、慢性支氣管炎、肺氣腫、嗜伊紅血球肺炎、特發性肺纖維化、侵襲性肺炎球菌疾病、流感、非結核性分枝桿菌病、胸膜積液、塵肺病、肺孢子蟲病、肺炎、肺放線菌病、肺泡蛋白沉著症、肺炭疽、肺水腫、肺栓子、肺發炎、肺組織細胞增多病X、肺動脈高血壓、肺諾卡氏菌病(pulmonary nocardiosis)、肺結核、肺靜脈閉塞疾病、類風濕性肺病、肉狀瘤病及韋格納肉牙腫病(Wegener's granulomatosis)。舉例而言，該疾病為慢性阻塞性肺病(COPD)。舉例而言，該疾病為哮喘。

包含抑制VEGF之藥劑的本發明之拮抗劑(例如，其中該藥劑係選自由以下各物組成之群：抗體片段(例如，Fab片段、Fab'片段、Fv片段(例如，scFv、雙硫鍵鍵結之Fv)、$F(ab')_2$片段、dAb)、配位體及dAb單體及多聚體(例如同元

或異元二聚體))可使用任何合適方法局部向個體之組織或器官(例如肺組織(例如，肺))或眼睛投與。舉例而言，藥劑可經由吸入或鼻內投藥局部向肺組織投與。對於吸入或鼻內投藥，VEGF之拮抗劑可使用噴霧器、吸入器、霧化器、氣霧化器(aerosolizer)、彌霧器(mister)、乾粉吸入器、定劑量吸入器、定劑量噴霧器、定劑量彌霧器、定劑量霧化器或其他合適吸入器或鼻內傳遞裝置投與。因此，在一實施例中，本發明提供含有VEGF拮抗劑之肺傳遞裝置。在一實施例中，該裝置為吸入器或鼻內傳遞裝置。

在一實施例中，藥劑可經由可植入傳遞裝置局部向眼睛投與。因此，在一實施例中，本發明提供含有VEGF拮抗劑之可植入傳遞裝置。

在一態樣中，本發明提供一種包含VEGF拮抗劑之口服調配物。調配物可為錠劑、丸劑、膠囊、液體或糖漿。在一態樣中，本發明提供包含VEGF拮抗劑之用於向眼睛傳遞之眼用調配物，該調配物例如可為液體滴眼劑或凝膠。

在一實施例中，本發明提供一種用於向肺傳遞之肺調配物，其中該調配物包含粒度範圍小於5微米、例如小於4.5、4、3.5或3微米之本發明之拮抗劑、多肽或可變區域(例如，當在例如pH 6.5至8.0、例如pH 7至7.5、例如pH 7或pH 7.5之伯瑞坦-魯賓遜(Britton-Robinson)緩衝液中時)。

在一實施例中，提供一種pH 6.5至8.0、例如7至7.5、例如7、例如7.5之本發明之調配物及組合物。

本發明之任何態樣之可變區域可具有50℃或至少55℃或至少60℃或至少65℃或至少70℃之Tm。本發明之拮抗劑、用途、方法、裝置或調配物可包含該可變區域。

在本發明之一態樣中，本發明之多肽、可變區域、拮抗劑、組合物或調配物在37℃至50℃下在伯瑞坦-魯賓遜或PBS緩衝液中培養(多肽或可變區域之濃度為1 mg/ml)14天後大體上為穩定的。在一實施例中，至少65、70、75、80、85、86、87、88、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%之多肽、拮抗劑或可變區域在37℃下進行該培養後仍不聚集。在一實施例中，至少65、70、75、80、85、86、87、88、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%之多肽或可變區域在37℃下進行該培養後仍為單體。在一實施例中，至少5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、86、87、88、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%之多肽、拮抗劑或可變區域在50℃下進行該培養後仍不聚集。在一實施例中，至少5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、86、87、88、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%之多肽或可變區域在50℃下進行該培養後仍為單體。在一實施例中，在任何一個該等培養後未見多肽、可變區域、拮抗劑之聚集。在一實施例中，多肽或可變區域之pI在37℃下在伯瑞坦-魯賓遜緩衝液中在1 mg/ml之多肽或可變區域濃度下培養後仍未變化或大體上未變化。

在本發明之一態樣中，本發明之多肽、可變區域、拮抗劑、組合物或調配物在4℃下在伯瑞坦-魯賓遜或PBS緩衝液中在pH 7至7.5(例如pH 7或pH 7.5)下培養(多肽或可變區域之濃度為100 mg/ml)7天後大體上為穩定的。在一實施例中，至少95、95.5、96、96.5、97、97.5、98、98.5、99或99.5%之多肽、拮抗劑或可變區域在該培養後仍不聚集。在一實施例中，至少95、95.5、96、96.5、97、97.5、98、98.5、99或99.5%之多肽或可變區域在該培養後仍為單體。在一實施例中，在任何一個該等培養後未見多肽、可變區域、拮抗劑之聚集。

在本發明之一態樣中，本發明之多肽、可變區域、拮抗劑、組合物或調配物(例如)在室溫、20℃或37℃下(例如)在噴射噴霧器(例如Pari LC+杯)中噴霧(例如，多肽或可變區域之濃度為40 mg/ml)1小時後大體上為穩定的。在一實施例中，至少65、70、75、80、85、86、87、88、90、91、92、93、94、95、95.5、96、96.5、97、97.5、98、98.5、99或99.5%之多肽、拮抗劑或可變區域在該噴霧後仍不聚集。在一實施例中，至少65、70、75、80、85、86、87、88、90、91、92、93、94、95、95.5、96、96.5、97、97.5、98、98.5、99或99.5%之多肽或可變區域在該噴霧後仍為單體。在一實施例中，在任何一個該噴霧後未見多肽、可變區域、拮抗劑之聚集。

在一態樣中，本發明提供一種經分離或重組核酸，其編碼包含本發明之任何態樣之免疫球蛋白單一可變區域之多

肽或編碼本發明之任何態樣之多肽、拮抗劑或可變區域。在一態樣中，本發明提供一種包含核酸之載體。在一態樣中，本發明提供一種包含核酸或載體之宿主細胞。在一態樣中，本發明提供一種產生包含免疫球蛋白單一可變區域之多肽之方法，該方法包含將宿主細胞維持在適於該核酸或該載體表現之條件下，藉此產生包含免疫球蛋白單一可變區域之多肽。該方法可進一步包含分離多肽、可變區域或拮抗劑及視情況產生比經分離多肽、可變區域或拮抗劑具有改良之親和力及/或ND50的變異體(例如，突變變異體)。此項技術已知改良免疫球蛋白單一可變區域之結合親和力之技術，例如親和力成熟技術。

在一態樣中，本發明提供一種醫藥組合物，其包含本發明之任何態樣之免疫球蛋白單一可變區域、多肽或拮抗劑及醫藥學上可接受之載劑、賦形劑或稀釋劑。

在一實施例中，本文中所述之VEGF配位體，例如本發明之任何態樣之結合VEGF之免疫球蛋白單一可變區域或VEGF拮抗劑包含抗體恆定區域之區域，例如抗體Fc，視情況其中Fc之N-末端連接於(視情況直接連接於)可變區域之C-末端。合適Fc之胺基酸序列展示於圖52b中。

因此，本發明提供：VEGF配位體(例如，如本文中所述之結合VEGF之可變區域或VEGF拮抗劑)，其進一步包括抗體恆定區之區域，例如其中該抗體恆定區之區域為抗體Fc區。

在一實施例中，抗體Fc區可具有圖52b中所示之胺基酸

Fc序列。

在另一實施例中，抗體Fc區可具有與圖52b中所示之胺基酸Fc序列至少70、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%一致之序列。

進一步包含抗體恆定區之區域之可變區域或拮抗劑可以(例如)融合物形式存在，且例如其中該抗體恆定區之N-末端連接於可變區域之C-末端。

亦提供一種抗VEGF免疫球蛋白單一可變區域，其係以與抗體Fc之融合物形式存在，且其具有與DOM15-26-593-Fc融合物之胺基酸序列(展示於圖52a中)一致之胺基酸序列。

本發明亦提供一種抗VEGF免疫球蛋白單一可變區域，其係以與Fc之融合物形式存在，且其具有與DOM15-26-593-Fc融合物之胺基酸序列(展示於圖52a中)97%一致之胺基酸序列。

本發明亦提供一種抗VEGF免疫球蛋白單一可變區域，其係以與Fc之融合物形式存在，且其係由與DOM15-26-593-Fc融合物之核酸序列(展示於圖52c中)一致之序列編碼。

本發明亦提供一種抗VEGF免疫球蛋白單一可變區域，其係以與Fc之融合物形式存在，且其係由與DOM15-26-593-F_C融合物之核酸序列(展示於圖52c中)至少70、80、90、95%一致之序列編碼。

本發明亦提供編碼配位體、拮抗劑及可變區域之核酸以

及含有該等核酸之載體及宿主細胞。

本發明之多肽或可變區域可為經分離的及/或重組的。

在一態樣，本發明為一種選擇蛋白酶抗性肽或多肽、例如血管內皮生長因子(VEGF)之拮抗劑(例如抗VEGF dAb)之方法。該方法包含提供肽或多肽譜系，在適於蛋白酶活性之條件下使該譜系與蛋白酶組合，及回收具有想要之生物活性之肽或多肽，藉此選擇蛋白酶抗性肽或多肽。

通常將譜系及蛋白酶培養至少約30分鐘之時間。在方法中可使用任何想要之蛋白酶，諸如一或多種以下蛋白酶：絲胺酸蛋白酶、半胱胺酸蛋白酶、天冬胺酸蛋白酶、硫醇蛋白酶、基質金屬蛋白酶、羧基肽酶(例如，羧基肽酶A、羧基肽酶B)、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、彈性蛋白酶、白血球酶、胰酶、凝血酶、纖溶酶、組織蛋白酶(例如組織蛋白酶G)、蛋白酶(例如，蛋白酶1、蛋白酶2、蛋白酶3)、嗜熱菌蛋白酶、凝乳酶、腸激酶、卡斯蛋白酶(例如卡斯蛋白酶1、卡斯蛋白酶2、卡斯蛋白酶4、卡斯蛋白酶5、卡斯蛋白酶9、卡斯蛋白酶12、卡斯蛋白酶13)、鈣激活蛋白酶、無花果蛋白酶、梭菌蛋白酶、獼猴桃蛋白酶、鳳梨蛋白酶及分離酶。在特定實施例中，蛋白酶為胰蛋白酶、彈性蛋白酶或白血球酶。蛋白酶亦可由生物提取物、生物組織勻漿或生物製劑提供。必要時，該方法進一步包含在培養完成後向譜系與蛋白酶之組合中添加蛋白酶抑制劑。

在一些實施例中，基於結合活性回收具有想要之生物活

性之肽或多肽。舉例而言，可基於結合諸如蛋白質A、蛋白質G或蛋白質L之一般配位體回收肽或多肽。結合活性亦可為與靶配位體之特異性結合。例示性靶配位體包括ApoE、Apo-SAA、BDNF、心營養素-1、CEA、CD40、CD40配位體、CD56、CD38、CD138、EGF、EGF受體、ENA-78、嗜酸性粒細胞趨化因子、嗜酸性粒細胞趨化因子-2、次級淋巴組織趨化因子(Exodus)-2、FAPα、FGF-酸性、FGF-鹼性、纖維母細胞生長因子-10、FLT3配位體、弗拉塔凱(CX3C)、GDNF、G-CSF、GM-CSF、GF-β1、人類血清白蛋白、胰島素、IFN-γ、IGF-I、IGF-II、IL-1α、IL-1β、IL-1受體、IL-1受體1型、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8(72 a.a.)、IL-8(77 a.a.)、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18(IGIF)、抑制素α、抑制素β、IP-10、角化細胞生長因子-2(KGF-2)、KGF、瘦體素、LIF、淋巴細胞趨化因子、穆勒氏抑制物質、單核細胞集落抑制因子、單核細胞引誘蛋白、M-CSF、MDC(67 a.a.)、MDC(69 a.a.)、MCP-1(MCAF)、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MDC(67 a.a)、MDC(69 a.a.)、MIG、MIP-1α、MIP-1β、MIP-3α、MIP-3β、MIP-4、骨髓祖細胞抑制劑因子-1(MPIF-1)、NAP-2、神經營養因子、神經生長因子、β-NGF、NT-3、NT-4、制瘤素M、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、PF-4、RANTES、SDF1α、SDF1β、SCF、SCGF、幹細胞因子(SCF)、TARC、TGF-α、TGF-β、TGF-β2、TGF-β3、腫瘤

壞死因子(TNF)、TNF-α、TNF-β、TNF受體I、TNF受體II、TNIL-1、TPO、VEGF、VEGF A、VEGF B、VEGF C、VEGF D、VEGF受體1、VEGF受體2、VEGF受體3、GCP-2、GRO/MGSA、GRO-β、GRO-γ、HCC1、1-309、HER 1、HER 2、HER 3、HER 4、血清白蛋白、vWF、澱粉樣蛋白(例如，澱粉樣α)、MMP12、PDK1、IgE、IL-13Rα1、IL-13Ra2、IL-15、IL-15R、IL-16、IL-17R、IL-17、IL-18、IL-18R、IL-23 IL-23R、IL-25、CD2、CD4、CD11α、CD23、CD25、CD27、CD28、CD30、CD40、CD40L、CD56、CD138、ALK5、EGFR、FcER1、TGFb、CCL2、CCL18、CEA、CR8、CTGF、CXCL12(SDF-1)、凝乳酶、FGF、弗林蛋白酶、內皮素-1、嗜酸性粒細胞趨化因子(例如，嗜酸性粒細胞趨化因子、嗜酸性粒細胞趨化因子-2、嗜酸性粒細胞趨化因子-3)、GM-CSF、ICAM-1、ICOS、IgE、IFNα、I-309、整合素、L-選擇素、MIF、MIP4、MDC、MCP-1、MMP、嗜中性彈性蛋白酶、骨橋蛋白、OX-40、PARC、PD-1、RANTES、SCF、SDF-1、siglec8、TARC、TGFb、凝血酶、Tim-1、TNF、TRANCE、類胰蛋白酶、VEGF、VLA-4、VCAM、α4β7、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR8、αvβ6、αvβ8、cMET、CD8、vWF、澱粉樣蛋白(例如，澱粉樣α)、MMP12、PDK1及IgE。

在特定實施例中，藉由淘選回收肽或多肽。

在一些實施例中，譜系包含呈現系統。舉例而言，呈現

系統可為噬菌體呈現、核糖體呈現、乳液隔室化及呈現、酵母呈現、嘌呤黴素呈現、細菌呈現、質體上之呈現或共價呈現。例示性呈現系統使核酸之編碼功能與由核酸所編碼之肽或多肽之功能特徵相關聯。在特定實施例中，呈現系統包含可複製之基因組。

在一些實施例中，呈現系統包含噬菌體呈現。舉例而言，噬菌體可為fd、M13、λ、MS2或T7。在特定實施例中，噬菌體呈現系統為多價系統。在一些實施例中，肽或多肽呈現為pIII融合蛋白。

在其他實施例中，方法進一步包含擴增編碼具有想要之生物活性之肽或多肽的核酸。在特定實施例中，藉由噬菌體擴增、細胞生長或聚合酶鏈反應擴增核酸。

在一些實施例中，譜系為免疫球蛋白單一可變區域譜系，其例如結合血管內皮生長因子(VEGF)且為血管內皮生長因子(VEGF)之拮抗劑。在特定實施例中，免疫球蛋白單一可變區域為重鏈可變區域。在更特定實施例中，重鏈可變區域為人類重鏈可變區域。在其他實施例中，免疫球蛋白單一可變區域為輕鏈可變區域。在特定實施例中，輕鏈可變區域為人類輕鏈可變區域。

在另一態樣中，本發明為一種自肽或多肽譜系選擇以高親和力結合靶配位體(例如，VEGF)之肽或多肽之方法。該方法包含提供肽或多肽譜系，在適於蛋白酶活性之條件下使譜系與蛋白酶組合，及回收結合靶配位體之肽或多肽。

通常將譜系及蛋白酶培養至少約30分鐘之時間。在方法

中可使用任何想要之蛋白酶，諸如一或多種以下蛋白酶：絲胺酸蛋白酶、半胱胺酸蛋白酶、天冬胺酸蛋白酶、硫醇蛋白酶、基質金屬蛋白酶、羧基肽酶(例如，羧基肽酶A、羧基肽酶B)、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、彈性蛋白酶、白血球酶、胰酶、凝血酶、纖溶酶、組織蛋白酶(例如組織蛋白酶G)、蛋白酶(例如，蛋白酶1、蛋白酶2、蛋白酶3)、嗜熱菌蛋白酶、凝乳酶、腸激酶、卡斯蛋白酶(例如卡斯蛋白酶1、卡斯蛋白酶2、卡斯蛋白酶4、卡斯蛋白酶5、卡斯蛋白酶9、卡斯蛋白酶12、卡斯蛋白酶13)、鈣激活蛋白酶、無花果蛋白酶、梭菌蛋白酶、獼猴桃蛋白酶、鳳梨蛋白酶及分離酶。在特定實施例中，蛋白酶為胰蛋白酶、彈性蛋白酶或白血球酶。蛋白酶亦可由生物提取物、生物組織勻漿或生物製劑提供。必要時，該方法進一步包含在培養完成後向譜系與蛋白酶之組合中添加蛋白酶抑制劑。

可基於結合任何想要之靶配位體、諸如本文中所揭示之靶配位體回收肽或多肽。在特定實施例中，藉由淘選回收肽或多肽。

在一些實施例中，譜系包含呈現系統。舉例而言，呈現系統可為噬菌體呈現、核糖體呈現、乳液隔室化及呈現、酵母呈現、嘌呤黴素呈現、細菌呈現、質體上之呈現或共價呈現。例示性呈現系統使核酸之編碼功能與由核酸所編碼之肽或多肽之功能特徵相關聯。在特定實施例中，呈現系統包含可複製之基因組。

在一些實施例中，呈現系統包含噬菌體呈現。舉例而言，噬菌體可為fd、M13、λ、MS2或T7。在特定實施例中，噬菌體呈現系統為多價系統。在一些實施例中，肽或多肽呈現為pIII融合蛋白。

在其他實施例中，方法進一步包含擴增編碼具有想要之生物活性之肽或多肽的核酸。在特定實施例中，藉由噬菌體擴增、細胞生長或聚合酶鏈反應擴增核酸。

在一些實施例中，譜系為免疫球蛋白單一可變區域譜系，例如其結合VEGF且為VEGF之拮抗劑。在特定實施例中，免疫球蛋白單一可變區域為重鏈可變區域。在更特定實施例中，重鏈可變區域為人類重鏈可變區域。在其他實施例中，免疫球蛋白單一可變區域為輕鏈可變區域。在特定實施例中，輕鏈可變區域為人類輕鏈可變區域。

在另一態樣中，本發明為一種產生蛋白酶抗性肽或多肽譜系之方法。該方法包含提供肽或多肽譜系，在適於蛋白酶活性之條件下使肽或多肽譜系與蛋白酶組合，及回收複數種具有想要之生物活性之肽或多肽，藉此產生蛋白酶抗性肽或多肽譜系。

在一些實施例中，通常將譜系及蛋白酶培養至少約30分鐘之時間。舉例而言，方法中所使用之蛋白酶可為一或多種以下蛋白酶：絲胺酸蛋白酶、半胱胺酸蛋白酶、天冬胺酸蛋白酶、硫醇蛋白酶、基質金屬蛋白酶、羧基肽酶(例如，羧基肽酶A、羧基肽酶B)、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、彈性蛋白酶、白血球酶、胰

酶、凝血酶、纖溶酶、組織蛋白酶(例如組織蛋白酶G)、蛋白酶(例如，蛋白酶1、蛋白酶2、蛋白酶3)、嗜熱菌蛋白酶、凝乳酶、腸激酶、卡斯蛋白酶(例如卡斯蛋白酶1、卡斯蛋白酶2、卡斯蛋白酶4、卡斯蛋白酶5、卡斯蛋白酶9、卡斯蛋白酶12、卡斯蛋白酶13)、鈣激活蛋白酶、無花果蛋白酶、梭菌蛋白酶、獼猴桃蛋白酶、鳳梨蛋白酶及分離酶。在特定實施例中，蛋白酶為胰蛋白酶、彈性蛋白酶或白血球酶。蛋白酶亦可由生物提取物、生物組織勻漿或生物製劑提供。必要時，該方法進一步包含在培養完成後向譜系與蛋白酶之組合中添加蛋白酶抑制劑。

在一些實施例中，基於結合活性回收複數種具有想要之生物活性之肽或多肽。舉例而言，可基於結合諸如蛋白質A、蛋白質G或蛋白質L之一般配位體回收複數種肽或多肽。結合活性亦可為與靶配位體、諸如本文中所述之靶配位體之特異性結合。在特定實施例中，藉由淘選回收複數種具有想要之生物活性之肽或多肽。

在一些實施例中，譜系包含呈現系統。舉例而言，呈現系統可為噬菌體呈現、核糖體呈現、乳液隔室化及呈現、酵母呈現、嘌呤黴素呈現、細菌呈現、質體上之呈現或共價呈現。在特定實施例中，呈現系統使核酸之編碼功能與由核酸所編碼之肽或多肽之功能特徵相關聯。在特定實施例中，呈現系統包含可複製之基因組。

在一些實施例中，呈現系統包含噬菌體呈現。舉例而言，噬菌體可為fd、M13、λ、MS2或T7。在特定實施例

中，噬菌體呈現系統為多價系統。在一些實施例中，肽或多肽呈現為pIII融合蛋白。

在其他實施例中，方法進一步包含擴增編碼複數種具有想要之生物活性之肽或多肽的核酸。在特定實施例中，藉由噬菌體擴增、細胞生長或聚合酶鏈反應擴增核酸。

在一些實施例中，譜系為免疫球蛋白單一可變區域譜系，例如其結合VEGF且為VEGF之拮抗劑。在特定實施例中，免疫球蛋白單一可變區域為重鏈可變區域。在更特定實施例中，重鏈可變區域為人類重鏈可變區域。在其他實施例中，免疫球蛋白單一可變區域為輕鏈可變區域。在特定實施例中，輕鏈可變區域為人類輕鏈可變區域。

在另一態樣中，本發明為一種自譜系選擇包含結合靶配位體(例如，VEGF)之免疫球蛋白單一可變區域(dAb)之蛋白酶抗性多肽的方法。在一實施例中，該方法包含提供包含多肽之譜系的噬菌體呈現系統，該等多肽包含免疫球蛋白單一可變區域之，在適於蛋白酶活性之條件下使噬菌體呈現系統與選自由彈性蛋白酶、白血球酶及胰蛋白酶組成之群之蛋白酶組合，及回收呈現包含結合靶配位體之免疫球蛋白單一可變區域之多肽的噬菌體。

在一些實施例中，使用100 μg/mL之蛋白酶，且在約37℃下將所組合之噬菌體呈現系統及蛋白酶培養隔夜。

在一些實施例中，藉由與靶配位體結合回收呈現包含結合該靶之免疫球蛋白單一可變區域之多肽的噬菌體。在其他實施例中，藉由淘選回收呈現包含結合靶配位體之免疫

球蛋白單一可變區域之多肽的噬菌體。

本發明亦係關於一種由本文中所述之方法可選擇或選擇之經分離蛋白酶抗性肽或多肽。在一特定實施例中，本發明係關於由本文中所述之方法可選擇或選擇之經分離蛋白酶(例如，胰蛋白酶、彈性蛋白酶、白血球酶)抗性免疫球蛋白單一可變區域(例如，人類抗體重鏈可變區域、人類抗體輕鏈可變區域)。

本發明亦係關於一種編碼由本文中所述之方法可選擇或選擇之蛋白酶抗性肽或多肽(例如，胰蛋白酶、彈性蛋白酶或白血球酶抗性免疫球蛋白單一可變區域)的經分離或重組核酸，及係關於包含該等核酸之載體(例如，表現載體)及宿主細胞。

本發明亦係關於一種製備由本文中所述之方法可選擇或選擇之蛋白酶抗性肽或多肽(例如，胰蛋白酶、彈性蛋白酶或白血球酶抗性免疫球蛋白單一可變區域)之方法，該方法包含將含有編碼蛋白酶抗性肽或多肽之重組核酸之宿主細胞維持在適於表現之條件下，藉此製造蛋白酶抗性肽或多肽。

本發明亦係關於一種由本文中所述之方法可選擇或選擇之蛋白酶抗性肽或多肽(例如，胰蛋白酶、彈性蛋白酶或白血球酶抗性免疫球蛋白單一可變區域)，其用於醫學中(例如，用於治療或診斷)。本發明亦係關於一種由本文中所述之方法可選擇或選擇之蛋白酶抗性肽或多肽(例如，胰蛋白酶、彈性蛋白酶或白血球酶抗性免疫球蛋白單一可

變區域)用於製造供治療疾病用之藥物的用途。本發明亦係關於治療疾病之方法，該方法包含向有需要之個體投與有效量之由本文中所述之方法可選擇或選擇之蛋白酶抗性肽或多肽(例如，胰蛋白酶、彈性蛋白酶或白血球酶抗性免疫球蛋白單一可變區域)。

本發明亦係關於一種確定樣品中是否存在VEGF或樣品中存在多少VEGF之診斷套組，該套組包含本發明之多肽、免疫球蛋白可變區域(dAb)或拮抗劑及使用說明書(例如，確定樣品中VEGF之存在性及/或數量)。在一些實施例中，套組進一步包含一或多種輔助試劑，諸如合適緩衝液或合適偵測試劑(例如，結合本發明之多肽或dAb或與其締合或接合之部分的經可偵性標記之抗體或其抗原結合片段)。

本發明亦係關於一種包含固體表面的裝置，可在該固體表面上固定本發明之多肽、拮抗劑或dAb以使所固定多肽或dAb結合VEGF。可使用上面可固定抗體或其抗原結合片段之任何合適固體表面，例如，玻璃、塑膠、碳水化合物(例如，瓊脂糖珠粒)。必要時，支撐物可含有或經改質以含有有助於固定之想要官能基。裝置及/或支撐物可具有任何合適形狀，例如片、桿、帶、板、載玻片、珠粒、小球、盤狀物、凝膠、試管、球體、晶片、板或器皿及其類似物。在一些實施例中，該裝置為量桿。

【實施方式】

在本說明書內，已參考實施例以使得能夠編寫清楚且簡

明之說明書之方式描述本發明。希望且應瞭解，在不脫離本發明之情況下，實施例可不同地組合或分離。

除非另有規定，否則本文中所使用之所有技術及科學術語具有一般熟習此項技術(例如，細胞培養、分子遺傳學、核酸化學、雜交技術及生物化學)者通常所理解之相同之含義。關於分子、遺傳及生化法(通常參見，Sambrook等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual，第2版(1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.及Ausubel等人，Short Protocols in Molecular Biology (1999)第4版，John Wiley & Sons, Inc.，其係以引用之方式併入本文中)及化學方法，使用標準技術。

如本文中所使用，術語"血管內皮生長因子(VEGF)拮抗劑"或"抗VEGF拮抗劑"或其類似物係指結合VEGF且可抑制VEGF之(亦即，一或多種)功能之藥劑(例如，分子、化合物)。

如本文中所使用，"肽"係指經由肽鍵結合在一起之約2個至約50個胺基酸。

如本文中所使用，"多肽"係指經由肽鍵結合在一起之至少約50個胺基酸。多肽通常包含三級結構且摺疊為功能區域。

如本文中所使用，"抗蛋白酶降解"肽或多肽(例如，區域抗體(dAb))當在適於蛋白酶活性之條件下與蛋白酶一起培養時大體上不會被蛋白酶降解。當在適於蛋白酶活性之溫

度，例如在37℃或50℃下與蛋白酶一起培養約1小時後不超過約25%、不超過約20%、不超過約15%、不超過約14%、不超過約13%、不超過約12%、不超過約11%、不超過約10%、不超過約9%、不超過約8%、不超過約7%、不超過約6%、不超過約5%、不超過約4%、不超過約3%、不超過約2%、不超過約1%或大體上無蛋白質被蛋白酶降解時，多肽(例如，dAb)大體上不降解。舉例而言，。可使用任何合適方法評估蛋白質降解，例如由SDS-PAGE或由如本文中所述之功能檢定(例如，配位體結合)。

如本文中所使用，"呈現系統"係指其中多肽或肽之集合易於基於想要之特徵(諸如物理、化學或功能特徵)加以選擇之系統。呈現系統可為多肽或肽之合適譜系(例如，在溶液中，固定於合適支撐物上)。呈現系統亦可為採用細胞表現系統(例如，於(例如)經轉型、感染、轉染或轉導細胞中表現核酸庫及於細胞表面上呈現經編碼多肽)或非細胞表現系統(例如，乳液隔室化及呈現)之系統。例示性呈現系統使核酸之編碼功能與由核酸所編碼之多肽或肽之物理、化學及/或功能特徵相關聯。當採用該呈現系統時，可選擇具有想要之物理、化學及/或功能特徵之多肽或肽，且可容易地分離或回收編碼所選擇之多肽或肽之核酸。此項技術已知許多使核酸之編碼功能與多肽或肽之物理、化學及/或功能特徵相關聯之呈現系統，例如噬菌體呈現(bacteriophage display/phage display)(例如，噬質體呈現)、核糖體呈現、乳液隔室化及呈現、酵母呈現、嘌呤

黴素呈現、細菌呈現、質體上之呈現、共價呈現及其類似者。(例如參見EP 0436597(Dyax)、美國專利第6,172,197號(McCafferty等人)、美國專利第6,489,103號(Griffiths等人)。)

如本文中所使用，"譜系"係指以胺基酸序列多樣性為特徵之多肽或肽之集合。譜系之個體成員可具有常見特徵，諸如常見結構特點(例如，常見核心結構)及/或常見功能特徵(例如，結合常見配位體(例如，一般配位體或靶配位體)之能力)。

如本文中所使用，"功能"描述具有生物活性、諸如特異性結合活性之多肽或肽。舉例而言，術語"功能多肽"包括經由抗原結合位點結合靶抗原之抗體或其抗原結合片段。

如本文中所使用，"一般配位體"係指結合給定譜系之相當一部分(例如，大體上所有)功能成員之配位體。一般配位體(例如，常見一般配位體)可結合給定譜系之許多成員，即使該等成員可能對常見靶配位體不具有結合特異性。多肽上存在功能一般配位體結合位點(如結合一般配位體之能力所指示)通常指示多肽經適當摺疊且具有功能。一般配位體之合適實例包括超抗原、結合表現於譜系之相當一部分功能成員上之抗原決定基之抗體及其類似者。

"超抗原"為技術術語，其係指與免疫球蛋白超家族之成員在不同於該等蛋白質之靶配位體結合位點之位點處相互作用之一般配位體。葡萄球菌腸毒素為與T-細胞受體相互

作用之超抗原實例。結合抗體之超抗原包括結合IgG恆定區之蛋白質G(Bjorck及Kronvall, *J. Immunol.*, 133:969 (1984))；結合IgG恆定區及V_H區域之蛋白質A(Forsgren及Sjoquist, *J. Immunol.*, 97:822 (1966))；及結合V_L區域之蛋白質L(Bjorck, *J. Immunol.*, 140:1194 (1988))。

如本文中所使用，"靶配位體"係指多肽或肽特異性或選擇性結合之配位體。舉例而言，當多肽為抗體或其抗原結合片段時，靶配位體可為任何想要之抗原或抗原決定基。與靶抗原之結合係視具有功能性之多肽或肽而定。

如本文中所使用，抗體係指源自任何天然產生抗體之物種或由DNA重組技術產生的自血清、B細胞、融合瘤、轉染瘤、酵母或細菌分離的IgG、IgM、IgA、IgD或IgE或片段(諸如Fab、$F(ab')_2$、Fv、雙硫鍵鍵結之Fv、scFv、封閉構形多特異性抗體、雙硫鍵鍵結之scFv、雙抗體)。

如本文中所使用，"抗體格式(antibody format)"係指其中可合併一或多個抗體可變區域以在結構上賦予抗原結合特異性之任何合適多肽結構。此項技術已知多種合適抗體格式，諸如嵌合抗體、人化抗體、人類抗體、單鏈抗體、雙特異性抗體、抗體重鏈、抗體輕鏈、抗體重鏈及/或輕鏈之同元二聚體及異元二聚體、任何上述各者之抗原結合片段(例如，Fv片段(例如單鏈Fv(scFv)、雙硫鍵鍵結之Fv)、Fab片段、Fab'片段、$F(ab')_2$片段)、單一抗體可變區域(例如，dAb、V_H、V_{HH}、V_L)及任何上述各者之經修飾形式(例如經由共價連接聚乙二醇或其他合適聚合物或人化V_{HH}

來修飾)。

短語"免疫球蛋白單一可變區域"係指獨立於其他V區或區域特異性結合抗原或抗原決定基之抗體可變區域(V_H、V_{HH}、V_L)。免疫球蛋白單一可變區域可以某一格式(例如同元或異元多聚體)與其他可變區或可變區域一起存在，其中該等其他區或區域不為單一免疫球蛋白可變區域之抗原結合所需(亦即，其中免疫球蛋白單一可變區域獨立於其他可變區域結合抗原)。"區域抗體"或"dAb"與本文中所使用之術語"免疫球蛋白單一可變區域"相同。"單一免疫球蛋白可變區域"與本文中所使用之術語"免疫球蛋白單一可變區域"相同。"單一抗體可變區域"與本文中所使用之術語"免疫球蛋白單一可變區域"相同。在一實施例中，免疫球蛋白單一可變區域為人類抗體可變區域，且包括來自其他物種之單一抗體可變區域，諸如齧齒動物(例如，如WO 00/29004中所揭示，其內容係以引用之方式整體併入本文中)、護士鯊(nurse shark)及駱駝類(*Camelid*)V_{HH} dAb。駱駝類V_{HH}為自產生天然缺少輕鏈之重鏈抗體之包括駱駝、美洲駝、羊駝、單峰駱駝及原駝之物種獲得的免疫球蛋白單一可變區域多肽。V_{HH}可為人化的。

"區域"為具有獨立於蛋白質其餘部分之三級結構之摺疊蛋白質結構。區域通常會產生蛋白質之離散功能性質，且在許多狀況下，可在不損失蛋白質之其餘部分及/或區域之功能之情況下，添加至其他蛋白質中、自其他蛋白質中移除或轉移至其他蛋白質中。"單一抗體可變區域"為包含

具有抗體可變區域特徵之序列之摺疊多肽區域。因此，其包括完全抗體可變區域及(例如)其中一或多個環已經被不具有抗體可變區域之特徵之序列置換的經修飾可變區域，或已經被截斷或包含N-末端或C-末端延伸之抗體可變區域，以及保留全長區域之至少結合活性及特異性之可變區域的摺疊片段。

術語"庫"係指異源多肽或核酸之混合物。庫包含各具有單一多肽或核酸序列之成員。就此而論，"庫"與"譜系"同義。庫成員之間的序列差異產生庫中所存在之多樣性。庫可採取多肽或核酸之簡單混合物形式或可呈經核酸庫轉型之例如細菌、病毒、動物或植物細胞及其類似者之生物體或細胞形式。在一實施例中，各個體生物或細胞僅含有一個或有限數目之庫成員。在一實施例中，將核酸併入表現載體中以允許表現由核酸所編碼之多肽。因此，在一態樣中，庫可採取宿主生物體群體之形式，各生物體含有一或多個含有單個呈核酸形式之庫成員的表現載體複本，該庫成員可經表現以產生相應多肽成員之核酸形式之庫成員。因此，宿主生物體群體具有編碼多樣性多肽大譜系之潛能。

"通用構架"為對應於如Kabat("Sequences of Proteins of Immunological Interest", US Department of Health and Human Services)所定義之在序列方面保守之抗體區或對應於如Chothia及Lesk, (1987) J. Mol. Biol. 196:910-917所定義之人類生殖系免疫球蛋白譜系或結構的單一抗體構架序

列。庫及譜系可使用單一構架或一組該等構架，儘管僅高變區中存在變異但已發現其仍准許實際上任何結合特異性之起源。

如本文中所使用，術語"劑量"係指一次(單位劑量)或在規定時間間隔內分兩次或兩次以上投藥向個體投與之配位體之數量。舉例而言，劑量可指在1天(24小時)(每日劑量)、2天、1週、2週、3週或一或多個月之時程內向個體投與(例如，單次投藥或兩次或兩次以上投藥)之配位體(例如，包含結合靶抗原之免疫球蛋白單一可變區域之配位體)之數量。劑量之間的間隔可為任何想要之時間量。

短語"半衰期"係指配位體(例如，dAb、多肽或拮抗劑)之血清濃度(例如)歸因於天然機制所致之配位體降解及/或配位體清除或隔離而活體內減小50%所需之時間。本發明之配位體在活體內係為穩定的且其半衰期可因結合抗降解及/或清除或隔離之分子而增加。該等分子通常為本身具有長活體內半衰期之天然存在之蛋白質。若配位體之功能活性在活體內比對半衰期增加分子不具有特異性之類似配位體持續更長之時間，則其半衰期增加。舉例而言，對人類血清白蛋白(HAS)及靶分子具有特異性之配位體係可比於對HSA不存在特異性(即不結合HSA但結合另一分子)之相同配位體。舉例而言，其可結合細胞上之第三靶。半衰期通常增加10%、20%、30%、40%、50%或以上。2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍或以上範圍內之半衰期之增加為可能的。另外或其他，高達30倍、

40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、150倍範圍內之半衰期之增加為可能的。

如本文中所使用，"流體動力學尺寸"係指基於分子擴散通過水溶液之分子(例如，蛋白質分子、配位體)表觀尺寸。可使得蛋白質擴散或運動通過溶液獲得蛋白質之表觀尺寸，其中該尺寸係以蛋白質粒子之"斯托克斯半徑(Stokes radius)"或"流體動力學半徑"給出。蛋白質之"流體動力學尺寸"視質量與形狀(構形)而定，如此兩個具有相同分子質量之蛋白質基於蛋白質之總構形可能具有不同流體動力學尺寸。

如本文中所提及，術語"競爭"意謂第一靶與其同源靶結合區域之結合在存在對該同源靶具有特異性之第二結合區域的情況下受到抑制。舉例而言，結合可能(例如)因結合區域之物理阻斷或結合區域之結構或環境之改變以致其對靶之親和力(affinity或avidity)減小而在空間上受到抑制。關於如何執行競爭ELISA及競爭BiaCore實驗以確定第一與第二結合區域之間的競爭的詳情，參見WO2006038027。

如下執行兩個序列之間的"同源性"或"一致性"或"相似性"之計算(該等術語在本文中可互換使用)。出於最佳比較目的比對序列(例如，為最佳比對，可在第一與第二胺基酸或核酸序列之一個或兩個中引入間隙，且出於比較之目的，可忽視非同源序列)。在一實施例中，出於比較之目的所比對之參考序列之長度為至少參考序列之長度的至少30%、或至少40%、或至少50%、或至少60%、或至少

70%、80%、90%、100%。隨後比較相應胺基酸位置或核苷酸位置處之胺基酸殘基或核苷酸。當第一序列中之某一位置由與第二序列中之相應位置相同之胺基酸殘基或核苷酸佔據時，則分子在該位置處一致(如本文中所使用，胺基酸或核酸"同源性"等效於胺基酸或核酸"一致性")。兩個序列之間的一致性%係隨考慮為最佳比對兩個序列所引入之缺口之數目及各間隙之長度的序列所共享之一致位置之數目而變化。可使用算法BLAST 2 Sequences使用缺省參數(Tatusova, T. A.等人，FEMS Microbiol Lett, 174:187-188(1999))準備且確定如本文中所定義之胺基酸及核苷酸序列比對及同源性、相似性或一致性。

選擇方法

在一實施例中，本發明係關於由選擇具有想要之生物活性(例如，結合VEGF)之蛋白酶抗性肽及多肽的方法選擇的多肽及dAb，例如抗VEGF dAb。方法中使用兩個選擇壓力以產生選擇高度穩定且抗蛋白酶降解且具有想要之生物活性之多肽的高效過程。如本文中所述，蛋白酶抗性肽及多肽通常保留生物活性。相反，蛋白酶敏感肽及多肽在本文中所述之方法中會被蛋白酶裂解或分解，且因此喪失其生物活性。因此，通常基於諸如結合活性之生物活性選擇蛋白酶抗性肽或多肽。

本文中所述之方法提供數個優點。舉例而言，如本文中所揭示及例示，經選擇而抗一種蛋白酶(例如，胰蛋白酶)之蛋白水解降解的可變區域、拮抗劑、肽或多肽亦對其他

蛋白酶(例如，彈性蛋白酶、白血球酶)降解具有抗性。在一實施例中，蛋白酶抗性與肽或多肽之較高熔融溫度(Tm)相關。較高熔融溫度指示較穩定可變區域、拮抗劑、肽及多肽。在一實施例中，抗蛋白酶降解亦與結合靶配位體之高親和力相關。因此，本文中所述之方法提供一種選擇、分離及/或回收具有想要之生物活性且因其具蛋白酶抗性且穩定而極適於活體內治療及/或診斷使用之可變區域、拮抗劑、肽、多肽的有效方式。在一實施例中，蛋白酶抗性與改良之PK(例如，比不具蛋白酶抗性之可變區域、拮抗劑、肽或多肽改良)相關。改良之PK可為改良之AUC(曲線下面積)及/或改良之半衰期。在一實施例中，蛋白酶抗性與可變區域、拮抗劑、肽或多肽對剪切力及/或熱應力之改良穩定性及/或噴霧期間減小之聚集傾向(例如，比不具蛋白酶抗性之可變區域、拮抗劑、肽或多肽改良)相關。在一實施例中，蛋白酶抗性與改良之儲存穩定性(例如，比不具蛋白酶抗性之可變區域、拮抗劑、肽或多肽改良)相關。在一態樣中，提供一個、二個、三個、四個或所有該等優點，該等優點為抗蛋白酶降解、較高Tm及結合靶配位體之高親和力。

選擇方法

在一態樣中，提供一種自肽及多肽之庫或譜系(例如，呈現系統)選擇、分離及/或回收抗蛋白酶(例如一或多種蛋白酶)降解之肽或多肽之方法。在一實施例中，該方法為自肽及多肽之庫或譜系(例如，呈現系統)選擇、分離及/或

回收抗蛋白酶(例如，一或多種蛋白酶)降解之多肽之方法。該方法通常包含提供肽或多肽之庫或譜系，在適於蛋白酶(例如，胰蛋白酶、彈性蛋白酶、白血球酶、胰酶、痰)活性之條件下使該庫或該譜系與蛋白酶組合，及選擇、分離及/或回收抗蛋白酶降解且具有想要之生物活性之肽或多肽。歸因於蛋白酶之活性，由蛋白酶降解之肽或多肽通常生物活性減小或喪失其生物活性。因此，可使用基於生物活性之方法選擇、分離及/或回收抗蛋白酶降解之肽或多肽，該生物活性諸如結合活性(例如，結合一般配位體、結合特異性配位體、結合受質)、催化活性或其他生物活性。

在適於蛋白酶(例如，一或多種蛋白酶)之蛋白水解活性之條件下使肽或多肽之庫或譜系與蛋白酶組合。適於蛋白酶及具有蛋白水解活性之生物製劑或混合物之蛋白水解活性的條件為此項技術所熟知或可由一般熟習此項技術者容易地確定。必要時，可(例如)藉由在一定範圍之pH值條件、蛋白酶濃度、溫度下評估蛋白酶活性及/或藉由改變使庫或譜系與蛋白酶反應之時間之量來鑑別或優化合適條件。舉例而言，在一些實施例中，蛋白酶(例如，胰蛋白酶)與肽或多肽(例如，可變區域)之比率(以莫耳/莫耳計)為800比80,00(例如，8,000比80,000)蛋白酶：肽或多肽，例如當使用10微克/毫升蛋白酶時，比率為800比80,000蛋白酶：肽或多肽；或當使用100微克/毫升蛋白酶時，比率為8,000比80,000蛋白酶：肽或多肽。在一實施例中，蛋白酶

(例如，胰蛋白酶)與肽或多肽(例如，可變區域)之比率(以重量/重量、例如微克/微克計)為1,600比160,000(例如，16,000比160,000)蛋白酶：肽或多肽，例如當使用10微克/毫升蛋白酶時，比率為1,600比160,000蛋白酶：肽或多肽；或當使用100微克/毫升蛋白酶時，比率為16,000比160,000蛋白酶：肽或多肽。在一實施例中，使用濃度為至少100或1000微克/毫升之蛋白酶，且蛋白酶(例如，胰蛋白酶)與肽或多肽(例如，可變區域)之蛋白酶：肽比率(以莫耳/莫耳計)為8,000比80,000蛋白酶：肽或多肽。在一實施例中，使用濃度為至少10微克/毫升之蛋白酶，且蛋白酶(例如，胰蛋白酶)與肽或多肽(例如，可變區域)之蛋白酶：肽比率(以莫耳/莫耳計)為800比80,000蛋白酶：肽或多肽。在一實施例中，蛋白酶(例如，胰蛋白酶)與肽或多肽(例如，可變區域)之比率(以重量/重量、例如微克/微克計)為1600比160,000蛋白酶：肽或多肽，例如當C為10微克/毫升時；或當C或C'為100微克/毫升時，比率為16,000比160,000蛋白酶：肽或多肽。在一實施例中，濃度(c或c')為至少100或1000微克/毫升蛋白酶。為測試個體或經分離肽或多肽(例如，免疫球蛋白可變區域)，例如早已自譜系或庫分離之肽或多肽，可向肽或多肽存於合適緩衝液(例如，PBS)中之溶液中添加蛋白酶以製得肽或多肽/蛋白酶溶液，諸如至少約0.01%(w/w)蛋白酶/肽或多肽、約0.01%至約5%(w/w)蛋白酶/肽或多肽、約0.05%至約5%(w/w)蛋白酶/肽或多肽、約0.1%至約5%(w/w)蛋白酶/肽或多肽、約

0.5%至約5%(w/w)蛋白酶/肽或多肽、約1%至約5%(w/w)蛋白酶/肽或多肽、至少約0.01%(w/w)蛋白酶/肽或多肽、至少約0.02%(w/w)蛋白酶/肽或多肽、至少約0.03%(w/w)蛋白酶/肽或多肽、至少約0.04%(w/w)蛋白酶/肽或多肽、至少約0.05%(w/w)蛋白酶/肽或多肽、至少約0.06%(w/w)蛋白酶/肽或多肽、至少約0.07%(w/w)蛋白酶/肽或多肽、至少約0.08%(w/w)蛋白酶/肽或多肽、至少約0.09%(w/w)蛋白酶/肽或多肽、至少約0.1%(w/w)蛋白酶/肽或多肽、至少約0.2%(w/w)蛋白酶/肽或多肽、至少約0.3%(w/w)蛋白酶/肽或多肽、至少約0.4%(w/w)蛋白酶/肽或多肽、至少約0.5%(w/w)蛋白酶/肽或多肽、至少約0.6%(w/w)蛋白酶/肽或多肽、至少約0.7%(w/w)蛋白酶/肽或多肽、至少約0.8%(w/w)蛋白酶/肽或多肽、至少約0.9%(w/w)蛋白酶/肽或多肽、至少約1%(w/w)蛋白酶/肽或多肽、至少約2%(w/w)蛋白酶/肽或多肽、至少約3%(w/w)蛋白酶/肽或多肽、至少約4%(w/w)蛋白酶/肽或多肽或約5%(w/w)蛋白酶/肽或多肽之溶液。可在適於蛋白酶活性之溫度(例如，室溫，約37℃)下培養混合物，且可以時間間隔(例如，1小時、2小時、3小時等)採集樣品。可使用任何合適方法、諸如SDS-PAGE分析或配位體結合就蛋白質降解分析樣品，且可使用結果建立降解時程。

在本文中所述之方法中可使用任何想要之蛋白酶。舉例而言，可使用單一蛋白酶、不同蛋白酶之任何想要之組合或具有蛋白水解活性之任何生物製劑、生物提取物或生物

組織勻漿。不必要知道所使用之蛋白酶之一致性。可單獨或以任何想要之組合使用之蛋白酶之合適實例包括絲胺酸蛋白酶、半胱胺酸蛋白酶、天冬胺酸蛋白酶、硫醇蛋白酶、基質金屬蛋白酶、羧基肽酶(例如，羧基肽酶A、羧基肽酶B)、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、彈性蛋白酶、白血球酶、胰酶、凝血酶、纖溶酶、組織蛋白酶(例如，組織蛋白酶G)、蛋白酶(例如，蛋白酶1、蛋白酶2、蛋白酶3)、嗜熱菌蛋白酶、凝乳酶、腸激酶、卡斯蛋白酶(例如，卡斯蛋白酶1、卡斯蛋白酶2、卡斯蛋白酶4、卡斯蛋白酶5、卡斯蛋白酶9、卡斯蛋白酶12、卡斯蛋白酶13)、鈣激活蛋白酶、無花果蛋白酶、梭菌蛋白酶、獼猴桃蛋白酶、鳳梨蛋白酶、分離酶及其類似物。具有蛋白水解活性之合適生物提取物、組織勻漿及製劑包括痰、黏液(例如，胃黏液、鼻黏液、支氣管黏液)、支氣管肺泡灌洗液、肺組織勻漿、肺提取物、胰腺提取物、胃液、唾液、眼淚及其類似物。蛋白酶係以適於發生蛋白水解降解之量使用。舉例而言，如本文中所述，可使用約0.01%至約5%(w/w，蛋白酶/肽或多肽)蛋白酶。當使蛋白酶與包含肽或多肽譜系之呈現系統(例如，噬菌體呈現系統)組合時，例如，可使用濃度為約10 μg/ml至約3 mg/ml、約10 μg/ml、約20 μg/ml、約30 μg/ml、約40 μg/ml、約50 μg/ml、約60 μg/ml、約70 μg/ml、約80 μg/ml、約90 μg/ml、約100 μg/ml、約200 μg/ml、約300 μg/ml、約400 μg/ml、約500 μg/ml、約600 μg/ml、約700

μg/ml、約800 μg/ml、約900 μg/ml、約1000 μg/ml、約1.5 mg/ml、約2 mg/ml、約2.5 mg/ml或約3 mg/ml之蛋白酶。

在適於蛋白酶活性之溫度下，蛋白酶與肽或多肽之集合(庫或譜系)一起培育。舉例而言，可在約20℃至約40℃(例如室溫、約20℃、約21 ℃、約22℃、約23℃、約24℃、約25℃、約26℃、約27℃、約28℃、約29℃、約30℃、約31℃、約32℃、約33℃、約34℃、約35℃、約36℃、約37℃、約38℃、約39℃、約40℃)之溫度培育蛋白酶及肽或多肽之集合。將蛋白酶及肽或多肽之集合一起培育一段足以發生蛋白水解降解之時間。舉例而言，可將肽或多肽之集合與蛋白酶一起培育約30分鐘至約24或約48小時。在一些實例，將肽或多肽之集合與蛋白酶一起培育隔夜，或至少約30分鐘、約1小時、約1.5小時、約2小時、約3小時、約4小時、約5小時、約6小時、約7小時、約8小時、約9小時、約10小時、約11小時、約12小時、約13小時、約14小時、約15小時、約16小時、約17小時、約18小時、約19小時、約20小時、約21小時、約22小時、約23小時、約24小時、約48小時或更長。

通常希望，至少在早期各輪選擇中(例如當使用呈現系統時)，與不包括和蛋白酶一起培育之選擇相比，蛋白酶使得所選擇之具有想要生物活性之純系數減少至少一個數量級。在特定實例中，該等方法中所使用之蛋白酶量及條件足以使所回收到之純系數減少至少約1個對數(10倍)、至少約2個對數(100倍)、至少約3個對數(1000倍)或至少約4

個對數(10,000倍)。造成想要之回收純系減少之適合蛋白酶量及培育條件可使用習知方法及/或本文中所提供之指導輕易地確定。

可使蛋白酶與肽或多肽之集合組合且使用任何合適方法(例如，活體外、活體內或離體)培養。舉例而言，可使蛋白酶與肽或多肽之集合組合於合適容器中且在適於蛋白酶活性之溫度下保持固定、搖動、震盪、渦旋或其類似情況。必要時，可使蛋白酶與肽或多肽之集合組合於活體內或離體系統中，諸如藉由將多肽之集合(例如，噬菌體呈現庫或譜系)引入合適動物(例如，小鼠)中，且在足以使蛋白酶活性起作用之時間過後，回收肽或多肽之集合。在另一實例中，用多肽之集合(例如，噬菌體呈現庫或譜系)灌注器官或組織，且在足以使蛋白酶活性起作用之時間過後，回收多肽之集合。

培養後，可基於諸如結合活性之想要之生物活性選擇蛋白酶抗性肽或多肽。必要時，可在選擇之前添加蛋白酶抑制劑。可使用大體上不會干擾選擇方法之任何合適蛋白酶抑制劑(或兩種或兩種以上蛋白酶抑制劑之組合)。合適蛋白酶抑制劑之實例包括α1-抗胰蛋白酶、α2-巨球蛋白、阿嗎他定(amastatin)、抗痛素(antipain)、抗凝血酶III、抑肽酶、4-(2-胺基乙基)苯磺醯氟鹽酸鹽(AEBSF)、(4-脒基-苯基)-甲烷-磺醯氟(APMSF)、貝他定(bestatin)、苯甲脒、抑凝乳蛋白酶素、3,4-二氯異香豆素、氟磷酸二異丙酯(DIFP)、E-64、乙二胺四乙酸(EDTA)、彈性蛋白酶抑制劑

(elastatinal)、亮肽素、N-乙基馬來醯亞胺、苯基甲基磺醯氟(PMSF)、胃酶抑素、1,10-菲羅啉(Phenanthroline)、膦醯二肽(phosphoramidon)、絲胺酸蛋白酶抑制劑、N-甲苯磺醯基-L-離胺酸-氯甲基酮(TLCK)、Na-甲苯磺醯基-Phe-氯甲基酮(TPCK)及其類似物。另外，可在購得許多含有數類蛋白酶抑制劑之製劑(例如，Roche Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets™(Roche Diagnostics Corporation; Indianapolis, IN, USA)，其抑制胰凝乳蛋白酶、嗜熱菌蛋白酶、木瓜蛋白酶、鏈黴蛋白酶、胰腺提取物及胰蛋白酶)。

可使用想要之生物活性選擇方法選擇蛋白酶抗性肽或多肽，該方法使得具有想要之生物活性之肽及多肽不同於不具有想要之生物活性之肽及多肽且對其加以選擇。已經被蛋白酶分解或裂解之肽或多肽通常喪失其生物活性，而蛋白酶抗性肽或多肽仍具功能性。因此，可使用生物活性之合適檢定選擇蛋白酶抗性肽或多肽。舉例而言，可使用合適結合檢定(例如，ELISA，淘選)評估常見結合功能(例如，結合一般配位體、結合特異性配位體或結合受質)。舉例而言，可藉由淘選或使用合適親和力基質選擇、分離及/或回收結合靶配位體或諸如蛋白質A、蛋白質L之一般配位體或抗體之多肽。可藉由向合適容器(例如，試管、皮氏培養皿(petri dish))中添加配位體(例如，一般配位體、靶配位體)之溶液且使配位體變得沈積或塗佈於容器壁上之來實現淘選。可洗除過量配位體且可向容器中添加

多肽(例如，噬菌體呈現庫)且將容器維持在適於多肽結合固定配位體之條件下。可洗除未結合多肽且可使用諸如刮削或(例如)降低pH值之任何合適方法回收結合多肽。

當使用噬菌體呈現系統時，可在噬菌體ELISA中測試結合。可根據任何合適程序執行噬菌體ELISA。在一實例中，可由ELISA就與所選擇之靶配位體或一般配位體之結合篩選各輪選擇下所產生之噬菌體群體以鑑別呈現蛋白酶抗性肽或多肽之噬菌體。必要時，可由例如ELISA使用例如針對C-末端或N-末端標籤之試劑就與靶配位體或一般配位體之結合測試可溶性肽及多肽(例如參見，Winter等人，(1994) *Ann. Rev. Immunology* 12, 433-55及其中所引用之參考文獻)。亦可由PCR產物之凝膠電泳(Marks等人，1991，同上；Nissim等人，1994，同上)、探測(Probing)(Tomlinson等人，1992, *J. Mol. Biol.* 227, 776)或藉由對載體DNA測序評估所選擇之噬菌體之多樣性。

除對VEGF具有特異性外，包含抗VEGF蛋白酶抗性多肽(例如，單一抗體可變區域)之拮抗劑或多肽(例如，雙特異性配位體)可對一般配位體或任何想要之靶配位體具有結合特異性，該一般配位體或靶配位體諸如人類或動物蛋白質，包括細胞激素、生長因子、細胞激素受體、生長因子受體、酶(例如，蛋白酶)、酶之輔因子、DNA結合蛋白、脂質及碳水化合物。

在一些實施例中，蛋白酶抗性肽或多肽(例如，dAb)或拮抗劑結合肺組織中之VEGF。在一實施例中，拮抗劑或

多肽亦結合肺組織中之另一靶。

當在本文中所述之方法中使用呈現系統(例如，使核酸之編碼功能與由核酸編碼之肽或多肽之功能特徵相關聯的呈現系統)時，擴增或增加編碼所選擇之肽或多肽之核酸的複本數通常有利。此提供獲得足夠數量之供使用本文中所述之方法或其他合適方法之其他輪選擇用或供製備其他譜系(例如，親和力成熟譜系)用之核酸及/或肽或多肽的有效方式。因此，在一些實施例中，該等方法包含使用呈現系統(例如，使核酸之編碼功能與由核酸編碼之肽或多肽之功能特徵相關聯之呈現系統，諸如噬菌體呈現)，且進一步包含擴增或增加編碼所選擇之肽或多肽之核酸的複本數。核酸可使用任何合適方法、諸如藉由噬菌體擴增、細胞生長或聚合酶鏈反應擴增。

本文中所述之方法可用作必要時可包含其他合適選擇方法之分離蛋白酶抗性肽或多肽(例如，dAb)之程序的部分。在該等情形中，可在程序之任何想要之點採用本文中所述之方法，諸如使用其他選擇方法之前或之後。如本文中所描述且例示，本文中所述之方法亦可用於提供兩輪或兩輪以上選擇。

在一實例中，提供一種選擇特異性結合VEGF且抗胰蛋白酶降解之肽或多肽(例如，dAb)的方法，該方法包含提供肽或多肽之庫或譜系，在適於胰蛋白酶蛋白水解分解之條件下使庫或譜系與胰蛋白酶組合及選擇、分離及/或回收抗胰蛋白酶降解且特異性結合VEGF之肽或多肽。

在特定實施例中，提供選擇抗胰蛋白酶降解且特異性結合VEGF之免疫球蛋白單一可變區域(dAb)之方法。在該等實施例中，提供包含dAb之庫或譜系且在適於胰蛋白酶(或包含胰蛋白酶之生物製劑、提取物或組織勻漿)蛋白水解分解之條件下使其與胰蛋白酶組合。選擇結合VEGF之胰蛋白酶抗性dAb。舉例而言，胰蛋白酶抗性dAb當在37℃下在胰蛋白酶之0.04%(w/w)溶液中培養至少約2小時之時間時大體上不降解。在一實施例中，胰蛋白酶抗性dAb當在37℃下在胰蛋白酶之0.04%(w/w)溶液中培養至少約3小時之時間時大體上不降解。在一實施例中，胰蛋白酶抗性dAb當在37℃下在胰蛋白酶之0.04%(w/w)溶液中培養至少約4小時、至少約5小時、至少約6小時、至少約7小時、至少約8小時、至少約9小時、至少約10小時、至少約11小時或至少約12小時之時間時大體上不降解。

在一例示性實施例中，提供一種選擇抗胰蛋白酶降解且特異性結合VEGF之免疫球蛋白單一可變區域(dAb)之方法。該方法包含提供包含多肽譜系之噬菌體呈現系統，該等多肽包含免疫球蛋白單一可變區域，使噬菌體呈現系統與胰蛋白酶(100 μg/mL)組合且在約37℃下培養混合物(例如)隔夜(例如，約12-16小時)，及隨後選擇呈現特異性結合VEGF之dAb之噬菌體。

在另一實例中，該方法為選擇抗彈性蛋白酶降解之肽或多肽(例如，dAb)，其包含提供肽或多肽之庫或譜系，在適於彈性蛋白酶(或包含彈性蛋白酶之生物製劑、提取物

或組織勻漿)蛋白水解分解之條件下使庫或譜系與彈性蛋白酶組合，及選擇、分離及/或回收抗彈性蛋白酶降解且具有VEGF結合活性之肽或多肽。

在特定實施例中，提供一種選擇抗彈性蛋白酶降解且結合VEGF的免疫球蛋白單一可變區域(dAb)的方法。在該等實施例中，提供包含dAb之庫或譜系且在適於彈性蛋白酶(或包含彈性蛋白酶之生物製劑、提取物或組織勻漿)蛋白水解分解之條件下使其與彈性蛋白酶組合。選擇特異性結合VEGF之彈性蛋白酶抗性dAb。舉例而言，彈性蛋白酶抗性dAb當在37℃下在0.04%(w/w)彈性蛋白酶溶液中培養至少約2小時之時間時大體上不降解。在一實施例中，彈性蛋白酶抗性dAb當在37℃下在0.04%(w/w)彈性蛋白酶溶液中培養至少約12小時之時間時大體上不降解。在一實施例中，彈性蛋白酶抗性dAb當在37℃下在0.04%(w/w)彈性蛋白酶溶液中培養至少約24小時、至少約36小時或至少約48小時之時間時大體上不降解。

在一實施例中，提供一種選擇抗彈性蛋白酶降解且結合VEGF的免疫球蛋白單一可變區域(dAb)的方法。該方法包含提供包含多肽譜系之噬菌體呈現系統，該等多肽包含免疫球蛋白單一可變區域，使噬菌體呈現系統與彈性蛋白酶(約100 μg/ml)組合且將混合物在約37℃下培養(例如)隔夜(例如約12-16小時)，及隨後選擇呈現特異性結合VEGF之dAb的噬菌體。

在一實例中，提供一種選擇抗白血球酶降解之肽或多肽

(例如，dAb)之方法，該方法包含提供肽或多肽之庫或譜系，在適於白血球酶(或包含白血球酶之生物製劑、提取物或組織勻漿)蛋白水解分解之條件下使庫或譜系與白血球酶組合，及選擇、分離及/或回收抗白血球酶降解且具有特異性VEGF結合活性之肽或多肽。

在特定實施例中，提供一種選擇抗白血球酶降解且結合VEGF的免疫球蛋白單一可變區域(dAb)的方法。在該等實施例中，提供包含dAb之庫或譜系且在適於白血球酶(或包含白血球酶之生物製劑、提取物或組織勻漿)蛋白水解分解之條件下使其與白血球酶組合。選擇特異性結合VEGF之白血球酶抗性dAb。舉例而言，白血球酶抗性dAb當在37℃下在0.04%(w/w)白血球酶溶液中培養至少約2小時之時間時大體上不降解。在一實施例中，白血球酶抗性dAb當在37℃下在0.04%(w/w)白血球酶溶液中培養至少約12小時之時間時大體上不降解。在一實施例中，白血球酶抗性dAb當在37℃下在0.04%(w/w)白血球酶溶液中培養至少約24小時、至少約36小時或至少約48小時之時間時大體上不降解。

在一實施例中，提供一種選擇抗白血球酶降解且特異性結合VEGF的免疫球蛋白單一可變區域(dAb)的方法。該方法包含提供包含多肽譜系之噬菌體呈現系統，該等多肽包含免疫球蛋白單一可變區域，使噬菌體呈現系統與白血球酶(約100 μg/ml)組合且將混合物在約37℃下培養(例如)隔夜(例如約12-16小時)，及隨後選擇呈現特異性結合VEGF

之dAb的噬菌體。在另一態樣中，提供一種產生蛋白酶抗性肽或多肽(例如，dAb)譜系之方法。該方法包含提供肽或多肽譜系；在適於蛋白酶活性之條件下使肽或多肽譜系與蛋白酶組合；及回收複數種特異性結合VEGF之肽或多肽；藉此產生蛋白酶抗性肽或多肽譜系。適用於方法中之蛋白酶、呈現系統、蛋白酶活性之條件及選擇肽或多肽之方法係在本文中相對於其他方法描述。

在一些實施例中，使用包含肽或多肽譜系之呈現系統(例如，使核酸之編碼功能與由核酸編碼之肽或多肽之功能特徵相關聯的呈現系統)，且該方法進一步包含擴增或增加編碼複數種所選擇之肽或多肽之核酸的複本數。核酸可使用任何合適方法、諸如藉由噬菌體擴增、細胞生長或聚合酶鏈反應加以擴增。

在特定實施例中，提供產生包含抗VEGF dAb之蛋白酶抗性多肽之譜系的方法。該方法包含提供包含抗VEGF dAb之多肽譜系；在適於蛋白酶(例如，胰蛋白酶、彈性蛋白酶、白血球酶)活性之條件下使肽或多肽譜系與蛋白酶組合；及回收複數種包含對VEGF具有結合特異性之dAb之多肽。該方法可用於產生未經處理之譜系或偏向於想要之結合特異性之譜系，諸如基於對VEGF具有結合特異性之親本dAb的親和力成熟譜系。

多肽呈現系統

在一實施例中，提供用於本文中所述之方法中之肽或多肽之譜系或庫包含合適呈現系統。呈現系統可抗蛋白酶

(例如，單一蛋白酶或蛋白酶之組合及具有蛋白水解活性之任何生物提取物、組織勻漿或製劑(例如，痰、黏液(例如，胃黏液、鼻黏液、支氣管黏液)、支氣管肺泡灌洗液、肺組織勻漿、肺提取物、胰腺提取物、胃液、唾液、眼淚及其類似物))降解。在一實施例中，呈現系統及呈現系統與所呈現多肽之間的關聯為至少與譜系之大多數穩定肽或多肽一樣抗蛋白酶。此使得編碼所選擇之呈現多肽之核酸易於分離及/或擴增。

在一實例中，可自溶液中或共價或非共價連接於合適表面(諸如塑膠或玻璃(例如，微量滴定板、多肽陣列，諸如微陣列))之肽或多肽(例如，dAb)譜系選擇、分離及/或回收蛋白酶抗性肽或多肽。舉例而言，可使用以將各不同庫成員(例如，獨特肽序列)置放在陣列離散預定位置上之方式位於表面上之肽陣列。可由其在陣列中之空間位置確定該陣列中之各庫成員之一致性。可確定陣列中發生(例如)靶配位體與活性庫成員之間的結合相互作用之位置，從而基於空間位置鑑別活性成員之序列。(例如參見，美國專利第5,143,854號、WO 90/15070及WO 92/10092。)

在一實施例中，方法採用使核酸之編碼功能與由核酸編碼之多肽之物理、化學及/或功能特徵相關聯之呈現系統。該呈現系統可包含複數種可複製基因組，諸如噬菌體或細胞(細菌)。在一實施例中，呈現系統包含庫，諸如噬菌體呈現庫。

已描述許多合適噬菌體呈現系統(例如，單價呈現及多

價呈現系統)。(例如參見，Griffiths等人，美國專利第6,555,313 B1號(以引用之方式併入本文中)；Johnson等人，美國專利第5,733,743號(以引用之方式併入本文中)；McCafferty等人，美國專利第5,969,108號(以引用之方式併入本文中)；Mulligan-Kehoe，美國專利第5,702,892號(以引用之方式併入本文中)；Winter, G.等人，*Annu. Rev. Immunol.* 12:433-455 (1994)；Soumillion, P.等人，*Appl. Biochem. Biotechnol.* 47(2-3): 175-189 (1994)；Castagnoli, L.等人，*Comb. Chem. High Throughput Screen,* 4(2): 121-133 (2001)。)呈現於噬菌體呈現系統中之肽或多肽可呈現於任何合適噬菌體上，諸如絲狀噬菌體(例如，fd、M13、F1)、裂解性噬菌體(例如，T4、T7、λ)或RNA噬菌體(例如，MS2)。

通常產生或提供以與合適噬菌體外殼蛋白(例如，fd pIII蛋白)形成之融合蛋白形式呈現肽或噬菌體多肽譜系之噬菌體庫。融合蛋白可在噬菌體外殼蛋白之尖端或必要時在內部位置呈現肽或多肽。舉例而言，所呈現之肽或多肽可存在於pIII之區域1之胺基末端位置。(pIII之區域1亦稱為N1。)所呈現之多肽可與pIII直接融合(例如，pIII之區域1之N-末端)或使用連接子與pIII融合。必要時，融合物可進一步包含標籤(例如，myc抗原決定基、His標籤)。可使用任何合適方法產生包含以與噬菌體外殼蛋白形成之融合蛋白形式呈現之肽或多肽譜系之庫，該等方法諸如藉由將編碼所呈現之肽或多肽之噬菌體載體或噬質體(phagemid)載

體庫引入合適宿主細菌中，且培養所得細菌以產生噬菌體(例如，必要時使用合適輔助噬菌體或互補質體)。可使用諸如沈澱及離心之任何合適方法自培養物中回收噬菌體庫。

呈現系統可包含含有任何想要之量之多樣性的肽或多肽譜系。舉例而言，譜系可含有胺基酸序列具有對應於由生物體、生物體群(例如，自駱駝類分離之V_{HH} dAb序列之譜系)、想要之組織或想要之細胞類型表現之天然存在之多肽的肽或多肽或可含有具有隨機或隨機化之胺基酸序列之肽或多肽。必要時，多肽可共享共同核心或骨架。該譜系或該庫中之多肽可包含具有隨機或隨機化之胺基酸序列之規定區及常見胺基酸序列區。在某些實施例中，譜系中之所有或大體上所有多肽具有想要之類型，諸如想要之酶(例如，聚合酶)或想要之抗體之抗原結合片段(例如，人類V_H或人類V_L)。在實施例中，多肽呈現系統包含多肽譜系，其中各多肽包含抗體可變區域。舉例而言，譜系中之各多肽可含有V_H、V_L或Fv(例如，單鏈Fv)。

可使用任何合適方法將胺基酸序列多樣性引入肽或多肽或骨架之任何想要之區中。舉例而言，可藉由使用任何合適突變誘發方法(例如，低保真度PCR、寡核苷酸介導之突變誘發或定位突變誘發，使用NNK密碼子多樣化)或任何其他合適方法製備編碼多樣性多肽之核酸庫將胺基酸序列多樣性引入靶區、諸如抗體可變區域或疏水性區域之互補判定區中。必要時，可隨機化待要使多樣化之多肽之區。

構成譜系之多肽之尺寸基本上為一個需要選擇之問題，且不需要均一的多肽尺寸。在一實施例中，譜系中之多肽具有至少三級結構(形成至少一個區域)。

選擇/分離/回收

可使用任何合適方法自譜系或庫(例如，於呈現系統中)選擇、分離及/或回收蛋白酶抗性肽或多肽(例如，蛋白酶抗性多肽群體)。在一實施例中，基於可選擇之特徵(例如，物理特徵、化學特性、功能特徵)選擇或分離蛋白酶抗性多肽。合適之可選擇之功能特徵包括譜系中之肽或多肽之生物活性，例如與一般配位體(例如，超抗原)之結合、與靶配位體(例如，抗原、抗原決定基、受質)之結合、與抗體之結合(例如，經由肽或多肽上所表現之抗原決定基)，及催化活性。(例如參見，Tomlinson等人，WO 99/20749、WO 01/57065、WO 99/58655)。在一實施例中，選擇係基於特異性結合VEGF。在另一實施例中，選擇係基於所選擇之功能特徵以產生成員具有蛋白酶抗性之第二譜系，接著自該第二譜系中選擇特異性結合VEGF之成員。

在一些實施例中，自大體上所有蛋白酶抗性肽或多肽共享常見之可選擇之特徵的肽或多肽之庫或譜系選擇及/或分離蛋白酶抗性肽或多肽。舉例而言，蛋白酶抗性肽或多肽可選自大體上所有蛋白酶抗性肽或多肽結合常見一般配位體、結合常見靶配位體、結合常見抗體(或由常見抗體結合)或具有常見催化活性之庫或譜系。該類型之選擇尤

其適用於製備基於具有想要之生物活性的親本肽或多肽之蛋白酶抗性肽或多肽譜系，例如當執行免疫球蛋白單一可變區域之親和力成熟化作用時。

基於與常見一般配位體之結合選擇可產生含有所有或大體上所有為原始庫或譜系之組分的蛋白酶抗性肽或多肽之肽或多肽集合或群體。舉例而言，可藉由淘選或使用合適親和力基質選擇、分離及/或回收結合靶配位體或諸如蛋白質A、蛋白質L之一般配位體或抗體之肽或多肽。可藉由向合適容器(例如，試管、皮氏培養皿)中添加配位體(例如，一般配位體、靶配位體)之溶液且使配位體變得沈積或塗佈於容器壁上來實現淘選。可洗除過量配位體且可向容器中添加肽或多肽(例如，已與蛋白酶一起培養之譜系)且將容器維持在適於肽或多肽結合固定配位體之條件下。可洗除未結合肽或多肽且可使用諸如刮削或(例如)降低pH值之任何合適方法回收結合肽或多肽。

合適配位體親和力基質通常含有配位體共價或非共價連接之固體支撐物或珠粒(例如，瓊脂糖)。可使用分批法、管柱法或任何其他合適方法在適於使肽或多肽與基質上之配位體結合的條件下使親和力基質與肽或多肽(例如，已與蛋白酶一起培養之譜系)組合。可洗除不結合親和力基質之肽或多肽，且可使用任何合適方法溶離及回收結合肽或多肽，該合適方法諸如用較低pH值之緩衝液、用溫和變性劑(例如，尿素)或用競爭以與配位體結合之肽進行溶離。在一實例中，在適於譜系中之肽或多肽結合靶配位體

(VEGF)之條件下使經生物素標記靶配位體與譜系組合。使用固定抗生物素蛋白或抗生蛋白鏈菌素(例如，在珠粒上)回收結合肽或多肽。

在一些實施例中，一般配位體為抗體或其抗原結合片段。結合在庫或譜系之肽或多肽中大體上為保守的肽或多肽之結構特徵之抗體或抗原結合片段尤其適合作為一般配位體。適合用作分離、選擇及/或回收蛋白酶抗性肽或多肽之配位體之抗體及抗原結合片段可為單株或多株，且可使用任何合適方法製備。

庫/譜系

在其他態樣中，提供蛋白酶抗性肽及多肽譜系，編碼蛋白酶抗性肽及多肽之庫及產生該等庫及譜系之方法。

可使用任何合適方法製備或獲得編碼及/或含有蛋白酶抗性肽及多肽之庫。該庫可基於所關注之肽或多肽(例如，選自庫之抗VEGF肽或多肽)經設計以編碼蛋白酶抗性肽或多肽，或可使用本文中所述之方法選自另一庫。舉例而言，可使用合適之多肽呈現系統製備富集蛋白酶抗性多肽之庫。

在一實例中，如本文中所述，在適於蛋白酶活性條件下使包含呈現多肽(包含免疫球蛋白單一可變區域(例如，V_H、V_κ、V_λ))之譜系的噬菌體呈現庫與蛋白酶組合。基於想要之生物活性，諸如結合活性(例如，結合一般配位體、結合靶配位體)回收蛋白酶抗性多肽，從而產生富集蛋白酶抗性多肽之噬菌體呈現庫。在一實施例中，回收係

基於結合一般配位體以產生富集庫，接著基於特異性結合VEGF選擇該庫之抗VEGF成員。

在另一實例中，首先篩選包含呈現多肽(包含免疫球蛋白單一可變區域(例如，V_H、V_κ、V_λ))之譜系的噬菌體呈現庫以鑑別譜系中對想要之靶抗原(例如，VEGF)具有結合特異性之成員。回收具有想要之結合特異性之多肽集合，且如本文中所述，在適於蛋白水解活性之條件下使集合與蛋白酶組合。回收具有想要之靶結合特異性之蛋白酶抗性多肽集合，從而產生富集蛋白酶抗性且高親和力多肽之庫。如本文在另一實施例中所述，該選擇方法中之蛋白酶抗性與高親和力結合相關。

可使用任何合適方法容易地產生編碼想要類型之多肽譜系之庫。舉例而言，可獲得編碼想要類型之多肽(例如，聚合酶、免疫球蛋白可變區域)之核酸序列，且可(例如)藉由使用易錯(error-prone)聚合酶鏈反應(PCR)系統擴增核酸、藉由化學突變誘發(Deng等人，*J. Biol. Chem.*, 269:9533 (1994))或使用細菌突變菌株(Low等人，*J. Mol. Biol.*, 260:359 (1996))製備各含有一或多個突變之核酸集合。

在其他實施例中，可靶向核酸之特定區以供多樣化。使所選位置產生突變之方法亦為此項技術所熟知且包括(例如)在使用或不使用PCR之情況下使用錯配寡核苷酸或簡併寡核苷酸。舉例而言，已藉由使突變靶向抗原結合環建立合成抗體庫。已將隨機或半隨機抗體H3及L3區附加至生

殖系免疫球蛋白V基因片段以產生具有未突變構架區之大庫(Hoogenboom及Winter(1992)同上；Nissim等人，(1994)同上；Griffiths等人，(1994)同上；DeKruif等人，(1995)同上)。已擴展該多樣化以包括部分或所有其他抗原結合環(Crameri等人，(1996)*Nature Med.*, 2:100；Riechmann等人，(1995) *Bio/Technology*, 13:475；Morphosys, WO 97/08320，同上)。在其他實施例中，可例如由採用第一PCR產物作為"大引子(mega-primer)"之兩步PCR策略靶向核酸之特定區以供多樣化。(例如參見，Landt, O.等人，*Gene 96*:125-128(1990)。)亦可(例如)由SOE PCR實現靶向多樣化。(例如參見，Horton, R.M.等人，*Gene* 77:61-68(1989)。)

所選擇位置處之序列多樣性可藉由改變指定多肽序列之編碼序列以便可在該位置併入許多可能的胺基酸(例如，所有20種或其子集)來實現。使用IUPAC命名法，最通用密碼子為NNK，其可編碼所有胺基酸以及TAG終止密碼子。可使用NNK密碼子以引入所需之多樣性。亦使用實現相同終端之其他密碼子，包括NNN密碼子，其使得產生其他終止密碼子TGA及TAA。該靶向方法可使完全序列空間處於待探索之靶區域內。

該等庫可包含具有已知主鏈構形之蛋白酶抗性抗體多肽。(例如參見，Tomlinson等人，WO 99/20749。)

庫可在合適質體或載體中製備。如本文中所使用，載體係指用於將異源DNA引入細胞中以用於其表現及/或複製

之離散元件。可使用任何合適載體，包括質體(例如，細菌質體)、病毒或噬菌體載體、人造染色體及游離型載體。可使用該等載體進行簡單的選殖及突變誘發，或可使用表現載體驅動庫表現。載體及質體通常含有一或多個選殖位點(例如，多接頭)、複製起點及至少一個可選擇標記物基因。表現載體可進一步含有驅動多肽轉錄及轉譯之元件，諸如增強子元件、啟動子、轉錄終止信號、信號序列及其類似物。該等元件可以可操作性連接於編碼多肽之經選殖插入物以致當該表現載體維持在適於表現之條件下(例如，在合適宿主細胞中)時表現且產生多肽的方式排列。

選殖及表現載體通常含有使得載體能夠複製於一或多個所選擇之宿主細胞中之核酸序列。在選殖載體中，該序列通常為使得載體能夠獨立於宿主染色體DNA複製之序列且包括複製起點或自發複製序列。對於多種細菌、酵母及病毒，該等序列為吾人所熟知。質體pBR322之複製起點適於大多數革蘭氏陰性菌(Gram-negative bacteria)，2微米質體起點適於酵母，且多種病毒起點(例如，SV40、腺病毒)適用於在哺乳動物細胞中選殖載體。哺乳動物表現載體通常不需要複製起點，除非該等表現載體用於能夠複製高級DNA之哺乳動物細胞(諸如COS細胞)中。

選殖或表現載體可含有亦稱為可選擇標記物之選擇基因。該等標記物基因編碼為在選擇性培養基中生長之轉型宿主細胞之存活或生長所需的蛋白質。因此，未經含有選

擇基因之載體轉型之宿主細胞在培養基中將不能存活。典型選擇基因編碼帶有抗生素及其他毒素(例如，胺苄西林(ampicillin)、新黴素、甲胺喋呤或四環素)抗性、互補營養缺陷不足或不可在生長培養基中供應關鍵營養物蛋白質。

合適表現載體可含有許多組分，例如複製起點、可選擇標記物基因、一或多個表現控制元件(諸如轉錄控制元件(例如，啟動子、強化子、終止子))及/或一或多個轉譯信號、信號序列或前導序列及其類似物。表現控制元件及信號或前導序列存在時可由載體或其他來源提供。舉例而言，可使用編碼抗體鏈之選殖核酸之轉錄及/或轉譯控制序列引導表現。

可提供啟動子以表現於想要之宿主細胞中。啟動子可為組成性或可誘導性啟動子。舉例而言，啟動子可可操作性連接於編碼抗體、抗體鏈或其部分之核酸，如此其引導核酸轉錄。可利用多種合適啟動子，對於原核宿主(例如，對於大腸桿菌(E. coli)為β-內醯胺酶及乳糖啟動子系統、鹼性磷酸酶、色胺酸(trp)啟動子系統、lac、tac、T3、T7啟動子)及對於真核宿主(例如，猿猴病毒40早期或晚期啟動子、勞氏肉瘤病毒(Rous sarcoma virus)長末端重複序列啟動子、細胞巨大病毒啟動子、腺病毒晚期啟動子、EG-1a啟動子)。

另外，表現載體通常包含選擇運載載體之宿主細胞之可選擇標記物，且在可複製表現載體之狀況下，包含複製起

點。編碼帶有抗生素或藥物抗性之產物之基因為常見之可選擇標記物且可用於原核細胞(例如，β-內醯胺酶基因(胺苄西林抗性)、Tet基因(四環素抗性))及真核細胞(例如，新黴素(G418或遺傳黴素)、gpt(麥考酚酸)、胺苄西林或潮黴素抗性基因)中。二氫葉酸還原酶標記物基因准許在多種宿主中用甲胺喋呤選擇。編碼宿主之營養缺陷標記物之基因產物的基因(例如，LEU2、URA3、HIS3)通常用作酵母中之可選擇標記物。亦涵蓋使用病毒(例如，桿狀病毒)或噬菌體載體及能夠整合於宿主細胞基因組中之載體，諸如反轉錄病毒載體。

適於表現於原核細胞(例如，細菌細胞，諸如大腸桿菌)或哺乳動物細胞中之表現載體包括(例如)pET載體(例如，pET-12a、pET-36、pET-37、pET-39、pET-40、Novagen及其他)、噬菌體載體(例如，pCANTAB 5 E，Pharmacia)、pRIT2T(蛋白質A融合載體，Pharmacia)、pCDM8、pCDNA1.1/amp、pcDNA3.1、pRc/RSV、pEF-1(Invitrogen, Carlsbad, CA)、pCMV-SCRIPT、pFB、pSG5、pXT1(Stratagene, La Jolla, CA)、pCDEF3(Goldman, L.A.等人，Biotechniques, 27:1013-1015 (1996))、pSVSPORT (GibcoBRL, Rockville, MD)、pEF-Bos (Mizushima, S.，等人，Nucleic Acids Res., 18:5322(1990))及其類似物。可利用適於用於多種表現宿主中之表現載體，該等宿主諸如原核細胞(大腸桿菌)、昆蟲細胞(果蠅史奈德S2細胞(*Drosophila* Schnieder S2 cells)、Sf9)、酵母(嗜甲醇酵母(*P.*

methanolica)、馬斯德畢赤酵母(*P. pastoris*)、釀酒酵母(*S. cerevisiae*))及哺乳動物細胞(例如，COS細胞)。

載體之實例為使得能夠表現對應於多肽庫成員之核苷酸序列之表現載體。因此，可藉由使表現多肽庫成員之單一純系獨立繁殖及表現執行用一般及/或靶配位體進行之選擇。如上所述，選擇呈現系統可為噬菌體呈現。因此，可使用噬菌體或噬質體載體。例示性載體為具有大腸桿菌複製起點(用於雙鏈複製)以及噬菌體複製起點(用於產生單鏈DNA)之噬質體載體。該等載體之操作及表現在此項技術中為熟知的(Hoogenboom及Winter(1992)同上；Nissim等人，(1994)同上)。簡言之，載體可含有賦予噬質體選擇性之β-內醯胺酶基因及在表現卡匣上游可含有合適前導序列、多個選殖位點、一或多個肽標籤、一或多個TAG終止密碼子及噬菌體蛋白質pIII之lac啟動子。因此，使用大腸桿菌之多種抑制因子及非抑制因子菌株且添加葡萄糖、異丙基硫基-β-D-半乳糖苷(IPTG)或輔助噬菌體，諸如VCS M13，該載體能夠以質體形式複製而不表現，來產生大量僅多肽庫成員或產物噬菌體，其中一些在其表面上含有至少一個多肽-pIII融合物複本。

本文中所述之庫及譜系可含有抗體格式。舉例而言，庫及譜系中所含之多肽可為整個獨立的V_H或V_L區域，其任一係經修飾或未經修飾。可使用任何合適方法容易地產生scFv片段以及其他抗體多肽。此項技術中熟知許多合適抗體工程化方法。舉例而言，scFv可藉由使編碼兩個可變區

域之核酸與編碼適當連接子肽(諸如(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)$_3$或其他合適連接子肽)之合適寡核苷酸相連接而形成。連接子橋接第一V區C-末端與第二V區N-末端。可使用構造諸如Fv、Fab及F(ab')$_2$片段之其他抗體格式之類似技術。為編排格式Fab及F(ab')$_2$片段，可使V_H及V_L多肽與可自重排基因、生殖系C基因分離或由抗體序列資料合成之恆定區片段組合。本文中所述之庫或譜系可為V_H或V_L庫或譜系。

包含蛋白酶抗性可變區域之多肽可包含靶配位體(例如，VEGF)結合位點及一般配位體結合位點。在某些實施例中，一般配位體結合位點為諸如蛋白質A、蛋白質L或蛋白質G之超抗原之結合位點。可變區域可基於任何想要之可變區域，例如人類V_H(例如，V_H 1a、V_H 1b、V_H 2、V_H 3、V_H 4、V_H 5、V_H 6)、人類V_λ(例如，V_λI、V_λII、V_λIII、V_λIV、V_λV、V_λVI或V_κ1)或人類V_κ(例如，V_κ2、V_κ3、V_κ4、V_κ5、V_κ6、V_κ7、V_κ8、V_κ9或V_κ10)或視情況經人化之駱駝類V_{HH}。

產生蛋白酶抗性多肽之核酸、宿主細胞及方法

本發明係關於編碼(例如)由本文中所述之方法可選擇或選擇之蛋白酶抗性肽或多肽的經分離及/或重組核酸。

本文中稱為"經分離"之核酸為已其原始環境中(例如，細胞中或諸如庫之核酸混合物中)之其他物質(例如，其他核酸，諸如基因組DNA、cDNA及/或RNA)遠遠分離之核酸。經分離核酸可以載體(例如，質體)之部分形式分離。

本文中稱為"重組"之核酸為已由重組DNA方法產生之核酸，該等方法包括依賴於諸如使用(例如)限制酶、同源重組、病毒及其類似物選殖於載體或染色體中之人工重組之方法，及使用聚合酶鏈反應(PCR)製得之核酸。

本發明亦係關於重組宿主細胞，其包含(一或多個)包含編碼蛋白酶抗性肽或多肽、例如由本文中所述之方法可選擇或選擇之肽或多肽之核酸的重組核酸或表現構築體。亦提供製造蛋白酶抗性肽或多肽之方法，其包含將本發明之重組宿主細胞維持在適於表現蛋白酶抗性肽或多肽之條件下。該方法必要時可進一步包含分離或回收蛋白酶抗性肽或多肽之步驟。

舉例而言，可使用任何適合於所選擇之宿主細胞之方法(例如，轉型、轉染、電穿孔、感染)，將編碼蛋白酶抗性肽或多肽之核酸分子(亦即，一或多個核酸分子)或包含該(該等)核酸分子之表現構築體(亦即，一或多個構築體)引入合適宿主細胞中以建立重組宿主細胞，如此核酸分子可操作性連接於一或多個表現控制元件(例如，於載體中、於由諸多方法在細胞中產生之構築體中、整合於宿主細胞基因組中)。可將所得重組宿主細胞維持在適於表現(例如，在誘導物存在下、在合適動物中、在補充有適當鹽、生長因子、抗生素、營養增補劑等之合適培養基中)之條件下，藉此產生經編碼之肽或多肽。必要時，可分離或回收(例如，自動物、宿主細胞、培養基、乳汁中)經編碼之肽或多肽。該方法涵蓋表現於轉殖基因動物之宿主細胞中

(例如參見，WO 92/03918，GenPharm International)。

亦可在合適活體外表現系統中由化學合成或任何其他合適方法產生由本文中所述之方法選擇之蛋白酶抗性肽或多肽。

多肽、dAb及拮抗劑

如本文中所描述及例示，本發明之蛋白酶抗性dAb通常以高親和力結合其靶配位體。因此，在另一態樣中，提供選擇、分離及/或回收以高親和力結合VEGF之本發明之多肽或dAb的方法。該方法通常包含提供肽或多肽(例如，dAb)之庫或譜系，在適於蛋白酶(例如，胰蛋白酶、彈性蛋白酶、白血球酶、胰酶、痰)活性之條件下使該庫或該譜系與蛋白酶組合，及選擇、分離及/或回收結合配位體(例如，靶配位體)之肽或多肽。因為庫或譜系已在蛋白酶敏感肽或多肽將會分解之條件下暴露於蛋白酶中，所以蛋白酶之活性可消除具有弱結合親和力之不太穩定的多肽，且從而產生高親和力結合肽或多肽之集合。

舉例而言，本發明之多肽或dAb可以300 nM至約1 pM(亦即，3×10^{-7}至5×10^{-12} M)、例如50 nM至1 pM、例如5 nM至1 pM且例如1 nM至1 pM之親和力(KD；如由表面電漿共振所測定$KD=K_{off}(kd)/K_{on}(ka)$)結合VEGF；例如如由表面電漿共振所測定，$K_D$為$1\times10^{-7}$ M或以下，例如1×10^{-8} M或以下，例如1×10^{-9} M或以下，例如1×10^{-10} M或以下及例如1×10^{-11} M或以下；及/或K_{off}速率常數為5×10^{-1} s^{-1}至$1\times10^{-7}s^{1}$，例如1×10^{-2} s^{-1}至1×10^{-6} s^{-1}，例如5×10^{-3} s^{-1}至

1×10^{-5} s^{-1}，例如5×10^{-1} s^{-1}或以下，例如1×10^{-2} s^{-1}或以下，例如1×10^{-3} s^{-1}或以下，例如1×10^{-4} s^{-1}或以下，例如1×10^{-5} s^{-1}或以下，例如1×10^{-6} s^{-1}或以下。

雖然吾人不受任何特定理論限制，但咸信，抗蛋白酶之肽及多肽具有較低熵及/或較高穩定能。因此，蛋白酶抗性與高親和力結合之間的相關性可能與由本文中所述之方法所選擇之肽及及多肽及dAb之表面緊密性及穩定性相關。

在一實施例中，本發明之多肽、dAb或拮抗劑以約1 μM或以下、約500 nM或以下、約100 nM或以下、約75 nM或以下、約50 nM或以下、約10 nM或以下或約1 nM或以下之IC50濃度50(IC50)抑制VEGF之結合。

在某些實施例中，多肽、dAb或拮抗劑以如由表面電漿共振所測定300 nM至1 pM、或300 nM至5 pM、或50 nM至1 pM、或50 nM至5 pM、或50 nM至20 pM、或約10 pM、或約15 pM、或約20 pM之解離常數(K_D)特異性結合VEGF，例如人類VEGF且與人類VEGF解離。在某些實施例中，多肽、dAb或拮抗劑以如由表面電漿共振所測定5×10^{-1} s^{-1}至1×10^{-7} s^{-1}、例如1×10^{-2} s^{-1}至1×10^{-6} s^{-1}、例如5×10^{-3} s^{-1}至1×10^{-5} s^{-1}、例如5×10^{-1} s^{-1}或以下、例如1×10^{-2} s^{-1}或以下、例如或1×10^{-3} s^{-1}或以下、例如1×10^{-4} s^{-1}或以下、例如1×10^{-5} s^{-1}或以下及例如1×10^{-6} s^{-1}或以下之K_{off}速率常數特異性結合VEGF，例如人類VEGF，且與人類VEGF解離。

在某些實施例中，多肽、dAb或拮抗劑以1×10^{-3} $M^{-1}s^{-1}$至1×10^{-7} $M^{-1}s^{-1}$、或1×10^{-3} $M^{-1}s^{-1}$至1×10^{-6} $M^{-1}s^{-1}$、或約1×10^{-4} $M^{-1}s^{-1}$、或約$1\times10^{-5}M^{-1}S^{-1}$之$K_{on}$特異性結合VEGF，例如人類VEGF。在一實施例中，多肽、dAb或拮抗劑以如該段落中所詳細說明之解離常數(K_D)及K_{off}特異性結合VEGF，例如人類VEGF，且與人類VEGF解離。在一實施例中，多肽、dAb或拮抗劑以如該段落中所詳細說明之解離常數(K_D)及K_{on}特異性結合VEGF，例如人類VEGF，且與人類VEGF解離。在一些實施例中，多肽或dAb以該段落中所述之K_D及/或K_{off}及/或K_{on}特異性結合VEGF(例如，人類VEGF)，且包含與具有DOM15-26-593之胺基酸序列之dAb的胺基酸序列至少或至少約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致之胺基酸序列。

可將多肽、dAb或拮抗劑表現於大腸桿菌或畢赤酵母物種(例如，馬斯德畢赤酵母)中。在一實施例中，當表現於大腸桿菌或畢赤酵母物種(例如，馬斯德畢赤酵母)中時，分泌至少約0.5 mg/L之量之配位體或dAb單體。雖然當表現於大腸桿菌或畢赤酵母物種(例如，馬斯德畢赤酵母)中時，可分泌本文中所述之配位體及dAb單體，但其可使用任何合適方法產生，諸如合成化學方法或不採用大腸桿菌或畢赤酵母物種之生物產生方法。

在一些實施例中，多肽、dAb或拮抗劑不包含駱駝類免疫球蛋白可變區域或一或多個僅為駱駝類生殖系抗體基因

片段所編碼之免疫球蛋白可變區域所特有之構架胺基酸，例如在位置108、37、44、45及/或47處。

本發明之VEGF之拮抗劑可為單價或多價拮抗劑。在一些實施例中，拮抗劑為單價且含有一個與VEGF相互作用之結合位點，該結合位點由本發明之多肽或dAb提供。單價拮抗劑結合一個VEGF且可能不會誘導可引起受體活化及信號轉導之細胞表面上之VEGF的交聯或叢集。

在其他實施例中，VEGF之拮抗劑為多價拮抗劑。VEGF之多價拮抗劑可含有兩個或兩個以上特定VEGF結合位點複本或含有兩個或兩個以上結合VEGF之不同結合位點，該等結合位點中之至少一個由本發明之多肽或dAb提供。舉例而言，如本文中所述，VEGF之拮抗劑可為包含兩個或兩個以上結合VEGF之本發明之特定多肽或dAb複本或兩個或兩個以上結合VEGF之本發明之不同多肽或dAb的二聚體、三聚體或多聚體。在某些實施例中，VEGF之多價拮抗劑含有兩個或兩個以上VEGF之想要之抗原決定基或區域的結合位點。

因為某些配位體(及拮抗劑)可用於結合且偵測、定量或量測樣品中之VEGF，所以其可具有診斷劑之效用。因此，可進行樣品中是否存在VEGF或存在多少VEGF之精確測定。

在其他實施例中，多肽、dAb或拮抗劑以本文中所述之K_D特異性結合VEGF且在標準鼠類異種移植模型中抑制腫瘤生長(例如，與合適對照相比，抑制腫瘤生長至少約

10%)。在一實施例中，當投與約1 mg/kg或以上，例如約5或10 mg/kg時，與標準鼠類異種移植模型中之合適對照相比，多肽、dAb或拮抗劑抑制腫瘤生長至少約10%或至少約25%或至少約50%。

在其他實施例中，多肽、dAb或拮抗劑結合VEGF且在標準細胞檢定中以≤100 nM之ND_{50}拮抗VEGF之活性。

在某些實施例中，當在發炎性疾病之動物模型(諸如WO 2006038027及WO 2006059108及WO 2007049017中所述之模型)中投與有效量之本發明之多肽、dAb或拮抗劑時為有效的。有效量通常為約1 mg/kg至約10 mg/kg(例如，約1 mg/kg、約2 mg/kg、約3 mg/kg、約4 mg/kg、約5 mg/kg、約6 mg/kg、約7 mg/kg、約8 mg/kg、約9 mg/kg或約10 mg/kg)。熟習此項技術者認為慢性發炎性疾病模型可預測在人類中之治療功效。

本發明配位體(例如，拮抗劑)通常將以純形式與藥理學上適當之載劑一起使用。該等載劑通常包括水性或醇性/水性溶液、乳液或懸浮液，任何均包括生理食鹽水及/或緩衝介質。非經腸媒劑包括氯化鈉溶液、林格氏右旋糖(Ringer's dextrose)、右旋糖及氯化鈉及乳酸化林格氏液(lactated Ringer's)。必要時保持多肽複合物呈懸浮狀之合適的生理學上可接受之佐劑可選自增稠劑，諸如羧甲基纖維素、聚乙烯吡咯啶酮、明膠及海藻酸鹽。

靜脈內媒劑包括流體及營養物補充劑及電解質補充劑，諸如基於林格氏右旋糖之彼等。亦可存在諸如抗菌劑、抗

氧化劑、螯合劑及惰性氣體之防腐劑及其他添加劑(Mack (1982) Remington's Pharmaceutical Sciences，第16版)。可使用多種合適調配物，包括延緩釋放調配物。

本發明之配位體(例如，拮抗劑)可以單獨投與之組合物形式使用或與其他藥劑結合使用。該等藥劑可包括多種免疫治療藥物，諸如環孢素、甲胺喋呤、阿黴素或順鉑及免疫毒素。醫藥組合物可包括多種細胞毒性劑或其他藥劑與本發明之配位體或甚至不管在投藥之前是否彙集之具有不同特性的本發明之配位體(諸如使用不同靶抗原或抗原決定基選擇之配位體)之組合結合的"混合物"。

本發明之醫藥組合物之投藥途徑可為一般熟習此項技術者通常已知之任一投藥途徑。對於治療(包括不限於免疫治療)而言，可根據標準技術向任何患者投與本發明之所選擇之配位體。

投藥可藉由任何適當模式，包括非經腸、靜脈內、肌肉內、腹膜內、經皮、經由肺途徑或亦適當地，藉由用導管直接輸注。投藥劑量及頻率應視患者之年齡、性別及病症、其他藥物之並行投與、禁忌症及臨床醫師要考慮之其他參數而定。如所指示，投藥可為局部(例如，藉由肺投藥方式局部向肺傳遞，例如，鼻內投藥方式)或全身性。

本發明之配位體可經凍乾以便儲存且在使用之前於合適載劑中復原。已經由習知免疫球蛋白展示該技術有效，且可採用技術已知之凍乾及復原技術。熟習此項技術者應瞭解，凍乾及復原可導致不同程度之抗體活性損失(例如，

對於習知免疫球蛋白而言，IgM抗體傾向於比IgG抗體具有較大之活性損失)且可能必須上調用量來補償。

含有本發明配位體(例如，拮抗劑)或其混合物之組合物可出於預防性及/或治療性治療目的而投與。在某些治療應用中，所選擇細胞之群體之足以實現至少部分抑制、抑止、調節、殺死或一些其他可量測參數之量係定義為"治療有效劑量"。達成該劑量所需之量應視疾病之嚴重程度及患者自身免疫系統之一般狀態而定，但通常在每公斤體重0.005 mg至5.0 mg配位體(例如dAb或拮抗劑)範圍內，其中更通常使用0.05至2.0毫克/公斤/劑量之劑量。對於預防性應用，亦可以類似或稍低劑量投與含有本發明配位體或其混合物之組合物以預防、抑制或延遲疾病發作(例如，維持症狀緩解或靜止期，或阻止急性期)。熟練的臨床醫師應能夠確定治療、抑止或預防疾病之適當給藥間隔。當投與VEGF配位體(例如，拮抗劑)以治療、抑止或預防疾病時，可以(例如)約10 μg/kg至約80 mg/kg、約100 μg/kg至約80 mg/kg、約1 mg/kg至約80 mg/kg、約1 mg/kg至約70 mg/kg、約1 mg/kg至約60 mg/kg、約1 mg/kg至約50 mg/kg、約1 mg/kg至約40 mg/kg、約1 mg/kg至約30 mg/kg、約1 mg/kg至約20 mg/kg、約1 mg/kg至約10 mg/kg、約10 μg/kg至約10 mg/kg、約10 μg/kg至約5 mg/kg、約10 μg/kg至約2.5 mg/kg、約1 mg/kg、約2 mg/kg、約3 mg/kg、約4 mg/kg、約5 mg/kg、約6 mg/kg、約7 mg/kg、約8 mg/kg、約9 mg/kg或約10 mg/kg之劑量每

天投與至多4次、每週兩次、每週一次、每兩週一次、每月一次或每兩月一次。在特定實施例中，以約10 μg/kg至約10 mg/kg(例如，約10 μg/kg、約100 μg/kg、約1 mg/kg、約2 mg/kg、約3 mg/kg、約4 mg/kg、約5 mg/kg、約6 mg/kg、約7 mg/kg、約8 mg/kg、約9 mg/kg或約10 mg/kg)之劑量每兩週一次或每月一次投與VEGF配位體(例如，拮抗劑)來治療、抑止或預防疾病。

若相對於治療之前所存在之一或多個症狀或相對於未經該組合物或其他合適對照物治療之個體(人類或模型動物)中之該或該等症狀，減少該或該等症狀(例如，減少至少10%或臨床評估表上之至少一個點)，則認為使用本文中所述之組合物執行之治療或療法"有效"。雖然症狀顯然將視靶向之疾病或病症而變化，但其可由一般熟練的臨床醫師或技師加以量測。該等症狀可(例如)藉由監測疾病或病症之一或多個生化指標之含量(例如，與疾病、感染細胞數目等相關之酶或代謝物之含量)、藉由監測物理表現症狀(例如，發炎、腫瘤尺寸等)或藉由公認之臨床評估表量測。

類似地，若相對於未經組合物治療之類似個體(人類或動物模型)中之一或多個症狀，延遲、減少或消除該或該等症狀之發作或嚴重程度，則使用如本文中所述之組合物執行之預防"有效"。

含有本發明之配位體(例如，拮抗劑)或其混合物之組合物可在預防性及治療性情形下使用以幫助改變、滅活、殺

死或移除哺乳動物中所選擇之靶細胞群體。另外，可離體或活體外選擇性使用本文中所述之所選擇之多肽譜系以殺死、排除或自細胞之異源集合有效移除靶細胞群體。可使哺乳動物之血液與配位體離體組合，藉此根據標準技術殺死或自血液移除不想要之細胞從而將血液送回至哺乳動物中。

含有本發明之配位體(例如，拮抗劑)之組合物可在預防性及治療性情形下使用以幫助改變、滅活、殺死或移除哺乳動物中所選擇之靶細胞群體。

配位體(例如，抗VEGF拮抗劑、dAb單體)可與一或多種其他治療或活性劑一起投與及/或調配。當配位體(例如，dAb)與其他治療劑一起投與時，配位體可在投與其他藥劑之前、與其同時或在其之後投與。配位體及其他藥劑通常以提供疊加治療效應之方式投與。

在一實施例中，本發明為一種治療、抑止或預防選自(例如)癌症(例如，實體腫瘤)、發炎性疾病、自體免疫疾病、血管增生性疾病(例如，AMD(年齡相關黃斑退化))之疾病之方法，該方法包含向有需要之哺乳動物投與治療有效劑量或量之本發明之多肽、結合VEGF之dAb或VEGF之拮抗劑。

本發明提供一種治療、抑止或預防肺病之方法。因此，在另一實施例中，本發明為一種治療、抑止或預防肺病(例如，肺癌)之方法，該方法包含向有需要之哺乳動物投與治療有效劑量或量之本發明之多肽、dAb或VEGF之拮抗

劑。

在特定實施例中，VEGF之拮抗劑係經由肺傳遞、諸如藉由吸入(例如，支氣管內、鼻內或經口吸入、鼻內滴劑)投與或藉由全身傳遞(例如，非經腸、靜脈內、肌肉內、腹膜內、皮下)投與。

在本發明之另一態樣中，提供一種組合物，其包含本發明之多肽、dAb或VEGF拮抗劑及醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑或賦形劑。

此外，本發明提供一種使用本發明之多肽、dAb或VEGF拮抗劑或組合物治療疾病之方法。在一實施例中，疾病為癌症(例如，實體腫瘤)或發炎性疾病(例如，類風濕性關節炎)或自體免疫疾病或血管增生性疾病(諸如AMD(年齡相關黃斑退化))。

格式

半衰期增加可適用於免疫球蛋白、尤其抗體且最尤其小尺寸抗體片段之活體內應用。該等片段(Fv、雙硫鍵鍵結之Fv、Fab、scFv、dAb)遭遇自身體內之快速清除；因此，雖然其能夠快速到達身體之大部分且快速產生且易於處理，但其活體內應用因其僅短暫之活體內持久性而受到限制。本發明之一實施例藉由提供活體內半衰期增加且因此在身體內具有持續時間較長之配位體功能活性之配位體來解決該問題。

熟習此項技術者應熟悉藥物動力學分析及配位體半衰期之測定之方法。詳情可見於*Kenneth, A*等人，Chemical

Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists及*Peters*等人，Phannacokinetc analysis: A Practical Approach (1996)。亦參考"Pharmacokinetics", M Gibaldi及D Perron，由Marcel Dekker出版，第2修訂附加版(Rev. ex edition)(1982)，其描述藥物動力學參數，諸如tα及tβ半衰期及曲線下面積(AUC)。

半衰期(t½ α及t½ β)及AUC可由配位體之血清濃度對時間之曲線確定。可使用WinNonlin軟體套件(自Pharsight Corp., Mountain View, CA94040, USA獲得)模擬曲線。在第一期(α期)中，配位體主要分布於患者中，其中部分消除。第二期(β期)為末期，此時配位體已分布且血清濃度配位體隨著自患者中清除配位體而降低。tα半衰期為第一期之半衰期且tβ半衰期為第二期之半衰期。因此，在一實施例中，本發明提供tα半衰期在15分鐘或以上範圍內之配位體或包含本發明之配位體的組合物。在一實施例中，範圍之下限為30分鐘、45分鐘、1小時、2小時、3小時、4小時、5小時、6小時、7小時、10小時、11小時或12小時。另外或其他，本發明之配位體或組合物應具有在至多12小時且包括12小時範圍內之tα半衰期。在一實施例中，範圍之上限為11、10、9、8、7、6或5小時。合適範圍之實例為1至6小時、2至5小時或3至4小時。

在一實施例中，本發明提供tβ半衰期在30分鐘或以上範圍內之配位體(多肽、dAb或拮抗劑)或包含本發明之配位體的組合物。在一實施例中，範圍之下限為45分鐘、1小

時、2小時3小時、4小時、5小時、6小時、7小時、10小時、11小時或12小時。另外或其他，本發明之配位體或組合物具有在至多21天且包括21天範圍內之tβ半衰期。在一實施例中，範圍之上限為12小時、24小時、2天、3天、5天、10天、15天或20天。在一實施例中，本發明之配位體或組合物應具有12至60小時範圍內之tβ半衰期。在另一實施例中，其應在12至48小時範圍內。在又一實施例中，其應在12至26小時範圍內。

除以上標準以外或其他，本發明提供AUC值(曲線下面積)在1 mg·min/ml或以上範圍內之配位體或包含本發明之配位體之組合物 在一實施例中，範圍之下限為5、10、15、20、30、100、200或300 mg·min/ml。另外或其他，本發明之配位體或組合物具有在至多600 mg·min/ml範圍內之AUC。在一實施例中，範圍之上限為500、400、300、200、150、100、75或50 mg·min/ml。在一實施例中，本發明之配位體應具有在選自由以下各範圍組成之群之範圍內之AUC：15至150 mg·min/ml、15至100 mg·min/ml、15至75 mg·min/ml及15至50 mg·min/ml。

本發明之多肽及dAb及包含該等多肽及dAb之拮抗劑可經編排格式以具有較大流體動力學尺寸，例如，藉由連接PEG基團、血清白蛋白、轉鐵蛋白、轉鐵蛋白受體或至少其轉鐵蛋白結合部分、抗體Fc區，或藉由接合抗體區域。舉例而言，多肽dAb及拮抗劑經編排格式為抗體之較大抗原結合片段或抗體(例如，經編排格式為Fab、Fab'、

$F(ab)_2$、$F(ab')_2$、IgG、scFv)。

可使用此項技術中熟知之方法測定本發明之配位體(例如，dAb單體及多聚體)之流體動力學尺寸。舉例而言，可使用凝膠過濾層析法測定配位體之流體動力學尺寸。諸如交聯瓊脂糖基質之測定配位體之流體動力學尺寸之合適凝膠過濾基質為吾人所熟知且可容易地獲得。

配位體格式之尺寸(例如，連接於dAb單體之PEG部分之尺寸)可視想要之應用而變化。舉例而言，當配位體意欲離開循環且進入周邊組織時，希望保持配位體之流體動力學尺寸較低以有助於自血流溢出。或者，當希望使配位體保留在體循環中較長時間時，可(例如)藉由編排格式為Ig樣蛋白增加配位體尺寸。

藉由靶向增加活體內半衰期之抗原或抗原決定基延長半衰期

亦可藉由使本發明之VEGF結合多肽、dAb或拮抗劑與結合如本文中所述之增加活體內半衰期之抗原或抗原決定基的結合區域(例如，抗體或抗體片段)接合或締合來增加配位體之流體動力學尺寸及其血清半衰期。舉例而言，可使VEGF結合劑(例如，多肽)與抗血清白蛋白或抗新生兒Fc受體抗體或抗體片段(例如，抗SA或抗新生兒Fc受體dAb、Fab、Fab'或scFv)或與抗SA親和體或抗新生兒Fc受體親和體或抗SA avimer或抗SA結合區域接合或連接，該抗SA結合區域包含選自(但較佳不限於)由以下各物組成之群之骨架：CTLA-4、脂質運載蛋白、SpA、親和體、avimer、

GroE1及纖維連接蛋白(參見，2008年2月8日申請之揭示該等結合區域之PCT/GB2008/000453，該等區域及其序列以引用之方式併入本文中且構成本發明正文之揭示內容之一部分)。接合物係指包含鍵結(共價或非共價)於結合血清白蛋白之結合區域的本發明之多肽、dAb或拮抗劑之組合物。

增加活體內血清半衰期之合適多肽包括(例如)轉鐵蛋白受體特異性配位體-神經藥劑融合蛋白(參見美國專利第5,977,307號，其教示內容以引用之方式併入本文中)、腦毛細血管內皮細胞受體、轉鐵蛋白、轉鐵蛋白受體(例如，可溶性轉鐵蛋白受體)、胰島素、胰島素樣生長因子1(IGF 1)受體、胰島素樣生長因子2(IGF 2)受體、胰島素受體、血凝因子X、α1-抗胰蛋白酶及HNF 1α。增加血清半衰期之合適多肽亦包括α-1醣蛋白(血清類黏蛋白；AAG)、α-1抗凝乳蛋白酶(ACT)、α-1微球蛋白(蛋白質HC；AIM)、抗凝血酶III(ATIII)、脫脂蛋白A-1(Apo A-1)、脫脂蛋白B(Apo B)、血漿銅藍蛋白(Cp)、互補組分C3(C3)、互補組分C4(C4)、C1酯酶抑制劑(C1 INH)、C-反應蛋白(CRP)、鐵蛋白(FER)、血液結合素(HPX)、脂蛋白(a)(Lp(a))、甘露糖結合蛋白(MBP)、肌血球素(Myo)、前白蛋白(甲狀腺素運送蛋白；PAL)、視黃醇結合蛋白(RBP)及類風濕因子(RF)。

來自細胞外基質之合適蛋白質包括(例如)膠原、層黏連蛋白、整合素及纖維連接蛋白。膠原為細胞外基質之主要

蛋白質。目前已知約15種類型之膠原分子，可見於身體之不同部位，例如I型膠原(佔體膠原之90%)可見於骨、皮膚、腱、韌帶、角膜、內臟中或II型膠原可見於軟骨、脊椎盤、脊索及眼睛玻璃狀液中。

血液之合適蛋白質包括(例如)血漿蛋白(例如，纖維蛋白、α-2巨球蛋白、血清白蛋白、纖維蛋白原(例如，纖維蛋白原A、纖維蛋白原B)、血清澱粉樣蛋白A、結合珠蛋白、前纖維蛋白(profilin)、泛素、子宮球蛋白及β-2-微球蛋白)、酶及酶抑制劑(例如，纖溶酶原、溶菌酶、半胱胺酸蛋白酶抑制劑C(cystatin C)、α-1-抗胰蛋白酶及胰腺胰蛋白酶抑制劑)、免疫系統蛋白質，諸如免疫球蛋白蛋白質(例如、IgA、IgD、IgE、IgG、IgM、免疫球蛋白輕鏈(κ/λ))、轉運蛋白(例如，視黃醇結合蛋白、α-1微球蛋白)、防禦素(defensin)(例如，β-防禦素1、嗜中性白血球防禦素1、嗜中性白血球防禦素2及嗜中性白血球防禦素3)及其類似物。

血腦屏障或神經組織中可見之合適蛋白質包括(例如)黑色素皮質素受體、髓磷脂、抗壞血酸轉運體及其類似物。

增加活體內血清半衰期之合適多肽亦包括位於腎中之蛋白質(例如，多囊蛋白(polycystin)、IV型膠原、有機陰離子轉運體K1、海曼氏抗原(Heymann's antigen))、位於肝中之蛋白質(例如，乙醇脫氫酶、G250)、位於肺中之蛋白質(例如，結合IgA之分泌組分)、位於心臟中之蛋白質(例如，與擴張性心肌病相關之HSP 27)、位於皮膚之蛋白質

(例如，角蛋白)、骨特異性蛋白質(諸如促進骨生成之蛋白質(BMP)，其為顯示成骨活性之蛋白質之轉化生長因子β超家族的子集(例如，BMP-2、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、BMP-8))、腫瘤特異性蛋白質(例如，滋養母細胞抗原、賀癌平受體(herceptin receptor)、雌激素受體、組織蛋白酶(例如，可見於肝及脾中之組織蛋白酶B))。

合適之疾病特異性蛋白質包括(例如)僅表現於活化T-細胞上之抗原(包括LAG-3(淋巴細胞活化基因))、骨保護素配位體(OPGL；參見*Nature* 402, 304-309 (1999))、OX40(TNF受體家族之成員，表現於活化T細胞上且尤其在I型人類T細胞白血病病毒(HTLV-I)產生細胞中上調；參見*Immunol.* 165 (l):263-70 (2000))。合適之疾病特異性蛋白質亦包括(例如)金屬蛋白酶(metalloprotease)(與關節炎/癌症相關)，包括CG6512果蠅、人類截癱蛋白(paraplegin)、人類FtsH、人類AFG3L2、鼠類ftsH；及血管生成生長因子，包括酸性纖維母細胞生長因子(FGF-1)、鹼性纖維母細胞生長因子(FGF-2)、血管內皮生長因子/血管滲透因子(VEGF/VPF)、轉化生長因子-α(TGF α)、腫瘤壞死因子-α(TNF-α)、血管生長素(angiogenin)、介白素-3(IL-3)、介白素-8(IL-8)、血小板源內皮生長因子(PD-ECGF)、胎盤生長因子(PlGF)、中期因子血小板源生長因子-BB(PDGF)及弗拉塔凱。

增加活體內血清半衰期之合適多肽亦包括應力蛋白，諸如熱休克蛋白(HSP)。HSP通常在細胞內可見。當其細胞

外可見時，其為細胞已死亡且溢出其內含物之指示。因外傷、疾病或損傷，發生該未計劃之細胞死亡(壞死)，細胞外HSP引發免疫系統之反應。與細胞外HSP之結合可使得使本發明之組合物定位於疾病部位。

涉及Fc轉運之合適蛋白質包括(例如)布蘭貝爾受體(Brambell receptor)(亦稱為FcRB)。Fc受體具有兩種功能，兩者均潛在適用於傳遞。該等功能為(1)自母體穿過胎盤轉運IgG至小孩，(2)保護IgG以免降解，從而延長其血清半衰期。認為受體使IgG自核內體再循環。(參見，Holliger等人，*Nat Biotechnol* 15(7):632-6 (1997)。)

結合血清白蛋白之dAb

在一實施例中，本發明提供一種包含結合TNFR1之抗TNFR1dAb(第一dAb)及結合血清白蛋白(SA)之第二dAb之多肽或拮抗劑(例如，雙特異性配位體)，該第二dAb以如由表面電漿共振所測定1 nM至1、2、3、4、5、10、20、30、40、50、60、70、100、200、300、400或500 μM(亦即，$\times 10^{-9}$至5×10^{-4})或100 nM至10 μM、或1至5 μM、或3至70 nM、或10nM至1、2、3、4或5 μM之K_D結合SA。舉例而言，如由表面電漿共振所測定30至70 nM。在一實施例中，第一dAb(或dAb單體)以如由表面血漿共振所測定約1、50、70、100、150、200、300 nM或1、2或3 μM之K_D結合SA(例如，HSA)。在一實施例中，對於包含第一抗SA dAb及第二抗VEGF之dAb之雙特異性配位體而言，第二dAb對其靶之親和力(例如，如由表面電漿共振、例如使用

BiaCore所量測，K_D及/或K_{off})為第一dAb對SA之親和力的1至100000倍(例如，100至100000、或1000至100000、或10000至100000倍)。在一實施例中，血清白蛋白為人類血清白蛋白(HSA)。舉例而言，第一dAb以約10 μM之親和力結合SA，而第二dAb以100 pM之親和力結合其靶。在一實施例中，血清白蛋白為人類血清白蛋白(HSA)。在一實施例中，第一dAb以約50 nM，例如70、100、150或200 nM之K_D結合SA(例如，HSA)。雙特異性配位體之詳情可見於WO03002609、WO04003019及WO04058821中。

在一實施例中，本發明之配位體可包含以如由所表面電漿共振測定1 nM至1、2、3、4、5、10、20、30、40、50、60、70、100、200、300、400或500 μM(亦即，$\times 10^{-9}$至5×10^{-4})或100 nM至10 μM、或1至5 μM、或3至70 nM、或10nM至1、2、3、4或5 μM之K_D結合血清白蛋白(SA)之dAb。舉例而言，如由表面電漿共振所測定30至70 nM。在一實施例中，第一dAb(或dAb單體)以如由表面血漿共振所測定約1、50、70、100、150、200、300 nM或1、2或3 μM之K_D結合SA(例如，HSA)。在一實施例中，第一及第二dAb由連接子連接，例如1至4個胺基酸或1至3個胺基酸或超過3個胺基酸或超過4、5、6、7、8、9、10、15或20個胺基酸之連接子。在一實施例中，使用較長連接子(超過3個胺基酸)增加效價(拮抗劑中之一個或兩個dAb之K_D)。

在配位體及拮抗劑之特定實施例中，dAb結合人類血清

白蛋白且與選自由以下各物組成之群之dAb競爭以結合白蛋白：

MSA-16、MSA-26(關於該等序列之揭示內容，參見WO04003019，該等序列及其核酸對應物以引用之方式併入本文中且構成本發明正文之揭示內容的一部分)，

DOM7m-16(SEQ ID NO: 473)、DOM7m-12(SEQ ID NO: 474)、DOM7m-26(SEQ ID NO: 475)、DOM7r-1(SEQ ID NO: 476)、DOM7r-3(SEQ ID NO: 477)、DOM7r-4(SEQ ID NO: 478)、DOM7r-5(SEQ ID NO: 479)、DOM7r-7(SEQ ID NO: 480)、DOM7r-8(SEQ ID NO: 481)、DOM7h-2(SEQ ID NO: 482)、DOM7h-3(SEQ ID NO: 483)、DOM7h-4(SEQ ID NO: 484)、DOM7h-6(SEQ ID NO: 485)、DOM7h-1(SEQ ID NO: 486)、DOM7h-7(SEQ ID NO: 487)、DOM7h-22(SEQ ID NO: 489)、DOM7h-23(SEQ ID NO: 490)、DOM7h-24(SEQ ID NO: 491)、DOM7h-25(SEQ ID NO: 492)、DOM7h-26(SEQ ID NO: 493)、DOM7h-21(SEQ ID NO: 494)、DOM7h-27(SEQ ID NO: 495)、DOM7h-8(SEQ ID NO: 496)、DOM7r-13(SEQ ID NO: 497)、DOM7r-14(SEQ ID NO: 498)、DOM7r-15(SEQ ID NO: 499)、DOM7r-16(SEQ ID NO: 500)、DOM7r-17(SEQ ID NO: 501)、DOM7r-18(SEQ ID NO: 502)、DOM7r-19(SEQ ID NO: 503)、DOM7r-20(SEQ ID NO: 504)、DOM7r-21(SEQ ID NO: 505)、DOM7r-22(SEQ ID NO: 506)、DOM7r-23(SEQ ID NO: 507)、DOM7r-24(SEQ ID NO: 508)、DOM7r-

25(SEQ ID NO: 509)、DOM7r-26(SEQ ID NO: 510)、DOM7r-27(SEQ ID NO: 511)、DOM7r-28(SEQ ID NO: 512)、DOM7r-29(SEQ ID NO: 513)、DOM7r-30(SEQ ID NO: 514)、DOM7r-31(SEQ ID NO: 515)、DOM7r-32(SEQ ID NO: 516)、DOM7r-33(SEQ ID NO: 517)(關於該等序列之揭示內容，參見WO2007080392，該等序列及其核酸對應物以引用之方式併入本文中且構成本發明正文之揭示內容的一部分；該段落中之SEQ ID No為WO2007080392中所出現之SEQ ID No)，

dAb8(dAb 10)、dAb 10、dAb36、dAb7r20(DOM7r20)、dAb7r21(DOM7r21)、dAb7r22(DOM7r22)、dAb7r23(DOM7r23)、dAb7r24(DOM7r24)、dAb7r25(DOM7r25)、dAb7r26(DOM7r26)、dAb7r27(DOM7r27)、dAb7r28(DOM7r28)、dAb7r29(DOM7r29)、dAb7r29(DOM7r29)、dAb7r31(DOM7r31)、dAb7r32(DOM7r32)、dAb7r33(DOM7r33)、dAb7r33(DOM7r33)、dAb7h22(DOM7h22)、dAb7h23(DOM7h23)、dAb7h24(DOM7h24)、dAb7h25(DOM7h25)、dAb7h26(DOM7h26)、dAb7h27(DOM7h27)、dAb7h30(DOM7h30)、dAb7h31(DOM7h31)、dAb2(dAb4、dAb7、dAb41)、dAb4、dAb7、dAb11、dAb12(dAb7m12)、dAb13(dAb 15)、dAb15、dAb16(dAb21、dAb7m16)、dAb17、dAb18、dAb19、dAb21、dAb22、dAb23、dAb24、dAb25(dAb26、dAb7m26)、dAb27、dAb30(dAb35)、dAb31、dAb33、dAb34、dAb35、dAb38

(dAb54)、dAb41、dAb46(dAb 47、dAb 52及dAb 56)、dAb47、dAb52、dAb53、dAb54、dAb55、dAb56、dAb7m12、dAb7m16、dAb7m26、dAb7r1(DOM7r1)、dAb7r3(DOM7r3)、dAb7r4(DOM7r4)、dAb7r5(DOM7r5)、dAb7r7(DOM7r7)、dAb7r8(DOM7r8)、dAb7r13(DOM7r13)、dAb7r14(DOM7r14)、dAb7r15(DOM7r15)、dAb7r16(DOM7r16)、dAb7r17(DOM7r17)、dAb7r18(DOM7r18)、dAb7r19(DOM7r19)、dAb7h1(DOM7h1)、dAb7h2(DOM7h2)、dAb7h6(DOM7h6)、dAb7h7(DOM7h7)、dAb7h8(DOM7h8)、dAb7h9(DOM7h9)、dAb7h10(DOM7h10)、dAb7h11(DOM7h11)、dAb7h12(DOM7h12)、dAb7h13(DOM7h13)、dAb7h14(DOM7h14)、dAb7p1(DOM7p1)及dAb7p2(DOM7p2)(關於該等序列之揭示內容，參見2008年2月8日申請之PCT/GB2008/000453，該等序列及其核酸對應物以引用之方式併入本文中且構成本發明正文之揭示內容之一部分)。dAb後之括號中展示替代名稱，例如dAb8具有替代名稱dAb10，亦即dAb8(dAb10)。該等序列亦陳述於圖51a及b中。

在某些實施例中，dAb結合人類血清白蛋白且包含與選自由以下各物組成之群之dAb的胺基酸序列具有至少約80%、或至少約85%、或至少約90%、或至少約95%、或至少約96%、或至少約97%、或至少約98%、或至少約99%之胺基酸序列一致性的胺基酸序列：

MSA-16, MSA-26

DOM7m-16(SEQ ID NO: 473)、DOM7m-12(SEQ ID NO: 474)、DOM7m-26(SEQ ID NO: 475)、DOM7r-1(SEQ ID NO: 476)、DOM7r-3(SEQ ID NO: 477)、DOM7r-4(SEQ ID NO: 478)、DOM7r-5(SEQ ID NO: 479)、DOM7r-7(SEQ ID NO: 480)、DOM7r-8(SEQ ID NO: 481)、DOM7h-2(SEQ ID NO: 482)、DOM7h-3(SEQ ID NO: 483)、DOM7h-4(SEQ ID NO: 484)、DOM7h-6(SEQ ID NO: 485)、DOM7h-1(SEQ ID NO: 486)、DOM7h-7(SEQ ID NO: 487)、DOM7h-22(SEQ ID NO: 489)、DOM7h-23(SEQ ID NO: 490)、DOM7h-24(SEQ ID NO: 491)、DOM7h-25(SEQ ID NO: 492)、DOM7h-26(SEQ ID NO: 493)、DOM7h-21(SEQ ID NO: 494)、DOM7h-27(SEQ ID NO: 495)、DOM7h-8(SEQ ID NO: 496)、DOM7r-13(SEQ ID NO: 497)、DOM7r-14(SEQ ID NO: 498)、DOM7r-15(SEQ ID NO: 499)、DOM7r-16(SEQ ID NO: 500)、DOM7r-17(SEQ ID NO: 501)、DOM7r-18(SEQ ID NO: 502)、DOM7r-19(SEQ ID NO: 503)、DOM7r-20(SEQ ID NO: 504)、DOM7r-21(SEQ ID NO: 505)、DOM7r-22(SEQ ID NO: 506)、DOM7r-23(SEQ ID NO: 507)、DOM7r-24(SEQ ID NO: 508)、DOM7r-25(SEQ ID NO: 509)、DOM7r-26(SEQ ID NO: 510)、DOM7r-27(SEQ ID NO: 511)、DOM7r-28(SEQ ID NO: 512)、DOM7r-29(SEQ ID NO: 513)、DOM7r-30(SEQ ID NO: 514)、DOM7r-31(SEQ ID NO: 515)、DOM7r-32(SEQ

ID NO: 516)、DOM7r-33(SEQ ID NO: 517)(該段落中之SEQ ID No為WO2007080392中所出現之SEQ ID No)，

dAb8、dAb 10、dAb36、dAb7r20、dAb7r21、dAb7r22、dAb7r23、dAb7r24、dAb7r25、dAb7r26、dAb7r27、dAb7r28、dAb7r29、dAb7r30、dAb7r31、dAb7r32、dAb7r33、dAb7h21、dAb7h22、dAb7h23、Ab7h24、Ab7h25、Ab7h26、dAb7h27、dAb7h30、dAb7h31、dAb2、dAb4、dAb7、dAb11、dAb12、dAb13、dAb15、dAb16、dAb17、dAb18、dAb19、dAb21、dAb22、dAb23、dAb24、dAb25、dAb26、dAb27、dAb30、dAb31、dAb33、dAb34、dAb35、dAb38、dAb41、dAb46、dAb47、dAb52、dAb53、dAb54、dAb55、dAb56、dAb7m12、dAb7m16、dAb7m26、dAb7r1、dAb7r3、dAb7r4、dAb7r5、dAb7r7、dAb7r8、dAb7r13、dAb7r14、dAb7r15、dAb7r16、dAb7r17、dAb7r18、dAb7r19、dAb7h1、dAb7h2、dAb7h6、dAb7h7、dAb7h8、dAb7h9、dAb7h10、dAb7h11、dAb7h12、dAb7h13、dAb7h14、dAb7p1及dAb7p2。

舉例而言，結合人類血清白蛋白之dAb可包含與以下各物具有至少約90%、或至少約95%、或至少約96%、或至少約97%、或至少約98%、或至少約99%之胺基酸序列一致性的胺基酸序列：DOM7h-2(SEQ ID NO:482)、DOM7h-3(SEQ ID NO:483)、DOM7h-4(SEQ ID NO:484)、DOM7h-

6(SEQ ID NO:485)、DOM7h-1(SEQ ID NO:486)、DOM7h-7(SEQ ID NO:487)、DOM7h-8(SEQ ID NO:496)、DOM7r-13(SEQ ID NO:497)、DOM7r-14(SEQ ID NO:498)、DOM7h-22(SEQ ID NO:489)、DOM7h-23(SEQ ID NO:490)、DOM7h-24(SEQ ID NO:491)、DOM7h-25(SEQ ID NO:492)、DOM7h-26(SEQ ID NO:493)、DOM7h-21(SEQ ID NO:494)、DOM7h-27(SEQ ID NO:495)(該段落中之SEQ ID No為WO2007080392中所出現之SEQ ID No)，

dAb8、dAb 10、dAb36、dAb7h21、dAb7h22、dAb7h23、Ab7h24、Ab7h25、Ab7h26、dAb7h27、dAb7h30、dAb7h31、dAb2、dAb4、dAb7、dAb11、dAb12、dAb13、dAb15、dAb16、dAb17、dAb18、dAb19、dAb21、dAb22、dAb23、dAb24、dAb25、dAb26、dAb27、dAb30、dAb31、dAb33、dAb34、dAb35、dAb38、dAb41、dAb46、dAb47、dAb52、dAb53、dAb54、dAb55、dAb56、dAb7h1、dAb7h2、dAb7h6、dAb7h7、dAb7h8、dAb7h9、dAb7h10、dAb7h11、dAb7h12、dAb7h13及dAb7h14。

在某些實施例中，dAb結合人類血清白蛋白且包含與選自由以下各物組成之群之dAb的胺基酸序列具有至少約80%、或至少約85%、或至少約90%、或至少約95%、或至少約96%、或至少約97%、或至少約98%、或至少約99%之胺基酸序列一致性的胺基酸序列：

DOM7h-2(SEQ ID NO:482)、DOM7h-6(SEQ ID NO:

485)、DOM7h-1(SEQ ID NO:486)、DOM7h-7(SEQ ID NO:487)、DOM7h-8(SEQ ID NO:496)、DOM7h-22(SEQ ID NO:489)、DOM7h-23(SEQ ID NO:490)、DOM7h-24(SEQ ID NO:491)、DOM7h-25(SEQ ID NO:492)、DOM7h-26(SEQ ID NO:493)、DOM7h-21(SEQ ID NO:494)、DOM7h-27(SEQ ID NO:495)(該段落中之SEQ ID No為WO2007080392中所出現之SEQ ID No)，

dAb7h21、dAb7h22、dAb7h23、Ab7h24、Ab7h25、Ab7h26、dAb7h27、dAb7h30、dAb7h31、dAb2、dAb4、dAb7、dAb38、dAb41、dAb7h1、dAb7h2、dAb7h6、dAb7h7、dAb7h8、dAb7h9、dAb7h10、dAb7h11、dAb7h12、dAb7h13及dAb7h14。

在更特定實施例中，dAb為結合人類血清白蛋白且具有選自由以下各物組成之群之胺基酸序列的V_K dAb：

DOM7h-2(SEQ ID NO:482)、DOM7h-6(SEQ ID NO:485)、DOM7h-1(SEQ ID NO:486)、DOM7h-7(SEQ ID NO:487)、DOM7h-8(SEQ ID NO:496)(該段落中之SEQ ID No為WO2007080392中所出現之SEQ ID No)，

dAb2、dAb4、dAb7、dAb38、dAb41、dAb54、dAb7h1、dAb7h2、dAb7h6、dAb7h7、dAb7h8、dAb7h9、dAb7h10、dAb7h11、dAb7h12、dAb7h13及dAb7h14。

在更特定實施例中，dAb為結合人類血清白蛋白且具有選自dAb7h30及dAb7h31之胺基酸序列的V_H dAb。

在更特定實施例中，dAb為dAb7h11或dAb7h14。

在其他實施例中，dAb、配位體或拮抗劑結合人類血清白蛋白且包含任何上述胺基酸序列中之一、兩或三個CDR，例如dAb7h11或dAb7h14中之一、兩或三個CDR。

結合血清白蛋白之合適駱駝類V_{HH}包括WO 2004/041862(Ablynx N.V.)及WO2007080392中所揭示之彼等V_{HH}(該等V_{HH}序列及其核酸對應物以引用之方式併入本文中且構成本發明正文之揭示內容之一部分)，諸如序列A(SEQ ID NO:518)、序列B(SEQ ID NO:519)、序列C(SEQ ID NO:520)、序列D(SEQ ID NO:521)、序列E(SEQ ID NO:522)、序列F(SEQ ID NO:523)、序列G(SEQ ID NO:524)、序列H(SEQ ID NO:525)、序列I(SEQ ID NO:526)、序列J(SEQ ID NO:527)、序列K(SEQ ID NO:528)、序列L(SEQ ID NO:529)、序列M(SEQ ID NO:530)、序列N(SEQ ID NO:531)、序列O(SEQ ID NO:532)、序列P(SEQ ID NO:533)、序列Q(SEQ ID NO:534)，該等序列號對應於WO2007080392或WO 2004/041862(Ablynx N.V.)中所引用之序列號。在某些實施例中，駱駝類V_{HH}結合人類血清白蛋白且包含與WO2007080392中所揭示之ALB 1或SEQ ID NOS:518-534中之任何一個具有至少約80%、或至少約85%、或至少約90%、或至少約95%、或至少約96%、或至少約97%、或至少約98%、或至少約99%之胺基酸序列一致性的胺基酸序列，該等序列號對應於WO2007080392或WO 2004/041862中所引用之序列號。

在一些實施例中，配位體或拮抗劑包含與本文中所揭示之任何抗血清白蛋白dAb競爭以結合血清白蛋白(例如人類血清白蛋白)之抗血清白蛋白dAb。

在一替代實施例中，拮抗劑或配位體包含對VEGF(例如，人類VEGF)具有特異性之結合部分，其中該部分包含如2008年2月8日申請之同在申請中之申請案PCT/GB2008/000453中所述的非免疫球蛋白序列，該等結合部分其製造及選擇(例如，自多樣性庫)方法及其序列之揭示內容、以引用之方式併入本文中作為本發明正文之揭示內容之一部分)。

接合半衰期延長部分(例如，白蛋白)

在一實施例中，使(一或多個)半衰期延長部分(例如，白蛋白、轉鐵蛋白及其片段及類似物)與本發明之VEGF結合多肽、dAb或拮抗劑接合或締合。供VEGF結合格式使用之合適白蛋白、白蛋白片段或白蛋白變異體之實例描述於WO 2005077042中，其揭示內容以引用之方式併入本文中且構成本發明正文之揭示內容之一部分 。在本發明中尤其可使用以下白蛋白、白蛋白片段或白蛋白變異體：

- SEQ ID NO: 1(如WO 2005077042中所揭示，該序列明確地以引用之方式併入本發明揭示內容中)；
- 包含WO 2005077042中之SEQ ID NO: 1之胺基酸1-387或由該等胺基酸1-387組成之白蛋白片段或變異體；
- 包含選自由以下各物組成之群之胺基酸序列的白蛋白或其片段或變異體：(a)WO 2005077042中之SEQ ID

NO: 1之胺基酸54至61；(b)WO 2005077042中之SEQ ID NO: 1之胺基酸76至89；(c)WO 2005077042中之SEQ ID NO: 1之胺基酸92至100；(d)WO 2005077042中之SEQ ID NO:1胺基酸170至176；(e)WO 2005077042中之SEQ ID NO: 1之胺基酸247至252；(f)WO 2005077042中之SEQ ID NO: 1之胺基酸266至277；(g)WO 2005077042中之SEQ ID NO: 1之胺基酸280至288；(h)WO 2005077042中之SEQ ID NO: 1胺基酸362至368；(i)2005077042中之SEQ ID NO: 1之胺基酸439至447；(j)WO 2005077042中之SEQ ID NO: 1之胺基酸462至475；(k)WO 2005077042中之SEQ ID NO: 1之胺基酸478至486；及(l)WO 2005077042中之SEQ ID NO: 1之胺基酸560至566。

供VEGF結合格式使用之合適白蛋白、片段或類似物之其他實例描述於WO 03076567中，其揭示內容以引用之方式併入本文中且構成本發明正文之揭示內容之一部分。在本發明中尤其可使用以下白蛋白、片段或變異體：

- 如WO 03076567中之(例如)圖3中所述之人類血清白蛋白，(該序列資訊係明確地以引用之方式併入本發明揭示內容中)；
- 由具有66,500之化學式分子量(formula molecular weight)之585個胺基酸的非糖基化多肽單鏈組成的人類血清白蛋白(HA)(參見，Meloun等人，*FEBS Letters 58:136* (1975)；Behrens等人，*Fed. Proc. 34:591*

(1975)；Lawn等人，*Nucleic Acids Research* 9:6102-6114 (1981)；Minghetti等人，*J. Biol. Chem. 261:6747* (1986))；

- 如Weitkamp等人，*Ann.* Hum. *Genet. 37*:219 (1973)中所述之白蛋白之多晶型變異體或類似物或片段；
- 如EP 322094中所述之白蛋白片段或變異體，例如HA(1-373)、HA(1-388)、HA(1-389)、HA(1-369)及HA(1-419)及1-369與1-419之間的片段；
- 如EP 399666中所述之白蛋白片段或變異體，例如HA(1-177)及HA(1-200)及HA(l-X)之間的片段，其中X為178至199之任何數字。

當使用(一或多個)半衰期延長部分(例如，白蛋白、轉鐵蛋白及其片段及類似物)編排本發明之VEGF結合多肽、dAb及拮抗劑格式時，可使用任何合適方法(諸如，直接融合)例如藉由使用編碼融合蛋白之單一核苷酸構築體使其與VEGF結合部分(例如，抗VEGF dAb)接合，其中該融合蛋白係編碼為半衰期延長部分定位於VEGF結合部分之N-末端或C-末端之多肽單鏈。或者，可藉由在部分之間使用肽連接子實現接合，肽連接子例如WO 03076567或WO 2004003019中所述之肽連接子(該等連接子揭示內容以引用之方式併入本發明揭示內容中以提供用於本發明之實例)。增加活體內血清半衰期之多肽通常為活體內天然存在且抗降解或由自生物體(例如，人類)移除不想要之物質之內源性機制移除的多肽。例如，增加活體內血清半衰期

之多肽可選自來自細胞外基質之蛋白質、血液中可見之蛋白質、血腦屏障或神經組織中可見之蛋白質、位於腎、肝、肺、心臟、皮膚或骨中之蛋白質、應力蛋白、疾病特異性蛋白質或涉及Fc轉運之蛋白質。

在貫穿該揭示內容所述之本發明之實施例中，代替在本發明之拮抗劑或配位體中使用抗VEGF "dAb"，涵蓋熟練的使用者可使用包含結合VEGF之本發明之dAb的一或多個或所有三個CDR(例如，接枝於合適蛋白質骨架或骨幹上之CDR，該骨架或骨幹例如親和體、SpA骨架、LDL受體A類區域或EGF區域)的多肽或區域。因此，揭示內容整體應解釋為提供使用該等區域代替dAb之拮抗劑之揭示內容。在這點上，參見2008年2月8日申請之PCT/GB2008/000453，其揭示內容以引用之方式併入)。

因此，在一實施例中，本發明之拮抗劑包含合適格式之對VEGF具有結合特性的免疫球蛋白單一可變區域或區域抗體(dAb)或該dAb之互補判定區。拮抗劑可為由該dAb組成或大體上由該dAb組成之多肽。拮抗劑可為包含合適格式、諸如抗體格式(例如，IgG樣格式、scFv、Fab、Fab'、$F(ab')_2$)中之dAb(或dAb之CDR)之多肽，或包含結合VEGF之dAb及結合另一靶蛋白質、抗原或抗原決定基(例如，血清白蛋白)之第二dAb的雙特異性配位體。

可將本發明之多肽、dAb及拮抗劑可編排格式為此項技術已知之多種合適抗體格式，諸如IgG樣格式、嵌合抗體、人化抗體、人類抗體、單鏈抗體、雙特異性抗體、抗

體重鏈、抗體輕鏈、抗體重鏈及/或輕鏈之同元二聚體及異元二聚體、任何上述者之抗原結合片段(例如，Fv片段(例如，單鏈Fv(scFv)、雙硫鍵鍵結之Fv)、Fab片段、Fab'片段、$F(ab')_2$片段)、單一可變區域(例如，V_H、V_L)、dAb及任何上述者之經修飾形式(例如，藉由共價連接聚伸烷二醇(例如，聚乙二醇、聚丙二醇、聚丁二醇)或其他合適聚合物而修飾)。

在一些實施例中，本發明提供為IgG樣格式之配位體(例如，抗VEGF拮抗劑)。該等格式具有習知IgG分子之四鏈結構(兩個重鏈及兩個輕鏈)，其中一或多個可變區(V_H及/或V_L)已經本發明之dAb置換。在一實施例中，各可變區(2個V_H區及2個V_L區)經dAb或單一可變區域置換，其中之至少一個為本發明之抗VEGF dAb。包括在IgG樣格式之dAb或單一可變區域可具有相同特異性或不同特異性。在一些實施例中，IgG樣格式為四價且可具有一種(僅抗VEGF)、兩種(例如，抗VEGF及抗SA)、三種或四種特異性。舉例而言，IgG樣格式可為單特異性且包含四個具有相同特異性之dAb；可為雙特異性且包含三個具有相同特異性之dAb及另一具有不同特異性之dAb；可為雙特異性且包含兩個具有相同特異性之dAb及兩個具有常見但不同特異性之dAb；可為三特異性且包含具有相同特異性之第一及第二dAb、具有不同特異性之第三dAb及具有不同於第一、第二及第三dAb之特異性之第四dAb；或可為四異性且包含四個各具有不同特異性之dAb。可製備IgG樣格式之抗原

結合片段(例如，Fab、$F(ab')_2$、Fab'、Fv、scFv)。在一實施例中，IgG樣格式或其抗原結合片段不會交聯VEGF，例如該格式對VEGF而言可為單價。若想要補體活化及/或抗體依賴性細胞的細胞毒性(ADCC)功能，則配位體可為IgG1樣格式。必要時，IgG樣格式可包含突變恆定區(變異體IgG重鏈恆定區)以最小化與Fc受體之結合及/或固定補體之能力，(例如參見Winter等人，GB 2,209,757 B；Morrison等人，WO 89/07142；Morgan等人，WO 94/29351，1994年12月22日)。

可將本發明之配位體(多肽、dAb及拮抗劑)編排格式為含有與第二免疫球蛋白單一可變區域直接融合之第一免疫球蛋白單一可變區域的融合蛋白。必要時，該格式可進一步包含半衰期延長部分。舉例而言，配位體可包含與第二免疫球蛋白單一可變區域直接融合的第一免疫球蛋白單一可變區域的融合蛋白，其中該第二免疫球蛋白單一可變區域直接融合於結合血清白蛋白之免疫球蛋白單一可變區域。

具有對靶具有結合特異性之結合位點之多肽區域的定向及配位體是否包含連接子通常為設計所要選擇之問題。然而，一些定向在有或無連接子之情況下可提供較其他定向佳之結合特徵。本發明所涵蓋之所有定向(例如，dAb1-連接子-dAb2、dAb2-連接子-dAb1)為含有提供可藉由篩選容易地鑑別之想要結合特徵的定向的配位體。

可使本發明之多肽及dAb(包括dAb單體、二聚體及三聚

體)與抗體Fc區連接，該抗體Fc區包含C_H2及C_H3區域中之一者或兩者及視情況鉸鏈區。舉例而言，可使用編碼以單一核苷酸序列形式連接於Fc區之配位體之載體製造該等多肽。

此外，本發明提供上述dAb單體(例如，抗VEGF dAb單體)之二聚體、三聚體及聚合物。

密碼子優化序列

如上所述，本發明之實施例提供編碼本發明之多肽及可變區域之密碼子優化核苷酸序列。如以下說明中所示，可產生編碼相同可變區域(在此狀況下，可變區域胺基酸序列與DOM1h-131-206一致)之具有約70%一致性之密碼子優化序列。在該情況下，序列經優化從而由馬斯德畢赤酵母(*Pichia pastoris*)(密碼子優化序列1-3)或大腸桿菌(密碼子優化序列4及5)表現。

考慮到遺傳密碼中之及簡併度執行計算且最大化由DOM1h-131-206之核苷酸序列(如下文DOM1h-131-206 WT所示)及還編碼與DOM1h-131-206一致之可變區域之理論核苷酸序列所編碼的各簡併密碼子中的核苷酸變化數。計算揭露理論序列將與DOM1h-131-206之核苷酸序列具有僅57%之一致性。

密碼子優化序列1

DNA序列

gaggttcaattgttggaatccggtggtggattggttcaacctggtggtttctttgagattgtcctgtgctg
cttccggttttacttttcgctcacgagactatggtttgggttagacaggctccaggtaaaggattggaatg
ggtttcccacattccaccagatggtcaagatccattctacgctgactccgttaagggaagattcactatc
tccagagacaactccaagaacactttgtacttgcagatgaactccttgagagctgaggatactgctgttt
accactgtgctttgttgccaaagagaggaccttggtttgattactggggacagggaactttggttactgt
ttcttcc

相應AA序列

evqllesggglvqpggslrlscaasgftfahetmvwvrqapgkglewvshippdgqdpfyadsvkgrfti
srdnskntlylqmnslraedtavyhcallpkrgpwfdywgqgtlvtvss

- 與WT序列之核苷酸序列一致性為74.1%

```
                                  1                                  50
密碼子優化 Domlh-131-206    (1) GAGGTTCAATTGTTGGAATCCGGTGGTGGATTGGTTCAACCTGGTGGTTTC
       Domlh-131-206 WT     (1) GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTC
                 一致       (1) GAGGT CA  TGTTGGA TC GG GG GG TTGGT CA CCTGG GG TC
                                 51                                 100
密碼子優化 Domlh-131-206   (51) TTTGAGATTGTCCTGTGCTGCTTCCGGTTTTACTTTCGCTCACGAGACTA
       Domlh-131-206 WT    (51) CCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGCATGAGACGA
                 一致      (51)   TG G  T TCCTGTGC GC TCCGG TT AC TT GC CA GAGAC A
                                101                                150
密碼子優化 Domlh-131-206  (101) TGGTTTGGGTTAGACAGGCTCCAGGTAAAGGATTGGAATGGGTTCCCAC
       Domlh-131-206 WT   (101) TGGTGTGGGTCCGCCAGGCACCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAT
                 一致     (101) TGGT TGGGT  G CAGGC CCAGG AA GG  T GA TGGGT TC CA
                                151                                200
密碼子優化 Domlh-131-206  (151) ATTCCACCAGATGGTCAAGATCCATTCTACGCTGACTCCGTTAAGGGAAG
       Domlh-131-206 WT   (151) ATTCCCCCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCG
                 一致     (151) ATTCC CC GATGGTCA GATCC TTCTACGC GACTCCGT AAGGG  G
                                201                                250
密碼子優化 Domlh-131-206  (201) ATTCACTATCTCCAGAGACAACTCCAAGAACACTTTGTACTTGCAGATGA
       Domlh-131-206 WT   (201) GTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGA
                 一致     (201)  TTCAC ATCTCC G GACAA TCCAAGAACAC  T TA  TGCA ATGA
                                251                                300
密碼子優化 Domlh-131-206  (251) ACTCCTTGAGAGCTGAGGATACTGCTGTTTACCACTGTGCTTTGTTGCCA
       Domlh-131-206 WT   (251) ACAGCCTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATCACTGTGCGCTGCTTCCT
                 一致     (251) AC  C TG G GC GAGGA AC GC GT TA CACTGTGC  TG T CC
                                301                                350
密碼子優化 Domlh-131-206  (301) AAGAGAGGACCTTGGTTTGATTACTGGGGACAGGGAACTTTGGTTACTGT

       Domlh-131-206 WT   (301) AAGAGGGGGCCTTGGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGT
                 一致     (301) AAGAG GG CCTTGGTTTGA TACTGGGG CAGGGAAC  TGGT AC GT
                                351        363
密碼子優化 Domlh-131-206  (351) TTCTTCCTAATGA
       Domlh-131-206 WT   (351) CTCGAGC------
                 一致     (351)  TC   C
```

密碼子優化序列2

DNA序列

gagaaaagagaggttcaattgcttgaatctggaggaggtttggtccagccaggagggtcccttcgactaa
gttgtgctgccagtgggtttacgtttgctcatgaaactatggtatgggtccgacaggcacctggtaaagg
tcttgaatgggtttcacatatcccctccagacggtcaagacccattttacgctgattccgtgaaaggcaga
tttacaatttcacgagataatttctaaaaacaccttgtacttacaaatgaactcattgagagctgaggaca
ctgcagtttatcactgcgctttactaccaaaacgtggaccttggtttgattattggggccaaggtacgtt
agtgactgttagttct

相應AA序列

ekrevqllesggglvqpggslrlscaasgftfahetmvwvrqapgkglewvshippdgqdpfyadsvkgr
ftisrdnskntlylqmnslraedtavyhcallpkrgpwfdywgqgtlvtvss

- 與WT序列之核苷酸序列一致性為71.1%

```
                          1                                                  50
    Domlh-131-206 WT     (1) ---------GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCC
 僅畢赤酵母MFa 206 dAb   (1) GAGAAAAGAGAGGTTCAATTGCTTGAATCTGGAGGAGGTTTGGTCCAGCC
                一致      (1)          GAGGT CA  TG T GA TCTGG GGAGG TTGGT CAGCC
                          51                                                 100
    Domlh-131-206 WT    (42) TGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGC
 僅畢赤酵母MFa 206 dAb  (51) AGGAGGGTCCCTTCGACTAAGTTGTGCTGCCAGTGGGTTTACGTTTGCTC
                一致      (51)  GG GGGTCCCT CG CT    TGTGC GCC   GG TT AC TTTGC C
                         101                                                 150
    Domlh-131-206 WT    (92) ATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCACCAGGGAAGGGTCTAGAGTGG
 僅畢赤酵母MFa 206 dAb (101) ATGAAACTATGGTATGGGTCCGACAGGCACCTGGTAAAGGTCTTGAATGG
                一致     (101) ATGA AC ATGGT TGGGTCCG CAGGCACC GG AA GGTCT GA TGG
                         151                                                 200
    Domlh-131-206 WT    (142) GTCTCACATATTCCCCCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
 僅畢赤酵母MFa 206 dAb (151) GTTTCACATATCCCTCCAGACGGTCAAGACCCATTTTACGCTGATTCCGT
                一致     (151) GT TCACATAT CC CC GA GGTCA GA CC TT TACGC GA TCCGT
                         201                                                 250
    Domlh-131-206 WT    (192) GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATC
 僅畢赤酵母MFa 206 dAb (201) GAAAGGCAGATTTACAATTTCACGAGATAATTCTAAAAACACCTTGTACT
                一致     (201) GAA GGC G TT AC AT TC CG GA AATTC AA AACAC  T TA
                         251                                                 300
    Domlh-131-206 WT    (242) TGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATCACTGTGCG
 僅畢赤酵母MFa 206 dAb (251) TACAAATGAACTCATTGAGAGCTGAGGACACTGCAGTTTATCACTGCGCT
                一致     (251) T CAAATGAAC    TG G GC GAGGACAC GC GT TATCACTG GC
                         301                                                 350
    Domlh-131-206 WT    (292) CTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCT
 僅畢赤酵母MFa 206 dAb (301) TTACTACCAAAACGTGGACCTTGGTTTGATTATTGGGGCCAAGGTACGTT
                一致     (301)  T CT CC AA  G GG CCTTGGTTTGA TA TGGGG CA GG AC  T
                         351           367
    Domlh-131-206 WT    (342) GGTCACCGTCTCGAGC-
 僅畢赤酵母MFa 206 dAb (351) AGTGACTGT-TAGTTCT
                一致     (351)  GT AC GT T G  C
```

密碼子優化序列3

DNA序列

gaagtgcagcttcttgaaagtggtggagggctagtgcagccagggggatctttaagattatcatgcgctg
ccagtggatttacttttgctcacgagacgatggtctgggtgagacaagctcctggaaaaggtttagagtg
ggtttctcacattccacctgatggtcaagatcctttctacgcagattccgtcaaaggaagatttactatc

tccagagataatagtaaaaacactttgtacctacagatgaactcacttagagccgaagataccgctgtgt
accactgcgccttgttgccaaagagaggtccttggttcgattactggggtcagggtactctggttacagt
ctcatct

相應AA序列

evqllesggglvqpggslrlscaasgftfahetmvwvrqapgkglewvshippdgqdpfyadsvkgrfti
srdnskntlylqmnslraedtavyhcallpkrgpwfdywgqgtlvtvss

- 與WT序列之核苷酸序列一致性為72.6%

```
                          1                                                  50
    Domlh-131-206 WT     (1) GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTC
 僅畢赤酵母Pre 206 dAb   (1) GAAGTGCAGCTTCTTGAAAGTGGTGGAGGGCTAGTGCAGCCAGGGGGATC
                一致      (1) GA GTGCAGCT  T GA   TGG GGAGG  T GT CAGCC GGGGG TC
                          51                                                 100
    Domlh-131-206 WT    (51) CCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGCATGAGACGA
 僅畢赤酵母Pre 206 dAb  (51) TTTAAGATTATCATGCGCTGCCAGTGGATTTACTTTGCTCACGAGACGA
                一致      (51)  T  G  T TC TG GC GCC   GGATT AC TTTGC CA GAGACGA
                         101                                                 150
    Domlh-131-206 WT    (101) TGGTGTGGGTCCGCCAGGCACCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAT
 僅畢赤酵母Pre 206 dAb (101) TGGTCTGGGTGAGACAAGCTCCTGGAAAAGGTTTAGAGTGGGTTTCTCAC
                一致     (101) TGGT TGGGT  G CA GC CC GG AA GGT TAGAGTGGGT TC CA
                         151                                                 200
    Domlh-131-206 WT    (151) ATTCCCCCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCG
 僅畢赤酵母Pre 206 dAb (151) ATTCCACCTGATGGTCAAGATCCTTTCTACGCAGATTCCGTCAAAGGAAG
                一致     (151) ATTCC CC GATGGTCA GATCC TTCTACGCAGA TCCGT AA GG  G
                         201                                                 250
```

```
   Domlh-131-206 WT  (201) GTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGA
僅畢赤酵母 Pre 206 dAb  (201) ATTTACTATCTCCAGAGATAATAGTAAAAACACTTTGTACCTACAGATGA
                一致  (201)  TT AC ATCTCC G GA AAT   AA AACAC  T TA CT CA ATGA
                      251                                                 300
   Domlh-131-206 WT  (251) ACAGCCTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATCACTGTGCGCTGCTTCCT
僅畢赤酵母 Pre 206 dAb  (251) ACTCACTTAGAGCCGAAGATACCGCTGTGTACCACTGCGCCTTGTTGCCA
                一致  (251) AC   CT  G GCCGA GA AC GC GT TA CACTG GC  TG T CC
                      301                                                 350
   Domlh-131-206 WT  (301) AAGAGGGGGCCTTGGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGT
僅畢赤酵母 Pre 206 dAb  (301) AAGAGAGGTCCTTGGTTCGATTACTGGGGTCAGGGTACTCTGGTTACAGT
                一致  (301) AAGAG GG CCTTGGTT GA TACTGGGGTCAGGG AC CTGGT AC GT
                      351
   Domlh-131-206 WT  (351) CTCGAGC-
僅畢赤酵母 Pre 206 dAb  (351) CTC-ATCT
                一致  (351) CTC A C
```

密碼子優化序列4

DNA序列

```
gaagtacaactgctggagagcggtggcggcctggttcaaccgggtggttccctgcgcctgtcctgtgcgg
catctggtttcaccttcgcacacgaaaccatggtgtgggttcgccaagctccgggcaaaggcctggaatg
ggtaagccacattcctccagatggccaggacccattctatgcggattccgttaagggtcgctttaccatt
tctcgtgataactccaaaaacaccctgtacctgcagatgaactccctgcgcgccgaggatactgcggtgt
accattgtgcgctgctgcctaaacgtggccccgtggttcgattactggggtcagggtactctggtcaccgt
aagcagc
```

相應AA序列

```
evqllesggglvqpggslrlscaasgftfahetmvwvrqapgkglewvshippdgqdpfyadsvkgrfti
srdnsskntlylqmnslraedtavyhcallpkrgpwfdywgqgtlvtvss
```

- 與WT序列之核苷酸序列一致性為76.5%

```
                                  1                                   50
   Domlh-131-206 WT    (1) GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTC
僅大腸桿菌Sec 206 dAb    (1) GAAGTACAACTGCTGGAGAGCGGTGGCGGCCTGGTTCAACCGGGTGGTTC
                一致    (1) GA GT CA CTG TGGAG   GG GG GGC TGGT CA CC GG GG TC
                        51                                                100
   Domlh-131-206 WT   (51) CCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGCATGAGACGA
僅大腸桿菌Sec 206 dAb   (51) CCTGCGCCTGTCCTGTGCGGCATCTGGTTTCACCTTCGCACACGAAACCA
                一致   (51) CCTGCG CT TCCTGTGC GC TC GG TTCACCTT GC CA GA AC A
                       101                                                150
   Domlh-131-206 WT  (101) TGGTGTGGGTCCGCCAGGCACCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAT
僅大腸桿菌Sec 206 dAb  (101) TGGTGTGGGTTCGCCAAGCTCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGGTAAGCCAC
                一致  (101) TGGTGTGGGT CGCCA GC CC GG AA GG CT GA TGGGT    CA
                       151                                                200
   Domlh-131-206 WT  (151) ATTCCCCCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCG
僅大腸桿菌Sec 206 dAb  (151) ATTCCTCCAGATGGCCAGGACCCATTCTATGCGGATTCCGTTAAGGGTCG
                一致  (151) ATTCC CC GATGG CAGGA CC TTCTA GC GA TCCGT AAGGG CG
                       201                                                250
   Domlh-131-206 WT  (201) GTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGA
僅大腸桿菌Sec 206 dAb  (201) CTTTACCATTTCTCGTGATAACTCCAAAAACACCCTGTACCTGCAGATGA
                一致  (201)  TT ACCAT TC CG GA AA TCCAA AACAC CT TA CTGCA ATGA
                       251                                                300
   Domlh-131-206 WT  (251) ACAGCCTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATCACTGTGCGCTGCTTCCT
僅大腸桿菌Sec 206 dAb  (251) ACTCCCTGCGCGCCGAGGATACTGCGGTGTACCATTGTGCGCTGCTGCCT
                一致  (251) AC  CCTGCG GCCGAGGA AC GCGGT TA CA TGTGCGCTGCT CCT
                       301                                                350
   Domlh-131-206 WT  (301) AAGAGGGGGCCTTGGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGT
僅大腸桿菌Sec 206 dAb  (301) AAACGTGGCCCGTGGTTCGATTACTGGGGTCAGGGTACTCTGGTCACCGT
                一致  (301) AA  G GG CC TGGTT GA TACTGGGGTCAGGG AC CTGGTCACCGT
                       351
   Domlh-131-206 WT  (351) CTCGAGC
僅大腸桿菌Sec 206 dAb  (351) AAGCAGC
                一致  (351)     AGC
```

密碼子優化序列5

DNA序列

```
gaggttcaactgctggaatctggtggtggtctggtacaaccgggtggttccctgcgtctgagctgtgcag
cctctggtttcaccttcgctcatgagaccatggtttgggtacgccaggctccgggtaaaggcctggagtg
ggtaagccatatccctcctgatggtcaggacccgttctatgctgattccgtcaaaggccgttttaccatt
tctcgtgacaacagcaaaaacactctgtacctgcaaatgaactccctgcgtgcagaagacacggcggttt
atcactgtgcactgctgccaaaacgcggcccttggttcgactactggggccagggtactctggtcactgt
atcttct
```

相應AA序列

```
evqllesggglvqpggslrlscaasgftfahetmvwvrqapgkglewvshippdgqdpfyadsvkqrfti
srdnsknt1ylqmnslraedtavyhcallpkrgpwfdywgqgtlvtvss
```

- 與WT序列之核苷酸序列一致性為78.4%

```
                    1                                                  50
  Dom1h-131-206 WT  (1) GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTC
僅大腸桿菌 IC 206 dAb (1) GAGGTTCAACTGCTGGAATCTGGTGGTGGTCTGGTACAACCGGGTGGTTC
            一致    (1) GAGGT CA CTG TGGA TCTGG GG GG  TGGTACA CC GG GG TC
                   51                                                 100
  Dom1h-131-206 WT (51) CCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGCATGAGACGA
僅大腸桿菌 IC 206 dAb (51) CCTGCGTCTGAGCTGTGCAGCCTCTGGTTTCACCTTCGCTCATGAGACCA
            一致    (51) CCTGCGTCT   CTGTGCAGCCTC GG TTCACCTT GC CATGAGAC A
                  101                                                 150
  Dom1h-131-206 WT (101) TGGTGTGGGTCCGCCAGGCACCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAT
僅大腸桿菌 IC 206 dAb (101) TGGTTTGGGTACGCCAGGCTCCGGGTAAAGGCCTGGAGTGGGTAAGCCAT
            一致    (101) TGGT TGGGT CGCCAGGC CC GG AA GG CT GAGTGGGT    CAT

                  151                                                 200
  Dom1h-131-206 WT (151) ATTCCCCCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCG
僅大腸桿菌 IC 206 dAb (151) ATCCCTCCTGATGGTCAGGACCCGTTCTATGCTGATTCCGTCAAAGGCCG
            一致    (151) AT CC CC GATGGTCAGGA CC TTCTA GC GA TCCGT AA GGCCG
                  201                                                 250
  Dom1h-131-206 WT (201) GTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGA
僅大腸桿菌 IC 206 dAb (201) TTTTACCATTTCTCGTGACAACAGCAAAAACACTCTGTACCTGCAAATGA
            一致    (201)  TT ACCAT TC CG GACAA   CAA AACAC CT TA CTGCAAATGA
                  251                                                 300
  Dom1h-131-206 WT (251) ACAGCCTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATCACTGTGCGCTGCTTCCT
僅大腸桿菌 IC 206 dAb (251) ACTCCCTGCGTGCAGAAGACACGGCGGTTTATCACTGTGCACTGCTGCCA
            一致    (251) AC  CCTGCGTGC GA GACAC GCGGT TATCACTGTGC CTGCT CC
                  301                                                 350
  Dom1h-131-206 WT (301) AAGAGGGGGCCTTGGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGT
僅大腸桿菌 IC 206 dAb (301) AAACGCGGCCCTTGGTTCGACTACTGGGGCCAGGGTACTCTGGTCACTGT
            一致    (301) AA  G GG CCTTGGTT GACTACTGGGG CAGGG AC CTGGTCAC GT
                  351
  Dom1h-131-206 WT (351) CTCGAGC
僅大腸桿菌 IC 206 dAb (351) ATCTTCT
            一致    (351)  TC
```

例證

實例A：主要選擇及表徵人類VEGF之區域抗體

所產生之區域抗體係源自噬菌體庫。根據相關標準方法執行被動吸收之人類TNFR1之可溶性選擇與淘選。人類TNFR1係以可溶性重組蛋白質形式自R&D systems(目錄號636-R1-025/CF)或Peprotech(目錄號310-07)購得，且直接使用(在被動選擇之狀況下)或在生物素標記後，經由一級胺偶合使用，接著在生物檢定中品質控制其活性且由質譜

分析其MW及生物素標記程度。通常執行3輪選擇，在每下一輪中利用遞減含量之抗原。

由噬菌體ELISA篩選來自選擇物之輸出物的抗TNFR1結合純系之存在。自該等噬菌體選擇物分離DNA且亞克隆於表現載體中以表現可溶性dAb片段。將可溶性dAb片段表現於96孔板中，且使用以抗c-myc偵測之直接結合ELISA或使用抗生蛋白鏈菌素/經生物素標記TNFR1 BIAcore™晶片之BIAcore™使用上清液篩選抗TNFR1結合dAb之存在，且根據解離速率(off-rate)分等級。

下文所述之前導分子係源自命名為DOM1h-131(揭示於WO2006038027中)之親本dAb。該分子在使用60 nM經生物素標記抗原選擇3輪後自噬菌體呈現庫選得。在各輪選擇中將經抗生蛋白鏈菌素或中性鏈親和素塗佈之Dyna珠粒交替作為捕獲試劑以防止選擇針對抗生蛋白鏈菌素或中性鏈親和素之結合劑。該階段前導DOM1h-131之效價如在MRC-5纖維母細胞/IL-8釋放細胞檢定中所測定處於低微莫耳範圍內。如由BIAcore™所測定之結合動力學通常呈現快速締合速率(on rate)/快速解離速率。該DOM1h-131前導分子之大腸桿菌表現含量以C-末端myc標記單體計處於8 mg/l之範圍內。

前導分子之親和力成熟作用：

使DOM1h-131進行親和力成熟作用以產生具有較高效價及改良生物物理學特徵之突變體(關於DOM1h-131來源之前導分子之胺基酸序列，參見圖3)。使用易錯PCR聚合酶

(Genemorph II，Stratagene)產生易錯庫(平均數為每dAb序列1個胺基酸變化，庫規模8×10^7)後，利用該等易錯庫執行7輪選擇。該策略可引起純系DOM1h-131-8分離，一種如由MRC-5細胞檢定所量測4個胺基酸變化(一個在構架1(FR1)中，一個在CDR1中，一個在CDR3中及一個在FR4中)產生約100倍效價提高(約4 nM)之分子。在該檢定中，將MRC-5細胞與測試樣品一起培養1小時，隨後添加TNF-α(200 pg/ml)。培養隔夜後，使用IL-8 ABI 8200細胞偵測檢定(FMAT)測定IL-8釋放。各實驗中包括TNF-α劑量曲線。在該檢定中，所使用之與dAb競爭結合TNFR1之TNF-α的濃度(200 pg/ml)為最大TNF-α反應之約70%。

為進一步提高效價，由易錯之前導一致資訊提示之關鍵位置處之寡核苷酸引導的突變誘發使單一胺基酸位置多樣化。該過程期間，經由BIAcore™篩選分離具有單個K94R胺基酸突變(胺基酸編號根據Kabat)及200-300 pM之RBA效價之DOM1h-131-8純系的改良形式，DOM1h-131-24(在修正之前，最初命名為DOM1h-131-8-2)。

產生其他基於該前導分子及源於其之NNS庫之易錯庫且使用熱處理使其經受3輪噬菌體選擇(關於方法，參見Jespers L等人，Aggregation-resistant domain antibodies selected on phage by heat denaturation. Nat Biotechnol. 2004年9月；22(9):1161-5)。在此選擇期間，彙集庫且自第2輪選擇所獲得之純系產生認為更加熱穩定之諸如DOM1h-131-53之dAb。假定該等純系將具有較佳生物物理

特徵。使純系DOM1h-131-53中之一些構架突變生殖系化以產生純系DOM1h-131-83。該純系形成使用如上所述之噬菌體呈現選擇或使用使用乳液之活體外隔室化技術經由寡核苷酸引導的個體CDR突變誘發進一步多樣化之基礎。噬菌體呈現策略產生前導分子DOM1h-131-117及DOM1h-131-151。活體外隔室化技術產生DOM1h-131-511。

在該階段中，在生物物理及生物檢定中比較此等三個前導分子，且DOM1h-131-511為具有最佳性質之分子。此外，在胰蛋白酶或白血球酶存在下測試該等分子的蛋白水解裂解抗性。白血球酶由自患有囊性纖維化之患者彙集的痰組成且含有高含量之彈性蛋白酶及其他蛋白酶且用作肺疾病活體內條件之替代品。該資料指示所有三個前導分子DOM1h-131-117、DOM1h-131-151及DOM1h-131-511在胰蛋白酶或白血球酶存在下均快速降解。該研究結果引起對當DOM1h-131-511處於患者體內時其活體內持久性之關注且研發一種選擇改良胰蛋白酶抗性之策略。假定該經改良胰蛋白酶抗性會對分子之其他生物物理性質產生有利效應。基本上修改標準噬菌體選擇方法以允許在對抗原選擇之前在蛋白酶存在下進行選擇。為此目的，使缺失c-myc標籤之新穎噬菌體載體工程化以允許在胰蛋白酶存在但未使所呈現之dAb裂解脫離噬菌體的情況下進行選擇。產生基於DOM1h-131-511之易錯庫且選殖於pDOM33載體中(關於pDOM33載體圖，參見圖50)。在37℃下用1 mg/ml或100 μg/ml胰蛋白酶預處理由該庫產生之噬菌體儲備液24小

時，接著添加為Roche完全蛋白酶抑制劑(Roche Complete Protease Inhibitor)(2×)之蛋白酶抑制劑以在選擇相關抗原之前阻斷胰蛋白酶活性。執行4輪選擇。在37℃下在存在或不存在胰蛋白酶(在100 μg/ml或1000 μg/ml最終胰蛋白酶濃度下)之情況下培養1小時或培養隔夜期間，在存在或不存在蛋白酶之情況下使用BIAcore™評估可溶性表現TNFR1結合dAb的結合TNFR1之能力。

此引起兩個前導分子DOM1h-131-202及DOM1h-131-206分離，該兩個前導分子如BIAcore™抗原結合實驗所示顯示改良之蛋白酶抗性。令人關注地注意到，與DOM1h-131-511相比，DOM1h-131-202僅含有一個突變在CDR2中(V53D)(所有胺基酸編號根據Kabat)，而DOM1h-131-206僅含有兩個突變：第一突變與DOM1h-131-202相同(在CDR2中之V53D突變)及第二突變為FR3中之Y91H突變(參見圖3)。該FR3中之Y91H突變出現在3-20人類生殖系基因中，指示該殘基出現在人類抗體中。該三個純系DOM1h-131-511、DOM1h-131-202及DOM1h-131-206具有如圖3中所示之胺基酸序列。

如下測定分子活性：

DOM1H-131-202、DOM1H-131-511及DOM1H-131-206結合人類TNFR1之BIAcore™結合親和力評估。

由BIAcore™分析評估DOM1H-131-202、DOM1H-131-511及DOM1H-131-206結合人類重組大腸桿菌表現之人類TNFR1之結合親和力。使用生物素標記之人類TNFR1進行

分析。將1400 RU經生物素標記之TNFR1塗佈於抗生蛋白鏈菌素(SA)晶片上。使用弱酸溶離條件使表面再生回到基線。規定濃度之DOM1H-131-202、DOM1H-131-511及DOM1H-131-206使用50 μl/min之流速通過該表面。在BIAcore™ 3000機器上進行研究，分析資料且擬合於1:1之結合模型。所有測試分子之結合資料充分擬合於1:1模型。由k_{on}及k_{off}速率計算所有K_D值。在25℃進行BIAcore™運行。

以下資料由三個獨立的實驗產生。在各個實驗中，藉由平均大量擬合結果(對kd而言使用最高之dAb濃度及對ka而言使用較低之濃度)來計算結果。資料以結果之平均值及標準偏差(在括號中)呈示(表1)。

表1：結合人類TNFR1之DOM1H-131-202、DOM1H-131-511及DOM1H-131-206之BIAcore™資料

	K_{on}	k_{off}	K_D(nM)
DOM1H-131-511 (511)	**5.03E+05** (1.07E+05)	**5.06E-04** (1.01E-04)	**1.07** (0.44)
DOM1H-131-202 (202)	**1.02E+06** (2.69E+05)	**5.42E-04** (3.69E-05)	**0.55** (0.11)
DOM1H-131-206 (206)	**1.55E+06** (3.57E+05)	**7.25E-04** (1.95E-04)	**0.47** (0.06)

DOM1H-131-202、DOM1H-131-511及DOM1H-131-206類似地且以高親和力結合人類TNFR1。DOM1H-131-202及DOM1H-131-206分別以0.55 nM及0.47 nM之平均親和力結合。與具有1.07 nM之平均親和力之DOM1H-131-511相比，DOM1H-131-202及DOM1H-131-206具有稍佳之親和力。

受體結合檢定：

在受體結合檢定中測定dAb對人類TNFR1之效價。該檢定量測TNF-α與TNFR1之結合及可溶性dAb阻斷該相互作用之能力。將TNFR1-FC融合物捕獲在預塗佈山羊抗人類IgG(H&L)之珠粒上。將受體塗佈珠粒與TNF-α(10 ng/mL)、dAb、生物素接合抗TNF-α及抗生蛋白鏈菌素alexa fluor 647在黑色側面透明底面之384孔板中一起培養。6小時後，將板在ABI 8200細胞偵測系統中讀數且測定珠粒相關螢光。若dAb阻斷TNF-α與TNFR1之結合，則螢光強度將減小。

使用ABI 8200分析軟體分析資料。使用GraphPad Prism及具有可變斜率之S形劑量反應曲線測定濃度效應曲線及效價(EC_{50})值。在三種獨立的情形下重複檢定。各實驗中包括TNF-α劑量曲線(圖38及39)。所使用之與dAb競爭以結合TNFR1之TNF-α濃度(10 ng/ml)在該檢定中為最大TNF-α反應之約90%。

圖39中展示代表性曲線圖，其展示dAb抑制TNF-α與TNFR1之結合之能力。在所有三個實驗中，陰性對照樣品(HEL4，抗雞蛋白溶菌酶dAb及V_H模擬物)在高濃度下微弱抑制TNF-α與TNFR1之間的相互作用。表2中展示測試樣品及陽性對照(自R&D Systems獲得之抗TNFR1 mAb，mAb225)及Enbrel™(依那西普(etanercept)；由連接於IgG1 Fc部分之TNFR2組成之二聚融合物；經許可用於治療類風濕性關節炎)的平均效價(EC_{50})值。

表2：三個重複實驗之TNFR1受體結合檢定中DOM1H-131-202、DOM1H-131-206及DOM1H-131-511之效價(EC_{50})值

樣品	平均EC_{50}(nM)	SEM
DOM1H-131-202	0.11	0.008
DOM1H-131-206	0.07	0.01
DOM1H-131-511	0.19	0.01
Enbrel™(Etanercept)	0.20	0.07
抗TNFR1 mAb # mAb225	0.08	0.003

在該檢定中，DOM1h-131-206似乎比正測試之其他兩種dAb有效且與市售抗TNFR1 mAb，MAB225(R and D Systems)具有類似效價。

如下文所述進行來自馬斯德畢赤酵母之前導純系之表現：

使用三個前導分子之一級胺基酸序列產生分泌表現於馬斯德畢赤酵母中之密碼子優化基因。密碼子優化DOM1H-131-206與非密碼子優化DOM1H-131-206之間存在75%之序列一致性。將三個合成基因選殖於表現載體pPIC-Zα(來自Invitrogen)中，且隨後轉型為兩個畢赤酵母菌株X33及KM71H。將轉型細胞濾出置於遞增濃度之芬森(Zeocin)(100、300、600及900 μg/ml)上以選擇具有多個整合子(integrant)之純系。選擇各個細胞系及構築體的約15個純系以用於表現篩選。因為馬斯德畢赤酵母中高/低基因複本數與表現含量之間的相關性尚未完全理解，所以在整個芬森濃度範圍內挑選數個純系。使用尚未就高產量進行廣泛篩選之純系進行5 L醱酵罐運行。此使得產生大量用於進一步研究之物質。

用於蛋白質表徵之物質產生：

已廣泛使用基於蛋白質A之層析樹脂自微生物培養上清液中純化V_H dAb。雖然此舉使得單步純化方法產生高純度(在大多數情況下通常>90%)材料，但對於一些分子，低pH值溶離條件會導致形成聚集體。亦存在用於dAb之親和力樹脂之容量受到限制之問題，此將意謂使用大量樹脂來加工來自醱酵罐之物。為產生用於表徵且進一步用於穩定性及噴霧器研究之高品質物質，使用混合模態電荷感應樹脂(mixed modal charge induction resin)將下游的純化過程設計為初級捕獲步驟，接著陰離子交換。未顯著優化，此允許回收約70%之純度為約95%之表現dAb。

對於混合模態電荷感應樹脂，來自GE Healthcare之Capto MMC上之捕獲步驟，使用50 mM磷酸鈉(pH 6.0)執行管柱平衡且在不需要任何稀釋液或pH值調節之情況下加載上清液。洗滌管柱後，使用為50 mM Tris(pH 9.0)之溶離緩衝液由pH梯度溶離蛋白質。特定洗滌及梯度條件將略視正溶離之蛋白質之pI而變化。

隨後使用陰離子交換層析用流經步驟(flow through step)進一步純化溶離液峰。此舉可移除諸如醇氧化酶之殘餘HMW污染且減少內毒素。使樹脂與PBS或無鹽之磷酸鹽緩衝液(pH 7.4)平衡。將來自Capto MMC之溶離液加載於陰離子交換樹脂上之後，dAb不結合且由流經步驟回收。內毒素及其他污染物與樹脂結合。鹽之存在(若使用PBS緩衝液)使該步驟之蛋白質回收率提高為91%，而非無鹽情況下

所達成之86%回收率。然而，鹽之存在會降低內毒素移除之效力，以致與當不存在鹽時所獲得之<1.0 EU/ml之dAb之內毒素含量相比，包括鹽之該步驟之後的典型含量經量測為58 EU/ml。

蛋白質表徵：

使用電噴霧質譜、胺基末端測序及等電聚焦表徵由5 L醱酵罐運行所產生之物質的一致性，且使用SDS-PAGE、SEC及Gelcode醣蛋白染色套組(Pierce)表徵純度。

一致性：

各蛋白質之第一個5殘基之胺基末端序列分析係如所預期(EVQLL...)。使用C4 Zip尖頭(Millipore)對已緩衝液交換於含有0.1%冰醋酸之50:50 H_2O：乙腈中之蛋白質樣品執行質譜分析。三種蛋白質中每一種之量測質量當允許因形成內部雙硫鍵而產生之-2的質量差時係在基於一級胺基酸序列之理論質量(使用平均質量計算)之0.5 Da範圍內。使用IEF基於對於各蛋白質為不同之pI鑑別蛋白質。

純度：

將三種蛋白質以1 μg及10 μg之量一式兩份裝載於非還原SDS-PAGE凝膠上。在所有情況下，觀察到單一條帶。亦執行尺寸排阻層析以顯示純度級。對於尺寸排阻層析(SEC)，將100 μg各蛋白質裝載於TOSOH G2000 SWXL管柱上，在0.5 ml/min下流動。移動相為PBS/10%乙醇。

研究dAb穩定性用於候選物選擇：

對於COPD適應症，將有必要(例如)使用噴霧器裝置傳

遞dAb至肺中。此將意謂視所使用之噴霧器類型而定蛋白質可潛在經歷一定範圍之剪切應力及熱應力且在肺環境下可經受蛋白酶酶促降解。已確定若蛋白質可使用該類型之裝置傳遞，則其形成適當粒度分布且在噴霧器傳遞後保留功能。因此，研究各分子對一定範圍之物理應力之固有穩定性以確定指示基線穩定性及最敏感穩定性之檢定。因為各蛋白質之穩定性將依賴於各蛋白質溶解於其中之緩衝溶液，所以一些預調配研究為必需的。該諸如緩衝液、pH值之資訊亦適用於理解下游純化過程及隨後儲存期間蛋白質之穩定性。為表徵暴露於一定範圍之物理應力期間分子之變化，使用大量分析技術，諸如尺寸排阻層析(SEC)、SDS-PAGE及等電點聚焦(IEF)。

DOM1H-131-202、DOM1H-131-511及DOM1H-131-206之蛋白酶穩定性之評估：

在過量蛋白酶中預培養規定時間點後由BIAcore™分析殘餘結合活性評估DOM1H-131-202、DOM1H-131-511及DOM1H-131-206之蛋白酶穩定性。將約1400 RU經生物素標記TNTR1塗佈於抗生蛋白鏈菌素(SA)晶片上。在30℃下使250 nM DOM1H-131-202、DOM1H-131-511及DOM1H-131-206與僅PBS一起或與100 μg/ml胰蛋白酶、彈性蛋白酶或白血球酶一起培養1、3及24小時。藉由添加蛋白酶抑制劑混合物使反應停止。然後使用參考池扣除法(reference cell subtraction)使dAb/蛋白酶混合物越過TNFR1塗佈晶片。在每次注射循環之間用10 μl 0.1 M甘胺酸(pH 2.2)使

晶片表面再生。相對於無蛋白酶之dAb結合，測定結合與蛋白酶一起預培養之人類TNFR1(在10秒內)之DOM1H-131-202、DOM1H-131-511及DOM1H-131-206的比例。在25℃下進行BIAcore™運行。由三個獨立的實驗產生資料。條形圖指示平均值且誤差棒指示結果之標準偏差(關於結果，參見圖24)。

已發現，與DOM1H-131-511相比，展示DOM1H-131-202及DOM1H-131-206具有較高胰蛋白酶、彈性蛋白酶或白血球酶蛋白水解降解抗性。與DOM1H-131-511相比，DOM1H-131-202與DOM1H-131-206之間的差異在與胰蛋白酶一起1小時後及與彈性蛋白酶或白血球酶一起3小時後最明顯。

如使用DSC所測定之熱穩定性：

為測定在何pH值下分子具有最大穩定性，使用差示掃描量熱計(DSC)量測各dAb在伯瑞坦-魯賓遜緩衝液中之熔融溫度(T_m)。當伯瑞坦-魯賓遜係由三組分緩衝液系統(乙酸鹽、磷酸鹽及硼酸鹽)構成時，在同一溶液中有可能產生3-10範圍內之pH值。由蛋白質一級胺基酸序列確定理論pI。由DSC，可見dAb具有最大內在熱穩定性之pH值對DOM1H-131-202(202)而言為pH 7，對DOM1H-131-206(206)而言為pH 7-7.5，且對DOM1H-131-511(511)而言為pH 7.5。關於所有隨後應力及穩定性研究，對於各dAb使用以下pH值：在伯瑞坦-魯賓遜緩衝液中，對於DOM1H-131-202(202)及DOM1H-131-206(206)，pH 7.0；且對於

DOM1H-131-511(511)，pH 7.5。結果概述於下表3中：

表3：如由DSC所測定於伯瑞坦-魯賓遜緩衝液中之1 mg/ml DOM1H-131-202(202)、DOM1H-131-206(206)及DOM1H-131-511(511)之pH及Tm的概述

dAb	產生最大固有熱穩定性之pH值	在給定pH值下dAb之Tm(℃)
DOM1H-131-202(202)	7.0	68.6
DOM1H-131-206(206)	7.0-7.5	65.8
DOM1H-131-511(511)	7.5	58.0

固有溶解度測試：

在離心Vivaspin濃縮器(5K截止點)中濃縮所有前導dAb以確定其最大溶解度及濃縮後之回收含量。在伯瑞坦-魯賓遜緩衝液中在最穩定pH值下執行實驗。經一定時程量測樣品體積及濃度，且記錄與預期濃度之偏差以及樣品回收百分率。

已發現，所有蛋白質均可在伯瑞坦-魯賓遜緩衝液中濃縮至超過100 mg/ml。雖然與DOM1H-131-511(511)相比，DOM1H-131-202(202)與DOM1H-131-206(206)展示比預期低之回收率，但仍在可接受之水準內。

前導dAb之噴霧器傳遞：

藉由測試不同噴霧器及調配物緩衝液，已證明dAb可使用廣泛範圍之噴霧裝置有效傳遞。更重要地，首次展示dAb於調配物緩衝液中之噴霧產生有效肺傳遞想要之粒度分布(使用<5 μm之液滴之百分率進行比較)，同時維持蛋白質功能性。此進一步描述如下。

比較多種裝置中之效能：

在六個噴霧器裝置中測試DOM1H-131-511(511)，該六個噴霧器裝置包含三個主要種類之液體調配物噴霧器(亦即，超音噴霧器、噴射噴霧器及振網噴霧器)之每一類的各兩個裝置。在各裝置中，在一定範圍之PEG濃度下，測試5 mg/ml dAb。對於各樣品，使用Malvern Spraytek Device(Malvern Instruments Limited, UK)量測<5 μm之液滴尺寸之百分率且結果展示於圖35中。使用SEC評估各樣品噴霧後之穩定性以分析已二聚於殘留在杯中及所收集之氣霧劑中之物質中的樣品的量。結果可見於圖36中。二聚體形成程度越小，穩定性越高。

大多數裝置可傳遞40%或更多的適當尺寸範圍內之液體調配物，但eFlow(振網噴霧器裝置)及PARI LC(噴射噴霧器)裝置表現更佳，其中當緩衝液中包括PEG時，PARI LC*(星號)裝置傳遞超過80%。由eFlow亦觀察到因PEG該傳遞之增加，對於PARI LC+，程度較小。

重要地，亦發現，dAb之活性在噴霧後仍保留(參見圖8中之結果)。

緩衝液添加劑之效應：

由於DOM1H-131-511(511)之較低穩定性，50mM磷酸鹽調配物緩衝液含有PEG 1000與蔗糖(且具有定義為約等於約2%至約10% PEG 1000於含有1.2% w/v蔗糖之50 mM磷酸鹽緩衝液中之溶液黏度之範圍內的黏度)以有助於保護dAb以免受剪切應力與熱應力。當DOM1H-131-202 (202)及DOM1H-131-206(206)具有較高T_m且展示顯著增加之熱應

力穩定性時，在原始調配物緩衝液中及伯瑞坦-魯賓遜緩衝液(其具有比調配物緩衝液低之黏度)中測試所有分子。在5 mg/ml之蛋白質濃度下在3.5分鐘之運行時間內在E-flow與Pari LC+裝置中測試dAb且使用Malvern Spraytek Device測定粒度分布。作為比較，使用噴霧器裝置傳遞之用於膀胱纖維化之市售藥物(命名為標準蛋白質X)在其自身調配物緩衝液中測試。結果展示於圖37中。為獲得良好傳遞及於深肺中之分配，理想粒度小於6微米，例如<5 μm。所有dAb在伯瑞坦-魯賓遜緩衝液與調配物緩衝液(如先前所述)中均得到小於5 μm之可比較級別之粒度。然而，調配物緩衝液之較高黏度尤其可有利產生適當尺寸範圍內之粒子，例如<5 μm之粒子。在噴霧之前及之後由A_{280}量測法測定裝置之杯中dAb之濃度。已發現，蛋白質濃度並未顯著變化，指示蛋白質與媒劑在傳遞期間均不會優先噴霧。

結論：

如上所述，已證明諸如dAb之多肽可在大量市售噴霧器裝置中噴霧，且重要地，其在噴霧後保留穩定性及生物活性，且噴霧後未觀察到顯著聚集。當向緩衝液調配物中添加諸如PEG之黏度增強賦形劑時，粒度分布及小於5 μm之液滴尺寸百分率得以改良，因此潛在改良dAb至深肺之傳遞。

dAb至肺之傳遞亦可藉由增加dAb濃度、例如高達約40 mg/ml之濃度及傳遞時間來改良而無dAb穩定性或活性之

任何降低。

實例1

噬菌體載體pDOM13

使用絲狀噬菌體(fd)呈現載體pDOM13。該載體與噬菌體外殼蛋白III產生融合蛋白。圖1中說明pDOM13之多個選殖位點。將編碼dAb之基因選殖為*Sal*I/*Not*I片段。

實例2

測試蛋白酶對具有一定範圍之胰蛋白酶抗性之噬菌體呈現區域抗體(dAb)的選擇

將編碼結合IL-1R1之dAb DOM4-130-54、結合TNFR1之DOM1h-131-511及結合VEGFA之DOM15-10、DOM15-26及DOM15-26-501的基因選殖於pDOM13中，且根據標準技術產生呈現該等dAb之噬菌體。將噬菌體由PEG沈澱純化，再懸浮於PBS中且測力價。

當以經分離蛋白質形式測試時，上述dAb展示一定範圍之抗胰蛋白酶降解之能力。如下評估抗降解性：在30℃下將40 μg/ml於PBS中之dAb(1 mg/ml)與胰蛋白酶一起培養，產生25:1 dAb：胰蛋白酶之分子比。添加胰蛋白酶之前即刻，且隨後在T=1小時、3時間及24小時時採集樣品(30 μl)。藉由添加Roche完全蛋白酶抑制劑(2×)中和蛋白酶活性，接著浸入液氮中且儲存於乾冰上。隨後藉由在Novex 10-20% Tricine凝膠上電泳分析15 μg各dAb樣品，且用SureBlue(1×)染色蛋白質。

第一個3小時期間，DOM15-10與DOM15-26-501顯著分

解。DOM15-26、DOM4-130-54及DOM1h-131-511較穩定，其中dAb之分解僅在24小時後變得明顯(圖2)。

亦在胰蛋白酶存在下培養噬菌體呈現dAb以評估噬菌體呈現dAb之胰蛋白酶抗性是否與由經分離可溶性dAb所獲得之結果相關。測試多種濃度之胰蛋白酶及培養時間。在所有狀況下，用Roche完全蛋白酶抑制劑中和胰蛋白酶後，測試噬菌體結合一般配位體：蛋白質A(其結合所有V_H區域抗體(例如，DOM1h-131、DOM15-26、DOM15-26-501))或蛋白質L(其結合所有V_κ區域抗體(例如，DOM4-130-54、DOM15-10))之能力。亦測試噬菌體與靶抗原之結合。在該兩種狀況下，認為結合與因經抗蛋白水解性保留dAb結構完整性相關。由ELISA(使用針對噬菌體之接合抗體)或由溶離所結合之噬菌體及指數生長大腸桿菌TG1細胞感染後進行力價分析來量測結合活性。

用DOM15-10、DOM15-26及DOM15-26-501測試噬菌體

在室溫下在一定範圍之胰蛋白酶濃度(100 μg/ml、10 μg/ml及0 μg/ml)下，將各dAb處理1小時。用Roche完全蛋白酶抑制劑(1×)阻斷胰蛋白酶活性，且隨後將噬菌體稀釋於PBS中之2% Marvell中，在室溫下與50 nM經生物素標記抗原(重組人類VEGF(R & D systems))一起培養1小時。添加在室溫下用PBS中之2% Marvell預阻斷1小時之抗生蛋白鏈菌素塗佈微珠(Dynabeads M-280(Invitrogen))，且隨後在室溫下將混合物培養5分鐘。所有與Dynabeads一起培養之步驟均在轉輪上進行。藉由用1 ml於PBS中之0.1% Tween-

20洗滌珠粒8次洗除未結合噬菌體。用0.5 ml 0.1 M甘胺酸(pH 2.2)溶離所結合噬菌體且用100 μl 1 M Tris-HCL(pH 8.0)中和。使用溶離噬菌體感染指數生長之TG1細胞(在37℃下1小時)且塗鋪於四環素板上。在37℃下將板培養隔夜，且進行菌落計數(參見表4)。由與100 μg/ml胰蛋白酶一起培養之選擇觀察到最佳結果。與DOM15-10及DOM15-26-501相比，DOM15-26之產率增加約10倍。

進行第二實驗以在更苛刻培養條件下進一步證實該等結果。在攪拌(250 rpm)下在37℃下將噬菌體呈現dAb處理1小時或2小時。由與100 μg/ml胰蛋白酶一起培養2小時之選擇觀察到最佳結果。DOM15-26之產率比DOM15-26-501之產率高200倍且比DOM15-10之產率高1000倍。

在第三實驗中，開始時將呈現DOM15-26及DOM15-26-501之噬菌體1:1混合。隨後在攪拌(250 rpm)下在37℃下在有胰蛋白酶(1000 μg/ml)或無胰蛋白酶之情況下將其培養2小時，且隨後如上所述就抗原結合加以選擇。測序來自各選擇之10個菌落，對於無胰蛋白酶預處理之選擇，揭露純系混合群體(DOM15-26：4/10；DOM15-26-501：6/10)，而有胰蛋白酶進行選擇之所有純系如所預期編碼DOM15-26。

該等實驗指示選擇壓力可藉由向噬菌體呈現dAb中添加蛋白酶來獲得，以致優先選擇呈現蛋白水解最穩定之dAb之噬菌體(在淘選一般配位體或抗原之後)。

表 4

實驗	培養時間長短	溫度	胰蛋白酶濃度	DOM15-26力價	DOM15-26-501力價	1:1混合力價	DOM15-10力價
1 輸入10^{10}	1 hr	室溫	100 μg/ml	1.6×10^{8}	6.3×10^{7}		1.1×10^{7}
	1 hr	室溫	10 μg/ml	3×10^{8}	4.4×10^{8}		2.4×10^{8}
	1 hr	室溫	0 μg/ml	0.9×10^{8}	2×10^{8}		0.7×10^{8}
2 輸入10^{9}	1 hr, 250 rpm	37℃	100 μg/ml	2×10^{7}	1×10^{6}		1×10^{5}
	2 hr, 250 rpm	37℃	100 μg/ml	1×10^{7}	6×10^{4}		1×10^{4}
	2 hr, 250 rqm	37℃	0 μg/ml	5.4×10^{7}	4.1×10^{7}		3×10^{8}
3 輸入10^{10}	2 h, 250 rpm	37℃	100 μg/ml	2.3×10^{8}	8×10^{5}	6.8×10^{7}	
	2 h, 250 rpm	37℃	0 μg/ml	3.9×10^{8}	4.4×10^{8}	4.8×10^{8}	

用 DOM4-130-54 測試噬菌體

以如上所述之類似方案測試DOM4-130-54。變化之參數為：胰蛋白酶之濃度、溫度及培養時間長短。針對IL-RI-Fc(IL-1R1與Fc之融合物)在1 nM於PBS中之濃度下進行生物淘選。僅在37℃下使噬菌體與100 μg/ml胰蛋白酶一起培養隔夜後才觀察到噬菌體力價之顯著降低(參見表5)。

表 5

培養時間長短	溫度	胰蛋白酶濃度	力價
1 hr	室溫	100 μg/ml	1.8×10^{10}
1 hr	室溫	10 μg/ml	7.2×10^{9}
1 hr	室溫	0 μg/ml	6.6×10^{9}
隔夜	室溫	100 μg/ml	2.16×10^{9}
隔夜	室溫	10 μg/ml	7.2×10^{9}
隔夜	室溫	0 μg/ml	7.8×10^{9}
隔夜	37℃	100 μg/ml	2.04×10^{6}
隔夜	37℃	10 μg/ml	3.84×10^{8}
隔夜	37℃	0 μg/ml	7.2×10^{9}

用 DOM1h-131 測試噬菌體

在室溫下用0 μg/ml、10 μg/ml、100 μg/ml及1000 μg/ml胰蛋白酶處理DOM1h-131噬菌體(胺基酸序列與DOM1h-131-511密切相關)1小時。藉由添加25×完全蛋白酶抑制劑

(Roche)抑制分解。沿著塗佈有1 nM TNFR1之ELISA板進行噬菌體之2倍連續稀釋，且用抗M13-HRP偵測結合噬菌體。結果展示下表6中。

表6

DOM1h-131 胰蛋白酶濃度				
1 mg/ml	100 μg/ml	10 μg/ml	0 μg/ml	噬菌體輸入
0.284	0.418			4.51E+10
0.229	0.377			2.26E+10
0.183	0.284			1.13E+10
0.133	0.196			5.64E+09
0.114	0.141			2.82E+09
0.089	0.115			1.41E+09
0.084	0.084	0.286		7.05E+08
0.080	0.084	0.213		3.52E+08

該等測試實驗顯然展示100 μg/ml胰蛋白酶及37℃之溫度適於將選擇壓力應用於呈現多種抗胰蛋白酶蛋白水解程度之dAb之噬菌體上。必要時，可優化各噬菌體呈現dAb之蛋白酶培養時間。

實例3

噬菌體呈現區域抗體譜系之蛋白酶選擇

使用以下dAb作為親本分子建立四個譜系：DOM4-130-54、DOM1h-131-511、DOM15-10及DOM15-26-555。使用Stratagene Mutazyme II套組、經生物素標記引子及供50 μl反應用之5-50 pg模板由PCR在基因中引入隨機突變。用*Sal*I及*Not*I分解後，用抗生蛋白鏈菌素塗佈微珠自未分解產物中純化插入物且使其在相應位點連接於pDOM13中。用純化連接混合物使大腸桿菌TB1細胞轉型，從而產生四

環素抗性純系大譜系：8.5×10^8(DOM4-130-54)、1.5×10^9(DOM1h-131-511)、6×10^8(DOM15-10)及3×10^9(DOM15-26-555)。

藉由以PEG雙重沈澱製備噬菌體庫且再懸浮於PBS中。

胺基酸突變率對DOM1h-131-511及DOM4-130-54譜系而言分別為2.3及4.4。藉由在噬菌體ELISA中使用塗佈有蛋白質A或蛋白質L(1 μg/ml)之孔測試96個純系評估功能性。在DOM1h-131-511及DOM4-130-54譜系中分別有62.5%及27%之純系展示功能性呈現dAb。

胺基酸突變率對DOM15-10及DOM15-26-555譜系而言分別為2.5及4.6。藉由在噬菌體ELISA中使用塗佈有蛋白質A或蛋白質L(1 μg/ml)之孔測試96個純系來評估功能性。在DOM15-10及DOM15-26-555譜系中分別有31.3%及10.4%之純系展示功能性呈現dAb。

DOM4-130-54及DOM1h-131-511譜系

對該等庫進行4輪選擇以選擇具有改良蛋白酶抗性之dAb。

第1輪選擇係抗原結合(1 nM或10 nM抗原)而無蛋白酶處理從而淨化庫以移除不再以高親和力結合抗原之任何純系。第1輪之輸出係在10^8-10^{10}範圍內(與10^{11}噬菌體之輸入形成對比)，指示庫之大部分以高親和力結合抗原。

在第2輪中引入100 μg/ml胰蛋白酶之蛋白酶處理，且輸出展示於下表7中：

表 7

胰蛋白酶培養條件	DOM1h-131-511庫	DOM4-130-54庫
37℃隔夜	1.86×10^{6}	2.1×10^{6}
37℃，2小時	4.8×10^{8}	5.1×10^{8}
室溫，2小時	1.2×10^{9}	4.62×10^{9}
無胰蛋白酶	約1×10^{9}	約4×10^{9}
無抗原	1.8×10^{4}	$<6\times10^{3}$

當在37℃下用胰蛋白酶處理dAb隔夜時，存在顯著選擇。將該輸出物送至第3輪，其中在37℃下用1 mg/ml或100 μg/ml胰蛋白酶處理噬菌體24小時。來自第3輪之經胰蛋白酶處理過之噬菌體的力價對DOM1h-131-511譜系而言為10^{5}-10^{6}且對DOM4-130-154譜系而言為10^{7}-10^{8}。

來自第3輪之所有輸出物(DOM1h-131-511及DOM4-130-154，1 mg/ml及100 μg/ml)在100 μg/ml胰蛋白酶下經受針對1 nM抗原之第4輪選擇。類似於第3輪中所見，力價係在10^{6}-10^{8}範圍內。對於DOM1h-131-511譜系可見一些富集，而對於DOM4-130-54譜系無富集。

DOM15-10及DOM15-26-555譜系

第1輪選擇係用2 nM經生物素標記hVEGF(人類血管內皮生長因子)濃縮物來進行而無蛋白酶處理從而淨化庫以移除不再以高親和力結合抗原之任何純系。第1輪之輸出為約10^{8}(與DOM15-10之10^{10}噬菌體及DOM15-26-555之10^{11}噬菌體之輸入形成對比)，指示庫之大部分以高親和力結合抗原。

用2 nM經生物素標記hVEGF執行第2及第3輪選擇。在對hVEGF淘選之前，在37℃下在震盪器(250 rpm)中在胰蛋白

酶(100 μg/ml)存在下培養噬菌體。培養時間對DOM15-10譜系而言為1小時且對DOM15-26-555譜系而言2小時。

輸出如下：DOM15-10譜系之第2及第3輪選擇為1.5×10^6及9×10^5；DOM15-26-555之第2及第3輪選擇為2.2×10^8及3.9×10^9。

實例4

分析選擇輸出物：DOM4-130-54及DOM1h-131-511譜系

將來自第3及第4輪之所有輸出物亞選殖於pDOM5載體中且轉型於JM83細胞中。pDOM5載體為pUC119基載體。由Plac啟動子驅動蛋白質之表現。GAS1前導序列(參見WO 2005/093074)確保經分離可溶性dAb分泌於大腸桿菌JM83之周質及培養上清液中。隨機挑選96個及72個來自第3輪及第4輪之個體菌落來表現。

對第3輪及第4輪輸出物之各12-24個純系進行測序。在該兩輪選擇中觀察到一致突變且挑選約25個持有一致基序(consensus motif)之純系來進一步表徵。該等純系之胺基酸序列展示於圖3(DOM1h-131-511所選擇之變異體)及圖4(DOM4-130-54所選擇之變異體)中且以DNA序列形式列於圖19A-19L中。突出所選擇之純系中不同於親本序列的胺基酸(彼等一致胺基酸由點標記)。對應於CDR1、CDR2及CDR3之環用框勾畫。

該等純系係以大量表現，在蛋白質L(就DOM4-130-54變異體而言)及蛋白質A(就DOM1h-131-511變異體而言)上純化且在存在或不存在胰蛋白酶(最終濃度為100 μg/ml或

1000 μg/ml)之情況下在37℃下培養1小時或隔夜後就抗原結合以BIAcore方式測試。

來自DOM4-130-54選擇之輸出物通常較穩定，大多數純系保留胰蛋白酶抗性1小時且最佳純系保留隔夜。比較而言，來自DOM1h-131-511選擇之少量純系抗胰蛋白酶1小時，而無純系抗胰蛋白酶隔夜。

實例5

分析選擇輸出物：DOM15-10及DOM15-26-555譜系

首先以單株噬菌體ELISA方式在存在或不存在胰蛋白酶分解之情況下測試經胰蛋白酶預處理之選擇有效性。挑選各庫之來自第2輪選擇之18個菌落及來自第3輪選擇之24個菌落。使用純系DOM15-10、DOM15-26-501及DOM15-26作為對照。其他對照包括第2及第3輪胰蛋白酶選擇後來自各庫之擴增且純化的噬菌體溶液。

將各噬菌體樣品分為兩部分，第一部分用100 μg/ml胰蛋白酶處理，第二部分不用胰蛋白酶處理。在37℃下在攪拌(250 rpm)下將該兩個部分培養1小時，且藉由添加Roche完全蛋白酶抑制劑(1×)阻斷。

使用經胰蛋白酶分解及未經分解樣品執行噬菌體ELISA。使ELISA孔塗佈有濃度為1 μg/ml之於0.1 M碳酸氫鹽緩衝液中之中性鏈親和素。用PBS進行洗滌及在室溫下用1%於PBS中之Tween-20阻斷抗原塗佈孔1小時之步驟後，使孔塗佈有濃度為100 ng/ml之稀釋於1%於PBS中之Tween-20中的經生物素標記hVEGF。接著，用PBS洗滌各

孔且添加用1% Tween-20/PBS 1:1稀釋之經處理或未經處理之噬菌體上清液。在37℃下培養30分鐘後，用1% Tween-20/PBS洗滌孔，接著在37℃下與抗M13噬菌體-HRP接合物(1/5000稀釋於1% Tween-20/PBS中)一起培養30分鐘。隨後用PBS及過氧化酶洗滌孔。藉由添加SureBlue試劑啓始反應。約10分鐘後，用等效體積1 M HCl使反應停止，且在$OD_{450\ nM}$下讀取孔。

經胰蛋白酶處理之不穩定對照DOM15-10及DOM15-26-501之ELISA讀數給出低於0.404之OD_{450}，且認為該值為不穩定純系之邊界值。產生低於0.404之OD之所有樣品視為不穩定。超過彼值之所有樣品視為穩定。

表8

庫	胰蛋白酶		無胰蛋白酶	
	第2輪選擇	第3輪選擇	第2輪選擇	第3輪選擇
DOM15-10	33%	89%	100%	100%
DOM15-26-555	94.4%	100%	100%	100%

表8展示各庫之第2及第3輪胰蛋白酶選擇後穩定純系之百分率。第3輪選擇後，該兩個庫中可見胰蛋白酶抗性純系之富集。在各狀況下，胰蛋白酶分解後，每次選擇後含有擴增純化噬菌體混合物之對照ELISA孔之值大大高於0.404。此外，當比較來自第3輪選擇之胰蛋白酶處理噬菌體與來自第2輪選擇之胰蛋白酶處理噬菌體時，觀察到信號小幅增加。DOM15-10噬菌體庫展示該起始值之約14%之增加。DOM15-26-555噬菌體庫展示代表該起始值之約2%之增加。

所有該等結果展示經胰蛋白酶預處理之選擇係有效自DOM15-10及DOM15-26-555譜系選擇胰蛋白酶抗性噬菌體純系。

將來自第2及第3輪選擇(DOM15-26-555)及僅來自第3輪選擇(DOM15-10)之所有輸出物亞選殖於pDOM5載體中且轉型於HB2151電穿孔法勝任細胞(electrocompetent cell)中。pDOM5載體為pUC119基載體。由Plac啟動子驅動蛋白質表現。GAS1前導序列確保經分離可溶性dAb分泌於大腸桿菌HB2151之周質及培養上清液中。隨機挑選184個來自各輪選擇(3及4)之個體集落來在1 ml培養物體積中表現。

將細菌上清液稀釋於HBS-EP BIAcore緩衝液(1:1體積比)中且分成兩份。僅向一個小瓶中添加胰蛋白酶，最終濃度為20 μg/ml。在攪拌(250 rpm)下在37℃下培養40分鐘。用Roche完全蛋白酶抑制劑(1×)阻斷反應後，在BIAcore 3000上就抗原結合(SA感應器晶片上之2,000 RU經生物素標記hVEGF)測試經胰蛋白酶處理與未經處理之噬菌體上清液。

挑選純系之標準為：相對於未經處理之dAb，<15%之經胰蛋白酶處理之dAb的抗原結合減小(基於在所選擇之時點所達到之最大RU)，此通常將反映dAb對蛋白酶處理之穩定性；及dAb自抗原解離期間，兩個時點之間的解離速率減小<40%。基於該等值，對60個來自DOM15-26-555庫之第2與第3輪選擇之純系及17個來自DOM15-10庫之第3輪選擇之純系進行測序。在該兩個庫之輸出物中觀察到一致突

變，且自各持有一致基序之庫挑選17個純系來進一步表徵。該等純系之胺基酸序列展示於圖5(DOM15-26-555所選擇之變異體)及圖6(DOM15-10所選擇之變異體)中，且以DNA序列形式列於圖20A-20E中。突出所選擇之純系中不同於親本序列之胺基酸(彼等一致胺基酸由點標記)。對應於CDR1、CDR2及CDR3之環由框勾畫。

將該等純系表現於50 ml表現培養物中，在稀釋於HBS-EP緩衝液中至100 nM濃度之蛋白質A(就DOM15-26-555變異體而言)或蛋白質L(就DOM15-10變異體而言)上純化且在存在或不存在胰蛋白酶(最終濃度為20 μg/ml)之情況下在攪拌(250 rpm)下在37℃下培養1.5小時後就抗原結合以BIAcore方式測試。

亦使用實例2中所述之方法測試該等純系胰蛋白酶抗性。將蛋白質緩衝液交換至PBS中且濃縮至1 mg/ml。將25 μg蛋白質與1 μg胰蛋白酶(Promega)混合且在30℃下培養0小時及24小時。此後，用Roche完全蛋白酶抑制劑(1×)阻斷反應，且添加DTT以及增重劑(loading agent)。使樣品在100℃下變性5分鐘。隨後由電泳在Novex 10-20% Tricine凝膠上分析15 μg各樣品，且用SureBlue(1×)染色蛋白質。

來自DOM15-26-555選擇之輸出物通常較穩定，當以BIAcore方式測試時大多數純系保留胰蛋白酶抗性1.5小時，且當以SDS-PAGE方式運行時，保留隔夜。相比較而言，當以SDS-PAGE方式運行時，對於隔夜處理，僅少量來自DOM15-10選擇之純系抗胰蛋白酶。

實例6

鑑別DOM1h-131-511變異體

更詳細地分析DOM1h-131-203、DOM1h-131-204及DOM1h-131-206。在37℃下與不同濃度之胰蛋白酶(在0至100 μg/ml範圍內)一起培養隔夜後，以BIAcore方式在500 nM之dAb濃度下將其加以比較。BIAcore迹線展示於圖7中。結果顯然展示在高濃度胰蛋白酶(100 μg/ml)下該兩個變異體比其親本對蛋白水解更具抗性。亦在上述條件下就抗大量包括白血球酶、彈性蛋白酶及胰酶之其他蛋白酶而言，在100 μg/ml之蛋白酶濃度下，比較兩個dAb DOM1h-131-202及DOM1h-131-206與其親本。與親本相比，dAb抗所有所測試之蛋白酶之蛋白水解展示增加之抗性。彈性蛋白酶及白血球酶之BIAcore迹線展示於圖8中。

用100 μg/ml測序級胰蛋白酶處理5 μM各dAb 0、1、3及24小時。用25× Roche完全蛋白酶抑制劑抑制反應，且使反應物在4-12% Novex Bis-Tris凝膠上運行。凝膠展示於圖9中。

實例7

鑑別DOM4-130-54變異體

更詳細地分析DOM4-130-201及DOM4-130-202。在37℃下與不同濃度之胰蛋白酶(在0與100 μg/ml範圍內)一起培養隔夜後，以BIAcore方式在500 nM之dAb濃度下將其加以比較。BIAcore迹線展示於圖10中。結果顯然展示在高濃度胰蛋白酶(100 μg/ml)下所有三個變異體比其親本對蛋白

水解更具抗性。亦在上述條件下就抗大量包括白血球酶、彈性蛋白酶及胰酶之其他蛋白酶而言，在100 μg/ml之蛋白酶濃度下，比較DOM4-130-201及DOM4-130-202與親本。雖然結果與在胰蛋白酶下相比不太明顯，但前導dAb與親本相比對所有所測試之蛋白酶展示增加之抗蛋白水解性。彈性蛋白酶及白血球酶之BIAcore迹線展示於圖11中。

用100 μg/ml測序級胰蛋白酶處理5 μM各dAb 0、1、3及24小時。用25× Roche完全蛋白酶抑制劑抑制反應，且使反應物在4-12% Novex Bis-Tris凝膠上運行。凝膠展示於圖9中。

實例8

進一步表徵DOM1h-131-511及DOM4-130-54變異體

首先使用差示掃描量熱法(DSC)分析dAb以確定胰蛋白酶抗性之增加是否與熔融溫度(Tm)之增加相關。胰蛋白酶穩定性之增加確實與Tm之增加相關(參見表9)。

表9

名稱	Tm(℃)
DOM1h-131-511	57.9
DOM1h-131-202	67.5
DOM1h-131-203	65.7
DOM1h-131-204	62.3
DOM1h-131-206	64.9
DOM4-130-54	54.1
DOM4-130-201	64.7
DOM4-130-202	64.5

亦在MRC-5細胞基檢定(cell-based assay)中比較DOM1h-131-511來源之dAb(參見表10)。在該檢定中，量測dAb中和TNFα刺激之IL-8釋放之能力以確定胰蛋白酶穩定性之增

加是否已使得功效降低。然而，胰蛋白酶抗性dAb之活性在該檢定中大體上未受影響。

表10

樣品	ND50(nM)
DOM1h-131-511	1.98
DOM1h-131-511	1.71
DOM1h-131-511(230307CE)	1.89
DOM1h-131-203(230307CE)	2.28
DOM1h-131-204(230307CE)	1.89
DOM1h-131-511	1.46
DOM1h-131-206(230307CE)	0.71

在受體結合檢定中測試DOM4-130-54來源之dAb以瞭解其是否仍具有相同的抑制IL-1與IL-RI結合之能力(參見表11)。胰蛋白酶抗性dAb之活性在該檢定中未受影響。

表11

dAb	IC50(nM)
DOM4-130-54	280 pM
DOM4-130-201	257 pM
DOM4-130-202	254 pM

實例9

鑑別DOM15-26-555變異體

更詳細地分析DOM15-26-588、DOM15-26-589、DOM15-26-591及DOM15-26-593以及其親本及兩個其他dAb DOM15-26-594及DOM15-26-595，其係藉由組合將對效價及穩定性產生最大影響之突變(E6V及F100S/I)之突變誘發而創建。序列展示於圖12中。與濃度為200 μg/ml之胰蛋白酶一起培養後在100 nM之dAb濃度下就hVEGF結合以BIAcore方式比較純系。在攪拌(250 rpm)下在37℃下使反應進行3小時及24小時。最佳純系DOM15-26-593及親本之

BIAcore迹線展示於圖13中。其他結果以圖表形式呈示於圖14中。結果顯然展示在胰蛋白酶處理24小時後，所有變異體比親本對蛋白水解更具抗性。

亦藉由以SDS-PAGE方式運行經處理及未經處理之樣品來檢查DOM15-26-593及親本之胰蛋白酶抗性。簡言之，將蛋白質緩衝液交換至PBS中且濃縮至1 mg/ml。將25 μg蛋白質與1 μg測序級胰蛋白酶(Promega)混合且在30℃下培養0小時、1小時、3小時及24小時。此後，用Roche完全蛋白酶抑制劑(1×)阻斷反應，且添加DTT以及增重劑。使樣品在100℃下變性5分鐘。將15 μg各樣品加載於Novex 10-20% Tricine凝膠上，且用SureBlue(1×)染色蛋白質。結果展示於圖15中。該實驗中DOM15-26-593之胰蛋白酶抗性概況不同於BIAcore實驗所展示之概況，從而提示反應條件之不同可能會影響胰蛋白酶裂解之最終結果。儘管如此，如下文所示，DOM15-26-593仍具有較其他所選擇之純系佳之生物物理性質以及親和力。DOM15-26-555變異體之性質之概述亦展示於下表12中。

表12

	屬性					
	SEC-MALLS		DSC	RBA	BIAcore	胰蛋白酶穩定性
dAb	單體%	估算mw	Tm(℃)	nM	KD(nM)	在+24小時時之結合%
15-26	0	37-136	64	10	28.2	30
15-26-501	0-40	18-290	51	1.14	9.1	5
15-26-555	0	28-78	63	11.7	26.1	10
15-26-588	10	33	70	27	59.1	15
15-26-589	*90*	17	63	1.94	9.6	65
15-26-591	20	21-234	63	16	38	35
15-26-593	80	*17*	*65*	0.323	3.2	*80*
15-26-595	60	*17*	*65*	0.828	5	70

實例10

鑑別DOM15-10變異體

更詳細地分析DOM15-10-11以及其親本DOM15-10。序列展示於圖16中。與濃度為200 μg/ml之胰蛋白酶一起培養後在100 nM之dAb濃度下就hVEGF結合以BIAcore方式比較dAb。在攪拌(250 rpm)下在37℃下使反應進行1小時、3小時及24小時。該等dAb之BIAcore迹線展示於圖17中。結果顯然展示在胰蛋白酶處理24小時後，所選擇之變異體比親本對蛋白水解更具抗性。

亦藉由運行SDS-PAGE之經處理及未經處理之樣品檢查前導分子及親本之胰蛋白酶抗性。簡言之，將蛋白質緩衝液交換至PBS中且濃縮至1 mg/ml。將25 μg蛋白質與1 μg測序級胰蛋白酶(Promega)混合且在30℃下培養0小時、1小時、3小時及24小時。此後，用Roche完全蛋白酶抑制劑(1×)阻斷反應，且添加DTT以及增重劑。使樣品在100℃下變性5分鐘。將15 μg各樣品加載於Novex 10-20% Tricine凝膠上，且用SureBlue(1×)染色蛋白質。結果呈示於圖18中。在此狀況下，胰蛋白酶抗性概況與BIAcore胰蛋白酶測試充分相關，從而展示結合活性直接反映蛋白質之完整性。

實例11

進一步表徵DOM15-26-555及DOM15-10變異體

首先使用差示掃描量熱法(DSC)分析dAb以確定胰蛋白酶抗性之增加是否與Tm之增加相關。結果展示於表13

中。DOM15-26-555變異體之胰蛋白酶抗性與熔融溫度之間存在相關性。前導DOM15-26-588及DOM15-26-593展示改良之Tm，但其他純系不展示。值得注意的是，雖然起始時DOM15-26-555及DOM15-10親本分子(63.3-63.7℃)具有比DOM4-130-54及DOM1h-131-511親本分子(起始時Tm：57.9-54.1℃)高得多之Tm，但總之，蛋白酶抗性純系達到類似範圍內之Tm(DOM1h-131-511/DOM4-130-54變異體之平均Tm為65.1℃，DOM15-26-55/DOM15-10變異體之平均Tm為64.9℃)。

表13

名稱	Tm(℃)
D0M15-26-555	63.3
DOM15-26-588	70.1
DOM15-26-589	63
DOM15-26-591	63
DOM15-26-593	65
DOM15-10	63.7
DOM15-10-11	63.3

在受體結合檢定中比較dAb，且量測BIAcore動力學以確定胰蛋白酶穩定性之增加是否已使得功效降低。然而，dAb之活性在該檢定中大體上未受影響或甚至得以改良。結果呈示於表14中。

表14

純系ID	EC_{50}(nM)	K_D(nM)
DOM15-26-555	11.7	26.1
DOM15-26-588	27	59.1
DOM15-26-589	1.94	9.6
DOM15-26-591	16	38

DOM15-26-593	0.323	3.2
DOM15-26-594	4.09	15.1
DOM15-26-595	0.828	5
DOM15-10	10.23	23.6
DOM15-10-11	3.58	14.6

Tm增加之優點

大多數蛋白質(包括區域抗體)以兩種狀態存在：摺疊狀態(產生生物學活性分子)及展開狀態(不具有功能活性)。該兩種狀態在所有溫度下共存且各狀態之相對比例通常由隨摺疊及展開之動力學常數而變之常數K確定。熔融溫度通常定義為K=1之溫度，亦即，摺疊蛋白質之比例等於展開蛋白質之比例時的溫度。常數K係由蛋白質之穩定及不穩定分子內相互作用確定，且因此主要由蛋白質之胺基酸序列確定。諸如溫度、pH值、緩衝液組成、壓力之外在參數影響K，且因此影響熔融溫度。

展開蛋白質為降解機制之容易靶：(i)暴露雙硫鍵視境況而定會增加氧化或減小之風險，(ii)增加主鏈靈活性可有助於自身蛋白水解反應，(iii)暴露肽片段可提供活體內蛋白酶、製造過程期間蛋白酶及下游加工及長期儲存期間遺留蛋白酶之靶，及(iv)暴露有聚集傾向片段會導致分子間聚集及蛋白質沈澱。在所有狀況下，發生蛋白質完整性、蛋白質含量及蛋白質活性損失，從而危及(i)確保批次重現性，(ii)確保存放長期穩定性及(iii)活體內功效之努力。

在自然界中，蛋白質已藉由進化設計以適於在體溫下執行且經由穩態機制容易地置換。經由生物技術方法製造出

之治療蛋白質面對不同環境：其通常由DNA重組技術在外來宿主中產生，在大容器中以較高量表現，整個下游過程中經受極重大之pH值或緩衝液組成變化且最後長期以高濃度儲存在非生理學緩衝液中。新穎傳遞技術(例如吸入、皮下貼片、緩慢傳遞奈米粒子)亦會增加治療蛋白質所經受之應力。最後，蛋白質工程化技術之出現使得可產生增強或完全新穎之治療蛋白質。因為大多數工程化技術為旨在改變或創造新穎胺基酸序列之基於活體外之技術，不會發生逐步改良生物蛋白質之進化過程，因而產生在應力抗性方面具有次最佳效能之蛋白質。

本發明之技術旨在再現整個達爾文進化(Darwinian evolution)中蛋白質所面對之條件中之一種。用在組織重塑及蛋白質穩態中發揮重要作用之蛋白酶灌注肽或多肽(例如免疫球蛋白單一可變區域)。亦測試任何可產生具有改良之功能適應之蛋白質的特定突變的適應其表現環境之能力。在本發明之一實施例中，再現該過程：建立肽或多肽變異體譜系且暴露於蛋白酶中。在第二步驟中，使變異體譜系與特定靶接觸。僅彼等經受住蛋白酶降解之蛋白質變異體能夠與靶接合，且因此(例如)由稱為‘淘選’之簡單親和力純化過程回收。與活體內過程相比，該系統提供多個優點：蛋白質譜系可面對較寬範圍之條件，例如多種蛋白酶、在較高濃度下、歷時較長時間、在不同緩衝液或pH值下且在不同溫度下。因此，該活體外技術提供一種設計可在較所起源之環境範圍寬之環境中表現且仍穩定的蛋

白質之方式。顯然，此為生物技術工業且尤其治療蛋白質領域提供多個優點。

實例12：蛋白酶抗性前導分子之PK相關性資料

進一步在活體內評估四個dAb品系中之每一個品系之親本dAb及蛋白酶抗性dAb(關於清單及詳情，參見下表15)。

表15：

品系	dAb ID	胰蛋白酶抗性	Tm(℃)	活性(nM)	Fc融合物形式之ID
DOM4-130	DOM4-130-54	良好	54	0.128*	DMS1541
	DOM4-130-202	極高	64	0.160*	DMS1542
DOM1h-131	DOM1h-131-511	良好	57	0.048†	DMS1543
	DOM1h-131-206	極高	64	0.047†	DMS1544
DOM15-10	DOM15-10	低	64	0.913†	DMS1546
	DOM15-10-11	高	63	0.577†	DMS1531
DOM15-26	DOM15-26-501(*)	低	52	0.330†	DMS1545
	DOM15-26-593	高	65	0.033†	DMS1529

*：如由MRC5/IL-α生物檢定所測定；†：如由RBA檢定所測定

註解：DOM15-26-501為本專利申請案中上文所例示之DOM15-26-555之親本形式。DOM15-26-555在CDR1(134M)中具有一個生殖系胺基酸突變。DOM15-26-501具有比DOM15-26-555低之熔融溫度(52℃對63.3℃)及增加之對胰蛋白酶之分解的敏感性。優於DOM15-26-555挑選DOM15-26-501用於PK研究，因為與DOM15-26-593相比，其更充分代表不良穩定性。

吾人可如下解釋抗性：

1 低

2 中

3 良好

4 高

5 極高

則此意謂親本分子之胰蛋白酶抗性為：

DOM4-130-54　　良好

DOM1h-131-511　　良好

DOM15-10　　低

DOM15-26-501　　低

關於所選擇之前導分子：

DOM4-130-202　　極高

DOM1h-131-206　　極高

DOM15-10-11　　高

DOM15-26-593　　高

因為區域抗體之尺寸小(12-15 kDa)，所以其在靜脈內或皮下注射後自循環中快速清除。實際上，腎絲球過濾截止點超過50 kDa，且因此諸如dAb之小蛋白質當其穿過腎時不會保留在循環中。因此，為評估活體內蛋白酶抗性之長期效應，吾人用增加全身性滯留之部分標記區域抗體。文獻中已報導數種旨在延長半衰期之方法(例如PEG、Fc融合、白蛋白融合等)。在本申請案中，用人類IgG1抗體之Fc部分標記區域抗體(或對其編排格式)。該格式提供兩個優點：(i)所得dAb-Fc之分子尺寸為約75 kDa，其足夠大以確保保留在循環中；(ii)抗體Fc部分結合FcRn受體(亦稱"布蘭貝爾"受體)。該受體定位於上皮細胞、內皮細胞及肝

細胞中且涉及延長抗體及白蛋白之壽命：實際上，在抗體及其他血清蛋白之胞飲作用後，蛋白質係引導至酸化核內體，其中FcRn受體在抗體轉運至核內體且使其返回至循環中之前截取抗體(經由與Fc部分結合)。因此，藉由使Fc部分標記於dAb，確保dAb將長期暴露於至少兩個隔室：血清及前核內體隔室(pre-endosomal compartment)中，其各自含有一組特定蛋白水解酶。另外，FcRn受體介導之穿胞運輸(transcytosis)，藉此使攜帶Fc之蛋白質遷至及遷出血管外空間。

藉由經由短介入肽連接子(粗體)使編碼VH及Vκ dAb之基因與編碼人類IgG1 Fc之基因融合實現用Fc編排格式：

對於VH dAb(加下劃線)：

EVQ.....GQGTLVTVSSASTHTCPPCPAPELLGGP...(hIgG1Fc)...PGK*

對Vκ dAb(加下劃線)：

DIQ.....GQGTKVEIKRTVAAPSTHTCPPCPAPELLGGP...(hIgG1Fc)...PGK*

根據標準方案使用293-fectin(Invitrogen)藉由瞬時轉染HEK293/6E細胞產生物質。該等細胞係經設計以當與pTT系列載體組合使用時高含量瞬時表現(Durocher等人，2002)。因此，將dAb基因選殖於經修改pTT5載體(pDOM38)中以產生Fc融合物表現載體(參見圖21)。在轉染後5天收集轉染細胞之上清液，藉由離心澄清且經0.2 μm過濾器過濾。藉由捕獲於蛋白質A流線型樹脂(GE Healthcare)上純化dAb-Fc融合蛋白。以10 mM檸檬酸鈉

(pH 3)自管柱中溶離蛋白質，接著添加...及1 M檸檬酸鈉(pH 6)以達到100 mM檸檬酸鈉(pH 6)之最終組成。

就活體內半衰期在大鼠中以於雌性Sprague-Dawley大鼠(每組n=3)中5 mg/kg之靶劑量測試dAb-Fc分子。應注意，靶劑量大大超過大鼠中之靶濃度，所以預期親本dAb與胰蛋白酶抗性dAb之間的親和力差異(參見實例11)不會影響活體內分子之最終結果。因此，希望dAb之間的PK概況之差異歸咎於抗原獨立性排除過程。

在投藥後0.03、1、4、8、24、48、72、96、120及168小時採集血樣。凝塊形成後，抽出血清且隨後在hIL-1R1、TNFR1或VEGF抗原捕獲檢定中測試。

hIL-1R1抗原捕獲檢定：

塗佈有4 μg/mL抗hIL-1R1

阻斷

添加500 ng/mL shIL-1R1

添加樣品

在1:10,000下用抗人類Fc HRP偵測

TNFR1抗原捕獲檢定：

塗佈有0.1 μg/mL sTNFR1

阻斷

添加樣品

在1:10,000下用抗人類Fc HRP偵測

VEGF抗原捕獲檢定：

塗佈有0.25 μg/mL VEGF

阻斷

添加樣品

在1:10,000下用抗人類Fc HRP偵測

使檢定之原始資料轉化為各血清樣品中之藥物之濃度。隨後在WinNonLin中使用非隔室分析(non-compartmental analysis，NCA)分析各時點之平均μg/mL值。各dAb-Fc對之PK概況展示於表16中，其概述所測出之PK參數。

表16：

ID	dAb	半衰期 (hr)	AUC/D(0-inf) (hr*μg/mL)/(mg/kg)	外推AUC%
DMS1541	4-130-54	93.2	691.5	22.7
DMS1542	4-130-202	176.8	710.1	49
DMS1543	1h-131-511	140.8	1807.5	40
DMS1544	1h-131-206	158.6	2173.0	43.6
DMS1546	15-10	43.2	324.6	3.8
DMS1531	15-10-11	56.6	770.5	n.d.
DMS1545	15-26-501	12.9	89	5.1
DMS1529	15-26-593	86.2	804.7	21.0

結果清楚指示，雖然dAb-Fc對4-130-54至1h-131-206之PK概況幾乎可重疊，但該等概況與其他對相差甚遠。當考慮AUC/D時，主要可見如下效應：15-10之AUC/D僅為15-10-11之42%。15-26-501之AUC/D僅為15-26-593之11%。該等重要差異亦影響(較小程度)半衰期：15-10及15-10-11分別為43.2 h對56.6 h。對於DOM15-26品系可見更大差異：15-26-501及15-26-593分別為12.9 h對86.2 h。實際上，對於使用非隔室分析之良好PK分析，應存在至少4個用以擬合線性回歸斜率之資料點，且半衰期估算值之時間應為半衰期計算值之至少3倍。

根據本文中之實例中所述之生物物理性質，任何給定dAb抗胰蛋白酶降解之能力似乎與dAb-Fc融合物在大鼠血清中循環較長時間之能力相關。實際上，如實例(諸如實例10)中所示，DOM15-10及DOM15-26-501為最易降解之dAb：在1 μg胰蛋白酶存在下在30℃下培養25 μg dAb約3小時可產生完全降解。該研究中之所有其他dAb(不管其是否以胰蛋白酶來選擇(亦即，DOM15-10-11、DOM15-26-593、DOM4-130-202及DOM1h-131-206)或其是否已具有部分如親本分子之胰蛋白酶抗性(DOM4-130-54及DOM1h-131-511))當再編排格式於dAb-Fc分子中時在大鼠中具有可比之PK概況。因此，本發明之PK研究提示當彼等dAb具有極低抗蛋白水解性時，對蛋白水解敏感會對dAb之活體內穩定性產生最大影響。亦展示，超過一定程度，胰蛋白酶降解抗性之進一步增量(例如DOM4-130-206對DOM4-130-54)並不等於說dAb-Fc分子進一步減緩活體內排除之能力。

在三種狀況下，在胰蛋白酶存在下之選擇產生熱穩定性(由熔融溫度所定義)增加之新穎分子：DOM4-130-202、DOM1h-131-206及DOM15-26-593。PK研究指示，在本發明資料集中，熔融溫度不足以使所觀察到之PK概況合理化之參數：實際上，DOM15-10具有比DOM15-10-11高之Tm，但比DOM15-10-11更快速地自循環中清除。另外，DOM4-130品系之兩個dAb具有顯著不同之Tm(相差10℃)，但當編排格式於dAb-Fc分子中時展示幾乎相同之活體內穩

定性。應注意，本質上不應排除熔融溫度作為預測活體內穩定性之關鍵參數。對於本發明之資料集恰好發生的為，大Tm差異(自54℃及以上)並不對活體內dAb之走向產生顯著影響。此並不排除在低於54℃之熔融溫度下，dAb之活體內穩定性可能與熱穩定性相關或也許甚至與熱穩定性及蛋白酶抗性都相關的可能性。

實例13

對DOM10-53-474之胰蛋白酶選擇

經純化DOM10-53-474之胰蛋白酶穩定性：

DOM10-53-474為以高效價與IL-13結合之區域抗體。為評估在胰蛋白酶存在下該dAb之穩定性，用胰蛋白酶分解純化dAb歷時增加之時點且在凝膠上運行以檢查任何可能的蛋白質降解。在30℃下使25 µl 1 mg/ml之純化DOM10-53-474與1 µl 1 mg/ml之測序級胰蛋白酶一起培養，從而產生25:1 dAb:胰蛋白酶之分子比。使dAb與胰蛋白酶一起培養1 h、4 h及24 h，且藉由添加4 µl Roche完全蛋白酶抑制劑中和蛋白酶活性，接著在冰上培養。藉由向dAb中添加蛋白酶抑制劑而不添加胰蛋白酶製備時間0之樣品。接著藉由電泳使用Labchip根據製造商說明書分析2 µl樣品。

圖22展示以與胰蛋白酶一起培養歷時增加之時點之DOM10-53-474運行的凝膠。為了比較，亦如以上所說明用胰蛋白酶處理一種胰蛋白酶穩定dAb DOM15-26-593且並排運行。如圖中所示，DOM15-26-593即使在與胰蛋白酶一起培養24 h後看起來亦為穩定的。然而，雖然

DOM10-53-474在24 h後在一定程度上降解，但在1 h及4 h時點時看起來為穩定的。該等資料表明DOM10-53-474在一定程度上抗胰蛋白酶降解，但不如最具胰蛋白酶穩定性之dAb DOM15-26-593穩定。

噬菌體呈現DOM10-53-474之胰蛋白酶穩定性：

為評估噬菌體呈現DOM10-53-474之胰蛋白酶穩定性，將編碼DOM10-53-474之基因選殖於pDOM33(圖50)之*Sal*/*Not*位點中及根據標準技術產生噬菌體。將噬菌體由PEG沈澱純化，再懸浮於PBS中且測力價。

使噬菌體呈現dAb與胰蛋白酶一起培養不同時點以評估胰蛋白酶抗性。與胰蛋白酶一起培養後，在感染指數生長大腸桿菌TG1細胞後，由力價分析量測穩定性。

在37℃下在震盪培養箱中使100 μl噬菌體於100 μg/ml胰蛋白酶中培養1 h、2 h、4 h及隔夜。用Roche完全蛋白酶抑制劑(×2)阻斷胰蛋白酶活性，且隨後將噬菌體稀釋於2%於PBS中之marvel中，在室溫下與10 nM經生物素標記IL-13一起培養1小時。添加在室溫下用2%於PBS中之marvel預阻斷1小時的抗生蛋白鏈菌素塗佈珠粒(Dynabeads M-280(Invitrogen))，且隨後在室溫下將混合物培養5分鐘。所有與Dynabeads一起進行之培養步驟均在轉輪上進行。藉由用存於PBS中之0.1% Tween-20洗滌珠粒8次洗除未結合噬菌體。用0.5 ml 0.1 M甘胺酸(pH 2.2)溶離結合噬菌體且用100 μl 1 M Tris-HCL(pH 8.0)中和。使用經溶離噬菌體感染指數生長之TG1細胞(在37℃下1小時)且塗鋪於四環

素板上。在37℃下將各板培養隔夜，且進行菌落計數。將胰蛋白酶分解後之噬菌體輸出力價概述於表17中。當與胰蛋白酶一起培養歷時增加時點時，噬菌體力價降低。培養24小時後，所有噬菌體分解。

表17：對噬菌體呈現DOM-10-53-474親本執行之胰蛋白酶選擇之輸出力價

胰蛋白酶培養時間長短	胰蛋白酶濃度	力價
無胰蛋白酶對照	-	3×10^7
1 h	100 μg/ml	1×10^7
2 h	100 μg/ml	7×10^6
4 h	100 μg/ml	5×10^6
隔夜	100 μg/ml	0

選擇更抗胰蛋白酶之dAb：

為選擇更抗胰蛋白酶降解之dAb，使用Stratergene Mutazyme 11套組、經生物素標記引子及供50 μl反應用之5-50 pg模板由PCR向編碼DOM10-53-474之基因中引入隨機突變。經*Sal*I及*Not*I分解後，用抗生蛋白鏈菌素塗佈珠粒自未分解產物中純化插入物且將其在相應位點處連接於pDOM33中。用經純化連接混合物轉型大腸桿菌TB1細胞，從而產生DOM10-53-474之易錯庫。庫之規模為1.9×10^9且胺基酸突變率為1.3。

對該庫執行3輪選擇以選擇具有改良蛋白酶抗性之dAb。在僅有抗原而無胰蛋白酶處理的情況下執行第1輪選擇以淨化庫從而移除不再以高親和力結合抗原之任何純系。在10 nM IL-13下進行選擇。與6×10^{10}個輸入噬菌體相比，第1輪之輸出為2×10^9，從而指示庫之大部分以高親和力結合

抗原。

用1 nM經生物素標記IL-13執行第2及第3輪選擇。在對IL-13淘選之前，在37℃下在震盪器(250 rpm)中使噬菌體與100 μg/ml胰蛋白酶一起培養。對於第2輪選擇，在室溫下或在37℃下培養胰蛋白酶1小時。第2輪選擇之輸出展示於表18中：

表18：第2輪選擇後輸出之噬菌體力價

胰蛋白酶處理	力價
無處理	1×10^{8}
1 h，室溫	5×10^{7}
1 h，37℃	2×10^{7}

使用來自37℃下1 h胰蛋白酶處理的第2輪選擇的噬菌體輸出物作為第3輪選擇之輸入物。對於第3輪選擇，用100 μg/ml胰蛋白酶處理噬菌體且歷時較長時點：在37℃下2 h，在37℃下4 h，在室溫下隔夜或在37℃下隔夜。第3輪選擇之輸出力價概述於表19中：

表19：第3輪選擇後輸出之噬菌體力價

胰蛋白酶處理	力價
無胰蛋白酶	1.3×10^{8}
2 h，37℃	1.9×10^{7}
4 h，37℃	2×10^{6}
隔夜，室溫	4×10^{7}
隔夜，37℃	2.1×10^{6}

對來自第1、2及3輪之各選擇輸出物之數個純系進行測序以評估序列多樣性。無胰蛋白酶處理之第1輪選擇後，選擇輸出物之50%具有親本DOM10-53-474序列。第2輪選擇後，親本之百分率增加至75%。第3輪選擇後，親本之

百分率增加至80%。

該資料指示DOM10-53-474已抗胰蛋白酶降解，且可自該等胰蛋白酶選擇物中選擇不太多之新穎純系。圖22展示當用胰蛋白酶分解經純化蛋白質時，DOM10-53-474即使在胰蛋白酶處理隔夜後亦不會完全分解。然而，為瞭解在選擇輸出物中是否存在任何比DOM10-53-474更具胰蛋白酶抗性之新穎純系，將在37℃下用胰蛋白酶處理噬菌體隔夜之第3輪選擇之輸出物亞選殖於pDOM5中。隨後對數百個純系測序以尋找任何胰蛋白酶抗性純系。在所分析之數百個純系中，僅26個純系具有新穎序列，然而該等純系中沒有一個在胰蛋白酶裂解位點(離胺酸或精胺酸)具有突變，表明該等純系不比DOM10-53-474更具胰蛋白酶抗性。

實例14

在胰蛋白酶存在下由噬菌體選擇引入前導DOM0101(抗TNFR1)dAb中之儲存及生物物理性改良：

為改良前導分子DOM1h-131-511之蛋白酶抗性，如先前所述在胰蛋白酶存在下進行噬菌體選擇。該方法產生大量與親本DOM1h-131-511分子相比具有改良胰蛋白酶穩定性之純系。選擇兩個純系DOM1h-131-202及DOM1h-131-206以進一步表徵，因為其展示胰蛋白酶作用之最顯著改良。如下文所概述之進一步研究展示，對於胰蛋白酶作用具有改良抗性，主要對分子抗剪切應力及熱應力之穩定性存在其他有利效應。該兩個參數對增加生物醫藥產物之儲存及

存放期穩定性至關重要。

馬斯德畢赤酵母中前導DOM0101 dAb之產生：

使用編碼三種前導分子之一級胺基酸序列之基因在馬斯德畢赤酵母中產生分泌蛋白質。將三種合成基因(DOM1h-131-511、DOM1h-131-202及DOM1h-131-206)選殖於表現載體pPIC-Zα中，且隨後轉型於兩種畢赤酵母菌株X33及KM71H中。將經轉型細胞濾出置於遞增濃度之芬森(100、300、600及900 μg/ml)上以選擇具有多個整合子之純系。隨後在2 L燒瓶中篩選數個純系以鑑別高表現細胞系。隨後使用最佳表現純系在醱酵罐中以5 L規模產生物質。

蛋白質純化及物質表徵：

為產生高品質物質用於表徵且用於進一步穩定性研究，使用混合模態電荷感應樹脂(Capto MMC)將下游純化過程設計為初級捕獲步驟，接著進行陰離子交換(Q Sepharose)。未顯著優化，此允許回收約70%之純度為約95%之表現dAb。使用電噴霧質譜、胺基末端測序及等電聚焦表徵物質一致性，且使用SDS-PAGE及SEC(尺寸排阻層析法)表徵純度。

蛋白質一致性：

各蛋白質之第一個5殘基之胺基末端序列分析係如所預期(EVQLL...)。使用C4 Zip尖頭(Millipore)對已緩衝液交換於含有0.1%冰醋酸之50:50 H_2O:乙腈中之蛋白質樣品執行質譜分析。對於三種蛋白質中每一種所量測到的質量當允許因形成內部雙硫鍵而產生之-2質量差時係在基於一級胺

基酸序列之理論質量(使用平均質量計算)的0.5 Da範圍內。使用IEF基於對於各蛋白質為不同之pI鑑別蛋白質。

蛋白質純度：

將三種蛋白質以1 μg及10 μg之量一式兩份裝載於非還原SDS-PAGE凝膠上。在所有情況下，觀察到單一條帶。

亦執行尺寸排阻層析以顯示純度級。對於尺寸排阻層析(SEC)，將100 μg各蛋白質裝載於TOSOH G2000 SWXL管柱上，在0.5 ml/min下流動。移動相為PBS/10%乙醇。基於曲線下之面積量測單體百分率(參見圖23)。

比較DOM1h-131-511、DOM1h-131-202及DOM1h-131-206之穩定性

評估蛋白酶穩定性：

在過量蛋白酶中預培養規定時點後，由BIAcore™分析殘餘結合活性評估DOM1h-131-511、DOM1h-131-202及DOM1h-131-206之蛋白酶穩定性。將約1400 RU經生物素標記TNFR1塗佈於抗生蛋白鏈菌素(SA)晶片上。在30℃下使250 nM DOM1h-131-511、DOM1h-131-202及DOM1h-131-206與僅PBS一起或與100 μg/ml胰蛋白酶、彈性蛋白酶或白血球酶一起培養1、3及24小時。藉由添加蛋白酶抑制劑混合物使反應停止。隨後使用參考池扣除法使dAb/蛋白酶混合物穿過TNFR1塗佈晶片。在每次注射循環之間用10 μl 0.1 M甘胺酸(pH 2.2)使晶片表面再生。相對於無蛋白酶之dAb結合，測定與蛋白酶一起預培養結合人類TNFR1之DOM1h-131-511、DOM1h-131-202及DOM1h-131-206(10秒

時)之比例。在25℃下進行BIAcore™運行。以下資料由三個獨立的實驗產生。條形圖指示平均值，且誤差棒指示結果之標準偏差(圖24)。

已發現，與DOM1h-131-511相比，DOM1h-131-202及DOM1h-131-206展示具有較大的胰蛋白酶、彈性蛋白酶或白血球酶蛋白水解降解抗性。與胰蛋白酶一起1小時後及與彈性蛋白酶或白血球酶一起3小時後，與DOM1h-131-511相比，DOM1h-131 -202與DOM1h-131-206之間的差異最明顯。在大部分測試條件下，存在與DOM1h-131-202相比，DOM1h-131-206稍更穩定之趨勢。

如使用DSC所測定之dAb之熱穩定性：

為確定在何pH值下前導分子具有最大穩定性，使用差示掃描量熱計(DSC)量測各dAb在伯瑞坦-魯賓遜緩衝液中之熔融溫度(T_m)。因為伯瑞坦-魯賓遜由三組分緩衝系統(乙酸、磷酸及硼酸各40 mM)構成，所以有可能在同一溶液中產生3-10範圍內之pH值。由蛋白質一級胺基酸序列確定理論pI。由DSC，可見dAb具有最大內在熱穩定性之pH值對DOM1h-131-202而言為pH 7，對DOM1h-131-206而言為pH 7-7.5，且對DOM1h-131-511而言為pH 7.5。對於所有隨後應力及穩定性研究，各dAb在伯瑞坦-魯賓遜緩衝液中使用以下pH值：對DOM1h-131-202及GSK1995057A DOM1h-131-206而言，pH 7.0，且對DOM1h-131-511而言，pH 7.5。結果概述於表20中。

表20：如由DSC所測定於伯瑞坦-魯賓遜緩衝液中1

mg/ml之DOM1h-131-202、DOM1h-131-206及DOM1h-131-511之pH值及T_m的概述。溫度以180℃/小時勻變。

dAb	產生最大固有熱穩定性之pH值	在給定pH值下dAb之Tm(℃)
DOM1h-131-202	7.0	68.6
DOM1h-131-206	7.0-7.5	65.8
DOM1h-131-511	7.5	58.0

兩週熱穩定性測試

蛋白質在高溫下持續長時間之能力通常為其穩定性之良好指示。在該等條件下，蛋白質可經受數種諸如聚集之物理過程，或化學改質。在37℃及50℃下在伯瑞坦-魯賓遜緩衝液中將dAb(1 mg/ml)培養14天。使用SEC測定經14天之時間溶液中遺留多少單體(圖25)。

由圖25可見DOM1h-131-202與DOM1h-131-206顯著比DOM1h-131-511對熱應力穩定。通常將蛋白質暴露於諸如37℃及50℃之高溫下來給出藥物長期存放期之指示。使用該等較高溫度加速與室溫下長期儲存相關之正常過程，諸如脫醯胺作用、氧化或聚集。亦可使用SEC監測溶液中聚集形成之程度(圖26A至I)。37℃下14天後，DOM1h-131-511自溶液中之損失可歸於沈澱與如由SEC所測定之較高有序性聚集體之形成(圖26B)。14天後在37℃下，關於DOM1h-131-202與DOM1h-131-206亦可見顯著較低之蛋白質損失，其中聚集體形成極少或無實質性增加，尤其在DOM1h-131-206之狀況下(圖26H)。在50℃下，分子之間的差異甚至更明顯，DOM1h-131-206在14天後在較高溫度下展示較DOM1h-131-202佳之穩定性，展示較高分子量聚集

體之形成顯著降低(圖26)。相對於t=0，14天後，DOM1h-131-206僅展示聚集體形成之小幅增加(圖26I)，而DOM1h-131-511幾乎沈澱析出溶液(圖26C)。

此展示由胰蛋白酶選擇引入dAb中之變化(例如改良之熱穩定性)顯著改良蛋白質在37℃及50℃下儲存穩定性。DOM1h-131-202明顯具有且DOM1h-131-206更顯著明顯具有改良之溶液穩定性及較低的在高溫下形成聚集體之傾向，此可直接解釋為在諸如+4℃及室溫之更多相關溫度下具有改良之長期儲存穩定性。

隨後由IEF分析熱應力實驗24小時、48小時、7天及14天時點之樣品以瞭解蛋白質是否經受任何會影響蛋白質總電荷之生物物理變化(圖27)。

在37℃下，DOM1h-131-202與DOM1h-131-206再次展示與DOM1h-131-511相比無顯著變化。關於DOM1h-131-511，24小時後在37℃下出現微弱之第二條帶。咸信，該額外出現的帶係歸因於蛋白質之二聚作用，從而掩蔽電荷且產生兩個分子群體。在50℃下，分子之間的差異更明顯，在高溫下DOM1h-131-206明顯展示無顯著變化，而24小時後，DOM1h-131-202展示一些改質跡象。在伯瑞坦-魯賓遜中48小時後，大部分DOM1h-131-511因沈澱而損失。

由TNFR-1 RBA分析50℃下之T=0、7及14天時點以確定暴露於高溫後蛋白質之功能性(圖28)。雖然目前該檢定在檢測歸因於應力之分子之微小變化方面不如SEC或IEF靈

敏，但可使用其展示dAb仍可結合抗原。

DOM1h-131-511之曲線之向左移動反映大部分dAb已歸因於沈澱而損失之事實。溶液中遺留之物質仍能夠結合抗原。如圖25中所示，大部分DOM1h-131-202與DOM1h-131-206即使在14天後亦能夠保持在溶液中。RBA展示所有可溶性蛋白質仍具功能性且能夠結合TNFR1。

高蛋白濃度下測試之儲存穩定性：

進行實驗以研究+4℃極高蛋白質濃度下之儲存穩定性以瞭解在該等條件下各分子如何表現。將所有前導dAb在最穩定pH值在伯瑞坦-魯賓遜緩衝液中在離心Vivaspin濃縮器中濃縮(5K截止點)至約100 mg/ml。隨後將約100 mg/ml之樣品擱置在+4℃下7天，且隨後由SEC分析以瞭解在高濃度下儲存期間樣品是否會發生任何其他物理變化(圖29)。在SEC管柱上於1×PBS 10%乙醇(v/v)中走柱之前，將樣品稀釋至約1 mg/ml。

由SEC迹線，可見DOM1h-131-202與DOM1h-131-206在7天後在聚集體形成方面均不展示任何顯著增加，而DOM1h-131-511單體濃度存在約2%之減小。

前導dAb之噴霧器傳遞：

為進行早期毒理學及臨床研究，將dAb調配為液體形式且經由噴霧裝置傳遞。視裝置(例如，超音波、噴射或振網)而定，dAb當其經噴霧以形成規定粒度之氣霧劑時將經歷一定程度之剪切應力及熱應力。因為與DOM1h-131-511相比，DOM1h-131-202與DOM1h-131-206具有較高T_m且展

示大大改良之熱應力穩定性，所以所有dAb均在兩種噴霧器裝置中測試以瞭解其如何回應噴霧期間所誘發之剪切應力/熱應力。隨後由SEC分析來自噴霧氣霧劑之蛋白質與裝置中(亦即，杯中)之殘留dAb以確定該過程期間產生聚集之量。

在伯瑞坦-魯賓遜緩衝液中在最穩定pH值下測試所有分子。在E-flow Rapid(振網)與Pari LC+(噴射噴霧器)中測試dAb，其中操作時間為3.5分鐘，蛋白質濃度為5 mg/ml且粒度分布使用Malvern Spraytek確定。結果展示於圖30中。為良好傳遞且分布於深肺中，理想粒度為<5 μm。所有dAb在伯瑞坦-魯賓遜緩衝液中產生小於5 μm之可比粒度級。在噴霧之前及之後，由A_{280}量測法測定裝置杯中之dAb之濃度(資料未圖示)。已發現，蛋白質濃度並未顯著改變，從而指示蛋白質與媒劑在傳遞期間均不會優先霧化。

在SEC上運行在伯瑞坦-魯賓遜緩衝液中霧化之dAb之樣品以確定傳遞期間蛋白質是否經受任何物理變化。圖31展示由SEC所測定之杯或氣霧劑中之相對百分率變化。可見，在單體濃度方面，DOM1h-131-202與DOM1h-131-206相對於DOM1h-131-511經受相對較小之變化。此證明具有改良T_m之DOM1h-131-202與DOM1h-131-206在噴霧期間具有較小的聚集傾向。

圖32展示於伯瑞坦-魯賓遜緩衝液中之DOM1h-131-206及DOM1h-131-511在噴霧後之實際SEC迹線且顯示單體之

相對損失(圖31)係歸因於二聚體形成。此再次提供由DOM1h-131-202及DOM1h-131-206所展示之較高熱穩定性即使在未優化調配物緩衝液中亦可阻止顯著聚集之理論的其他證據。

關於毒理學及安全評估研究，有必要傳遞比給予患者之治療劑量顯著高之含量的dAb至動物中。此僅可藉由使用顯著較高之蛋白質濃度及/或經長時間傳遞dAb來達成。因為已展示DOM1h-131-511在經3.5分鐘在5 mg/ml下噴霧時形成聚集體，所以DOM1h-131-206係在PBS中在40 mg/ml下測試且使用Pari LC+噴霧至多1小時。整個運行期間在各時點採集杯及氣霧劑之樣品以瞭解延長噴霧是否會導致dAb歸因於剪切應力或熱應力(由SEC測定)及蛋白質濃度(A280 nm量測法)而聚集。表21展示由A280確定之杯與氣霧劑中之dAb的蛋白質濃度。

表21：在使用Pari LC+在約40 mg/ml下噴霧dAb期間，杯與氣霧劑之由A280吸光度讀數確定之DOM1h-131-206的經量測蛋白質濃度。考慮到稀釋誤差及儀器誤差，在經1小時噴霧dAb後，樣品濃度並未改變。

時間(Min)	杯樣品(mg/ml)	氣霧劑樣品(mg/ml)
1	43.8	43.4
29	44.5	43.5
59	44.6	44.1

由表21可見蛋白質濃度在運行期間並未顯著改變，顯示不存在顯著的歸因於聚集之蛋白質損失。圖33展示如由SEC所測定，經1小時之噴霧時間，DOM1h-131-206並未形

成任何較高有序性之聚集體，諸如二聚體。此明顯顯示如由胰蛋白酶選擇向分子中引入之改良生物物理性質顯著增加dAb抗剪切應力及熱應力性，且此可與改良之儲存存放期及噴霧蛋白質以致不形成較高有序性聚集體之能力直接相關。

前導dAb之溶解狀態：

因為所有三種前導dAb之主要降解途徑似乎為最初導致二聚合接著進一步聚集且最終沈澱之自締合，所以由分析超速離心(Analytical Ultra-Centrifugation，AUC)研究該三種前導分子以確定自締合之程度。由兩種方法，即沈降平衡及沈降速度研究蛋白質。

關於沈降平衡方法，在0.5 mg/ml至5 mg/ml範圍內之三種不同濃度下用離心效應使用三個不同轉子速度運行三個樣品。由該方法，確定DOM1h-131-511為穩定二聚體(26.1-34.4 kDa)，DOM1h-131-202為單體/二聚體平衡(22.7-27.8 kDa)，由K_d=1.3 μM量測在各濃度下具有相對穩定之二聚物狀態，且DOM1h-131-206主要為單體性(15.4-17.9 kDa)，單體締合為二聚體之K_d為360 μM。

由沈降速度方法，所有樣品在稀釋後展示一定程度之解離。由展示於圖34中之所獲得之結果，關於DOM1h-131-511所觀察到之沈降係數指示較高有序性聚集體，且稀釋後峰位移為該等聚集體解離之指示。蛋白質聚集及解離互相抵消，可得出如由沈降平衡所觀察到之穩定二聚體之印象。關於DOM1h-131-202所觀察到之沈降係數指示快速動

力平衡，且因此可將單體及二聚體峰彼此分開，從而得到具有比適於樣品質量高之沈降係數之單峰。該結果與沈降平衡方法所獲得之結果一致，且解離常數經量測為1 μM。DOM1h-131-206係經測定比其他兩個樣品更具單體性，與其他兩個樣品之2.5 s相比，其具有1.9 s之沈降係數。該資料與沈降平衡資料極一致。在量測濃度下，360 μM之K_d以下約10倍，樣品主要為單體性。

實例15

DOM15-26-593 dAb之效價增強：

圖40中展示VEGFR2受體結合檢定中DOM15-26-593 dAb比DOM15-26親本之效價增加之實例。在該檢定中，在板基檢定中量測潛在抑制劑阻止VEGF與VEGFR2結合之能力。在該檢定中，將VEGFR2-Fc嵌合體塗佈於96孔ELISA板上，且向其中添加預定量之已與測試dAb稀釋系列一起預培養之VEGF。洗除未結合蛋白質後，用抗VEGF抗體偵測與受體結合之VEGF之量，比色測定其含量。以隨測試物質濃度變化之VEGF結合抑制百分率繪製劑量-反應效應。因此有效抑制劑為顯示在低濃度下實質性阻斷配位體結合之抑制劑。

FC融合物之效價及半衰期：

VEGF阻斷在治療腫瘤中之治療潛能已實現超過30年。癌症之慢性性質指示生物醫藥需要長的血清半衰期來介導其效應，而此與游離dAb因腎濾過而自循環快速清除不相符。為評估VEGF dAb作為治療癌症之抗血管生成劑之效

用，藉由使用FcRn介導抗體補救途徑經由雜交連接子使前導區域抗體編排格式為與野生型人類IgG1 Fc之融合物以形成具有延長的血清半衰期之二價分子。

在該Fc融合物格式中，使用先前所述之檢定，可將前導胰蛋白酶選擇dAb(DOM15-26-593)之效價與最初親本dAb(DOM15-26)及胰蛋白酶不穩定dAb(DOM15-26-501)作比較。結果展示於下表22中：

表22：呈Fc融合物格式之DOM15-26前導分子之效價(RBA)及半衰期特徵

dAb	Fc	效價(nM)	T1/2b(hr)
DOM15-26	hIgG1	0.506	ND
D0M15-26-501	hIgG1	0.323	12.9
DOM15-26-593	hIgG1	0.033	84.6

由該等結果可見，在二聚體Fc融合格式中，親和力及效價歸因於親和性(avidity)效應相對於游離dAb增加。顯然，由於胰蛋白酶選擇所獲得之DOM15-26-593之效價增加得以維持且在該Fc格式中甚至更明顯。此外，熱及蛋白酶穩定性之改良解釋為分子活體內藥物動力學特性之深度改變。與DOM15-26-501相比，DOM15-26-593之排除半衰期之改良(參見圖41)很可能為dAb穩定性增加之直接結果，從而使其變得更抗核內體隔室(endosomal compartment)所發生之降解過程。因此，亦預期具有增強蛋白酶穩定性之dAb能夠在其中蛋白水解為涉及生物分子轉換(turnover)之活性過程的其他生物隔室(諸如血清、黏膜表面及多種組織隔室)中持續較長時間。

藥物動力學清除概況：

在向3隻大鼠靜脈內投與濃度為5 mg/kg之DOM15-26-593及DOM15-26-501後，量測DOM15-26-593及DOM15-26-501之藥物動力學清除概況。隨後使用直接VEGF結合標準ELISA檢定及抗人類Fc抗體量測DOM15-26-593及DOM15-26-501在血清中之含量，因此僅偵測血清樣品中之完整藥物。完整藥物動力學概況展示於下表23中：

表23：大鼠中DOM15-26及DOM15-26-593 Fc融合物之藥物動力學參數概述

dAb	半衰期	Cmax(μg/ml)	AUC(0-inf)(hr*μg/ml)	清除率(ml/hr/kg)
DOM15-26-501	12.9	91.4	445.1	11.8
DOM15-26-593	84.6	101.8	3810	1.3

由該等結果可見DOM15-26-593具有顯著改良之藥物動力學概況，(例如)延長之半衰期及降低之清除率。

DOM15-26-593之顯著改良之效價及藥物動力學性質產生對分析化合物之多種其他生物物理屬性的分析。

溶解狀態性質：由SEC-MALLs及AUC分析：

由尺寸排阻層析-多角雷射散射(SEC-MALLS)與分析超速離心(AUC)評估DOM15-26-593之溶解著的狀態。在Superdex 200 GF管柱(瓊脂糖基質)上在0.3 $ml \cdot min^{-1}$之流速下在杜氏PBS(Dulbecco's PBS)(Sigma)中運行SEC-MALLS，其中在Wyatt Optilab rEX上偵測折射率(RI)且在Wyatt TREOS MALLS偵測器上偵測MALLS。使用ASTRA軟體分析資料。分析兩批獨立的DOM15-26-593且兩批均展示在至多2.5 mg/ml之濃度下表現為溶解狀態的單體，其中計算

分子質量為78-81 KDa，與約76 kDa之計算完整分子質量一致。

對於AUC分析，將DOM15-26-593在PBS中稀釋至0.2、0.5及1.0 mg/ml濃度，且在Beckman XL-A分析超速離心機中在40000 rpm下進行沈降速度操作。在20℃之設定溫度下以5分鐘為間隔獲得資料。使用SEDFIT軟體分析資料，且使用c(S)或ls-g(s*)程式產生沈降係數分布。

該分析之結果展示DOM15-26-593在至多2.5 mg/ml之濃度下表現為溶解狀態之單體，其中計算分子質量為78-81 KDa，與約76 kDa之計算完整分子質量(圖42a及42b)一致。

熱熔融性質：由DSC分析

用DOM15-26-593(及Fc融合物)如下進行實驗：

使用差示掃描量熱法分析dAb及Fc融合物之熱穩定性。簡言之，將濃度為2 $mg \cdot ml^{-1}$之蛋白質與緩衝液參比一起置放於Microcal量熱計中。在適當緩衝液中將樣品以180℃·hr^{-1}之速率自20℃加熱至100℃，且使用"Origin"軟體使用適合於所分析之蛋白質之性質的擬合模型分析熱變性資料。

胰蛋白酶選擇dAb(65℃，圖43之中間圖)之增加之熱穩定性在Fc融合物(64.5℃，圖43之上圖)中得以維持。展示DOM15-26-501 dAb(52℃，圖43之下圖)之Tm曲線以便比較。

冷凍-解凍、溫度應力及血清組分之穩定性

用DOM15-26-593(及Fc融合物)如下進行實驗：

DOM15-26-593 dAb之穩定性性質意謂可使其經受物理及生物應力，而對其結合VEGF之能力產生最小影響(參見圖44-47(a及b))。在所有狀況下，由ELISA測定VEGF dAb-Fc融合物與VEGF之結合。簡言之，使96孔ELISA板塗佈有250 mg/ml存於碳酸鹽緩衝液中之$VEGF_{165}$隔夜。隨後用1%存於PBS中之BSA阻斷板，之後添加稀釋於相同緩衝液中之測試物質。培養60分鐘後，洗除未結合物質，且用HRP-接合抗人類IgG之1:10,000稀釋液，接著"SureBlue"顯色受質且用1 M HCl停止來偵測結合物質。

舉例而言，可使分子自液氮(-196℃)至體溫(37℃)重複冷凍解凍10次循環，而如由ELISA所測定不損失結合活性(圖44)。如由習知尺寸排阻層析法所評估，該處理亦不對分子聚集狀態產生明顯改變(圖45)。其他測試證明分子可置放於-80℃至55℃範圍之不同溫度下而僅在最高培養溫度下168小時後，抗原結合活性稍微減小(圖46)。此外，如由VEGF結合ELISA所測定，在37℃下與人類或獼猴血清一起培養14天不導致抗原結合能力損失(圖47a及47b)。

VEGFR2受體結合檢定及HUVEC細胞檢定中之效價：

使用上述受體結合檢定評估DOM15-26-593 dAb-Fc融合物之效價(圖48)。已發現，DOM15-26-593 dAb在該檢定中具有增強之效價，此確立dAb阻斷VEGF與VEGFR2活體外結合之能力。亦在量測VEGF拮抗劑阻斷HUVE細胞之VEGF刺激增生之能力的HUVEC(人類臍靜脈內皮細胞)檢

定中證明DMS1529之效價。簡言之，將約4e3個HUVE細胞分配於96孔板之孔中，向該等孔中添加VEGF與測試物質之稀釋系列之混合物以致VEGF之最終濃度為5 ng/ml或如由劑量-反應滴定所測定。將細胞在37℃下再培養4天，此時藉由使用諸如"CellTiter"之細胞定量試劑測定細胞數目。此使得可與標準物比較來比色測定經過4天實驗之細胞增生。在與預定量之VEGF及不同量之測試物品一起培養固定時期結束時，測定細胞數目。拮抗劑越有效，所觀察到之細胞增生越低(圖49)。

【圖式簡單說明】

圖1說明用於製備噬菌體呈現譜系之pDOM13(亦稱為pDOM33)之多個選殖位點。

圖2展示以來自在30℃與40 μg/ml胰蛋白酶一起培養之dAb之不同時點的樣品運行之數個Novex 10-20% Tricene凝膠。在添加胰蛋白酶之前即刻及隨後在添加胰蛋白酶之後1小時、3小時及24小時獲取樣品。用1×SureBlue染色蛋白質。凝膠說明在與胰蛋白酶一起培養第一個3小時期間，DOM15-10與DOM15-26-501顯著分解。DOM15-26、DOM4-130-54及DOM1h-131-511之分解僅在與胰蛋白酶一起培養24小時後才變得明顯。

圖3說明DOM1h-131-511及24個所選擇之變異體之胺基酸序列。突出所選擇之純系中不同於親本序列之胺基酸(彼等一致胺基酸由點標記)。對應於CDR1、CDR2及CDR3之環用框勾畫。

圖4說明DOM4-130-54及27個所選擇之變異體之胺基酸序列。突出所選擇之純系中不同於親本序列之胺基酸(彼等一致胺基酸由點標記)。對應於CDR1、CDR2及CDR3之環用框勾畫。

圖5說明DOM15-26-555及21個所選擇之變異體之胺基酸序列。突出所選擇之純系中不同於親本序列之胺基酸(彼等一致胺基酸由點標記)。對應於CDR1、CDR2及CDR3之環用框勾畫。

圖6說明DOM15-10及16個所選擇之變異體之胺基酸序列。突出所選擇之純系中不同於親本序列之胺基酸(彼等一致胺基酸由點標記)。對應於CDR1、CDR2及CDR3之環用框勾畫。

圖7A-7D為展示在37℃下與不同濃度之胰蛋白酶(在0至100 μg/ml範圍內)一起培養隔夜後，親本dAb DOM1h-131-511(圖7A)及三個變異體dAb DOM1h-131-203(圖7B)、DOM1h-131-204(圖7C)及DOM1h-131-206(圖7D)與固定TNFR1之結合的BIAcore迹線。結果展示在高濃度胰蛋白酶(100 μg/ml)下，所有三個變異體比親本對蛋白水解更具抗性。

圖8A-8C為展示在與彈性蛋白酶及白血球酶一起培養隔夜後dAb DOM1h-131-511(圖8A)、DOM1h-131-202(圖8B)及DOM1h-131-206(圖8C)與固定TNFR1之結合的BIAcore迹線。與親本相比，dAb對彈性蛋白酶與白血球酶之蛋白水解展示增加之抗性。

圖9展示以dAb DOM1h-131-511、DOM1h-131-203、DOM1h-131-204、DOM1h-131-206、DOM1h-131-54、DOM1h-131-201及DOM1h-131-202之與胰蛋白酶一起培養之前的樣品及以100 μg/ml胰蛋白酶一起培養1小時、3小時及24小時後的樣品運行的兩個4-12% Novex Bis-Tris凝膠。

圖10A-10C為展示在37℃下與不同濃度胰蛋白酶(在0至100 μg/ml範圍內)一起培養隔夜後，DOM4-130-54(圖10A)、DOM4-130-201(圖10B)及DOM4-130-202(圖10C)與固定IL-1R1融合蛋白之結合的BIAcore迹線。結果展示在高濃度胰蛋白酶(100 μg/ml)下，兩個變異體比其親本對蛋白水解更具抗性。

圖11A-11C為展示與彈性蛋白酶及白血球酶一起培養隔夜後，DOM4-130-54(圖11A)、DOM4-130-201(圖11B)及DOM4-130-202(圖11C)與固定IL-1R1融合蛋白之結合的BIAcore迹線。與親本相比，dAb對兩種所測試之蛋白酶之蛋白水解展示增加之抗性。

圖12說明DOM15-26-555及6個變異體之胺基酸序列。突出所選擇之純系中不同於親本序列之胺基酸(彼等一致胺基酸由點標記)。

圖13A及13B為展示親本dAb DOM15-26-555(圖13A)及最具蛋白酶抗性變異體DOM15-26-593(圖13B)與固定VEGF之結合的BIAcore迹線。與濃度為200 μg/ml之胰蛋白酶一起培養後在100 nM之dAb濃度下就hVEGF結合以BIAcore方

式比較親本及變異體。在37℃下進行反應3小時或24小時。結果展示在胰蛋白酶處理24小時後，變異體比親本對蛋白水解更具抗性。

圖14為展示胰蛋白酶處理對DOM15-26-555變異體之hVEGF結合之影響的圖表。結果顯然展示胰蛋白酶處理24小時後，所有變異體比親本(DOM15-26-555)對蛋白水解更具抗性。

圖15展示兩個加載15 μg經處理及未經處理之DOM15-26-555或DOM15-26-593樣品之Novex 10-20% Tricine凝膠。在添加胰蛋白酶之前即刻及隨後在添加胰蛋白酶之後1小時、3小時及24小時獲取樣品。用1×SureBlue染色蛋白質。凝膠說明DOM15-26-593之胰蛋白酶抗性概況不同於由BIAcore實驗展示之概況。

圖16說明DOM15-10及變異體DOM15-10-11之胺基酸序列。突出變異體中不同於親本序列之胺基酸(彼等一致胺基酸由點標記)。

圖17A及17B為展示親本DOM15-10(圖17A)及變異體DOM15-10-11(圖17B)與固定VEGF之結合的BIAcore迹線。與濃度為200 μg/ml之胰蛋白酶一起培養後在100 nM之dAb濃度下就hVEGF結合以BIAcore方式比較親本及變異體。在37℃下進行反應1小時、3小時及24小時。結果展示在胰蛋白酶處理24小時後，變異體比親本對蛋白水解更具抗性。

圖18展示兩個加載15 μg DOM15-10及DOM15-10-11樣品

之Novex 10-20% Tricene凝膠。在添加胰蛋白酶之前即刻及隨後在添加胰蛋白酶之後1小時、3小時及24小時獲取樣品。用SureBlue(1×)染色蛋白質。結果展示BIAcore研究中可見之結合活性直接反映蛋白質之完整性。

圖19A-19L說明數個編碼為DOM1h-131-511或DOM4-130-54之變異體之dAb的核酸的核苷酸序列。核苷酸序列分別編碼圖3及圖4中所呈示之胺基酸序列。

圖20A-20E說明數個編碼為DOM15-26-555或DOM15-10之變異體之dAb的核酸的核苷酸序列。核苷酸序列分別編碼圖5及圖6中所呈示之胺基酸序列。

圖21展示pDOM38之載體圖。

圖22展示不同時點在30℃下以25:1 dAb:胰蛋白酶比率用胰蛋白酶處理之DOM10-53-474及DOM15-26-593蛋白質之在Labchip上運行的凝膠。箭頭展示全長蛋白質。

圖23為展示各樣品由MMC層析接著陰離子交換純化後所獲得之高純度級的尺寸排阻層析迹線。在225 nm下監測UV且用具有10%乙醇(v/v)之1×PBS走柱。藉由經基線校正之峰面積積分計算單體百分率。

圖24展示DOM1h-131-511、DOM1h-131-202及DOM1h-131-206之蛋白酶穩定性資料。

圖25為說明DOM1h-131-202、DOM1h-131-206及DOM1h-131-511在37℃及50℃下在伯瑞坦-魯賓遜緩衝液中之14天穩定性資料的SEC。所有dAb之蛋白質濃度為1 mg/ml。使用SEC確定熱應力期間蛋白質中是否會發生任何變化及相

對於時間=0(T0)樣品溶液中所遺留之單體之量。

圖26A至I展示SEC迹線，其展示DOM1h-131-511(A至C)、DOM1h-131-202(D至F)及DOM1h-131-206(G至I)之熱應力(37℃及50℃)效應。亦展示給定時點下相對於T=0時溶液中所遺留之單體百分率。

圖27展示熱應力24小時、48小時及7天及14天時DOM1h-131-202、DOM1h-131-206及DOM1h-131-511之IEF分析。樣品已在37℃或50℃下在伯瑞坦-魯賓遜緩衝液中培養。

圖28為展示在50℃下將DOM1h-131-202、DOM1h-131-206及DOM1h-131-511培養14天之效應的TNFR-1 RBA。假定蛋白質濃度為1 mg/ml。亦展示不結合抗原之陰性對照dAb(VH模擬物)。

圖29說明在+4℃下在約100 mg/ml下將A：DOM1h-131-202，B：DOM1h-131-206及C：DOM1h-131-511在伯瑞坦-魯賓遜緩衝液中儲存7天之效應。在280 nm下監測UV。

圖30展示Pari E-flow及LC+中之DOM1h-131-202、DOM1h-131-206及DOM1h-131-511之噴霧器測試的資料。蛋白質濃度在任一伯瑞坦-魯賓遜緩衝液中為5 mg/ml。

圖31說明在以5 mg/ml存於伯瑞坦-魯賓遜緩衝液中之DOM1h-131-202、DOM1h-131-206及DOM1h-131-511噴霧期間，單體濃度之相對百分率之變化。

圖32展示伯瑞坦-魯賓遜緩衝液中之DOM1h-131-206及DOM1h-131-511自Pari LC+噴霧後之SEC迹線。

圖33展示經1小時噴霧過程期間以40 mg/ml存於PBS中之

DOM1h-131-206之SEC迹線。噴霧器杯與氣霧劑中之蛋白質對噴霧期間dAb可能會經歷之剪切應力及熱應力效應具有高抗性。

圖34展示三種主要蛋白質(DOM1h-131-206及DOM1h-131-511及DOM1h-131-202)各自之沈降速度曲線。所觀察到之較低濃度樣品DOM1h-131-206之雙峰為在此情況下由來自樣品池之樣品洩漏所致之偽跡。

圖35展示緩衝液及裝置對GSK 1995056A(DOM1h-131-511)之噴霧液滴尺寸之影響。

圖36為如由SEC所量測，在各裝置中噴霧後，由二聚體形成評估之GSK1995056A(DOM1h-131-511)之穩定性。

圖37展示Pari E-flow及LC+中GSK1922567A(202)、GSK1995057A(206)及GSK1995056A(511)之噴霧器測試。A)伯瑞坦-魯賓遜緩衝液中之測試，B)PEG1000/蔗糖緩衝液中之測試。

圖38描繪人類TNFR1受體結合檢定中之TNF-α劑量曲線。以四個複本測試各樣品。

圖39展示人類TNFR1受體結合檢定中GSK1922567A(DOM1h-131-202)、GSK1995057A(DOM1h-131-206)及GSK1995056A(DOM1h-131-511)之抑制。以四個複本測試各樣品。

圖40說明DOM15-26及DOM15-26-593 dAb在VEGF RBA中之效價。

圖41展示DMS1529(DOM15-26-593)及DMS1545(DOM15-

26-501)在以5 mg/mg單次快速靜脈內注射向大鼠投與後之藥物動力學。

圖42a展示確認單體性質之DMS1529 Fc融合物(DOM15-2-593 Fc融合物)之SEC-MALLs(尺寸排阻層析-多角雷射散射)分析。展示在折射率(亦即，濃度；虛線)及光散射(實線)方面顯示類似性質之兩個不同批次。用箭頭標記之線表示分子質量計算值。

圖42b展示確認單體性質之DMS1529 Fc融合物(DOM15-26-593 Fc融合物)之AUC(分析超速離心)分析。在三個不同濃度，即約0.2、0.5及1.0 mg/ml下在PBS緩衝液中測試一個批次之材料。沈降速率分析確認分子質量約80 kDa。

圖43展示DMS1529(DOM15-26-593)及DOM15-26-501之DSC迹線。

圖44為對兩個不同批次之材料進行10次冷凍-解凍循環之前及之後，DMS1529(DOM15-26-593)之VEGF結合ELISA。

圖45展示10次冷凍-解凍循環之前及之後，DOM15-26-593 SEC概況之一致性。

圖46說明DMS1529融合物(DOM15-26-593 Fc融合物)之加速穩定性研究的結果；結合ELISA在所示溫度下顯示培養7天後之活性。

圖47A展示在37℃下培養14及15天後，DMS1529(DOM15-26-593)在人類獼猴中之穩定性。

圖47B展示在37℃下培養14及15天後，DMS1529

(DOM15-26-593)在人類血清中之穩定性。

圖48展示DOM15-26及DOM15-26-593 dAb作為Fc融合物(相應DMS1564及1529)在VEGF RBA中之效價。

圖49說明DMS1529融合物(DOM15-26-593 FC融合物)對HUVEC細胞增生之抑制。

圖50為pDom33載體圖。

圖51a描繪結合血清白蛋白之dAb之胺基酸序列。

圖51b描繪結合血清白蛋白之dAb之核酸序列。

圖52A描繪DOM15-26-593-Fc融合物之胺基酸序列。

圖52B描繪抗體Fc之胺基酸序列。

圖52C描繪DOM15-26-593-Fc融合物之核酸序列。

序列表

<110> 英商多曼提斯有限公司

<120>多肽、抗體可變區域及拮抗劑

<130> D0058

<140> TW097121268

<141> 2008-06-06

<150> US 60/933,632
<151> 2007-06-06

<150> GB 0724331.4
<151> 2007-12-13

<160> 237

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 109
<212> DNA
<213>人工序列

<220>
<223> pDOM13

<400> 1
taatgttatt taaatcatta tcaaaattag caaccgcagc agcatttttt gcaggcgtgg 60
caacagcgtc gacacactgc aggaggcggc cgcagaaact gttgaacgt 109

<210> 2
<211> 119
<212> PRT
<213> 智人

<400> 2
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1   5   10   15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala His Glu
            20   25   30
Thr Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35   40   45
Ser His Ile Pro Pro Val Gly Gln Asp Pro Phe Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65   70   75   80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85   90   95
Ala Leu Leu Pro Lys Arg Gly Pro Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100   105   110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115

<210> 3
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3
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 Tyr Leu Asn
            20   25   30
Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35   40   45
Asn Phe Gly Ser Glu Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

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

<210> 4
<211> 116
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4

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

<210> 5
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 5

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

<210> 6
<211> 358
<212> DNA
<213> 智人

<400> 6

```
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc atggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttgcg catgagacga tggtgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacat attcccccgg ttggtcagga tccctttctac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acagcggtat attactgtgc gctgctttct 300
aagaggggggc cttggtttga ctactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagcg   358
```

<210> 7
<211> 358
<212> DNA
<213> 智人

<400> 7

```
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
```

tcctgtgcag cctccggatt cgcctttgcg catgagacga tggtgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacat attccccccgg ttggtcagga tccccttctac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
ctgcaaatga acagcctgcg agccgaggac acagcggtat attactgtgc gctgcttcct 300
aagagggggc cttggtttga ctactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagcg 358

<210> 8
<211> 358
<212> DNA
<213> 智人

<400> 8
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caactttgcg catgagacga tggtgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacat attccccccgg ttggtcagga tccccttctac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acagcggtat attactgtgc gctgcttcct 300
aagagggggc cttggtttga ctactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagcg 358

<210> 9
<211> 358
<212> DNA
<213> 智人

<400> 9
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttgcg catgagacga tggtgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacat attccccccgg ttggtcagga tccccttctac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgacg attccaagaa cacgctatat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acagcggtat attactgtgc gctgcttcct 300
aagagggggc cttggtttga ctactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagcg 358

<210> 10
<211> 358
<212> DNA
<213> 智人

<400> 10
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttgcg catgagacga tggtgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacat attccccccgg ttggtcagga tccccttctat 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
ctgcaaatga acaacctgcg cgccgaggac acagcggtat attactgtgc gctgcttcct 300
aagagggggc cttggtttga ctactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagcg 358

<210> 11
<211> 358
<212> DNA
<213> 智人

<400> 11
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttgcg catgagacga tggtgtgggt ccgccaggcc 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacat attccccccgg ctggtcagga tccccttctac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagag cacgctatat 240
ctgcaaatga acggcctgcg tgccgaggac acagcggtat attactgtgc gctgcttcct 300
aagagggggc cttggtttga ctactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagcg 358

<210> 12
<211> 358
<212> DNA
<213> 智人

<400> 12
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttgcg catgagacga tggtgtgggt ccgccaggct 120
cctgggaagg gtctagagtg ggtctcacat attccccccgg ctggtcagga tccccttctac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acagcggtat attactgtgc gctgcttcct 300
aagagggggc cttggtttga ctactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagcg 358

<210> 13
<211> 358
<212> DNA
<213> 智人

<400> 13
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttigcg catgagacga tggtgtgggt ccgccaggcc 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacat attccccccgg acggtcaaga tccctttctac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acagcggtat attactgtgc gctgcttcct 300
aagagggggc cttggttiga ctactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagcg 358

<210> 14
<211> 358
<212> DNA
<213> 智人

<400> 14
gaggtgcagc tgtgggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttigcg catgagacga tggtgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacat attccccccgg atggtcagga tccctttctac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acagcggtat attactgtgc gctgcttcct 300
aagagggggc cttggattga ctactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagcg 358

<210> 15
<211> 358
<212> DNA
<213> 智人

<400> 15
gaggtgcagc tgtcggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttigcg catgagacga tggtgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacat attccccccag atggtcagga tccctttctac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acagcggtat attactgtgc gctgcttcct 300
aatagggggc cttggttiga ctactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagcg 358

<210> 16
<211> 358
<212> DNA
<213> 智人

<400> 16
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttigcg catgagacga tggtgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacat attccccccgg atggtcagga tccctttctac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acagcggtat attactgtgc gctgcttcct 300
aagagggggc cttggttiga ctactggggt cagggaaccc aggtcaccgt ctcgagcg 358

<210> 17
<211> 358
<212> DNA
<213> 智人

<400> 17
gaggtgcggc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtacag cctccggatt caccttigcg catgagacga tggtgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacat attccccccgg atggtcagga tccctttctac 180
gcagactccg tgaagagccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
ctgcagatga acagcctgcg tgccgaggac acagcggtgt attactgtgc gctgcttcct 300
aagagagggc cttggttiga ctactggggt cagggaaccc aggtcaccgt ctcgagcg 358

<210> 18
<211> 358
<212> DNA
<213> 智人

<400> 18
gaggtgcggc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgaggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttigcg catgagacga tggtgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacat attccccccgg atagccagga tccctttctac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acagcggtat attactgtgg gctgcttcct 300
aagagggggc cttggttiga ctacaggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagcg 358

<210> 19

<211> 358
<212> DNA
<213> 智人

<400> 19
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccattgcg catgaaacga tggtgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacat attccccccgg ttggtcagga tccctttctac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acagcggtat attactgtgc gctgtttcct 300
aagagggggc cttggtttga ctaccggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagcg 358

<210> 20
<211> 358
<212> DNA
<213> 智人

<400> 20
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttigcg catgagacga tggtgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacat attcctccgg ttggtcagga tccctttctac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acagcggtat attactgtgc gcggctttcct 300
aagagggggc cttggtttga ctactggggt cagggaacct tggtcaccgt ctcgagcg 358

<210> 21
<211> 357
<212> DNA
<213> 智人

<400> 21
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttigcg catgagacga tggtgtgggt ccgccaggca 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacat attccccccgg atggtcagga tccctttctac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acagcggtat attactgtgc gctgtttcct 300
aagagggggc cttggtttga ctactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 22
<211> 357
<212> DNA
<213> 智人

<400> 22
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttigcg catgagacga tggtgtgggt ccgccgggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacat attccccccgg atggtcagga tccctttctac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acagcggtat attactgtgc gctgtttcct 300
aagagggggc cttggtttga ctactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 23
<211> 357
<212> DNA
<213> 智人

<400> 23
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag ccaccggatt caccttigcg catgagacga tggtgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaggg gtctagagtg ggtctcacat attccccccgg atggtcagga tccctttctac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acagcggtat attactgtgc gctgtttcct 300
aagagggggc cttggtttga ctactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 24
<211> 357
<212> DNA
<213> 智人

<400> 24
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ctggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttigcg catgagacga tggtgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaggg gtctagagtg ggtctcacat attcccicgg atggtcagga tccctttctac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acagcggtat attactgtgc gctgtttcct 300

aagaggggggc cttggttcga ctactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 25
<211> 357
<212> DNA
<213> 智人

<400> 25
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttgcg catgagacga tggtgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacat attccccccgg atggtcagga tccccttctac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acagcggtat attactgtgc gctgcttcct 300
aagaaggggc cttggtttga ctactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 26
<211> 357
<212> DNA
<213> 智人

<400> 26
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttgcg cgtgagacga tggtgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacat attccccccgg ttggtcagga tccccttctac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acagcggtat attactgtgc gctgcttcct 300
aagaggggggc cttggtttga ctactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 27
<211> 357
<212> DNA
<213> 智人

<400> 27
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttgcg cuagagacga tggtgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacat attccccccgg ttggtcagga tccccttctac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaagac acagcggtat attactgtgc gcggcttcct 300
aagaggggggc cttggtttga ctactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 28
<211> 357
<212> DNA
<213> 智人

<400> 28
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cttccggatt caccttttgcg catgagacga tggtgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacat attccccccgg ttggtcagga tccccttctac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acagcggtat attactgtgc gctgcttcct 300
aagaaggggc cttggtttga ctactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 29
<211> 357
<212> DNA
<213> 智人

<400> 29
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttgcg catgagacga tggtgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacat attccccccgg ctggtcagga tccccttctac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acagcggtat attactgtgc gcggcttcct 300
aagaggggggc cttggtttga ctactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 30
<211> 325
<212> DNA
<213> 智人

<400> 30
gacatcctga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac ctgaattlag actggtatca gcagaaacca 120

gggaaggccc ctaagctcct gatcaatctt ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatgtcg ctacgtacta ctgtcaaccg tcttttact tcccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acggg 325

<210> 31
<211> 325
<212> DNA
<213> 智人

<400> 31
gacatcctga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaatttt ggctccgagt tgcaaagtgg tgtcccatca 180
cgtttcagtg gcagcggata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttcg ctacgtacta ctgtcaaccg tcttttact tcccttatac gttcggccag 300
gggaccaagg tggaaatcaa acggg 325

<210> 32
<211> 325
<212> DNA
<213> 智人

<400> 32
gacatccaga cgacccagtc tccgtcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac cagaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaatttt ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccatct 180
cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttcg ctacgtacta ctgtcaaccg tcttttact tcccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acggg 325

<210> 33
<211> 325
<212> DNA
<213> 智人

<400> 33
gacatccagg tgacccagtc tccatccacc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaacttt ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttcg ctacgtacta ctgtcaaccg tcttttact tcccttatac gttcggccga 300
gggaccaagg tggaaatcaa acggg 325

<210> 34
<211> 325
<212> DNA
<213> 智人

<400> 34
gacatccaga tgacccagtc tccatcctta ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac cagaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaatttt ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggata cgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatatcg ctacgtacta ctgtcaaccg tcttttact tcccttatac gttggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa agggg 325

<210> 35
<211> 325
<212> DNA
<213> 智人

<400> 35
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtcggcat ctgaaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac cagaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaatttt ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggata tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagacttcg ctacgtacta ctgtcaaccg tcttttact tcccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acggg 325

<210> 36
<211> 325
<212> DNA
<213> 智人

<400> 36
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
gtcacttgcc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaatttt ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcagcct 240
gaagatttcg ctacgtacta ctgtcaaccg tcttttttact tcccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acggg 325

<210> 37
<211> 325
<212> DNA
<213> 智人

<400> 37
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac ctggatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaatttt ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccatcagcgg tctgcaacct 240
gaagatttcg ctacgtacta ctgtcaaccg tcttttttact tcccttatac gttcggccga 300
gggaccaggg tggaaatcaa acggg 325

<210> 38
<211> 325
<212> DNA
<213> 智人

<400> 38
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcagtttt ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttcg ctacgtacta ctgtcaaccg tcttttttact tcccttacac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acggg 325

<210> 39
<211> 325
<212> DNA
<213> 智人

<400> 39
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaaattt ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccatcagcaa tctgcaacct 240
gaagatttcg ctacgtacta ctgtcaaccg tcttttttact tcccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa atggg 325

<210> 40
<211> 325
<212> DNA
<213> 智人

<400> 40
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcatttat ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccacca 180
cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttcg ctacgtacta ctgtcaaccg tcttttttact tcccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acggg 325

<210> 41
<211> 325
<212> DNA
<213> 智人

<400> 41
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatatac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaatttt ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccacca 180
cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttcg ctacgtacta ctgtcaaccg tcttttttact tcccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acagg 325

<210> 42
<211> 325

<212> DNA
<213> 智人

<400> 42
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaatttt ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcgctctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattccg ctacgtacta ctgtcaaccg tcttttttact tcccatatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acagg 325

<210> 43
<211> 325
<212> DNA
<213> 智人

<400> 43
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcact 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaatttt ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatgtcg ctacgtacta ctgtcaaccg tcttttttact tcccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acggg 325

<210> 44
<211> 325
<212> DNA
<213> 智人

<400> 44
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaatttt ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagacttcg ctacgtacta ctgtcaaccg tcttttttact tcccatatac gtttggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acagg 325

<210> 45
<211> 325
<212> DNA
<213> 智人

<400> 45
gacatccaaa tggcccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttgg actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcagtttt ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattccg ctacgtacta ctgtcagccg tcttttttact tcccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acagg 325

<210> 46
<211> 325
<212> DNA
<213> 智人

<400> 46
gacatccaga tgacccagtc accatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggacatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaatttt ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttcg ctacgtacta ctgtcaaccg tcttttttact tcccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acggg 325

<210> 47
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 47
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcgt ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaatttt ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcacactca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttcg ctacgtacta ctgtcaaccg tcttttttact tcccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa actg 324

<210> 48
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 48
gacatccaga taacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaatttt ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttcg ctacgtacta ctgtcaaccg tcttttttact tcccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa accg 324

<210> 49
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 49
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaatttt ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttcg ctacgtacta ctgtcaaccg tcttttttact acccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acag 324

<210> 50
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 50
gacatccaga tgacacagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atctcttgcc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcagtttt ggttccgagt tgcaaagtgg tgttcctca 180
cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcagcct 240
gaagattccg ctacgtacta ctgtcaaccg tcttttttact acccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 51
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 51
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaatttt ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttcg ctacgtacta ctgtcaaccg tcttttttact acccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 52
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 52
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaatttt ggttccgagt tgcaaagtgg agtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattccg ctacgtacta ctgtcaaccg tcttttttact tcccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa tcgg 324

<210> 53
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 53
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat atgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcagtttt ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccatca 180

cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttcg gtacgtacta ctgtcaaccg tcttttttact tccccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 54
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 54
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgtc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaatttt ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttcg gtacgtacta ctgtcaaccg tcttttttact tccccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 55
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 55
gacatccaga tgacccagtc tccgtcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccttgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaattta ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttcg ctacgtacta ctgtcaaccg tcttttttact tccccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgt 324

<210> 56
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 56
gacatcctga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaggccc ctaagctcct gatcaatctt ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatgtcg ctacgtacta ctgtcaaccg tcttttttact tccccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 57
<211> 348
<212> DNA
<213> 智人

<400> 57
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttaag gcttatccga tgatgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcagag atttcgcctt cgggttctta tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaagatcct 300
cggaagtttg actactgggg tcagggaacc ctggtcaccg tctcgagc 348

<210> 58
<211> 348
<212> DNA
<213> 智人

<400> 58
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttaag gcttatccga tgatgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtccagagtg ggtctcagag atttcgcctt cgggttctta tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgtgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaagatcct 300
cggaagtttg actactgggg tcagggaacc ctggtcaccg tctcgagc 348

<210> 59
<211> 348
<212> DNA
<213> 智人

<400> 59

gaggtgcagc tgttggtgtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttaag gcttatccga tgatgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtccagagtg ggtctcagag atttcgcctt cgggttctta tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cgcgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgcagaggac accgcggtat attactgtgc gaaagatcct 300
cggaagttta actactgggg tcagggagcc ctggtcaccg tctcgagc 348

<210> 60
<211> 348
<212> DNA
<213> 智人

<400> 60
gaggtgcagc tgttggtgtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttaag gcttatccga tgatgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg gatctcagag atttcgcctt cgggttctta tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc aaaagatcct 300
cggaagttta actactgggg tcagggaacc ctggtcaccg tctcgagc 348

<210> 61
<211> 348
<212> DNA
<213> 智人

<400> 61
gaggtgcagc tgctggtgtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttaag gcttatccga tgatgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcagag atttcgcctt cgggttcata tacatactat 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaagatcct 300
cggaagttta aatactgggg tcagggaacc ctggtcaccg tctcgagc 348

<210> 62
<211> 348
<212> DNA
<213> 智人

<400> 62
gaggtgcagc tgttggtgtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttaag gcttatccga tgatgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcagag atttcgcctt cgggttctta tacatactac 180
gcggactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaatgatcct 300
cggaagttta actactgggg tcagggaacc ctggtcaccg tctcgagc 348

<210> 63
<211> 348
<212> DNA
<213> 智人

<400> 63
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacattttaag gcttatccga tgatgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcagag atttcgcctt cgggttctta tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acggcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaacgatcct 300
cggaagattg actactgggg tcagggaacc ctggtcaccg tctcgagc 348

<210> 64
<211> 348
<212> DNA
<213> 智人

<400> 64
gaggtgcagc tgttggtgtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttaag gcttatccga tgatgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcagag atttcgcctt cgggttctta tacatactac 180
gcatactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgca tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaagatcct 300
cggaagttag actactgggg tcagggaacc ctggtcaccg tctcgagc 348

<210> 65
<211> 348
<212> DNA

<213> 智人

<400> 65
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc caggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgctg cctccggatt caccttttaag gcttatccga tgatgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaaga gtctagagtg ggtctcagag atttcgcctt cgggttctta tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcacaatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaagatcct 300
cggaagattg actactgggg tcagggaacc ctggtcaccg tctcgagc 348

<210> 66
<211> 348
<212> DNA
<213> 智人

<400> 66
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggGtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttaag gcttatccga tgatgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcagag atttcgcctt cgggttctta tacatactac 180
gcagagtccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtac gaaagatcct 300
cggaagtttg actactgggg tcagggaacc ctggtcaccg tctcgagc 348

<210> 67
<211> 348
<212> DNA
<213> 智人

<400> 67
gaggtgcagt tgttggtgtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggGtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttaag gcttatccga tgatgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcagag atttcgcctt cgggttctta tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatt tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaagatcct 300
cggaagtttg actactgggg tcagggaacc ctggtcaccg tctcgagc 348

<210> 68
<211> 348
<212> DNA
<213> 智人

<400> 68
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggGtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttaag gcttatccga tgatgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcagag atttcgcctt cgggttctta tacatactac 180
gcaaactccg tgaaggGtcg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaagatcct 300
cggaagattg actactgggg tcagggaacc ctggtcaccg tctcgagc 348

<210> 69
<211> 348
<212> DNA
<213> 智人

<400> 69
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggGtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttaag gcttatccga tgatgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcagag atttcgcctt cgggttctta tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaagatcct 300
cggaagtctg actactgggg tcagggaacc ctggtcaccg tctcgagc 348

<210> 70
<211> 348
<212> DNA
<213> 智人

<400> 70
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggGtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttaag gcttatccga tgatgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcagag atctcgcctt cgggttctta tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaagatcct 300
cggaagattg actactgggg tcagggaacc ctggtcaccg tctcgagc 348

<210> 71
<211> 348
<212> DNA
<213> 智人

<400> 71
gaggtgcatc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttaag gcttatccga tgatgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcagag attcgccttt cgggttctta tacatactac 180
gcaaactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaagatcct 300
cggaagattg actactgggg tcagggaacc ctggtcaccg tctcgagc 348

<210> 72
<211> 348
<212> DNA
<213> 智人

<400> 72
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttaag gcttatccga tgatgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcagag attcgccttt cgggttctta tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaagatcct 300
cggaagttag actactgggg tcagggaacc ctggtcaccg tctcgagc 348

<210> 73
<211> 348
<212> DNA
<213> 智人

<400> 73
gaggtgcagc tgttggtgtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttaag gcttatccga tgatgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcagag attcgccttt cgggttctta tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtac gaaagatcct 300
cggaagtttg actactgggg tcagggaacc ctggtcaccg tctcgagc 348

<210> 74
<211> 348
<212> DNA
<213> 智人

<400> 74
gaggtgcagc tgttggtgtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttaag gcttatccga tgatgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtttcagag attcgccttt cgggttctta tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaagatcct 300
cggaagttag actactgggg tcagggaacc ctggtcaccg tctcgagc 348

<210> 75
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 75
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gtggattggt ccggagttaa gttggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatcat acgtccattt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag tatatgtttc agcctaggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcag acgg 324

<210> 76
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 76
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gtggattggt ccggagttaa gttggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagcgcct gatctatcat tcgtccattt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag tatatgtttg agcctaggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcag acag 324

<210> 77
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 77
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgtc gggcaagtca gtggattggt ccggagttaa gatggtacca gaagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatcat acgtccattt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag tatatgtttc agcctaggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcag acgg 324

<210> 78
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 78
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gtggattggt ccggagttaa gttggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagcacct gatctatcat acgtccattt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtagatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag tatatgtttc agcctaagac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcag atgg 324

<210> 79
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 79
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gtggattggt cctgagttaa gatggtacca gaagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatcat acgtccattt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactttca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag tatatgtttc agcctaggac gttcggccca 300
gggaccaagg tggaaattag acgg 324

<210> 80
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 80
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gtggattggt ccggagttaa gttggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatcat acgtccattt tgcgaagtgg ggtcccatct 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag tatatgtttc agcctaggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcag atgg 324

<210> 81
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 81
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gtggattggt ccggagttaa gttggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagcgcct gatctatcat acgtccattt tacagagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gcagattttg caacgtacta ctgtcaacag tatatgtttc agcctaggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcag acag 324

<210> 82
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 82
gacatccaga tgacccagtc cccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gtggattggt ccggagttaa gttggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatcat acgtccattt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag tatatgtttt ggcctaggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcag acaa 324

<210> 83
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 83
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtccgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gtggattggt ccggagttaa gttggtacca gcagaaacca 120
gggaaagctc ctaagctcct gatctatcat acgtccattt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaactt 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag tatatgtttc tgcctaggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcag aggg 324

<210> 84
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 84
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gtggattggt ccggagttaa gttggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagttcct gatctatcat acgtccattt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccatcaacag tctgcaacct 240
ggagattttg ctacgtacta ctgtcaacag tatatgtttc agcctaggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcag acgg 324

<210> 85
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 85
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gtggattggt ccggagttaa gttggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatcat acgtccattt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag tatatgtatc agcctaggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcag acag 324

<210> 86
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 86
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gtggattggt ccggagttaa gatggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatcat acgtccattt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag tatatgtttc agcctatgac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcag aggg 324

<210> 87
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 87
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gtggattggt ccggagttaa gatggtacca gaagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatcat acgtccattt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaagct 240
gaagattctg ctacgtacta ctgtcaacag tatatgtttc agcctaggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaaccag acgg 324

<210> 88
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 88
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgaaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gtggattggt ccggagttaa gttggtacca gcagaaacca 120
cggaaagccc ctaagctcct gatctatcat acgtccattt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcactg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag tatatgtttc agcctatgac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcag acgg 324

<210> 89
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 89
gacatcctga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gtggattggt ccggagttac gttggtacca gcataaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatcat acgtccattt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctct ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttcg ctacgtacta ctgtcaacag tatatgtttc agcctaggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcag atgg 324

<210> 90
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 90
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gtggattggt ccggagttaa gttggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc caaagctcct gatctatcat acgtccattt tgcaaggtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaggatttig ctacgtacta ctgtcaacag tatatgtttt ggcctaggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcag acag 324

<210> 91
<211> 300
<212> DNA
<213> 智人

<400> 91
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gtggattggt ccggagttac gttggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatcat acgtccattt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttig ctacgtacta ctgtcaacag tatatgtttc agcctatgac gttcggccaa 300

<210> 92
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Gas 前導序列

<400> 92
Met Leu Phe Lys Ser Leu Ser Lys Leu Ala Thr Ala Ala Ala Phe Phe
1 5 10 15
Ala Gly Val Ala Thr Ala
20

<210> 93
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基因 III 序列

<400> 93
Ala Ala Ala Glu Thr Val Glu Ser
1 5

<210> 94
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 94
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Arg Asn Ser Phe Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Thr Val Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gln
100 105

<210> 95
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 95
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Arg Asn Ser Pro Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Ser Ile Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 96
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 96
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 Arg Pro Ile Gly Thr Thr
20 25 30
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Trp Phe Gly Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ala Gly Thr His Pro Thr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 97
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 97
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

<210> 98
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 98

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

<210> 99
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 99

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

<210> 100
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 100

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

85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 101
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 101
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Trp Ile Asp Thr Gly
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asn Val Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Gly Ser Pro Thr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 102
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 102
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 Glu Ile Tyr Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asn Ala Ser His Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Ile Gly Asp Pro Val
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 103
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 103
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Thr Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Arg Leu Ser Val Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Asn Val Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 104
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 104
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Arg Asn Ser Gln Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Phe Ala Val Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 105
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 105
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Arg Asn Ser Pro Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Arg Val Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 106
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 106
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 His Ile Gly Leu Trp
20 25 30
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Arg Ser Ser Leu Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Lys Tyr Asn Leu Pro Tyr
85 90 95
Thr Ser Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 107
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 107
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Phe Arg His
20 25 30
Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

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

<210> 108
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 108

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

<210> 109
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 109

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

<210> 110
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 110

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

<210> 111
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 111
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 His Ile His Arg Glu
20 25 30
Leu Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Gln Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Lys Tyr Leu Pro Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 112
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 112
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 His Ile His Arg Glu
20 25 30
Leu Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Gln Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Tyr Arg Val Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 113
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 113
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Arg Arg
20 25 30
Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ala Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Arg Thr Ser Trp Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Ser Gln Trp Pro His
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 114
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 114
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 Lys Ile Tyr Lys Asn

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

<210> 115
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 115

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

<210> 116
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 116

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

<210> 117
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 117

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

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


<210> 118
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 118
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 Tyr Ile Gly Arg Tyr
            20                  25                  30
Leu Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
Tyr Asp Ser Ser Val Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Tyr Met Gln Pro Phe
                85                  90                  95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105


<210> 119
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 119
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 Trp Ile Gly Arg Tyr
            20                  25                  30
Leu Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
Tyr Asn Gly Ser Gln Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Tyr Leu Gln Pro Tyr
                85                  90                  95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105


<210> 120
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 120
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 Tyr Ile Gly Arg Tyr
            20                  25                  30
Leu Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
Tyr Asp Ser Ser Val Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Tyr Ser Ser Pro Tyr
                85                  90                  95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105


<210> 121
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人
```

<400> 121
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 Tyr Ile Ser Arg Gln
20 25 30
Leu Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Gly Ala Ser Val Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Tyr Ile Thr Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys Arg
100 105

<210> 122
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 122
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 Trp Ile His Arg Gln
20 25 30
Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Ala Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Phe Ser Lys Pro Ser
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 123
<211> 118
<212> PRT
<213> 智人

<400> 123
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Tyr Asp Tyr
20 25 30
Asn Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Thr Ile Thr His Thr Gly Gly Val Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Gln Asn Pro Ser Tyr Gln Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 124
<211> 120
<212> PRT
<213> 智人

<400> 124
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Leu Tyr
20 25 30
Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

<210> 125
<211> 123
<212> PRT
<213> 智人

<400> 125
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Lys Tyr
20 25 30
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Asp Phe Met Gly Pro His Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Gly Arg Thr Ser Met Leu Pro Met Lys Gly Lys Phe Asp Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 126
<211> 118
<212> PRT
<213> 智人

<400> 126
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe His Arg Tyr
20 25 30
Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Thr Ile Leu Pro Gly Gly Asp Val Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Gln Thr Pro Asp Tyr Met Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 127
<211> 117
<212> PRT
<213> 智人

<400> 127
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Trp Lys Tyr
20 25 30
Asn Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Thr Ile Leu Gly Glu Gly Asn Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Thr Met Asp Tyr Lys Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 128
<211> 118
<212> PRT
<213> 智人

<400> 128
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Glu Tyr
20 25 30
Asn Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Thr Ile Leu Pro His Gly Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Gln Asp Pro Leu Tyr Arg Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 129
<211> 118
<212> PRT
<213> 智人

<400> 129
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Arg Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Thr Ile Ile Ser Asn Gly Lys Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Gln Asp Trp Met Tyr Met Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 130
<211> 118
<212> PRT
<213> 智人

<400> 130
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Thr Tyr
20 25 30
Thr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Thr Ser Ser Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Val Asn Ser Leu Tyr Lys Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 131
<211> 119
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> VARIANT
<222> 119
<223> Xaa = 任何胺基酸

<400> 131
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Pro Thr
20 25 30
Asn Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Thr Ile Thr Gly Thr Gly Ala Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Gln Asn Ser Arg Tyr Arg Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser Xaa
115

<210> 132
<211> 117
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> VARIANT
<222> 117
<223> Xaa = 任何胺基酸

<400> 132
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Trp Pro Tyr
20 25 30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Thr Ile Ser Pro Phe Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Gly Gly Lys Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser Xaa
115

<210> 133
<211> 123
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> VARIANT
<222> 123
<223> Xaa = 任何胺基酸

<400> 133

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

<210> 134
<211> 121
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> VARIANT
<222> 121
<223> Xaa = 任何胺基酸

<400> 134

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

<210> 135
<211> 118
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> VARIANT
<222> 118
<223> Xaa = 任何胺基酸

<400> 135

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

<210> 136
<211> 119
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> VARIANT
<222> 119
<223> Xaa = 任何胺基酸

<400> 136
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Trp Pro Tyr
20 25 30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Thr Ile Ser Pro Phe Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Lys Thr Gly Pro Ser Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser Xaa
115

<210> 137
<211> 118
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> VARIANT
<222> 118
<223> Xaa = 任何胺基酸

<400> 137
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Trp Pro Tyr
20 25 30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Thr Ile Ser Pro Phe Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Lys Leu Ser Asn Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser Xaa
115

<210> 138
<211> 119
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> VARIANT
<222> 119
<223> Xaa = 任何胺基酸

<400> 138
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Trp Pro Tyr
20 25 30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

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

<210> 139
<211> 119
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> VARIANT
<222> 119
<223> Xaa = 任何胺基酸

<400> 139

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

<210> 140
<211> 121
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> VARIANT
<222> 121
<223> Xaa = 任何胺基酸

<400> 140

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

<210> 141
<211> 121
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> VARIANT
<222> 121
<223> Xaa = 任何胺基酸

<400> 141
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Lys Asp Tyr
20 25 30
Asp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Met Ile Ser Ser Ser Gly Leu Trp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Gly Phe Arg Leu Phe Pro Arg Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Xaa
115 120

<210> 142
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 142
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Pro Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Ser Val Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 143
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 143
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Arg Ala Ser Pro Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Arg Ile Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 144
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 144

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

<210> 145
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

```
<400> 145
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1               5                  10                  15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Tyr His
            20                  25                  30
Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
Tyr Lys Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
    50                  55                  60
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65                  70                  75                  80
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Arg Lys Val Pro Arg Thr
                85                  90                  95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 146
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

```
<400> 146
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1               5                  10                  15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Arg Arg Tyr
            20                  25                  30
Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
Tyr Gln Ala Ser Val Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Leu Tyr Pro Pro Ile
                85                  90                  95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 147
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

```
<400> 147
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1               5                  10                  15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Asn Trp
            20                  25                  30
Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
Tyr Arg Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
```

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

<210> 148
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 148
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Leu Trp His
20 25 30
Leu Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr His Ala Ser Leu Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ala Val Tyr Pro Lys
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 149
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 149
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Phe Arg Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr His Ala Ser His Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Leu Leu Tyr Pro Lys
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 150
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 150
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Phe Tyr His
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Pro Ala Ser Lys Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ala Arg Trp Pro Arg
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 151
<211> 108

<212> PRT
<213> 智人

<400> 151
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ile Trp His
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Arg Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Ala Arg Val Pro Arg
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 152
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 152
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Arg Tyr
20 25 30
Leu Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Val Gly Tyr Pro Arg
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 153
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 153
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Leu Lys Tyr
20 25 30
Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asn Ala Ser His Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Thr Tyr Tyr Pro Ile
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 154
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 154
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Leu Arg Tyr
20 25 30
Leu Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

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

<210> 155
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 155

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

<210> 156
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 156

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

<210> 157
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 157

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

<210> 158
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 158
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Arg Arg Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Leu Phe Tyr Pro Lys
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 159
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 159
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ile Lys His
20 25 30
Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Gly Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ala Arg Trp Pro Gln
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 160
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 160
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Tyr His
20 25 30
Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Arg Lys Val Pro Arg
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 161
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 161
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

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

<210> 162
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 162

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

<210> 163
<211> 116
<212> PRT
<213> 智人

<400> 163

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

<210> 164
<211> 120
<212> PRT
<213> 智人

<400> 164

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Gly Arg Asp His Asn Tyr Ser Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 165
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 165
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatcgg aattccttit tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaaccc 240
gaagatttig ctacgtacta ctgtcaacag acgtatactg ttcctcctac gtttggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acag 324

<210> 166
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 166
gacatccaga tgacccagtc tccaccctcc ctgtccgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatcgg aattcccctt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttig ctacgtacta ctgtcaacag acttattcga tttcctcctac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 167
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 167
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtcg tccgattggg acgacgttaa gttggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctggttt ggttcccggt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttig ctacgtacta ctgtgcgcag gctgggacgc atcctacgac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 168
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 168
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtaa gtatattggt tcgcagttaa attggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcgcttgg gcgtccgttt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttig ctacgtacta ctgtcgtcag ggtgctgcgt cgcctcggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 169
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 169
gacattcaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gtttatttat cggtatttat cgtggtatca gcagaaacca 120
gggaaaagcc ctaagctcct gatctataat gcgtcctatt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttig ctacgtacta ctgtcaacag catgctcatt tgcctcgtac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 170
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 170
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gtggattggg tctcagttat cttggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcatgtgg cgttcctcgt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttig ctacgtacta ctgtgctcag ggtgcggcgt tgcctaggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 171
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 171
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gaagattgct acttatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatagg tcttcctctt tgcaaagcgc ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagtt ttcacactca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag acgtatgctg ttcctcctac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 172
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 172
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gtggattgat actgggttag cgtggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaggctcct gatctataat gtgtccaggt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttig ctacgtacta ctgtcaacag tattggggta gtcctacgac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 173
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 173
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggagatttat tcgtggttag cgtggtacca gcagagacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctataat gcttcccatt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttig ctacgtacta ctgtcaacag gtgattggtg atcctgttac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 174
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 174
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctacgctcct gatctatcgg ttgtccgtgt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttig ctacgtacta ctgtcaacag acttataatg ttcctcctac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 175
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 175
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatctaa attggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatagg aatttcccag tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag acttttgcgg ttcctcctac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggagatcaa acgg 324

<210> 176
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 176
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatcgg aattcccctt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag acgtataggg tgcctcctac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 177
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 177
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gcatattggg ttgtggttac attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatagg tcttcctttgt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag aagtataatt tgccttatac gtccggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 178
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 178
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcatttttt cggcatttaa agtggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgcg gcatcccgtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag gttgcgctgt atcctaagac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 179
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 179
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattatt aagcatttaa agtggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatggt gcatcccggt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag gggggctcggt ggcctcagac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 180
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 180
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcatttat tatcatttaa agtggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctataag gcatccacgt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag gttcggaagg tgcctcggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 181
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 181
gacatccaga cgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60

atcactlgcc gggcaagtca gtatattggt aggtatttac gttggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgat tcttccgtgt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag cgttatcgta tgccttatac gttcggccaa 300
gggaccaggg tagaaatcaa acgg 324

<210> 182
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 182
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gcatattcat agggagttaa ggtggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatcag gcgtcccgtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag aagtatctgc ctccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 183
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 183
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gcatattcat agggagttaa ggtggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatcag gcgtcccgtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag cgttataggg tgccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 184
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 184
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagtattggg cggaggttaa agtggtacca gcagaaacca 120
ggggcagccc ctaggctcct gatctatcgt acgtcctggt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag acgtcgcagt ggcctcatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 185
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 185
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gaagatttat aagaatttac gttggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctataat tcttccattt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag aggtatctgt cgccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 186
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 186
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gaagatttat aataatttaa ggtggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctataat actttccatt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag cgatggcgtg cgccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 187
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 187
gacattcaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gtggatttat aagtcgttag ggtggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatcag tcttctttgt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag tatcatcaga tgcctcggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 188
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 188
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctatctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gtggatttat aggcatttaa ggtggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgat gcgtccaggt tgcaaagtgg ggtcccaaca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag actcataatc ctcctaagac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 189
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 189
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gtatattggt aggtatttac gttggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgat tcttccgtgt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag aggtatatgc agcctttac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 190
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 190
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtccgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gtggattggt cggtatttac ggtggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctataat gggtcccagt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag cggtatcttc agccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 191
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 191
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gtatattggt aggtatttac gttggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgat tcttccgtgt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag cgttatcttt cgccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa gcgg 324

<210> 192
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 192
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gtatatttcg cgtcagttaa ggtggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaggctcct gatctatggg gcgtccgttt tgcaaagcgg gatcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag aggtatatta ctccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaagtcaa acgg 324

<210> 193

<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 193
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gtggattcat aggcagttaa agtggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctattat gcttccattt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag acgttttcta gcctttctac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 194
<211> 354
<212> DNA
<213> 智人

<400> 194
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggGtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttat gattataata tgtcttgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcaact attacgcata cgggtggggt tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacagaat 300
cctcttatc agttgactа ctggggtcag ggaaccctgg tcaccgtctc gagc 354

<210> 195
<211> 360
<212> DNA
<213> 智人

<400> 195
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggGtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttTgat ctttatgata tgtcgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcatcg attgttaatt cgggtgttag gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacttaat 300
cagagttatc attgggattt tgactactgg ggtcagggaa ccctggtcac cgtctcgagc 360

<210> 196
<211> 369
<212> DNA
<213> 智人

<400> 196
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggGtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttcg aagtattgga tgtcgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcatct attgatttta tgggtccgca tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaagggagg 300
acgtcgatgt tgccgatgaa ggggaagttt gactactggg gtcagggaac cctggtcacc 360
gtctcgagc 369

<210> 197
<211> 354
<212> DNA
<213> 智人

<400> 197
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggGtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttTcat cgttattcga tgtcttgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcaacg attttgcctg gtggtgatgt tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacagacg 300
cctgattata tgttTgacta ctggggtcag ggaaccctgg tcaccgtctc gagc 354

<210> 198
<211> 351
<212> DNA
<213> 智人

<400> 198
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggGtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttgg aagtataata tggcgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcaact attcttggtg agggtaataa tacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaaacgatg 300
gattataagt ttgactactg gggtcaggga accctggtca ccgtctcgag c 351

<210> 199
<211> 354
<212> DNA
<213> 智人

<400> 199
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtacag cctccggatt caccttttgat gagtataata tgtcttgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcaacg attctgccgc atggtgatcg gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacaggat 300
cctttgtata ggtttgacta ctggggtcag ggaaccctgg tcaccgtctc gagc 354

<210> 200
<211> 354
<212> DNA
<213> 智人

<400> 200
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttcg gattatcgga tgagttgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcaacg attatttcga atggtaagtt tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacaggat 300
tggatgtata tgtttgacta ctggggtcag ggaaccctgg tcaccgtctc gagc 354

<210> 201
<211> 354
<212> DNA
<213> 智人

<400> 201
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttcgg acgtatacta tggcttgggt ccgccaggcc 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcatcg attactagta gtggttcttc tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaagtgaat 300
tctttgtata agtttgacta ctggggtcag ggaaccctgg tcaccgtctc gagc 354

<210> 202
<211> 355
<212> DNA
<213> 智人

<400> 202
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttcgg ccgactaata tgtcgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcaact attactggta ctggtgctgc gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacagaat 300
tctcgttata ggtttgacta ctggggtcag ggaaccctgg tcaccgtctc gagcg 355

<210> 203
<211> 349
<212> DNA
<213> 智人

<400> 203
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttgg ccgtatacga tgagttgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcaacg atttcgccgt ttggttcgac tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaaggggggg 300
aaggattttg actactgggg tcagggaacc ctggtcaccg tctcgagcg 349

<210> 204
<211> 367
<212> DNA
<213> 智人

<400> 204

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttgg ccgtatacga tgagttgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcaacg attcgccgt ttggttcgac tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaaagtgat 300
gttcttaaga cgggtctgga tggttttgac tactggggtc agggaaccct ggtcaccgtc 360
tcgagcg 367

<210> 205
<211> 361
<212> DNA
<213> 智人

<400> 205
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttatg gcgtatcaga tggcttgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcaact attcatcaga cgggtttttc tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaagtgcgt 300
tctatgcgtc cttataagtt tgactactgg ggtcagggaa ccctggtcac cgtctcgagc 360
g 361

<210> 206
<211> 352
<212> DNA
<213> 智人

<400> 206
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttgg ccgtatacga tgagttgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcaacg atttcgccgt ttggttcgac tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaaggtaat 300
cttgagccgt ttgactactg gggtcaggga accctggtca ccgtctcgag cg 352

<210> 207
<211> 355
<212> DNA
<213> 智人

<400> 207
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttgg ccgtatacga tgagttgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcaacg atttcgccgt ttggttcgac tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaaaagacg 300
ggtccgtcgt cgtttgacta ctggggtcag ggaaccctgg tcaccgtctc gagcg 355

<210> 208
<211> 352
<212> DNA
<213> 智人

<400> 208
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggt ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttgg ccgtatacga tgagttgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcaacg atttcgccgt ttggttcgac tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaaaagctt 300
agtaatggtt ttgactactg gggtcaggga accctggtca ccgtctcgag cg 352

<210> 209
<211> 355
<212> DNA
<213> 智人

<400> 209
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttgg ccgtatacga tgagttgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcaacg atttcgccgt ttggttcgac tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaagtggtt 300
aaggataata cgtttgacta ctgggggtcag ggaaccctgg tcaccgtctc gagcg 355

<210> 210

<211> 355
<212> DNA
<213> 智人

<400> 210
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttgg ccgtatacga tgagttgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcaacg atttcgccgt ttggttcgac tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatt tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaaaatact 300
gggggtaagc agtttgacta ctgggggtcag ggaaccctgg tcaccgtctc gagcg 355

<210> 211
<211> 361
<212> DNA
<213> 智人

<400> 211
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttgg ccgtatacga tgagttgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcaacg atttcgccgt ttggttcgac tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaaaggact 300
gagaataggg gggtttcttt tgactactgg ggtcagggaa ccctggtcac cgtctcgagc 360
g 361

<210> 212
<211> 361
<212> DNA
<213> 智人

<400> 212
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttaag gattatgata tgacttgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcaatg atttcttcgt cgggtctttg gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaaggtttt 300
aggctgtttc ttcggacttt tgactactgg ggtcagggaa ccctggtcac cgtctcgagc 360
g 361

<210> 213
<211> 343
<212> PRT
<213> 智人

<400> 213
Glu Val Gln Leu Leu Val Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1   5   10   15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Lys Ala Tyr
            20   25   30
Pro Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35   40   45
Ser Glu Ile Ser Pro Ser Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ile Leu Tyr
65   70   75   80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85   90   95
Ala Lys Asp Pro Arg Lys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100   105   110
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
        115   120   125
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
    130   135   140
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
145   150   155   160
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
                165   170   175
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
            180   185   190
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
        195   200   205
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
    210   215   220
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

```
225                 230                 235                 240
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
                245                 250                 255
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
            260                 265                 270
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
        275                 280                 285
Thr Ile Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
    290                 295                 300
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
305                 310                 315                 320
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
                325                 330                 335
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            340
```

<210> 214
<211> 225
<212> PRT
<213> 智人

<400> 214

```
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 1               5                  10                  15
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
            20                  25                  30
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
        35                  40                  45
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
    50                  55                  60
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
65                  70                  75                  80
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
                85                  90                  95
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
            100                 105                 110
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
        115                 120                 125
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
    130                 135                 140
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
145                 150                 155                 160
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
                165                 170                 175
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
            180                 185                 190
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
        195                 200                 205
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
    210                 215                 220
Lys
225
```

<210> 215
<211> 1029
<212> DNA
<213> 智人

<400> 215

```
gaggtgcagc tgttggtgtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggGtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttTaag gcttatccga tgatgtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtttcagag atttcgcctt cgggttctta tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaagatcct 300
cggaagttag actactgggg tcagggaacc ctggtcaccg tctcgagcgc tagcacccac 360
accgccccc cctgccctgc ccccgagctg ctgggcggac ctagcgtgtt cctgttcccc 420
cccaagccta aggacaccct gatgatcagc aggacccccg aagtgacctg cgtggtggtg 480
gatgtgagcc acgaggaccc tgaagtgaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaagtg 540
cacaacgcca agaccaagcc cagagaggag cagtacaaca gcacctaccg cgtggtgtct 600
gtgctgaccg tgctgcacca ggattggctg aacggcaagg agtacaagtg caaagtgagc 660
aacaaggccc tgcctgcccc tatcgagaaa accatcagca aggccaaggg ccagcctaga 720
gagccccagg tctacaccct gcctcccctcc agagatgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc 780
ctgacctgtc tggtgaaggg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac 840
```

ggccagcccg agaacaacta caagaccacc ccccctgtgc tggacagcga tggcagcttc 900
ttcctgtact ccaagctgac cgtggacaag agcagatggc agcagggcaa cgtgttcagc 960
tgcagcgtga tgcacgaggc cctgcacaat cactacaccc agaagagtct gagcctgtcc 1020
cctggcaag 1029

<210> 216
<211> 357
<212> DNA
<213> 智人

<400> 216
gaggttcaat tgttggaatc cggtggtgga ttggttcaac ctggtggttc tttgagattg 60
tcctgtgctg cttccggttt tactttcgct cacgagacta tggttgggt tagacaggct 120
ccaggtaaag gattggaatg ggtttcccac attccaccag atggtcaaga tccattctac 180
gctgactccg ttaagggaag attcactatc tccagagaca actccaagaa cactttgtac 240
ttgcagatga actccttgag agctgaggat actgctgttt accactgtgc tttgttgcca 300
aagagaggac cttggtttga ttactggggа cagggaactt tggttactgt ttcttcc 357

<210> 217
<211> 119
<212> PRT
<213> 智人

<400> 217
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala His Glu
20 25 30
Thr Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser His Ile Pro Pro Asp Gly Gln Asp Pro Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr His Cys
85 90 95
Ala Leu Leu Pro Lys Arg Gly Pro Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 218
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 一致序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)...(6)
<223> n = t 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)...(9)
<223> n = a 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)...(10)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)...(18)
<223> n = a 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)...(21)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)...(24)
<223> n = t 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (27)...(27)
<223> n = t 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)...(30)
<223> n = a 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)...(36)
<223> n = t 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)...(39)
<223> n = a 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)...(45)
<223> n = t 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (48)...(48)
<223> n = t 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (51)...(51)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)...(52)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)...(55)
<223> n = a 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (57)...(57)
<223> n = a 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (58)...(58)
<223> n = t 或 c

<220>

<221> misc_feature
<222> (60)...(60)
<223> n = g 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (69)...(69)
<223> n = t 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (72)...(72)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (78)...(78)
<223> n = t 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (81)...(81)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (84)...(84)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (87)...(87)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (90)...(90)
<223> n = t 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (93)...(93)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (99)...(99)
<223> n = t 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (105)...(105)
<223> n = t 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (111)...(111)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (112)...(112)
<223> n = a 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (114)...(114)
<223> n = a 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (120)...(120)
<223> n = t 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (126)...(126)
<223> n = t 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (129)...(129)
<223> n = a 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (132)...(132)
<223> n = a 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (133)...(133)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (135)...(135)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (138)...(138)
<223> n = a 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (144)...(144)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (147)...(147)
<223> n = c 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (150)...(150)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (156)...(156)
<223> n = a 或 c

<220>

<221> misc_feature
<222> (159)...(159)
<223> n = a 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (168)...(168)
<223> n = a 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (174)...(174)
<223> n = a 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (183)...(183)
<223> n = t 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (192)...(192)
<223> n = t 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (198)...(198)
<223> n = a 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (199)...(199)
<223> n = a 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (201)...(201)
<223> n = a 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (207)...(207)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (214)...(214)
<223> n = a 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (216)...(216)
<223> n = a 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (222)...(222)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (234)...(234)
<223> n = t 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (235)...(235)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (237)...(237)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (240)...(240)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (241)...(241)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (246)...(246)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (253)...(253)
<223> n = t 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (254)...(254)
<223> n = c 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (256)...(256)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (259)...(259)
<223> n = a 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (261)...(261)
<223> n = a 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (264)...(264)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (270)...(270)
<223> n = t 或 c

<220>

<221> misc_feature
<222> (273)...(273)
<223> n = t 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (276)...(276)
<223> n = t 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (279)...(279)
<223> n = t 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (282)...(282)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (291)...(291)
<223> n = t 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (292)...(292)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (295)...(295)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (297)...(297)
<223> n = g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (300)...(300)
<223> n = a 或 t

<221> misc_feature
<222> (306)...(306)
<223> n = a 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (309)...(309)
<223> n = a 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (321)...(321)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (330)...(330)
<223> n = a 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (339)...(339)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (340)...(340)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (345)...(345)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (348)...(348)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (351)...(351)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (354)...(354)
<223> n = t 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (355)...(355)
<223> n = t 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (356)...(356)
<223> n = c 或 g

<400> 218
gaggtncann tgttggantc nggnggnggn ttggtncanc ctggnggntc nntgngnntn 60
tcctgtgcng cntccggntt nacnttngcn cangagacna tggtntgggt nngncaggcn 120
ccaggnaang gnntngantg ggtntcncan attccnccng atggtcanga tccnttctac 180
gcngactccg tnaagggnng nttcacnatc tccngngaca antccaagaa cacnntntan 240
ntgcanatga acnncntgng ngcngaggan acngcngtnt ancactgtgc nntgntnccn 300
aagagnggnc cttggtttga ntactggggn cagggaacnn tggtnacngt ntcnnnc 357

<210> 219
<211> 366
<212> DNA
<213> 智人

<400> 219
gagaaaagag aggttcaatt gcttgaatct ggaggaggtt tggtccagcc aggagggtcc 60
cttcgactaa gttgtgctgc cagtgggttt acgtttgctc atgaaactat ggtatgggtc 120
cgacaggcac ctggtaaagg tcttgaatgg gtttcacata tccctccaga cggtcaagac 180
ccatttttacg ctgattccgt gaaaggcaga tttacaattt cacgagataa ttctaaaaac 240
accttgtact tacaaatgaa ctcattgaga gctgaggaca ctgcagttta tcactgcgct 300
ttactaccaa aacgtggacc ttggtttgat tattggggcc aaggtacgtt agtgactgtt 360
agttct 366

<210> 220
<211> 122
<212> PRT
<213> 智人

<400> 220
Glu Lys Arg Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
1 5 10 15
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
20 25 30
Ala His Glu Thr Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Ser His Ile Pro Pro Asp Gly Gln Asp Pro Phe Tyr Ala
50 55 60
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
65 70 75 80
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95
Tyr His Cys Ala Leu Leu Pro Lys Arg Gly Pro Trp Phe Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 221
<211> 366
<212> DNA
<213> 馬斯德畢赤酵母

<400> 221
gagaaaagag aggttcaatt gcttgaatct ggaggaggtt tggtccagcc aggagggtcc 60
cttcgactaa gttgtgctgc cagtgggttt acgtttgctc atgaaactat ggtatgggtc 120
cgacaggcac ctggtaaagg tcttgaatgg gtttcacata tccctccaga cggtcaagac 180
ccattttacg ctgattccgt gaaaggcaga tttacaattt cacgagataa ttctaaaaac 240
accttgtact tacaaatgaa ctcattgaga gctgaggaca ctgcagttta tcactgcgct 300
ttactaccaa aacgtggacc ttggtttgat tattggggcc aaggtacgtt agtgactgtt 360
agttct 366

<210> 222
<211> 358
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 一致序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)...(6)
<223> n = g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)...(9)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)...(10)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)...(13)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)...(15)
<223> n = g 或 t

<220>
<221> misc_feature

<222> (18)...(18)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)...(24)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)...(30)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)...(36)
<223> n = a 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (42)...(42)
<223> n = t 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)...(45)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (54)...(54)
<223> n = g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (57)...(57)
<223> n = t 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (60)...(60)
<223> n = c 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (61)...(61)
<223> n = t 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (62)...(62)
<223> n = c 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (63)...(63)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (69)...(69)
<223> n = a 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (73)...(73)
<223> n = t 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (74)...(74)
<223> n = c 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (75)...(75)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (78)...(78)
<223> n = a 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (81)...(81)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (84)...(84)
<223> n = c 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (90)...(90)
<223> n = g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (96)...(96)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (99)...(99)
<223> n = g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (105)...(105)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (114)...(114)
<223> n = c 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (123)...(123)
<223> n = a 或 t

<220>
<221> misc_feature

<222> (126)...(126)
<223> n = g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (129)...(129)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (135)...(135)
<223> n = a 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (138)...(138)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (144)...(144)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (153)...(153)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (156)...(156)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (159)...(159)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (162)...(162)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (168)...(168)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (171)...(171)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (174)...(174)
<223> n = c 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (177)...(177)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (183)...(183)
<223> n = a 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (186)...(186)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (195)...(195)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (199)...(199)
<223> n = c 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (201)...(201)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (204)...(204)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (207)...(207)
<223> n = c 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (210)...(210)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (213)...(213)
<223> n = c 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (216)...(216)
<223> n = c 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (219)...(219)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (225)...(225)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (228)...(228)

<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (234)...(234)
<223> n = g 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (235)...(235)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (237)...(237)
<223> n = a 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (240)...(240)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (241)...(241)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (243)...(243)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (253)...(253)
<223> n = a 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (254)...(254)
<223> n = g 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (255)...(255)
<223> n = c 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (256)...(256)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (259)...(259)
<223> n = c 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (261)...(261)
<223> n = t 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (264)...(264)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (273)...(273)
<223> n = a 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (276)...(276)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (279)...(279)
<223> n = a 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (288)...(288)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (291)...(291)
<223> n = g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (292)...(292)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (294)...(294)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (297)...(297)
<223> n = t 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (300)...(300)
<223> n = t 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (303)...(303)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (304)...(304)
<223> n = a 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (306)...(306)

<223> n = g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (309)...(309)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (321)...(321)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (324)...(324)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (330)...(330)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (333)...(333)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (336)...(336)
<223> n = a 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (339)...(339)
<223> n = c 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (340)...(340)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (342)...(342)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (345)...(345)
<223> n = c 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (348)...(348)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (351)...(351)
<223> n = c 或空白

<220>
<221> misc_feature
<222> (353)...(353)
<223> n = c 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (355)...(355)
<223> n = a 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (356)...(356)
<223> n = g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (358)...(358)
<223> n = 空白或 t

<400> 222
gaggtncann tgntngantc tggnggaggn ttggtncagc cnggngggtc cctncgnctn 60
nnntgtgcng ccnnnggntt nacntttgcn catganacna tggtntgggt ccgncaggca 120
ccnggnaang gtctngantg ggtntcacat atnccnccng anggtcanga nccnttntac 180
gcngantccg tgaanggcng nttnacnatn tcncgngana attcnaanaa cacnntntan 240
ntncaaatga acnnnntgng ngcngaggac acngcngtnt atcactgngc nntnctnccn 300
aannggggnc cttggtttga ntantggggn canggnacnn tngtnacngt ntngnncn 358

<210> 223
<211> 357
<212> DNA
<213> 智人

<400> 223
gaagtgcagc ttcttgaaag tggtggaggg ctagtgcagc cagggggatc tttaagatta 60
tcatgcgctg ccagtggatt tacttttgct cacgagacga tggtctgggt gagacaagct 120
cctggaaaag gttagagtg ggtttctcac attccacctg atggtcaaga tcctttctac 180
gcagattccg tcaaaggaag atttactatc tccagagata atagtaaaaa cactttgtac 240
ctacagatga actcacttag agccgaagat accgctgtgt accactgcgc cttgttgcca 300
aagagaggtc cttggttcga ttactggggt cagggtactc tggttacagt ctcatct 357

<210> 224
<211> 119
<212> PRT
<213> 智人

<400> 224
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1   5   10   15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala His Glu
            20   25   30
Thr Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35   40   45
Ser His Ile Pro Pro Asp Gly Gln Asp Pro Phe Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65   70   75   80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr His Cys
                85   90   95
Ala Leu Leu Pro Lys Arg Gly Pro Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100   105   110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115

<210> 225
<211> 357
<212> DNA
<213> 馬斯德畢赤酵母

<400> 225
gaagtgcagc ttcttgaaag tggtggaggg ctagtgcagc cagggggatc tttaagatta 60
tcatgcgctg ccagtggatt tacttttgct cacgagacga tggtctgggt gagacaagct 120
cctggaaaag gtttagagtg ggtttctcac attccacctg atggtcaaga tcctttctac 180
gcagattccg tcaaaggaag atttactatc tccagagata atagtaaaaa cactttgtac 240
ctacagatga actcacttag agccgaagat accgctgtgt accactgcgc cttgttgcca 300
aagagaggtc cttggttcga ttactggggt cagggtactc tggttacagt ctcatct 357

<210> 226
<211> 358
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 一致序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)...(3)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)...(12)
<223> n = g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)...(13)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)...(15)
<223> n = g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)...(18)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)...(19)
<223> n = t 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)...(20)
<223> n = c 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)...(24)
<223> n = g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)...(30)
<223> n = c 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)...(31)

<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (33)...(33)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)...(36)
<223> n = a 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (42)...(42)
<223> n = t 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (48)...(48)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (51)...(51)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)...(52)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (54)...(54)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)...(55)
<223> n = c 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (57)...(57)
<223> n = t 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (58)...(58)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (60)...(60)
<223> n = c 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (63)...(63)
<223> n = c 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (66)...(66)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (69)...(69)
<223> n = a 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (73)...(73)
<223> n = t 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (74)...(74)
<223> n = c 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (75)...(75)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (81)...(81)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (84)...(84)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (90)...(90)
<223> n = g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (93)...(93)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (105)...(105)
<223> n = g 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (111)...(111)
<223> n = c 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (112)...(112)
<223> n = c 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (114)...(114)
<223> n = c 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (117)...(117)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (120)...(120)
<223> n = a 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (123)...(123)
<223> n = a 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (126)...(126)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (129)...(129)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (133)...(133)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (144)...(144)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (147)...(147)
<223> n = a 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (150)...(150)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (156)...(156)
<223> n = c 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (159)...(159)
<223> n = g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (168)...(168)
<223> n = g 或 a

<220>

<221> misc_feature
<222> (174)...(174)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (186)...(186)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (192)...(192)
<223> n = g 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (195)...(195)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (198)...(198)
<223> n = c 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (199)...(199)
<223> n = c 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (201)...(201)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (204)...(204)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (207)...(207)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (214)...(214)
<223> n = c 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (216)...(216)
<223> n = c 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (219)...(219)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature

<222> (223)...(223)
<223> n = t 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (224)...(224)
<223> n = c 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (225)...(225)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (228)...(228)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (234)...(234)
<223> n = g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (235)...(235)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (237)...(237)
<223> n = a 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (240)...(240)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (243)...(243)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (246)...(246)
<223> n = a 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (253)...(253)
<223> n = a 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (254)...(254)
<223> n = g 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (255)...(255)
<223> n = c 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (258)...(258)
<223> n = g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (259)...(259)
<223> n = c 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (261)...(261)
<223> n = t 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (267)...(267)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (270)...(270)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (273)...(273)
<223> n = a 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (276)...(276)
<223> n = g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (279)...(279)
<223> n = a 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (282)...(282)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (288)...(288)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (291)...(291)
<223> n = g 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (292)...(292)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature

<222> (295)...(295)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (297)...(297)
<223> n = t 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (300)...(300)
<223> n = t 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (306)...(306)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (309)...(309)
<223> n = g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (318)...(318)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (321)...(321)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (336)...(336)
<223> n = a 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (339)...(339)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (345)...(345)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (348)...(348)
<223> n = c 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (354)...(354)
<223> n = g 或 blank

<220>
<221> misc_feature
<222> (356)...(356)
<223> n = g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (358)...(358)
<223> n = 空白或 t

<400> 226
gangtgcagc tnntngannn tggnggaggn ntngtncagc cngggggntc nntnngnntn 60
tcntgngcng ccnnnggatt nacntttgcn cangagacga tggtntgggt nngncangcn 120
ccnggnaang gtntagagtg ggtntcncan attccnccng atggtcanga tccnttctac 180
gcagantccg tnaanggnng nttnacnatc tccngngana atnnnaanaa cacnntntan 240
ctncanatga acnnnctnng ngccgangan acngcngtnt ancactgngc nntgntnccn 300
aagagnggnc cttggttnga ntactggggt cagggnacnc tggtnacngt ctcnancn 358

<210> 227
<211> 357
<212> DNA
<213> 智人

<400> 227
gaagtacaac tgctggagag cggtggcggc ctggttcaac cgggtggttc cctgcgcctg 60
tcctgtgcgg catctggttt caccttcgca cacgaaacca tggtgtgggt tcgccaagct 120
ccgggcaaag gcctggaatg ggtaagccac attcctccag atggccagga cccattctat 180
gcggattccg ttaagggtcg ctttaccatt tctcgtgata actccaaaaa caccctgtac 240
ctgcagatga actccctgcg cgccgaggat actgcggtgt accattgtgc gctgctgcct 300
aaacgtggcc cgtggttcga ttactggggt cagggtactc tggtcaccgt aagcagc 357

<210> 228
<211> 119
<212> PRT
<213> 智人

<400> 228
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1   5   10   15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala His Glu
            20   25   30
Thr Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35   40   45
Ser His Ile Pro Pro Asp Gly Gln Asp Pro Phe Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65   70   75   80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr His Cys
                85   90   95
Ala Leu Leu Pro Lys Arg Gly Pro Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100   105   110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115

<210> 229
<211> 357
<212> DNA
<213> 大腸桿菌

<400> 229
gaagtacaac tgctggagag cggtggcggc ctggttcaac cgggtggttc cctgcgcctg 60
tcctgtgcgg catctggttt caccttcgca cacgaaacca tggtgtgggt tcgccaagct 120
ccgggcaaag gcctggaatg ggtaagccac attcctccag atggccagga cccattctat 180
gcggattccg ttaagggtcg ctttaccatt tctcgtgata actccaaaaa caccctgtac 240
ctgcagatga actccctgcg cgccgaggat actgcggtgt accattgtgc gctgctgcct 300
aaacgtggcc cgtggttcga ttactggggt cagggtactc tggtcaccgt aagcagc 357

<210> 230
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 一致序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)...(3)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)...(6)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)...(9)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)...(13)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)...(19)
<223> n = t 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)...(20)
<223> n = c 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)...(21)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)...(24)
<223> n = g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (27)...(27)
<223> n = a 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)...(31)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)...(36)
<223> n = a 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)...(39)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (42)...(42)

<223> n = t 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)...(45)
<223> n = g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (48)...(48)
<223> n = g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (57)...(57)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (60)...(60)
<223> n = c 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (69)...(69)
<223> n = a 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (72)...(72)
<223> n = c 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (75)...(75)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (78)...(78)
<223> n = a 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (87)...(87)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (90)...(90)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (93)...(93)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (96)...(96)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (99)...(99)
<223> n = g 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (111)...(111)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (117)...(117)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (120)...(120)
<223> n = a 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (123)...(123)
<223> n = a 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (126)...(126)
<223> n = g 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (129)...(129)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (132)...(132)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (135)...(135)
<223> n = a 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (138)...(138)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (144)...(144)
<223> n = c 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (145)...(145)
<223> n = t 或 a

<220>
<221> misc_feature

<222> (146)...(146)
<223> n = c 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (147)...(147)
<223> n = a 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (150)...(150)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (156)...(156)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (159)...(159)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (165)...(165)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (171)...(171)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (174)...(174)
<223> n = c 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (180)...(180)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (183)...(183)
<223> n = a 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (186)...(186)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (192)...(192)
<223> n = g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (198)...(198)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (201)...(201)
<223> n = g 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (204)...(204)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (210)...(210)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (213)...(213)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (216)...(216)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (219)...(219)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (222)...(222)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (228)...(228)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (234)...(234)
<223> n = g 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (237)...(237)
<223> n = a 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (240)...(240)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (246)...(246)
<223> n = a 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (253)...(253)

<223> n = a 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (254)...(254)
<223> n = g 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (261)...(261)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (270)...(270)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (273)...(273)
<223> n = a 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (279)...(279)
<223> n = a 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (282)...(282)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (285)...(285)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (297)...(297)
<223> n = t 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (303)...(303)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (304)...(304)
<223> n = a 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (306)...(306)
<223> n = g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (309)...(309)
<223> n = g 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (312)...(312)
<223> n = t 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (318)...(318)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (321)...(321)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (336)...(336)
<223> n = a 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (339)...(339)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (351)...(351)
<223> n = c 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (352)...(352)
<223> n = t 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (353)...(353)
<223> n = c 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (354)...(354)
<223> n = g 或 c

<400> 230
gangtncanc tgntggagnn nggnggnggc ntggtncanc cnggnggntc cctgcgnctn 60
tcctgtgcng cntcnggntt caccttngcn canganacna tggtgtgggt ncgccangcn 120
ccnggnaang gnctngantg ggtnnnncan attccnccng atggncagga nccnttctan 180
gcnganttccg tnaagggncg nttnaccatn tcncgngana antccaanaa cacnctntan 240
ctgcanatga acnncctgcg ngccgaggan acngcggtnt ancantgtgc gctgctncct 300
aannngnggnc cntggttnga ntactggggt cagggnacnc tggtcaccgt nnnnagc 357

<210> 231
<211> 357
<212> DNA
<213> 智人

<400> 231
gaggttcaac tgctggaatc tggtggtggt ctggtacaac cgggtggttc cctgcgtctg 60
agctgtgcag cctctggttt caccttcgct catgagacca tggtttgggt acgccaggct 120
ccgggtaaag gcctggagtg ggtaagccat atccctcctg atggtcagga cccgttctat 180
gctgattccg tcaaaggccg ttttaccatt tctcgtgaca acagcaaaaa cactctgtac 240
ctgcaaatga actccctgcg tgcagaagac acggcggttt atcactgtgc actgctgcca 300
aaacgcggcc cttggttcga ctactggggc cagggtactc tggtcactgt atcttct 357

<210> 232
<211> 119
<212> PRT
<213> 智人

<400> 232
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala His Glu
20 25 30
Thr Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser His Ile Pro Pro Asp Gly Gln Asp Pro Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr His Cys
85 90 95
Ala Leu Leu Pro Lys Arg Gly Pro Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 233
<211> 357
<212> DNA
<213> 大腸桿菌

<400> 233
gaggttcaac tgctggaatc tggtggtggt ctggtacaac cgggtggttc cctgcgtctg 60
agctgtgcag cctctggttt caccttcgct catgagacca tggtttgggt acgccaggct 120
ccgggtaaag gcctggagtg ggtaagccat atccctcctg atggtcagga cccgttctat 180
gctgattccg tcaaaggccg ttttaccatt tctcgtgaca acagcaaaaa cactctgtac 240
ctgcaaatga actccctgcg tgcagaagac acggcggttt atcactgtgc actgctgcca 300
aaacgcggcc cttggttcga ctactggggc cagggtactc tggtcactgt atcttct 357

<210> 234
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 一致序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)...(6)
<223> n = g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)...(9)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)...(13)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)...(18)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)...(24)
<223> n = g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (27)...(27)
<223> n = a 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)...(30)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)...(31)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)...(39)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (42)...(42)
<223> n = t 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)...(45)
<223> n = g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (48)...(48)
<223> n = g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (60)...(60)
<223> n = c 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (61)...(61)
<223> n = t 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (62)...(62)
<223> n = c 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (75)...(75)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (78)...(78)
<223> n = a 或 t

<220>

<221> misc_feature
<222> (87)...(87)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (90)...(90)
<223> n = g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (99)...(99)
<223> n = g 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (105)...(105)
<223> n = g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (111)...(111)
<223> n = c 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (120)...(120)
<223> n = a 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (123)...(123)
<223> n = a 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (126)...(126)
<223> n = g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (129)...(129)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (132)...(132)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (135)...(135)
<223> n = a 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (144)...(144)
<223> n = c 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (145)...(145)
<223> n = t 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (146)...(146)
<223> n = c 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (147)...(147)
<223> n = a 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (153)...(153)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (156)...(156)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (159)...(159)
<223> n = g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (171)...(171)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (174)...(174)
<223> n = c 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (180)...(180)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (183)...(183)
<223> n = a 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (186)...(186)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (192)...(192)
<223> n = g 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (195)...(195)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (201)...(201)
<223> n = g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (204)...(204)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (210)...(210)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (213)...(213)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (216)...(216)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (222)...(222)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (223)...(223)
<223> n = t 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (224)...(224)
<223> n = c 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (228)...(228)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (234)...(234)
<223> n = g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (237)...(237)
<223> n = a 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (240)...(240)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature

<222> (253)...(253)
<223> n = a 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (254)...(254)
<223> n = g 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (264)...(264)
<223> n = c 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (267)...(267)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (273)...(273)
<223> n = a 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (279)...(279)
<223> n = a 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (291)...(291)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (297)...(297)
<223> n = t 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (300)...(300)
<223> n = t 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (303)...(303)
<223> n = g 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (304)...(304)
<223> n = a 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (306)...(306)
<223> n = g 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (309)...(309)
<223> n = g 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (318)...(318)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (330)...(330)
<223> n = t 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (336)...(336)
<223> n = a 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (339)...(339)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (348)...(348)
<223> n = c 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (351)...(351)
<223> n = c 或 a

<220>
<221> misc_feature
<222> (354)...(354)
<223> n = g 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (355)...(355)
<223> n = a 或 t

<220>
<221> misc_feature
<222> (356)...(356)
<223> n = g 或 c

<220>
<221> misc_feature
<222> (357)...(357)
<223> n = c 或 t

<400> 234
gaggtncanc tgntggantc tggnggnggn ntggtacanc cnggnggntc cctgcgtctn 60
nnctgtgcag cctcnggntt caccttngcn catgagacna tggtntgggt ncgccaggcn 120
ccnggnaang gnctngagtg ggtnnnnncat atnccnccng atggtcagga nccnttctan 180
gcngantccg tnaanggccg nttnaccatn tcncgngaca annncaanaa cacnctntan 240
ctgcaaatga acnncctgcg tgcngangac acngcggtnt atcactgtgc nctgctnccn 300
aanngnggnc cttggttnga ctactggggn cagggnacnc tggtcacngt ntcnnnn 357

<210> 235
<211> 5
<212> PRT

<213> 智人

<400> 235
Glu Val Gln Leu Leu
1 5

<210> 236
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子

<400> 236
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr His Thr Cys
1 5 10 15
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
20 25

<210> 237
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子

<400> 237
Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser
1 5 10 15
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
20 25 30

五、中文發明摘要：

本發明係關於抵抗蛋白酶降解之抗VEGF多肽及抗體單一可變區域(dAbs)以及包含該等之拮抗劑。該等多肽、dAbs及拮抗劑適於經肺投與、經口投與、向肺傳遞及向患者之胃腸(GI)道傳遞，以及適用於治療癌症及發炎性疾病，諸如關節炎。

六、英文發明摘要：

The invention relates to anti-VEGF polypeptides and antibody single variable domains (dAbs) that are resistant to degradation by a protease, as well as antagonists comprising these. The polypeptides, dAbs and antagonists are useful for pulmonary administration, oral administration, delivery to the lung and delivery to the GI tract of a patient, as well as for treating cancer and inflammatory disease, such as arthritis.

十、申請專利範圍：

1. 一種抗VEGF免疫球蛋白單一可變區域，其包含與DOM15-26-593之胺基酸序列(展示於圖5中)至少97%一致之胺基酸序列，且其進一步包含抗體恆定區之區域。
2. 如請求項1之免疫球蛋白單一可變區域，其包含纈胺酸在位置6，其中編號係根據Kabat。
3. 如請求項1或2之免疫球蛋白單一可變區域，其包含白胺酸在位置99，其中編號係根據Kabat。
4. 如請求項1或2之免疫球蛋白單一可變區域，其包含離胺酸在位置30，其中編號係根據Kabat。
5. 一種抗VEGF免疫球蛋白單一可變區域，其包含與DOM15-26-593之胺基酸序列(展示於圖5中)一致的胺基酸序列，且其進一步包含抗體恆定區之區域。
6. 一種抗VEGF免疫球蛋白單一可變區域，其係由與選自DOM15-26-593之核酸序列(展示於圖20c中)之序列至少80%一致之核苷酸序列編碼，且該可變區域進一步包含抗體恆定區之區域。
7. 一種抗VEGF免疫球蛋白單一可變區域，其係由與DOM15-26-593之核酸序列(展示於圖20c中)一致之序列編碼，且其進一步包含抗體恆定區之區域。
8. 一種抗VEGF拮抗劑，其包含如請求項1至7中任一項之抗VEGF免疫球蛋白單一可變區域。
9. 如請求項8之拮抗劑，其包含第一及第二免疫球蛋白單一可變區域，其中各可變區域係如請求項1至7中任一

項。

10. 如請求項8或9之拮抗劑，其中該拮抗劑包含該單一可變區域之單體或該單一可變區域之同元二聚體(homodimer)。

11. 如請求項8或9之拮抗劑，其中該單一可變區域或各單一可變區域之胺基酸序列係與DOM15-26-593之胺基酸序列(展示於圖5中)一致。

12. 一種抗VEGF免疫球蛋白單一可變區域，其包含與DOM15-26-593之胺基酸序列(展示於圖5中)一致或不超過14個胺基酸位置與DOM15-26-593之胺基酸序列不同且具有與DOM15-26-593之CDR1序列至少50%一致之CDR1序列的胺基酸序列，且其進一步包含抗體恆定區之區域。

13. 一種抗VEGF免疫球蛋白單一可變區域，其包含與DOM15-26-593之胺基酸序列(展示於圖5中)一致或不超過14個胺基酸位置與DOM15-26-593之胺基酸序列不同且具有與DOM15-26-593之CDR2序列至少50%一致之CDR2序列的胺基酸序列，且其進一步包含抗體恆定區之區域。

14. 一種抗VEGF免疫球蛋白單一可變區域，其包含與DOM15-26-593之胺基酸序列(展示於圖5中)一致或不超過14個胺基酸位置與DOM15-26-593之胺基酸序列不同且具有與DOM15-26-593之CDR3序列至少50%一致之CDR3序列的胺基酸序列，且其進一步包含抗體恆定區之區

域。

15. 一種抗VEGF免疫球蛋白單一可變區域，其包含與DOM15-26-593之胺基酸序列(展示於圖5中)一致或不超過14個胺基酸位置與DOM15-26-593之胺基酸序列不同且具有與DOM15-26-593之CDR1序列至少50%一致之CDR1序列且具有與DOM15-26-593之CDR2序列至少50%一致之CDR2序列的胺基酸序列，且其進一步包含抗體恆定區之區域。

16. 一種抗VEGF免疫球蛋白單一可變區域，其包含與DOM15-26-593之胺基酸序列(展示於圖5中)一致或不超過14個胺基酸位置與DOM15-26-593之胺基酸序列不同且具有與DOM15-26-593之CDR1序列至少50%一致之CDR1序列且具有與DOM15-26-593之CDR3序列至少50%一致之CDR3序列的胺基酸序列，且其進一步包含抗體恆定區之區域。

17. 一種抗VEGF免疫球蛋白單一可變區域，其包含與DOM15-26-593之胺基酸序列(展示於圖5中)一致或不超過14個胺基酸位置與DOM15-26-593之胺基酸序列不同且具有與DOM15-26-593之CDR2序列至少50%一致之CDR2序列且具有與DOM15-26-593之CDR3序列至少50%一致之CDR3序列的胺基酸序列，且其進一步包含抗體恆定區之區域。

18. 一種抗VEGF免疫球蛋白單一可變區域，其包含與DOM15-26-593之胺基酸序列(展示於圖5中)一致或不超

過14個胺基酸位置與DOM15-26-593之胺基酸序列不同且具有與DOM15-26-593之CDR1序列至少50%一致之CDR1序列且具有與DOM15-26-593之CDR2序列至少50%一致之CDR2序列且具有與DOM15-26-593之CDR3序列至少50%一致之CDR3序列的胺基酸序列，且其進一步包含抗體恆定區之區域。

19. 一種抗VEGF拮抗劑，其具有與DOM15-26-593(展示於圖5中)之CDR1序列至少50%一致之CDR1序列，且其進一步包含抗體恆定區之區域。

20. 一種抗VEGF拮抗劑，其具有與DOM15-26-593(展示於圖5中)之CDR1序列至少50%一致之CDR2序列，且其進一步包含抗體恆定區之區域。

21. 一種抗VEGF拮抗劑，其具有與DOM15-26-593(展示於圖5中)之CDR1序列至少50%一致之CDR3序列，且其進一步包含抗體恆定區之區域。

22. 一種抗VEGF拮抗劑，其具有與DOM15-26-593(展示於圖5中)之CDR1序列至少50%一致之CDR1序列及與DOM15-26-593之CDR2序列至少50%一致之CDR2序列，且其進一步包含抗體恆定區之區域。

23. 一種抗VEGF拮抗劑，其具有與DOM15-26-593(展示於圖5中)之CDR1序列至少50%一致之CDR1序列及與DOM15-26-593之CDR3序列至少50%一致之CDR3序列，且其進一步包含抗體恆定區之區域。

24. 一種抗VEGF拮抗劑，其具有與DOM15-26-593(展示於圖

5中)之CDR2序列至少50%一致之CDR2序列及與DOM15-26-593之CDR3序列至少50%一致之CDR3序列，且其進一步包含抗體恆定區之區域。

25. 一種抗VEGF拮抗劑，其具有與DOM15-26-593(展示於圖5中)之CDR1序列至少50%一致之CDR1序列及與DOM15-26-593之CDR2序列至少50%一致之CDR2序列及與DOM15-26-593之CDR3序列至少50%一致之CDR3序列，且其進一步包含抗體恆定區之區域。

26. 一種抗VEGF拮抗劑，其包含免疫球蛋白單一可變區域，該可變區域包含DOM15-26-593(展示於圖5中)之CDR1、CDR2及/或CDR3序列，且其進一步包含抗體恆定區之區域。

27. 一種抗VEGF拮抗劑，其與DOM15-26-593競爭結合VEGF，且其進一步包含抗體恆定區之區域。

28. 一種蛋白酶抗性免疫球蛋白單一可變區域，其包含VEGF結合位點，其中該可變區域在以下情況下對蛋白酶具有抗性：

(i)在37℃與至少10微克/毫升之濃度(c)之蛋白酶一起培養至少1小時之時間(t)；或

(ii)在30℃與至少40微克/毫升之濃度(c')之蛋白酶一起培養至少1小時之時間(t)；

且其進一步包含抗體恆定區之區域。

29. 如請求項28之可變區域，其中該濃度(c或c')為至少100或1000微克/毫升蛋白酶，且其進一步包含抗體恆定區之區

域。

30. 如請求項28或29之可變區域，其中時間(t)為1、3或24小時或隔夜，且其進一步包含抗體恆定區之區域。

31. 如請求項28之可變區域，其中該可變區域在條件(i)下具抗性且該濃度(c)為10或100微克/毫升蛋白酶且時間(t)為1小時，且其進一步包含抗體恆定區之區域。

32. 如請求項28之可變區域，其中該可變區域在條件(ii)下具抗性且該濃度(c')為40微克/毫升蛋白酶且時間(t)為3小時，且其進一步包含抗體恆定區之區域。

33. 如請求項28、29、31及32中任一項之可變區域，其中該蛋白酶係選自胰蛋白酶、彈性蛋白酶、白血球酶(leucozyme)及胰酶，且其進一步包含抗體恆定區之區域。

34. 如請求項28、29、31及32中任一項之可變區域，其中該蛋白酶為胰蛋白酶，且其進一步包含抗體恆定區之區域。

35. 如請求項28、29、31及32中任一項之可變區域，其中該可變區域對胰蛋白酶及至少另一種選自彈性蛋白酶、白血球酶及胰酶之蛋白酶具有抗性，且其進一步包含抗體恆定區之區域。

36. 如請求項28、29、31及32中任一項之可變區域，其中該可變區域在條件(i)或(ii)下培養後特異性結合VEGF，且其進一步包含抗體恆定區之區域。

37. 如請求項36之可變區域，該可變區域在條件(i)或(ii)下培

養後在ELISA中具有至少0.404之OD_{450}讀數，且其進一步包含抗體恆定區之區域。

38. 如請求項28、29、31及32中任一項之可變區域，其中該可變區域在條件(i)或(ii)下培養後特異性結合蛋白質A或蛋白質L，且其進一步包含抗體恆定區之區域。

39. 如請求項28、29、31及32中任一項之可變區域，其中該可變區域在條件(i)或(ii)下培養後在凝膠電泳中大體上展現單一條帶，且其進一步包含抗體恆定區之區域。

40. 一種抗VEGF拮抗劑，其包含如請求項28至39中任一項之可變區域，且其進一步包含抗體恆定區之區域。

41. 如請求項1、2、5至7、12至18、28、29、31及32中任一項之可變區域，其進一步包含抗體恆定區之區域，且其中該抗體恆定區之區域為抗體Fc區。

42. 如請求項41之可變區域，其中該抗體Fc區具有圖52b中所示之胺基酸Fc序列。

43. 如請求項41之可變區域，其中該抗體Fc區具有與圖52b中所示之胺基酸Fc序列至少70%一致之序列。

44. 如請求項1、2、5至7、12至18、28、29、31及32中任一項之可變區域，其包含抗體恆定區之區域，且其中該抗體恆定區之N端例如以融合物形式連接於該可變區域之C端。

45. 如請求項8、9、19至27及40中任一項之拮抗劑，其進一步包含抗體恆定區之區域，且其中該抗體恆定區之區域為抗體Fc區。

46. 如請求項41之拮抗劑，其中該抗體Fc區具有與圖52b中所示之胺基酸Fc序列至少70%一致之序列。

47. 如請求項41之拮抗劑，其中該抗體Fc區具有與圖52b中所示之胺基酸Fc序列至少70%一致之序列。

48. 如請求項41之拮抗劑，其包含抗體恆定區之區域，且其中該抗體恆定區之N端例如以融合物形式連接於該可變區域之C端。

49. 一種抗VEGF免疫球蛋白單一可變區域，其係以與Fc之融合物形式存在，且其具有與DOM15-26-593-Fc融合物之胺基酸序列(展示於圖52a中)一致之胺基酸序列。

50. 一種抗VEGF免疫球蛋白單一可變區域，其係以與Fc之融合物形式存在，且其具有與DOM15-26-593-Fc融合物之胺基酸序列(展示於圖52a中)97%一致之胺基酸序列。

51. 如請求項40之VEGF拮抗劑，其係用於經口傳遞。

52. 如請求項40之VEGF拮抗劑，其係用於向患者之胃腸(GI)道傳遞。

53. 如請求項41之可變區域，其係用於經口傳遞。

54. 如請求項49或50之可變區域，其係用於經口傳遞。

55. 如請求項41之可變區域，其係用於向患者之GI道傳遞。

56. 如請求項49或50之可變區域，其係用於向患者之GI道傳遞。

57. 一種如請求項40及45至48中任一項之VEGF拮抗劑或如請求項41至44、49及50中任一項之可變區域在製造用於經口傳遞之藥物的用途。

58. 一種如請求項40及45至48中任一項之VEGF拮抗劑或如請求項41至44、49及50中任一項之可變區域在製造用於向患者之GI道傳遞之藥物的用途。

59. 如請求項40、51及52中任一項之拮抗劑，其中該可變區域對胰蛋白酶、彈性蛋白酶及/或胰酶具有抗性。

60. 如請求項41之可變區域，其中該可變區域對胰蛋白酶、彈性蛋白酶及/或胰酶具有抗性。

61. 如請求項49或50之可變區域，其中該可變區域對胰蛋白酶、彈性蛋白酶及/或胰酶具有抗性。

62. 如請求項57或58之用途，其中該可變區域對胰蛋白酶、彈性蛋白酶及/或胰酶具有抗性。

63. 如請求項40之VEGF拮抗劑，其係用於肺傳遞。

64. 如請求項40之VEGF拮抗劑，其係用於向患者之眼睛傳遞。

65. 如請求項41之可變區域，其係用於肺傳遞。

66. 如請求項49或50之可變區域，其係用於肺傳遞。

67. 如請求項41之可變區域，其係用於向患者之眼睛傳遞。

68. 如請求項49或50之可變區域，其係用於向患者之眼睛傳遞。

69. 一種如請求項40及45至48中任一項之VEGF拮抗劑或如請求項41至44、49及50中任一項之可變區域在製造用於肺傳遞之藥物的用途。

70. 一種如請求項40及45至48中任一項之VEGF拮抗劑或如請求項41至44、49及50中任一項之可變區域在製造用於

向患者之眼睛傳遞之藥物的用途。

71. 如請求項51或52之拮抗劑，其中該可變區域對胰蛋白酶具有抗性。

72. 如請求項53之可變區域，其中該可變區域對胰蛋白酶具有抗性。

73. 如請求項54之可變區域，其中該可變區域對胰蛋白酶具有抗性。

74. 如請求項55之可變區域，其中該可變區域對胰蛋白酶具有抗性。

75. 如請求項56之可變區域，其中該可變區域對胰蛋白酶具有抗性。

76. 如請求項40之VEGF拮抗劑，其係用於治療及/或預防癌症、發炎、自體免疫疾病或年齡相關黃斑退化(AMD)或VEGF介導之病狀或疾病、慢性阻塞性肺病(COPD)或肺炎。

77. 如請求項41之可變區域，其係用於治療及/或預防癌症、發炎、自體免疫疾病或AMD或VEGF介導之病狀或疾病、COPD或肺炎。

78. 如請求項49或50之可變區域，其係用於治療及/或預防癌症、發炎、自體免疫疾病或AMD或VEGF介導之病狀或疾病、COPD或肺炎。

79. 一種如請求項40及45至48中任一項之VEGF拮抗劑或如請求項41至44、49及50中任一項之可變區域在製造用於治療及/或預防癌症、發炎、自體免疫疾病或AMD或

VEGF介導之病狀或疾病、COPD或肺炎之藥物的用途。

80. 如請求項40之拮抗劑，其係用於治療及/或預防癌症、發炎、發炎性疾病、自體免疫疾病或AMD或VEGF介導之病狀或疾病、COPD或肺炎。

81. 如請求項80之拮抗劑，其中該病狀為AMD。

82. 如請求項80之拮抗劑，其中該癌症係選自肺癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、胰腺癌、乳癌、前列腺癌及卵巢癌。

83. 如請求項80之拮抗劑，其中該發炎性疾病為發炎性腸疾病且係選自由克羅恩氏病(Crohn's disease)及潰瘍性結腸炎組成之群。

84. 如請求項80之拮抗劑，其中該慢性阻塞性肺病係選自由慢性支氣管炎、慢性阻塞性支氣管炎及肺氣腫組成之群。

85. 如請求項80之拮抗劑，其中該肺炎為細菌性肺炎。

86. 如請求項41之可變區域，其係用於治療及/或預防癌症、發炎、發炎性疾病、自體免疫疾病或AMD或VEGF介導之病狀或疾病、COPD或肺炎。

87. 如請求項86之可變區域，其中該病狀為AMD。

88. 如請求項86之可變區域，其中該癌症係選自肺癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、胰腺癌、乳癌、前列腺癌及卵巢癌。

89. 如請求項86之可變區域，其中該發炎性疾病為發炎性腸疾病且係選自由克羅恩氏病及潰瘍性結腸炎組成之群。

90. 如請求項86之可變區域，其中該慢性阻塞性肺病係選自

由慢性支氣管炎、慢性阻塞性支氣管炎及肺氣腫組成之群。

91. 如請求項86之可變區域，其中該肺炎為細菌性肺炎。

92. 如請求項49或50之可變區域，其係用於治療及/或預防癌症、發炎、發炎性疾病、自體免疫疾病或AMD或VEGF介導之病狀或疾病、COPD或肺炎。

93. 如請求項92之可變區域，其中該病狀為AMD。

94. 如請求項92之可變區域，其中該癌症係選自肺癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、胰腺癌、乳癌、前列腺癌及卵巢癌。

95. 如請求項92之可變區域，其中該發炎性疾病為發炎性腸疾病且係選自由克羅恩氏病及潰瘍性結腸炎組成之群。

96. 如請求項92之可變區域，其中該慢性阻塞性肺病係選自由慢性支氣管炎、慢性阻塞性支氣管炎及肺氣腫組成之群。

97. 如請求項92之可變區域，其中該肺炎為細菌性肺炎。

98. 如請求項40之VEGF拮抗劑，其係用於治療及/或預防癌症。

99. 如請求項41之可變區域，其係用於治療及/或預防癌症。

100. 如請求項49或50之可變區域，其係用於治療及/或預防癌症。

101. 一種如請求項40及45至48中任一項之VEGF拮抗劑或如請求項41至44、49及50中任一項之可變區域在製造用於治療及/或預防癌症之藥物的用途。

102. 如請求項98之拮抗劑，其中該癌症為選自由肺癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、胰腺癌、乳癌、前列腺癌及卵巢癌組成之群之實體腫瘤。

103. 如請求項99之可變區域，其中該癌症為選自由肺癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、胰腺癌、乳癌、前列腺癌及卵巢癌組成之群之實體腫瘤。

104. 如請求項100之可變區域，其中該癌症為選自由肺癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、胰腺癌、乳癌、前列腺癌及卵巢癌組成之群之實體腫瘤。

105. 如請求項101之用途，其中該癌症為選自由肺癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、胰腺癌、乳癌、前列腺癌及卵巢癌組成之群之實體腫瘤。

106. 一種肺傳遞裝置，其含有如請求項40及45至48中任一項之VEGF拮抗劑或如請求項41至44、49及50中任一項之可變區域。

107. 如請求項106之裝置，其中該裝置為吸入器或鼻內投藥裝置。

108. 一種口服調配物，其包含如請求項40及45至48中任一項之VEGF拮抗劑或如請求項41至44、49及50中任一項之可變區域。

109. 如請求項108之調配物，其中該調配物為錠劑、丸劑、膠囊、液體或糖漿。

110. 如請求項8、9、40、51、52、76、80至85、98及102中任一項之拮抗劑，其中該拮抗劑包含如請求項1至7、12

至18及28至39中任一項之可變區域。

111. 如請求項8、9、40、51、52、76、80至85、98及102中任一項之拮抗劑，其中該拮抗劑包含具有至少50℃之Tm之可變區域。

112. 如請求項8、9、40、51、52、76、80至85、98及102中任一項之拮抗劑，其中該拮抗劑包含在標準HUVEC細胞檢定中以500 nM至50 pM之ND50中和人類VEGF之可變區域。

113. 如請求項41之用途，其中該拮抗劑包含如請求項1至7、12至18及28至39中任一項之可變區域。

114. 如請求項49或50之用途，其中該拮抗劑包含如請求項1至7、12至18及28至39中任一項之可變區域。

115. 如請求項41之用途，其中該拮抗劑包含具有至少50℃之Tm之可變區域。

116. 如請求項49或50之用途，其中該拮抗劑包含具有至少50℃之Tm之可變區域。

117. 如請求項41之用途，其中該拮抗劑包含在標準HUVEC細胞檢定中以500 nM至50 pM之ND50中和人類VEGF之可變區域。

118. 如請求項49或50之用途，其中該拮抗劑包含在標準HUVEC細胞檢定中以500 nM至50 pM之ND50中和人類VEGF之可變區域。

119. 如請求項106或107之裝置，其中該拮抗劑包含如請求項1至7、12至18及28至39中任一項之可變區域。

120. 如請求項106或107之裝置，其中該拮抗劑包含具有至少50℃之Tm之可變區域。

121. 如請求項106或107之裝置，其中該拮抗劑包含在標準HUVEC細胞檢定中以500 nM至50 pM之ND50中和人類VEGF之可變區域。

122. 如請求項108或109之調配物，其中該拮抗劑包含如請求項1至7、12至18及28至39中任一項之可變區域。

123. 如請求項108或109之調配物，其中該拮抗劑包含具有至少50℃之Tm之可變區域。

124. 如請求項108或109之調配物，其中該拮抗劑包含在標準HUVEC細胞檢定中以500 nM至50 pM之ND50中和人類VEGF之可變區域。

125. 如請求項1、2、5至7、12至18、28、29、31及32中任一項之可變區域，其中該可變區域具有至少50℃之Tm。

126. 如請求項1、2、5至7、12至18、28、29、31及32中任一項之可變區域，其中該可變區域在標準HUVEC細胞檢定中以500 nM至50 pM之ND50中和人類VEGF。

127. 一種雙特異性配位體，其包含如請求項1至7、12至18、28至39、41至44、49、50、125及126中任一項之可變區域。

128. 一種分離或重組核酸，其編碼包含如請求項1至7、12至18、28至39、41至44、49、50、125及126中任一項之免疫球蛋白單一可變區域之多肽。

129. 一種載體，其包含如請求項128之核酸。

130. 一種宿主細胞，其包含如請求項128之核酸或如請求項129之載體。

131. 一種產生包含免疫球蛋白單一可變區域之多肽之方法，該方法包含將如請求項130之宿主細胞維持在適於該核酸或該載體表現之條件下，藉此產生包含免疫球蛋白單一可變區域之多肽。

132. 如請求項131之方法，其進一步包含分離該多肽，及視情況產生比該分離之多肽具有改良親和力及/或ND50之變異體，例如突變變異體。

133. 一種醫藥組合物，其包含如請求項1至7、12至18、28至39、41至44、49、50、125及126中任一項之免疫球蛋白單一可變區域或如請求項8至11、19至27、40、45至48、51、52、59、63、64、71、76、80至85、98、102及110至112中任一項之拮抗劑及醫藥學上可接受之載劑、賦形劑或稀釋劑。

134. 一種多肽，其包含與DOM15-26-593之胺基酸序列(展示於圖5中)至少97%一致之序列，且其進一步包含抗體恆定區之區域。

135. 一種多肽，其係由與DOM15-26-593之核苷酸序列之核苷酸序列(展示於圖20C中)至少80%一致之序列編碼，且其進一步包含抗體恆定區之區域。

136. 一種融合蛋白，其包含如請求項134或135之多肽，且其進一步包含抗體恆定區之區域。

137. 一種分離或重組核酸，其編碼如請求項134或135之多肽

或如請求項136之融合蛋白，且其進一步包含編碼該抗體恆定區之區域之核酸。

138. 如請求項1、2、5至7、12至18、28、29、31、32、49及50中任一項之免疫球蛋白單一可變區域，其進一步包含抗體恆定區域。

139. 如請求項1、2、5至7、12至18、28、29、31、32、49及50中任一項之可變區域，其包含抗體Fc，視情況其中該Fc之N端連接於(視情況直接連接於)該可變區域之C端。

140. 如請求項8、9、40、51、52、76、80至85、98及102中任一項之拮抗劑，其進一步包含抗體恆定區域。

141. 如請求項8、9、40、51、52、76、80至85、98及102中任一項之拮抗劑，其包含抗體Fc，視情況其中該Fc之N端連接於(視情況直接連接於)該可變區域之C端。

142. 如請求項134或135之多肽，其進一步包含抗體恆定區域。

143. 如請求項134或135之多肽，其包含抗體Fc，視情況其中該Fc之N端連接於(視情況直接連接於)該可變區域之C端。

十一、圖式：

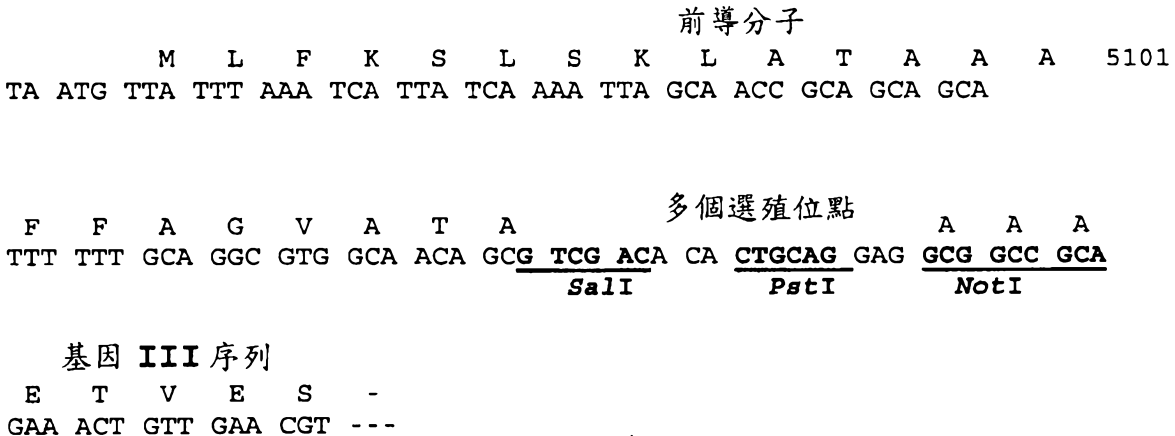

前導分子
M L F K S L S K L A T A A A 5101
TA ATG TTA TTT AAA TCA TTA TCA AAA TTA GCA ACC GCA GCA GCA
多個選殖位點
F F A G V A T A A A A
TTT TTT GCA GGC GTG GCA ACA GCG TCG ACA CA CTGCAG GAG GCG GCC GCA
SalI
PstI
NotI
基因 III 序列
E T V E S -
GAA ACT GTT GAA CGT ---

圖1

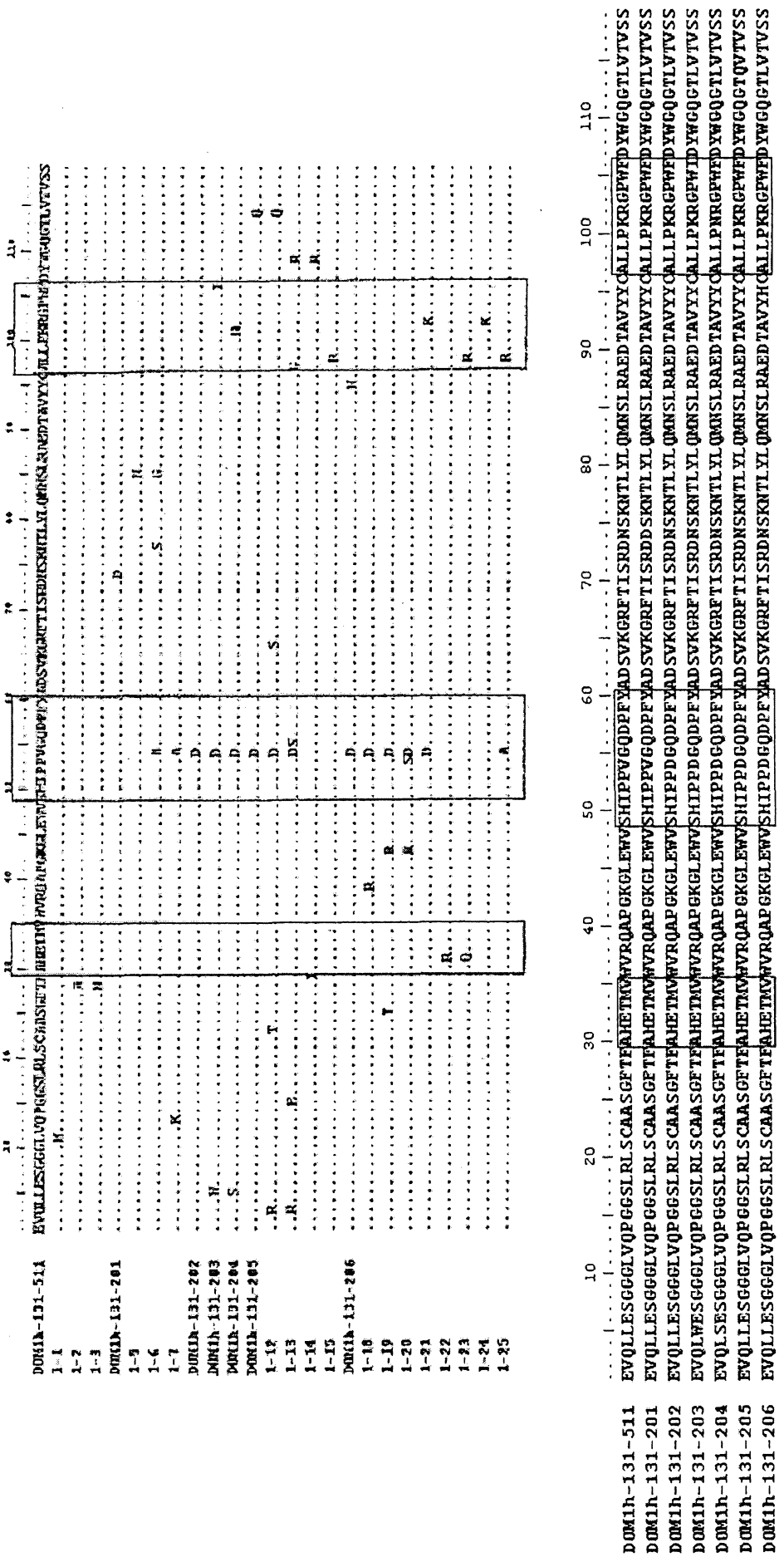


圖3

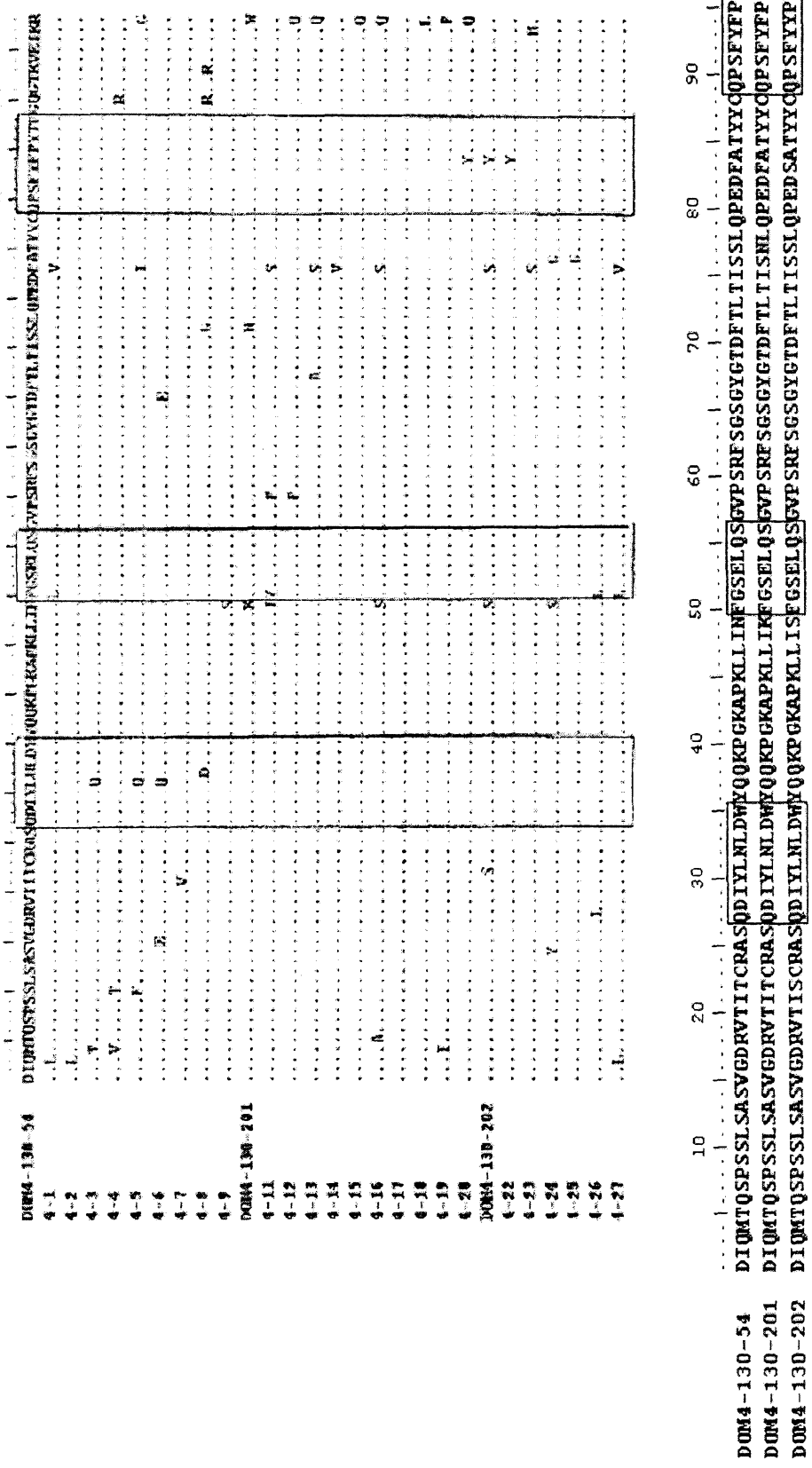


圖 4

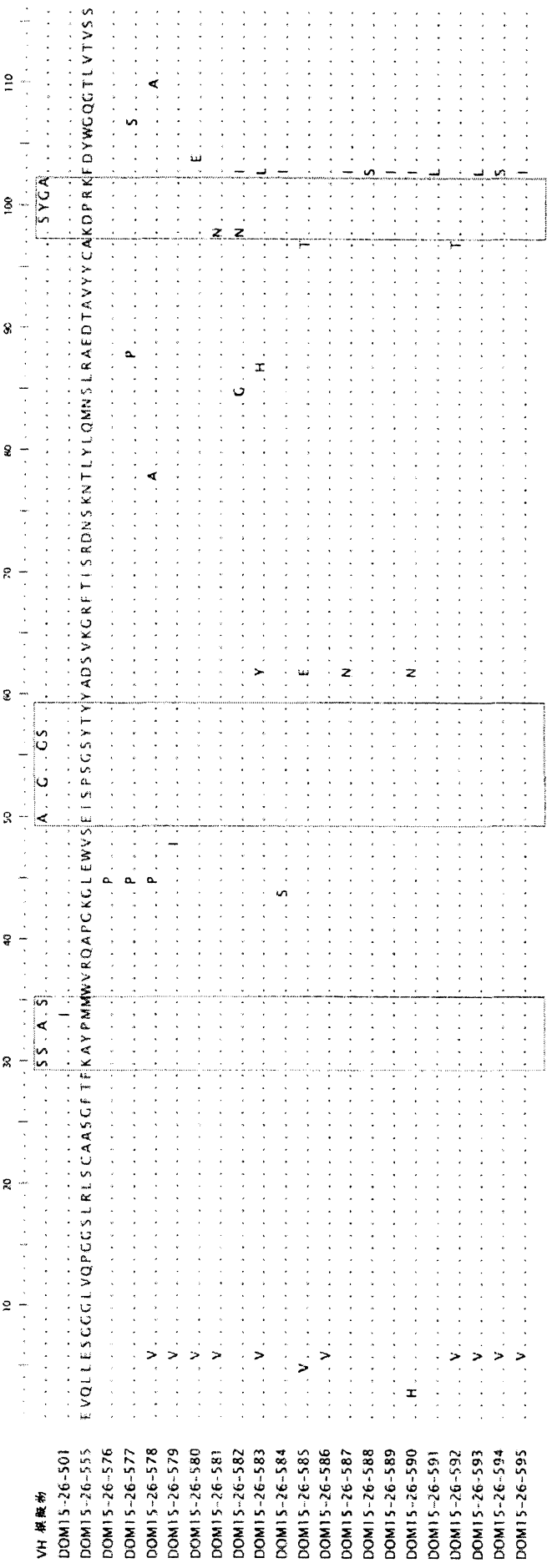

VH 模板株
DOM15-26-501
DOM15-26-555
DOM15-26-576
DOM15-26-577
DOM15-26-578
DOM15-26-579
DOM15-26-580
DOM15-26-581
DOM15-26-582
DOM15-26-583
DOM15-26-584
DOM15-26-585
DOM15-26-586
DOM15-26-587
DOM15-26-588
DOM15-26-589
DOM15-26-590
DOM15-26-591
DOM15-26-592
DOM15-26-593
DOM15-26-594
DOM15-26-595

図5

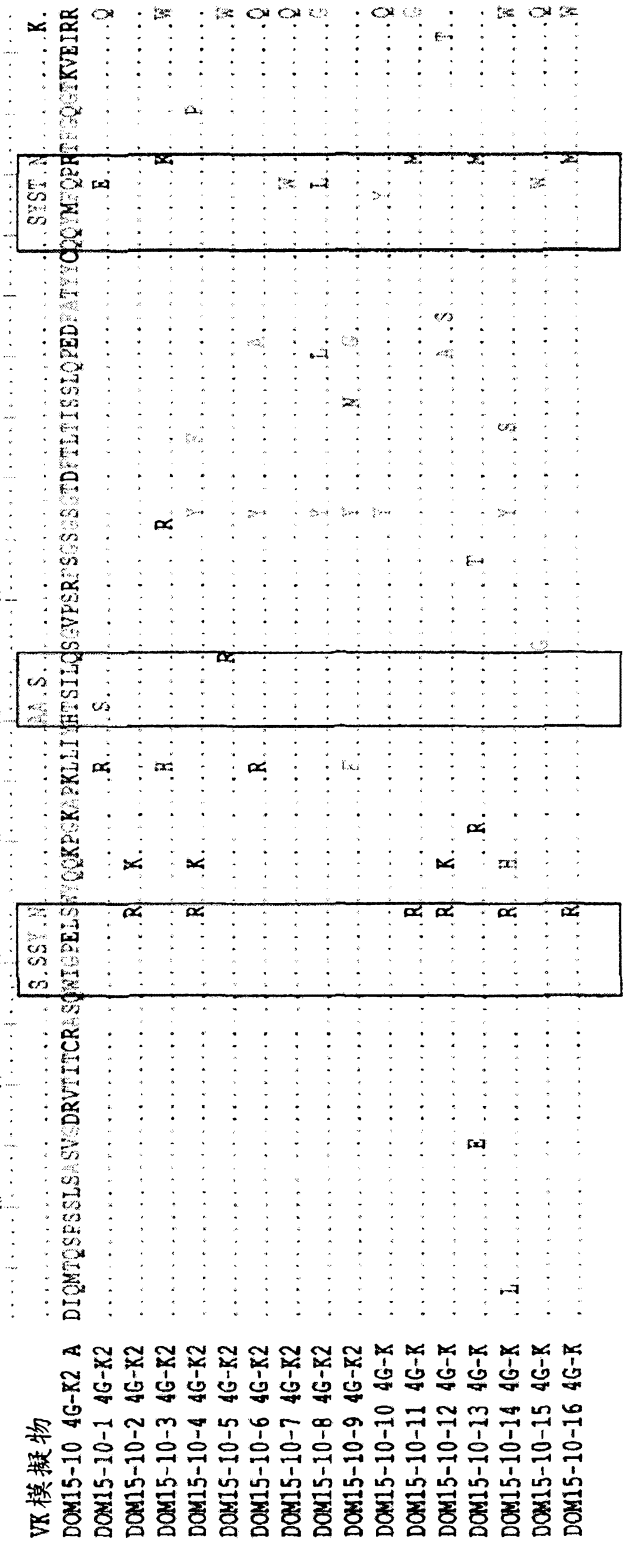

VK模擬物
DOM15-10 4G-K2 A
DOM15-10-1 4G-K2
DOM15-10-2 4G-K2
DOM15-10-3 4G-K2
DOM15-10-4 4G-K2
DOM15-10-5 4G-K2
DOM15-10-6 4G-K2
DOM15-10-7 4G-K2
DOM15-10-8 4G-K2
DOM15-10-9 4G-K2
DOM15-10-10 4G-K
DOM15-10-11 4G-K
DOM15-10-12 4G-K
DOM15-10-13 4G-K
DOM15-10-14 4G-K
DOM15-10-15 4G-K
DOM15-10-16 4G-K

圖6

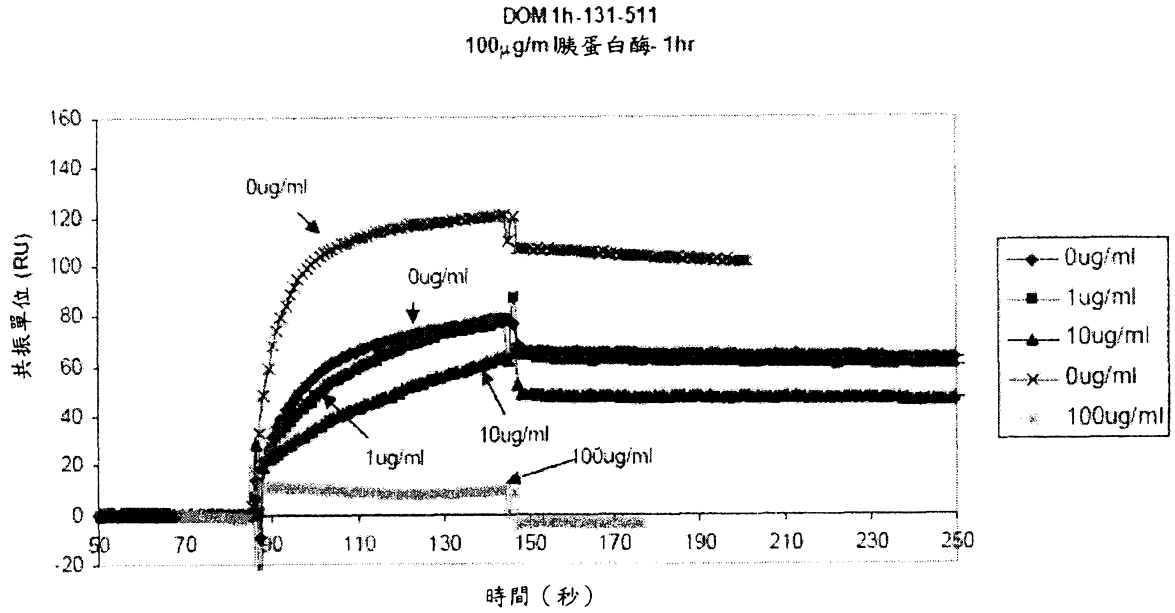

DOM1h-131-511
100μg/ml胰蛋白酶-1hr
共振單位 (RU)
時間（秒）
0ug/ml
0ug/ml
1ug/ml
10ug/ml
100ug/ml
0ug/ml
1ug/ml
10ug/ml
0ug/ml
100ug/ml

圖7A

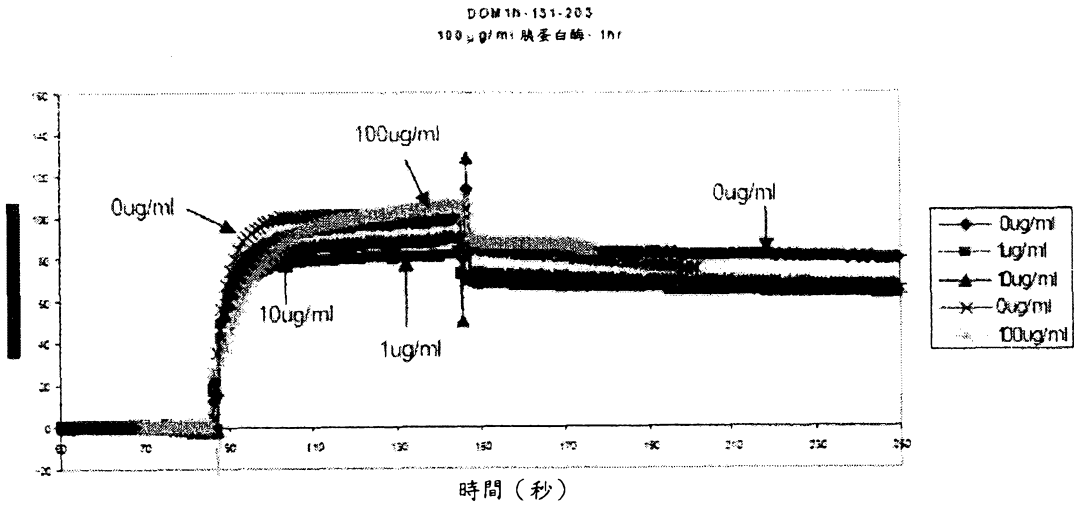

時間（秒）
100ug/ml
0ug/ml
0ug/ml
10ug/ml
1ug/ml
0ug/ml
1ug/ml
10ug/ml
0ug/ml
100ug/ml

圖7B

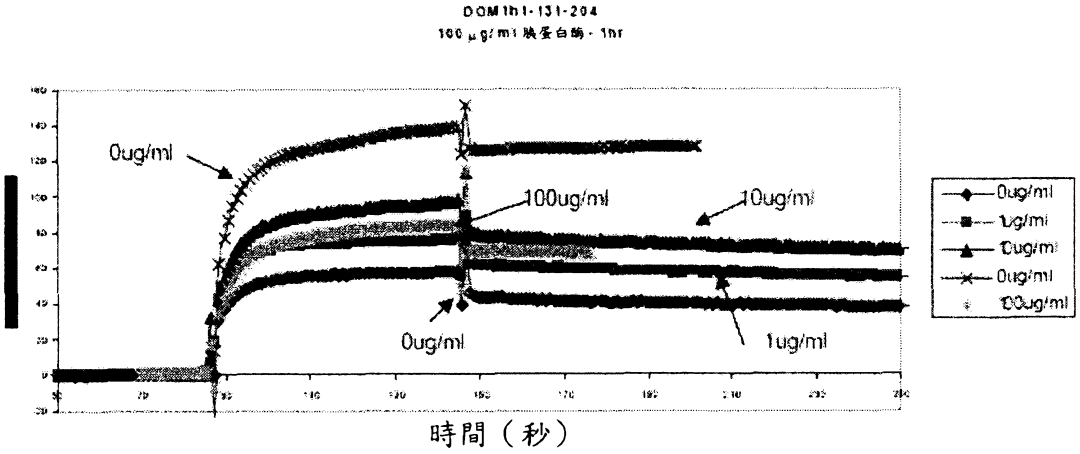

0ug/ml
100ug/ml
10ug/ml
0ug/ml
1ug/ml
0ug/ml
1ug/ml
10ug/ml
100ug/ml
時間（秒）

圖7C

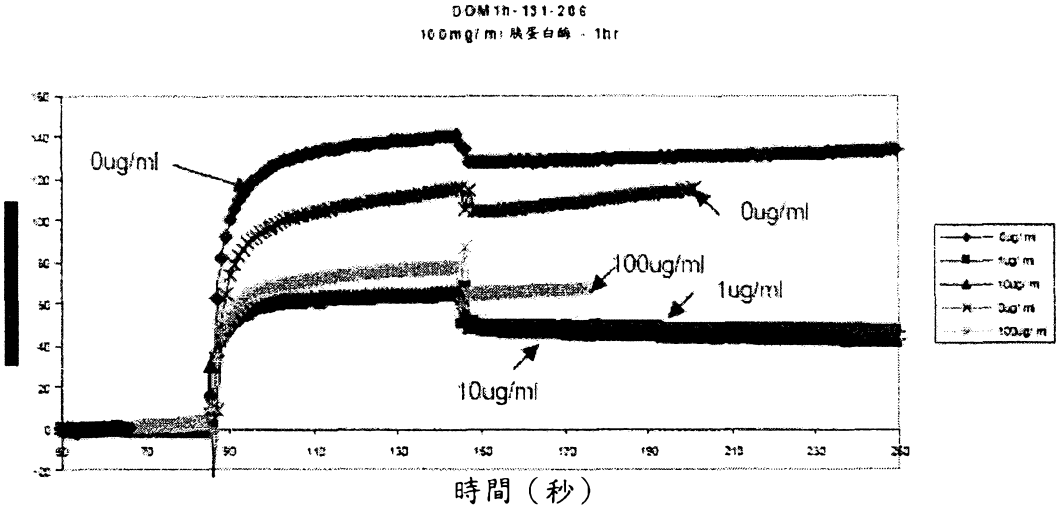

0ug/ml
0ug/ml
100ug/ml
1ug/ml
10ug/ml
時間（秒）

圖7D

DOM1h-131-511

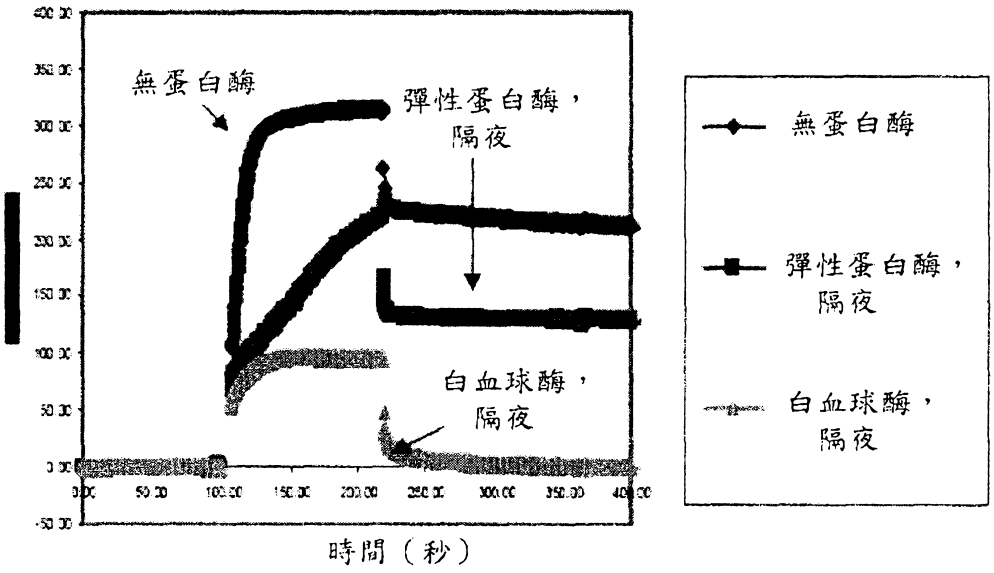


圖 8A

DOM1h-131-202

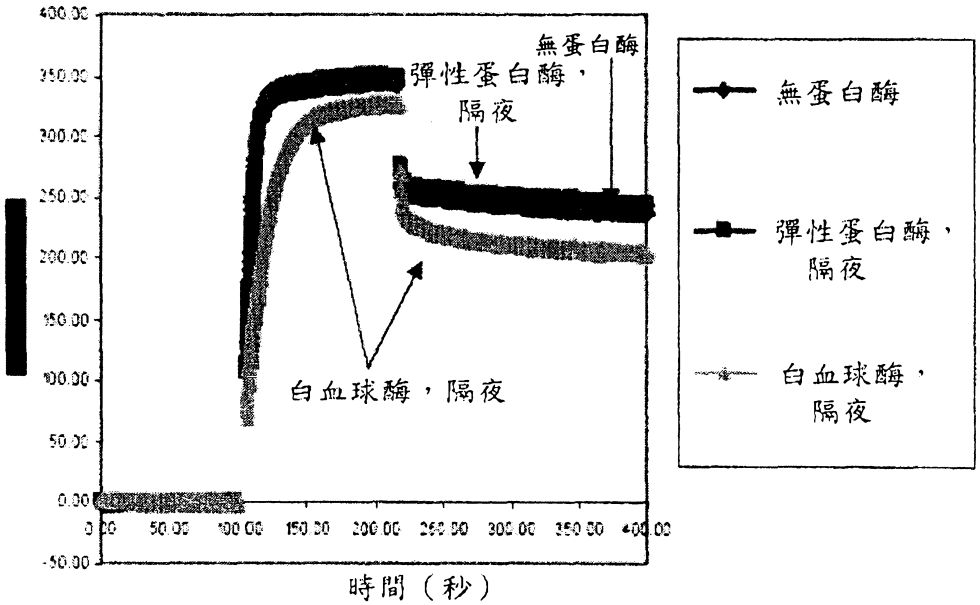


圖 8B

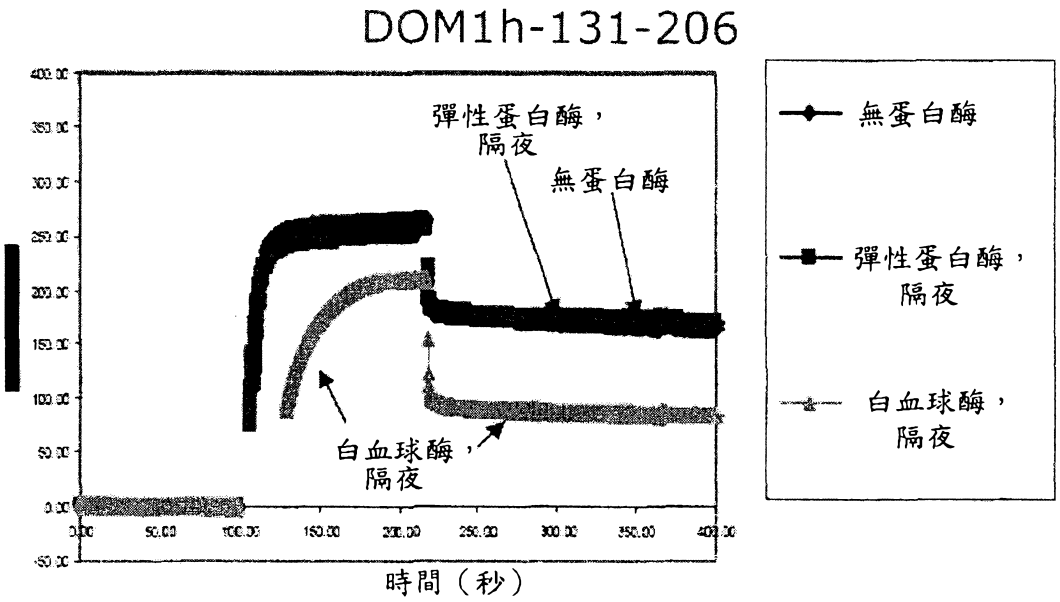


圖8C

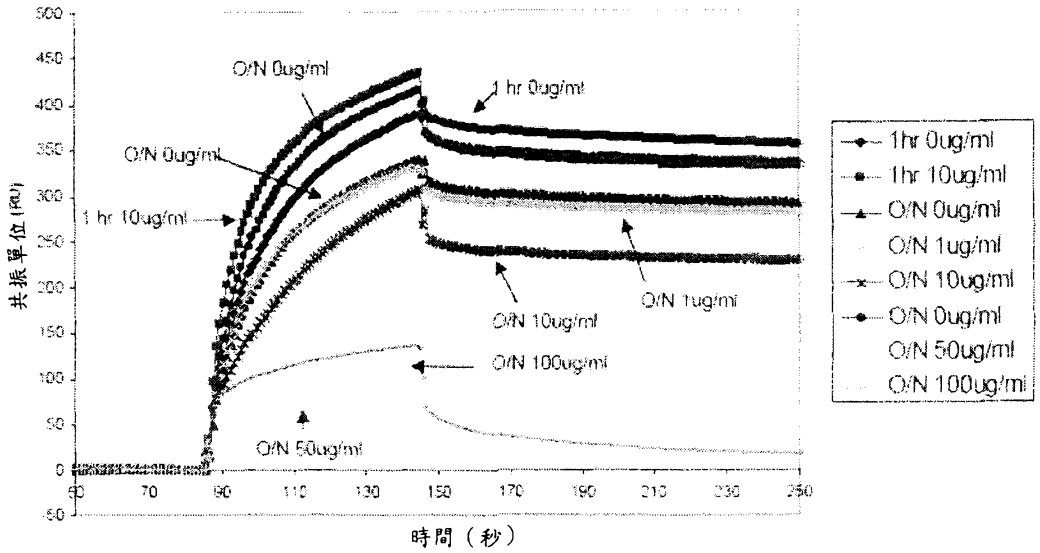

O/N 0ug/ml
1 hr 0ug/ml
O/N 0ug/ml
1 hr 10ug/ml
O/N 10ug/ml
O/N 1ug/ml
O/N 100ug/ml
O/N 50ug/ml
共振單位 (RU)
時間（秒）
1hr 0ug/ml
1hr 10ug/ml
O/N 0ug/ml
O/N 1ug/ml
O/N 10ug/ml
O/N 0ug/ml
O/N 50ug/ml
O/N 100ug/ml

圖10A

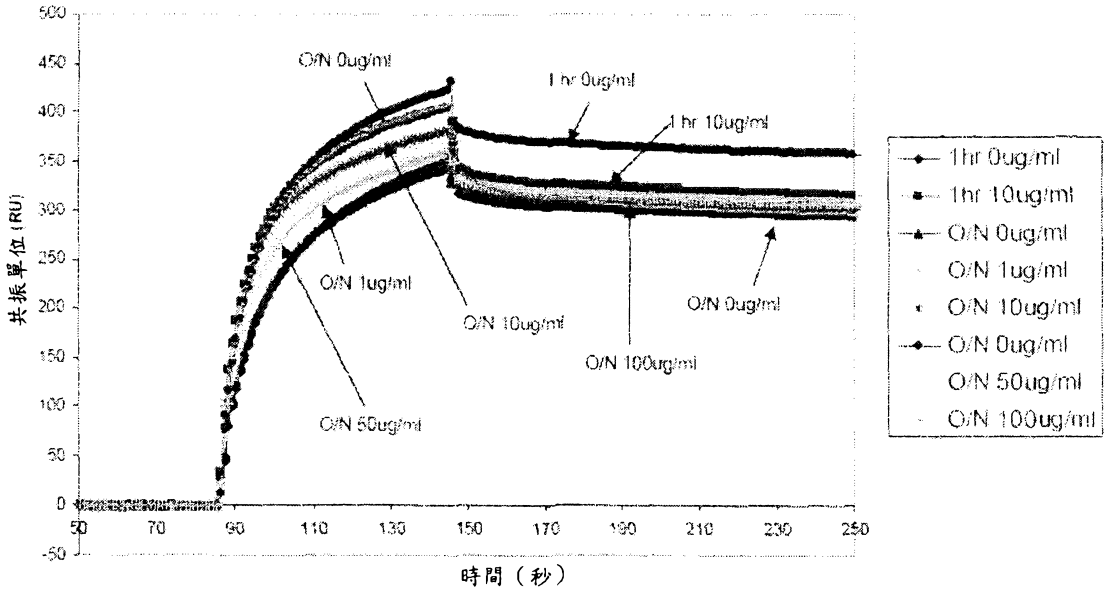

O/N 0ug/ml
1 hr 0ug/ml
1 hr 10ug/ml
O/N 1ug/ml
O/N 10ug/ml
O/N 0ug/ml
O/N 100ug/ml
O/N 50ug/ml
共振單位 (RU)
時間（秒）
1hr 0ug/ml
1hr 10ug/ml
O/N 0ug/ml
O/N 1ug/ml
O/N 10ug/ml
O/N 0ug/ml
O/N 50ug/ml
O/N 100ug/ml

圖10B

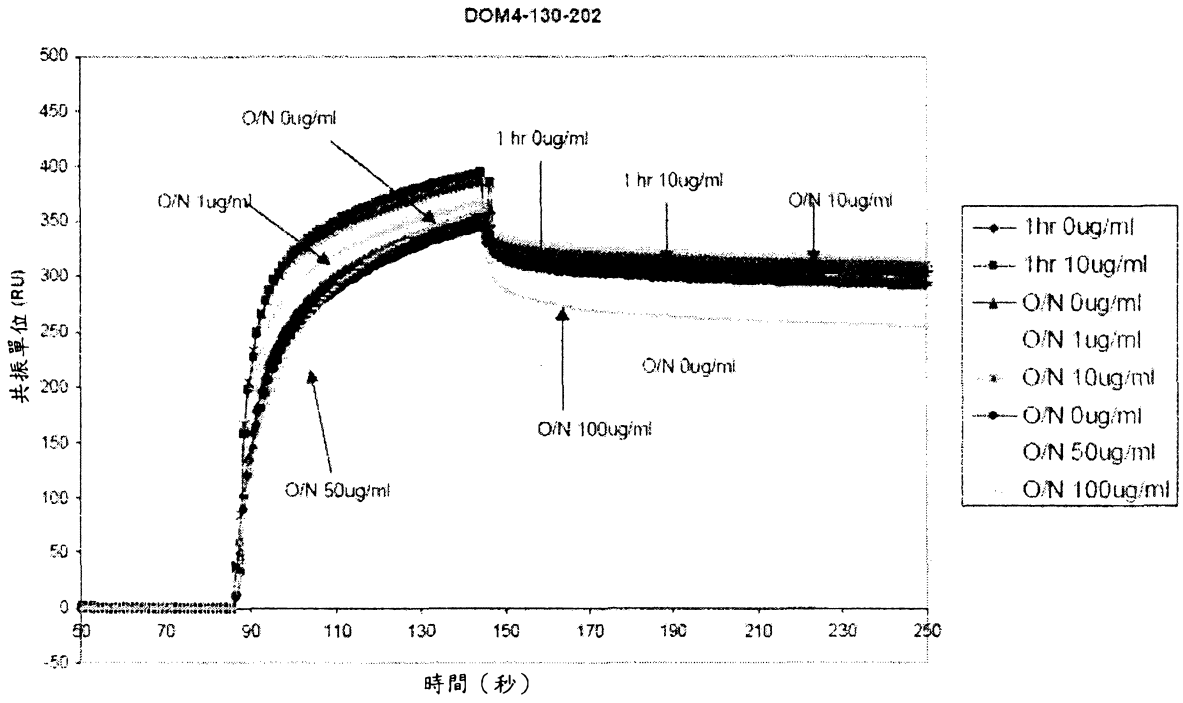

DOM4-130-202
共振單位 (RU)
時間（秒）
O/N 0ug/ml
1 hr 0ug/ml
1 hr 10ug/ml
O/N 10ug/ml
O/N 1ug/ml
O/N 0ug/ml
O/N 100ug/ml
O/N 50ug/ml
1hr 0ug/ml
1hr 10ug/ml
O/N 0ug/ml
O/N 1ug/ml
O/N 10ug/ml
O/N 0ug/ml
O/N 50ug/ml
O/N 100ug/ml

圖10C

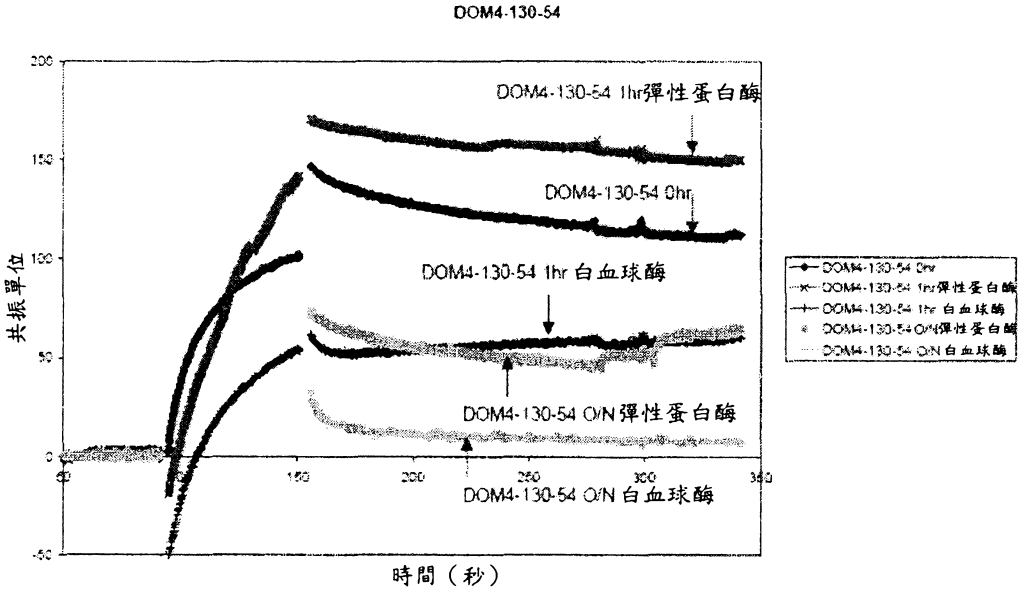

DOM4-130-54
DOM4-130-54 1hr彈性蛋白酶
DOM4-130-54 0hr
DOM4-130-54 1hr 白血球酶
DOM4-130-54 O/N彈性蛋白酶
DOM4-130-54 O/N 白血球酶
共振單位
時間（秒）

圖11A

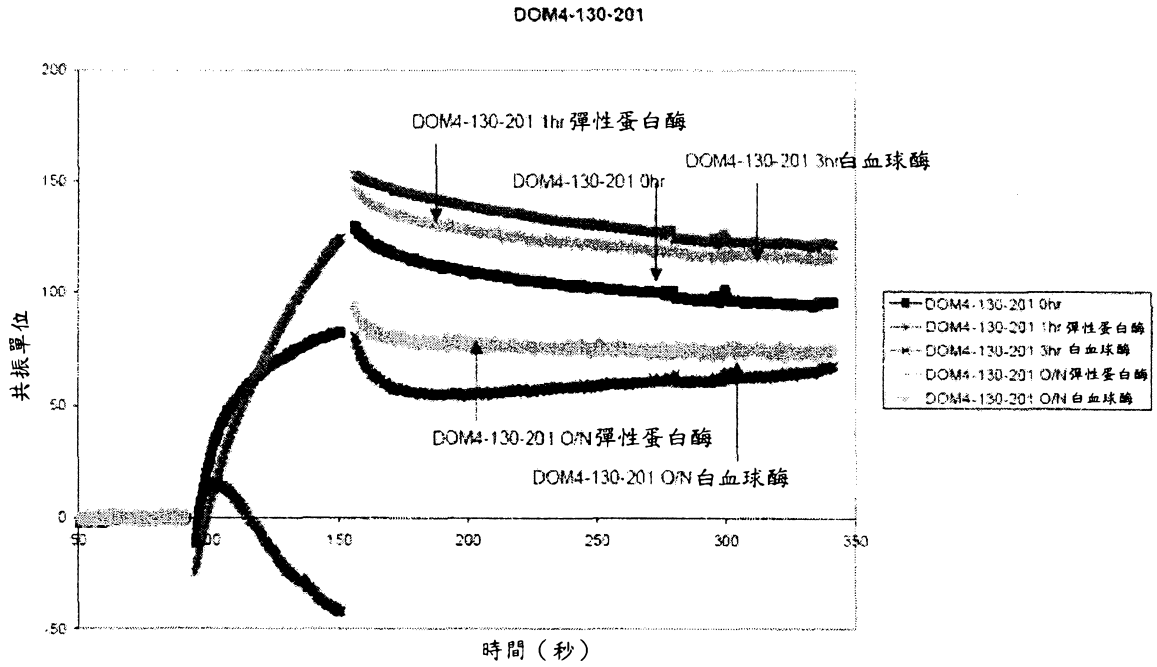

DOM4-130-201
DOM4-130-201 1hr彈性蛋白酶
DOM4-130-201 3hr白血球酶
DOM4-130-201 0hr
DOM4-130-201 O/N彈性蛋白酶
DOM4-130-201 O/N白血球酶
共振單位
時間（秒）

圖11B

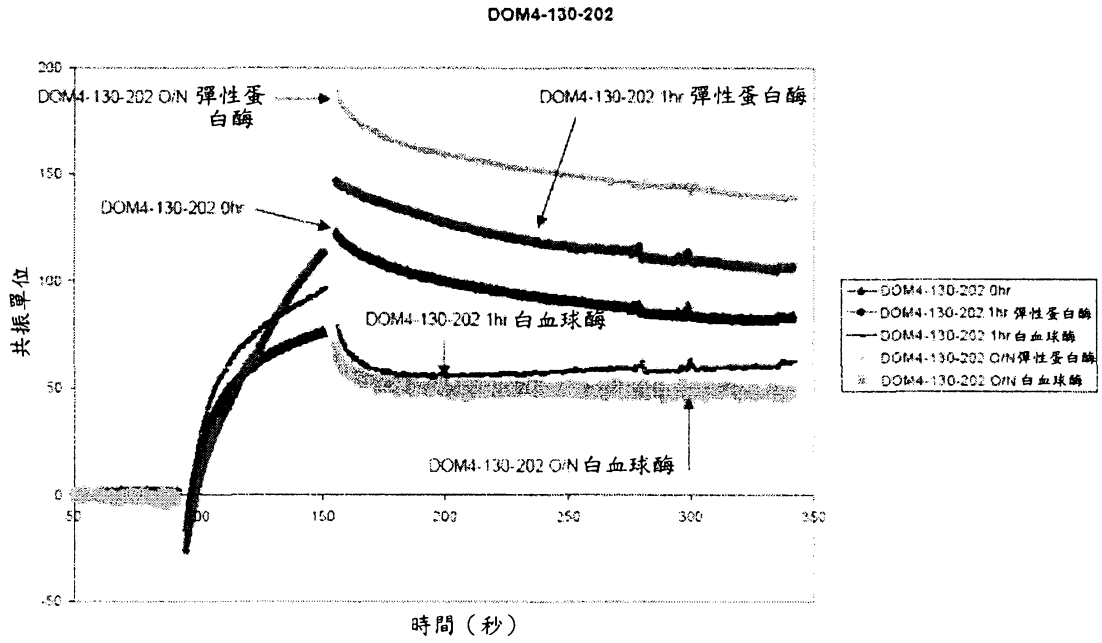

DOM4-130-202
DOM4-130-202 O/N 彈性蛋白酶
DOM4-130-202 1hr 彈性蛋白酶
DOM4-130-202 0hr
DOM4-130-202 1hr 白血球酶
DOM4-130-202 O/N 白血球酶
共振單位
時間（秒）
DOM4-130-202 0hr
DOM4-130-202 1hr 彈性蛋白酶
DOM4-130-202 1hr 白血球酶
DOM4-130-202 O/N彈性蛋白酶
DOM4-130-202 O/N 白血球酶

圖11C

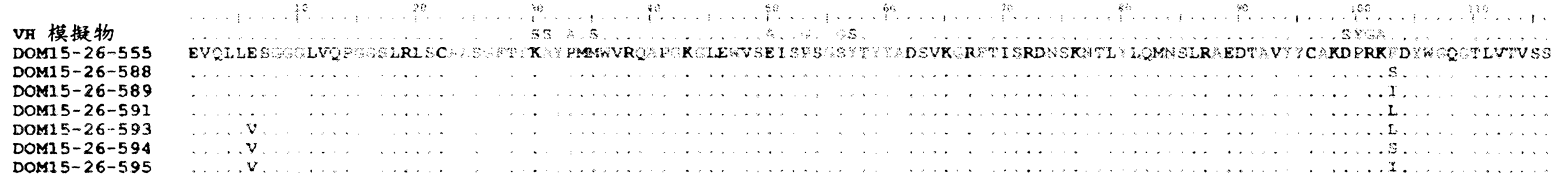

VH 模擬物
DOM15-26-555 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC
DOM15-26-588
DOM15-26-589
DOM15-26-591
DOM15-26-593
DOM15-26-594
DOM15-26-595

圖12

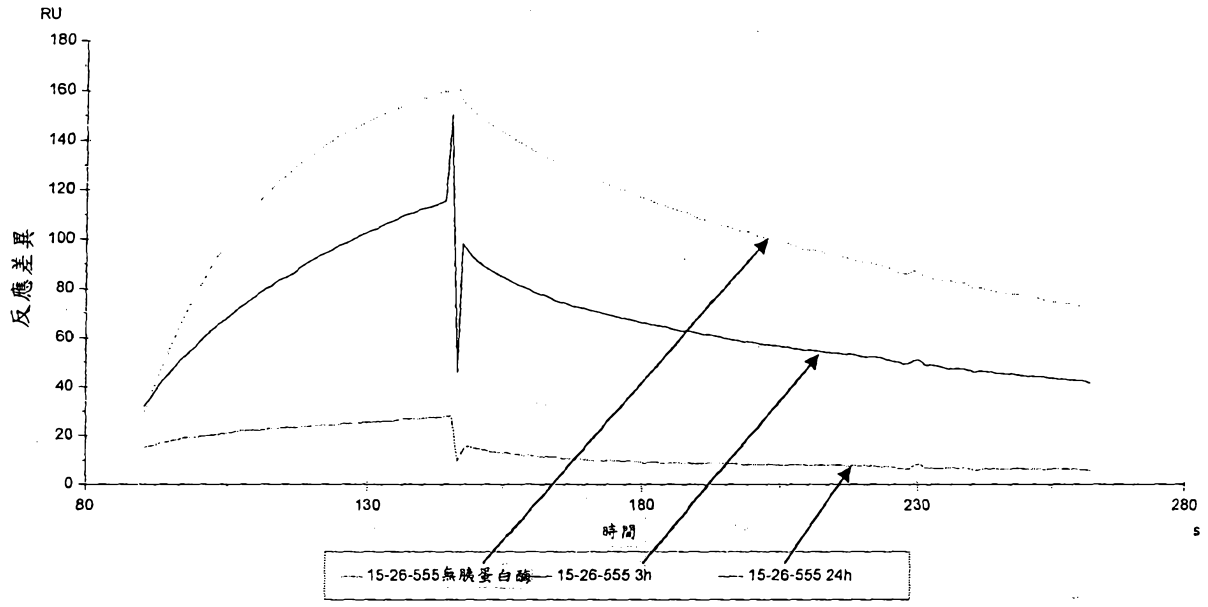

RU
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
反應差異
80
130
180
230
280
s
時間
15-26-555無胰蛋白酶
15-26-555 3h
15-26-555 24h

圖13A

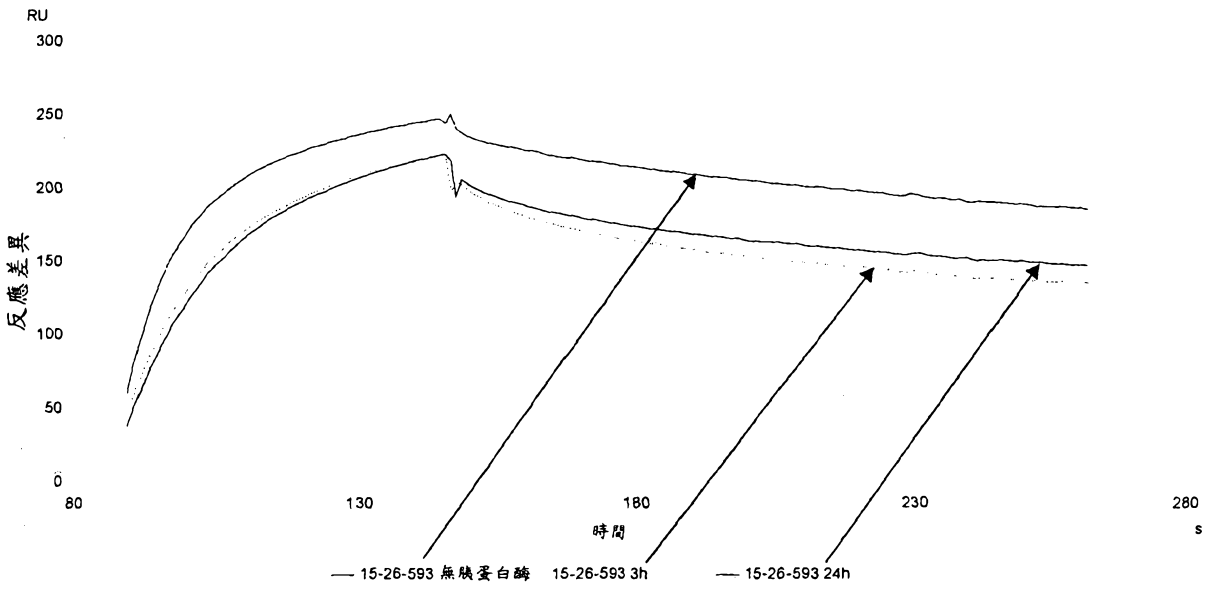

RU
300
250
200
150
100
50
0
反應差異
80
130
180
230
280
s
時間
15-26-593 無胰蛋白酶
15-26-593 3h
15-26-593 24h

圖13B

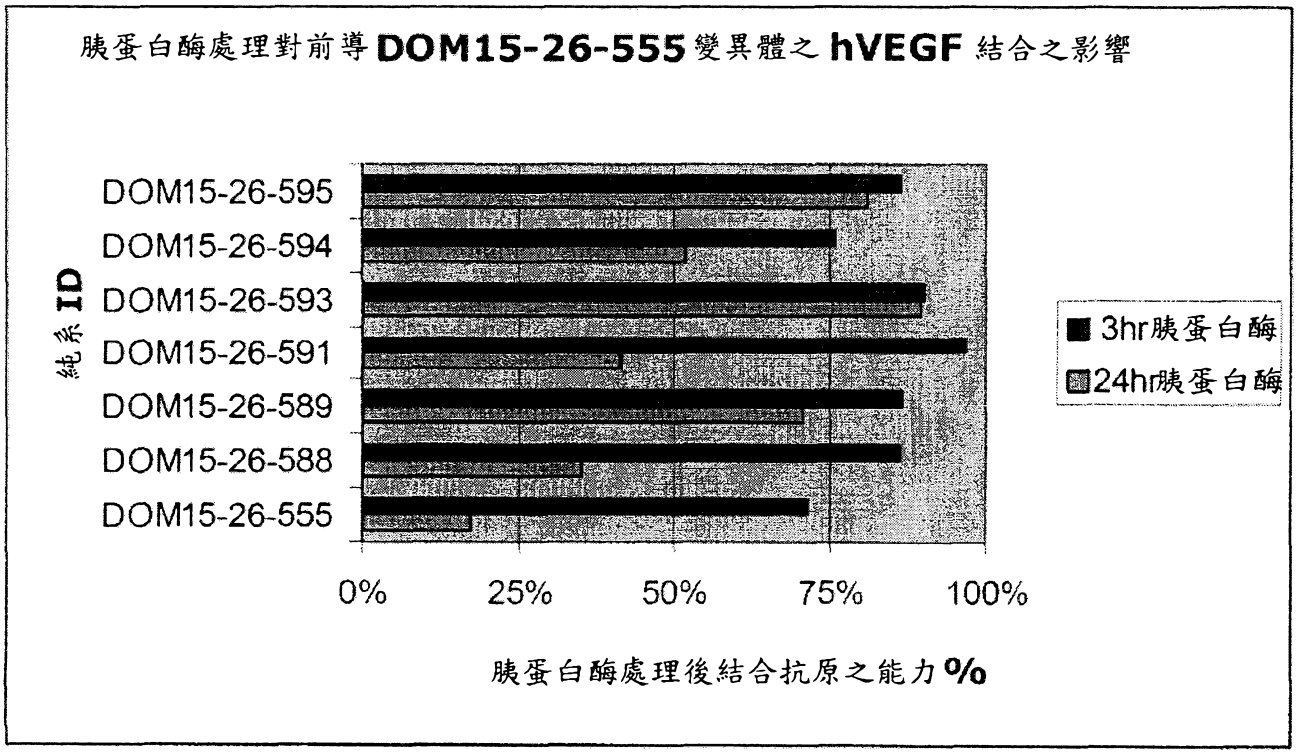

胰蛋白酶處理對前導DOM15-26-555變異體之hVEGF結合之影響
DOM15-26-595
DOM15-26-594
DOM15-26-593
DOM15-26-591
DOM15-26-589
DOM15-26-588
DOM15-26-555
純系ID
0%
25%
50%
75%
100%
胰蛋白酶處理後結合抗原之能力%
3hr胰蛋白酶
24hr胰蛋白酶

圖14

```
VK模板物      .....B.SSV.N.....AA.S.....SYST.N.....K.
DOM15-10 4G   DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQWIGPELSWYQQKPGKAPKLLIYHTSILQSGVPSRFSSSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYMEQPRTFGQGTKVEIRR
DOM15-10-11   .....R.....M.....G
```

圖16

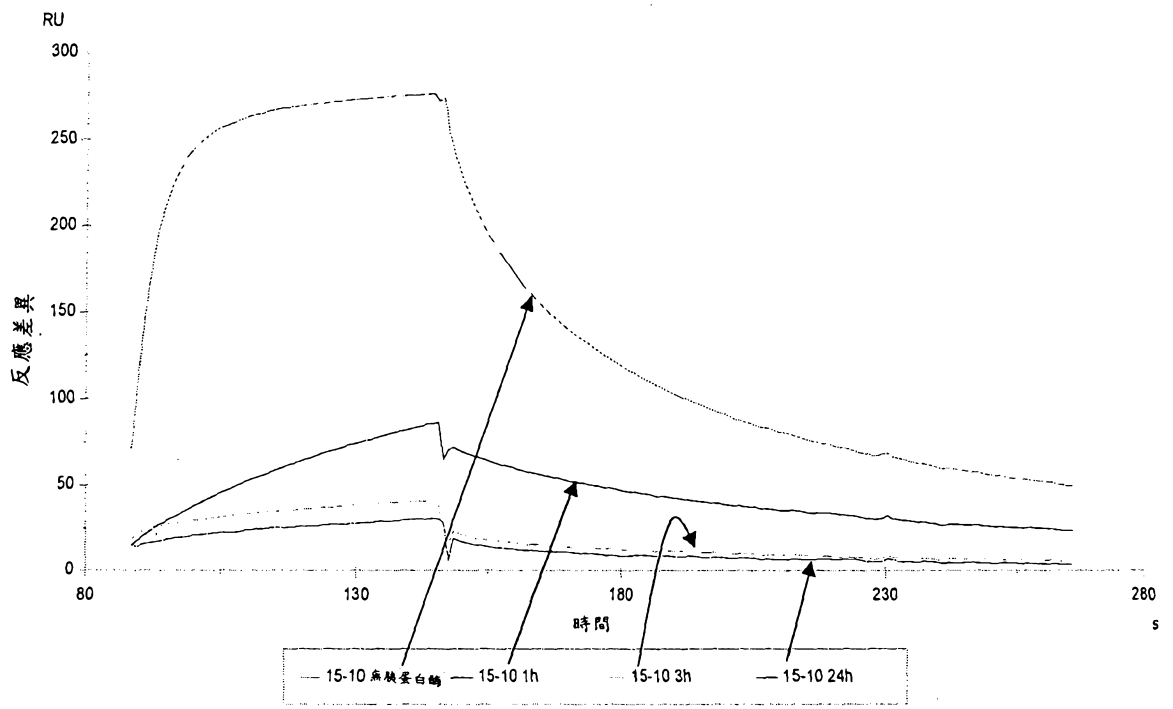

RU
300
250
200
150
100
50
0
反應差異
80
130
180
230
280
時間
s
15-10 無膜蛋白酶
15-10 1h
15-10 3h
15-10 24h

圖17A

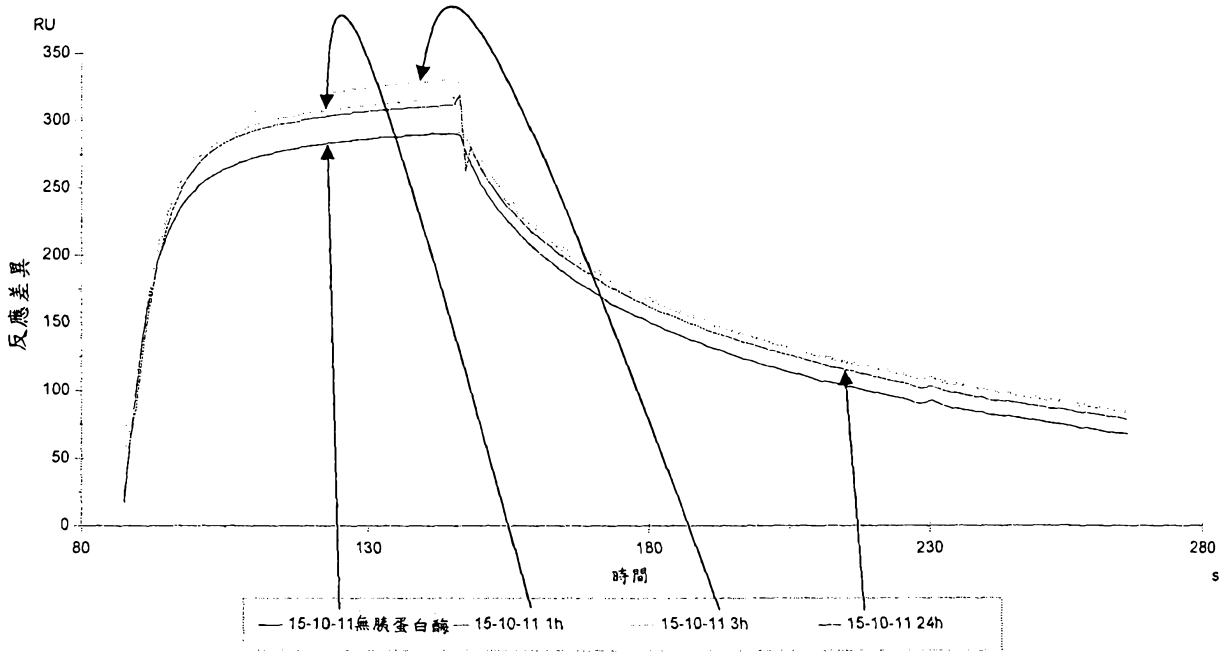

RU
350
300
250
200
150
100
50
0
反應差異
80
130
180
230
280
時間
s
15-10-11無膜蛋白酶
15-10-11 1h
15-10-11 3h
15-10-11 24h

圖17B

DOM1h-131-511 衍生序列

>1-1

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCATGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>1-2

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCGCCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGG
AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGAGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>1-3

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCAACTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>DOM1h-131-201

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACGATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

圖19A

>1-5
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTATGCAGACTCCGTG
AAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAACCT
GCGCGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTGAC
TACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG
>1-6
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCCCCAGGG
AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCCGGCTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCG
TGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAGCACGCTATATCTGCAAATGAACGG
CCTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTT
GACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG
>1-7
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCTGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCCGGCTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG
>DOM1h-131-202
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCCCCAGGG
AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCCGGACGGTCAAGATCCCTTCTACGCAGACTCCG
TGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

圖19B

>DOM1h-131-203
GAGGTGCAGCTGTGGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGATTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG
>DOM1h-131-204
GAGGTGCAGCTGTCGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCCAGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAATAGGGGGCCTTGGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG
>DOM1h-131-205
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCAGGTCACCGTCTCGAGCG
>1-12
GAGGTGCGGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTACAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGAGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAGATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTGTATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGAGGGCCTTGGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCAGGTCACCGTCTCGAGCG

圖19C

>1-13
GAGGTGCGGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGAGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCCGGATAGCCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGGGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
ACTACAGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG
>1-14
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCACCATTGCGCATGAAACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
ACTACCGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG
>1-15
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCTCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGTG
AAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGCCT
GCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCGGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTGAC
TACTGGGGTCAGGGAACCTTGGTCACCGTCTCGAGCG
>DOM1h-131-206
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCACCAGGG
AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCG
TGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATCACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

圖19D

>1-18
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCGGGCTCCAGGG
AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCG
TGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC
>1-19
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCACCGGATTCACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGG
AGGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCG
TGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC
>1-20
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
GGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCTCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTCG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC
>1-21
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAAGGGGCCTTGGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

圖19E

>1-22
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGCGTGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGG
AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC
>1-23
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGCAAGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGG
AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAAGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCGGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC
>1-24
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCTTCCGGATTCACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAAGGGGCCTTGGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC
>1-25
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCCGGCTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCGGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

圖19F

DOM4-130-54衍生序列

>4-1

GACATCCTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCATCACTT
GCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGGCCCCT
AAGCTCCTGATCAATCTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGA
TATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATGTCGCTACGTACTACTGT
CAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG

>4-2

GACATCCTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCATCACTT
GCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCT
AAGCTCCTGATCAATTTTGGCTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGCGGA
TATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTCGCTACGTACTACTGT
CAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCGGCCAGGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG

>4-3

GACATCCAGACGACCCAGTCTCCGTCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCAGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC
TAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTCGCTACGTACTACTG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG

>4-4

GACATCCAGGTGACCCAGTCTCCATCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC
TAAGCTCCTGATCAACTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTCGCTACGTACTACTG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCGGCCGAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG

>4-5

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTTCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCATCACTT
GCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCAGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCT
AAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGA
TACGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATATCGCTACGTACTACTGT
CAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTTGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAGGGG

圖19G

>4-6

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCGGCATCTGAAGGAGACCGTGTCACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCAGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC
TAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGACTTCGCTACGTACTACTG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG

>4-7

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCGTCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC
TAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAGCCTGAAGATTTCGCTACGTACTACTG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG

>4-8

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGGATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC
TAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCGGTCTGCAACCTGAAGATTTCGCTACGTACTACTG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCGGCCGAGGGACCAGGGTGGAAATCAAACGGG

>4-9

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC
TAAGCTCCTGATCAGTTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTCGCTACGTACTACTG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTACACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG

>DOM4-130-201

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC
TAAGCTCCTGATCAAATTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATCTGCAACCTGAAGATTTCGCTACGTACTACTG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAATGGG

圖19H

>4-11
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC
TAAGCTCCTGATCATTTATGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCACCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTCCGCTACGTACTACTG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG
>4-12
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATATACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC
TAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCACCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTCGCTACGTACTACTG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACAGG
>4-13
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC
TAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTCGCTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTCCGCTACGTACTACTG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCATATACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACAGG
>4-14
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACTATCACTT
GCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCT
AAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGA
TATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATGTCGCTACGTACTACTGT
CAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG
>4-15
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC
TAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGACTTCGCTACGTACTACTG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCATATACGTTTGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACAGG

圖19I

>4-16
GACATCCAAATGGCCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCATCAC
TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTGGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
CCTAAGCTCCTGATCAGTTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTCCGCTACGTACT
ACTGTCAGCCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACAG
G
>4-17
GACATCCAGATGACCCAGTCACCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCATCAC
TTGCCGGGCAAGTCAGGACATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
CCTAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTCGCTACGTACT
ACTGTCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG
G
>4-18
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCGTCTGTAGGAGACCGTGTCACCATCAC
TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
CCTAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATATGGGACAGATTTCACACTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTCGCTACGTACT
ACTGTCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACTG
>4-19
GACATCCAGATAACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCATCAC
TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
CCTAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTCGCTACGTACT
ACTGTCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACCG
>4-20
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCATCAC
TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
CCTAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTCGCTACGTACT
ACTGTCAACCGTCTTTTTACTACCCTTATACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACAG

圖19J

>DOM4-130-202
GACATCCAGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCATCTC
TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
CCTAAGCTCCTGATCAGTTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTTCCTTCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAGCCTGAAGATTCCGCTACGTACT
ACTGTCAACCGTCTTTTTACTACCCTTATACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG
>4-22
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCATCAC
TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
CCTAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTCGCTACGTACT
ACTGTCAACCGTCTTTTTACTACCCTTATACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG
>4-23
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCATCAC
TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
CCTAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGAGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTCCGCTACGTACT
ACTGTCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAATCGG
>4-24
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATATGTAGGAGACCGTGTCACCATCAC
TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
CCTAAGCTCCTGATCAGTTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTCGGTACGTACT
ACTGTCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG
>4-25
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCATCAC
TTGTCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
CCTAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTCGGTACGTACT
ACTGTCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

圖19K

>4-26

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCGTCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCTTGTCACCATCAC
TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
CCTAAGCTCCTGATCAATTTAGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTCGCTACGTACT
ACTGTCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGT

>4-27

GACATCCTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCATCAC
TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGGCC
CCTAAGCTCCTGATCAATCTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATGTCGCTACGTACT
ACTGTCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

圖19L

>DOM15-26-555
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTCGCCTTCGGGTTCTTATACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
CGGAAGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC
>DOM15-26-576
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCCAGAGTGGGTCTCAGAGATTTCGCCTTCGGGTTCTTATACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGTGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
CGGAAGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC
>DOM15-26-578
GAGGTGCAGCTGTTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCCAGAGTGGGTCTCAGAGATTTCGCCTTCGGGTTCTTATACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACGCGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCAGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
CGGAAGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAGCCCTGGTCACCGTCTCGAGC
>DOM15-26-579
GAGGTGCAGCTGTTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGATCTCAGAGATTTCGCCTTCGGGTTCTTATACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCAAAAGATCCT
CGGAAGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC
>DOM15-26-580
GAGGTGCAGCTGCTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTCGCCTTCGGGTTCATATACATACTAT
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
CGGAAGTTTGAATACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC
>DOM15-26-581
GAGGTGCAGCTGTTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTCGCCTTCGGGTTCTTATACATACTAC
GCGGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAATGATCCT
CGGAAGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC
>DOM15-26-582
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACATTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTCGCCTTCGGGTTCTTATACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACGGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAACGATCCT
CGGAAGATTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

圖20A

>DOM15-26-583
GAGGTGCAGCTGTTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTCGCCTTCGGGTTCTTATACATACTAC
GCATACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCATGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
CGGAAGTTAGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC
>DOM15-26-584
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCAGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCTGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGAGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTCGCCTTCGGGTTCTTATACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACAATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
CGGAAGATTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC
>DOM15-26-585
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTCGCCTTCGGGTTCTTATACATACTAC
GCAGAGTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTACGAAAGATCCT
CGGAAGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC
>DOM15-26-586
GAGGTGCAGTTGTTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTCGCCTTCGGGTTCTTATACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATTTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
CGGAAGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC
>DOM15-26-587
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTCGCCTTCGGGTTCTTATACATACTAC
GCAAACTCCGTGAAGGGTCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
CGGAAGATTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC
>DOM15-26-588
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTCGCCTTCGGGTTCTTATACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
CGGAAGTCTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC
>DOM15-26-589
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATCTCGCCTTCGGGTTCTTATACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
CGGAAGATTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

圖20B

>DOM15-26-590
GAGGTGCATCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTCGCCTTCGGGTTCTTATACATACTAC
GCAAACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
CGGAAGATTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC
>DOM15-26-591
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTCGCCTTCGGGTTCTTATACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
CGGAAGTTAGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC
>DOM15-26-592
GAGGTGCAGCTGTTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTCGCCTTCGGGTTCTTATACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTACGAAAGATCCT
CGGAAGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC
>DOM15-26-593
GAGGTGCAGCTGTTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTTTCAGAGATTTCGCCTTCGGGTTCTTATACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
CGGAAGTTAGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC
>DOM15-10
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAGGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAGACGG
>DOM15-10-1
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATCATTCGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTGAGCCTAGGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAGACAG
>DOM15-10-2
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACC
ATCACTTGTCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGATGGTACCAGAAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAGGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAGACGG

圖20C

>DOM15-10-3
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCACCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTAGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAAGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAGATGG
>DOM15-10-4
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCTGAGTTAAGATGGTACCAGAAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATATGGGACAGATTTCACTTTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAGGACGTTCGGCCCA
GGGACCAAGGTGGAAATTAGACGG
>DOM15-10-5
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCGAAGTGGGGTCCCATCT
CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAGGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAGATGG
>DOM15-10-6
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATCATACGTCCATTTTACAGAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GCAGATTTTGCAACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAGGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAGACAG
>DOM15-10-7
GACATCCAGATGACCCAGTCCCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTTGGCCTAGGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAGACAA
>DOM15-10-8
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCCGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACTT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCTGCCTAGGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAGAGGG
>DOM15-10-9
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGTTCCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAACAGTCTGCAACCT
GGAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAGGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAGACGG

圖20D

>DOM15-10-10
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTATCAGCCTAGGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAGACAG
>DOM15-10-11
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGATGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTATGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAGAGGG
>DOM15-10-12
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGATGGTACCAGAAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAAGCT
GAAGATTCTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAGGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAACCAGACGG
>DOM15-10-13
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGAAGGAGACCGTGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
CGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTATGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAGACGG
>DOM15-10-14
GACATCCTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTACGTTGGTACCAGCATAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATATGGGACAGATTTCACTCTCTCCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTCGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAGGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAGATGG
>DOM15-10-15
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCAAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCAAGGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAGGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTTGGCCTAGGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAGACAG
>DOM15-10-16
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTACGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTATGACGTTCGGCCAA

圖20E

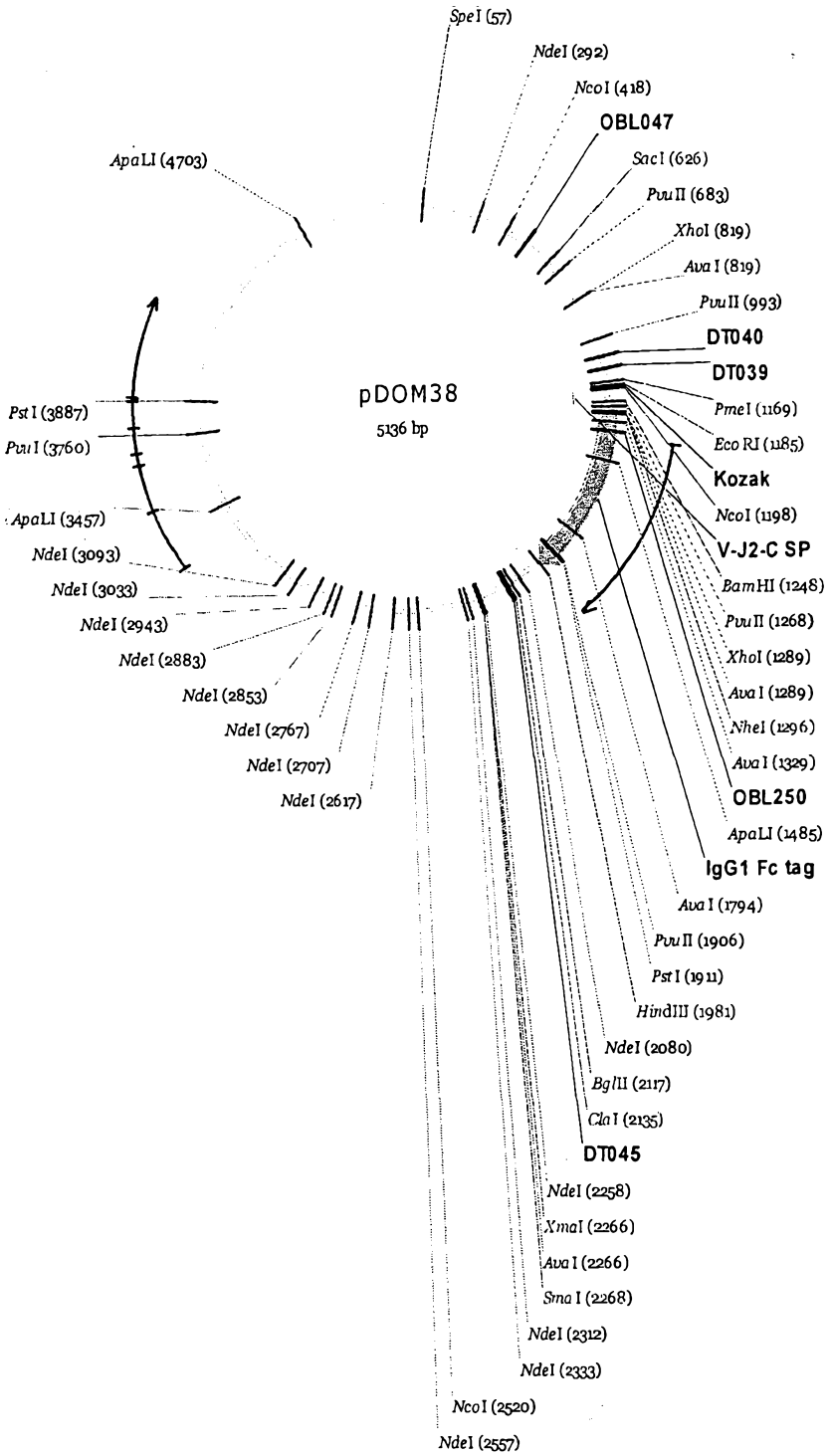

pDOM38
5136 bp
SpeI (57)
NdeI (292)
NcoI (418)
OBL047
SacI (626)
PvuII (683)
XhoI (819)
AvaI (819)
PvuII (993)
DT040
DT039
PmeI (1169)
Eco RI (1185)
Kozak
NcoI (1198)
V-J2-C SP
BamHI (1248)
PvuII (1268)
XhoI (1289)
AvaI (1289)
NheI (1296)
AvaI (1329)
OBL250
ApaLI (1485)
IgG1 Fc tag
AvaI (1794)
PvuII (1906)
PstI (1911)
HindIII (1981)
NdeI (2080)
BglII (2117)
ClaI (2135)
DT045
NdeI (2258)
XmaI (2266)
AvaI (2266)
SmaI (2268)
NdeI (2312)
NdeI (2333)
NcoI (2520)
NdeI (2557)
ApaLI (4703)
PstI (3887)
PvuI (3760)
ApaLI (3457)
NdeI (3093)
NdeI (3033)
NdeI (2943)
NdeI (2883)
NdeI (2853)
NdeI (2767)
NdeI (2707)
NdeI (2617)

圖21

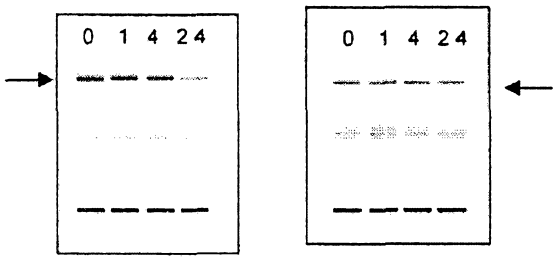


圖22

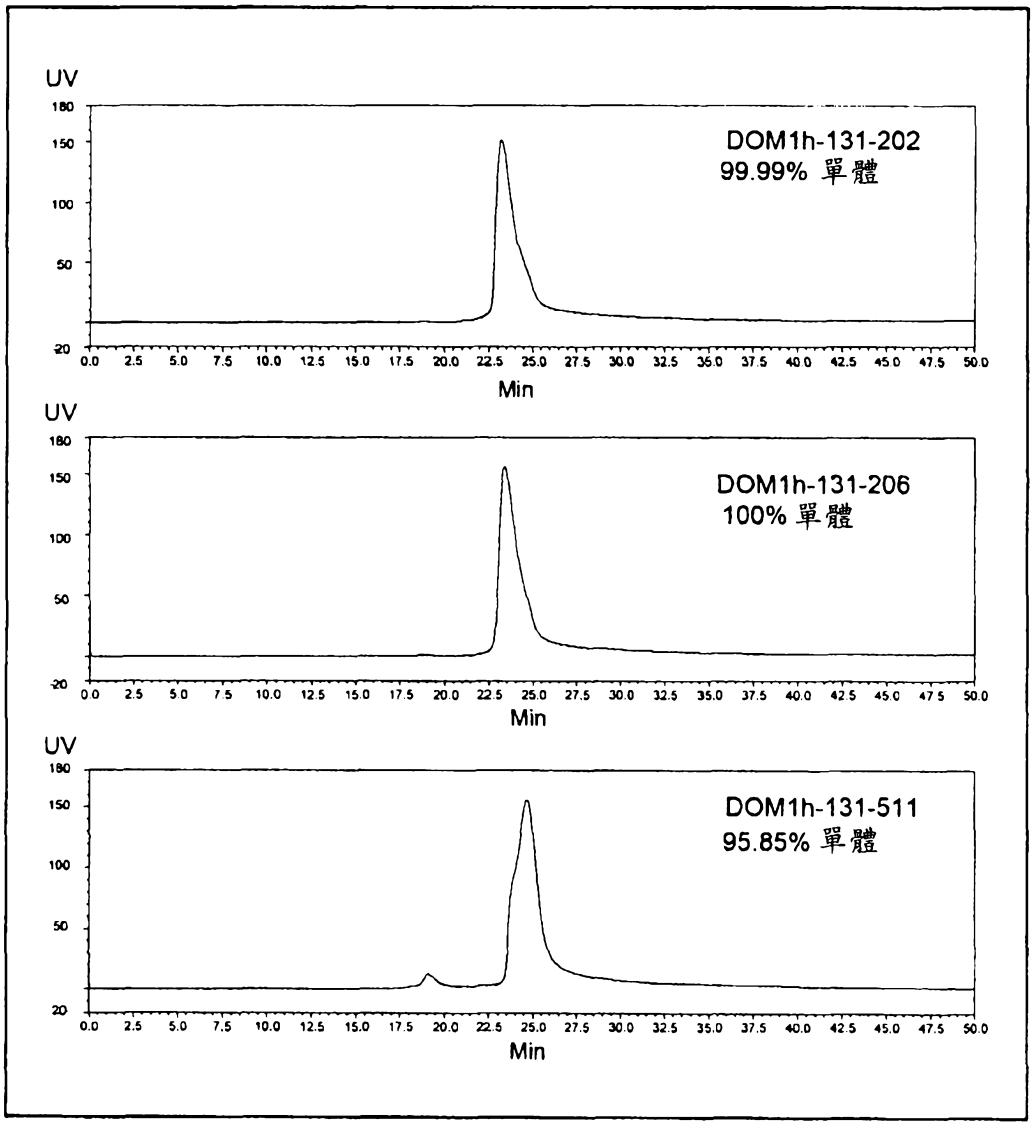

UV
DOM1h-131-202
99.99% 單體
Min
UV
DOM1h-131-206
100% 單體
Min
UV
DOM1h-131-511
95.85% 單體
Min

圖23

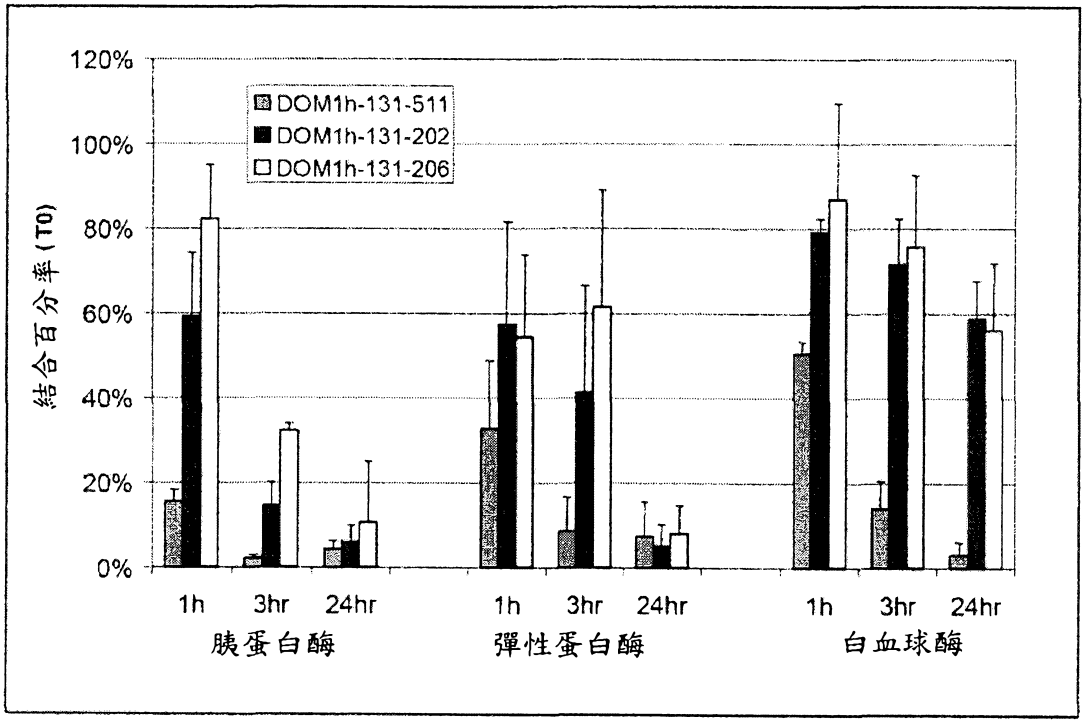

120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
結合百分率 (T0)
DOM1h-131-511
DOM1h-131-202
DOM1h-131-206
1h
3hr
24hr
胰蛋白酶
彈性蛋白酶
白血球酶

圖24

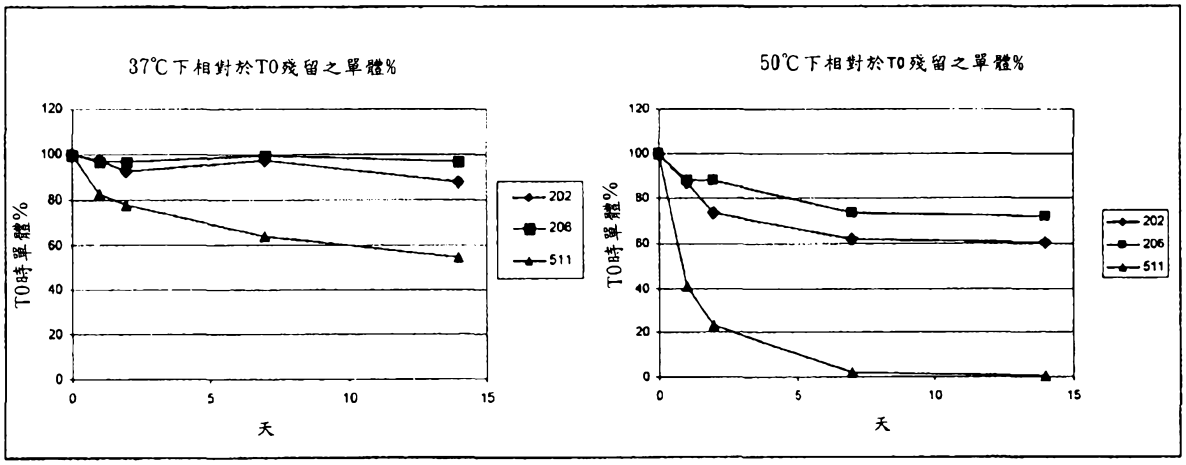

37℃下相對於T0殘留之單體%
T0時單體%
120
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
天
202
206
511
50℃下相對於T0殘留之單體%
T0時單體%
120
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
天
202
206
511

圖25

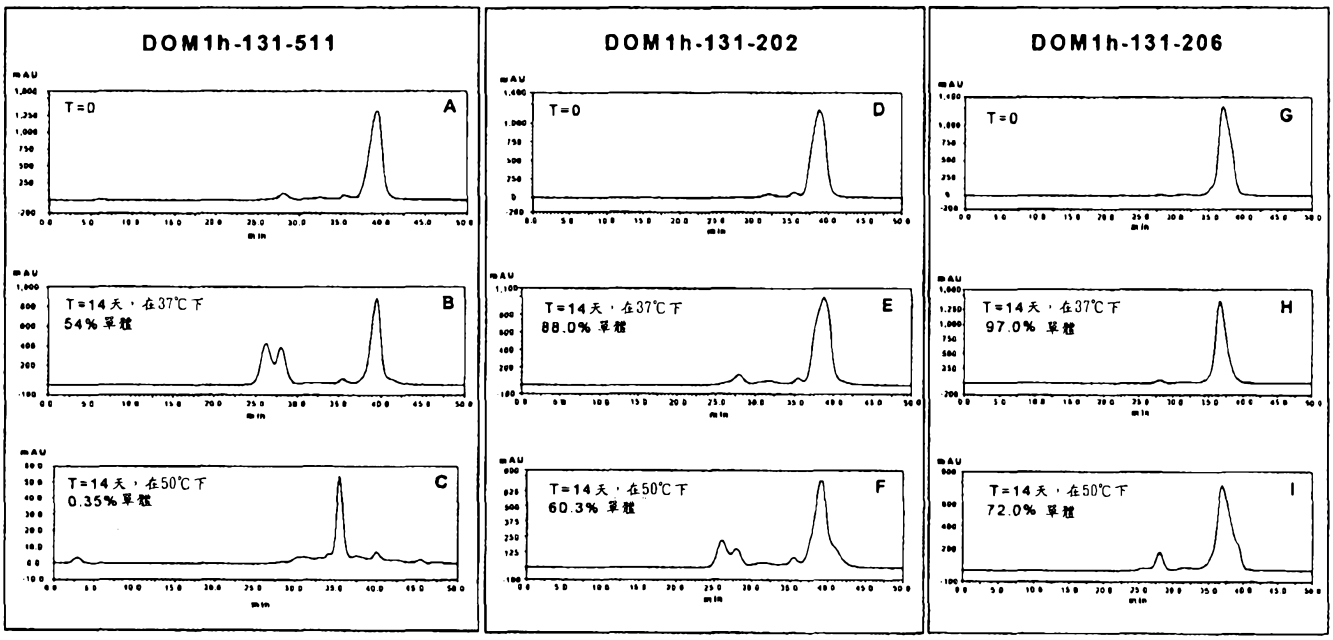

DOM1h-131-511
T=0
A
T=14天，在37℃下
54%單體
B
T=14天，在50℃下
0.35%單體
C
DOM1h-131-202
T=0
D
T=14天，在37℃下
88.0%單體
E
T=14天，在50℃下
60.3%單體
F
DOM1h-131-206
T=0
G
T=14天，在37℃下
97.0%單體
H
T=14天，在50℃下
72.0%單體
I

圖26

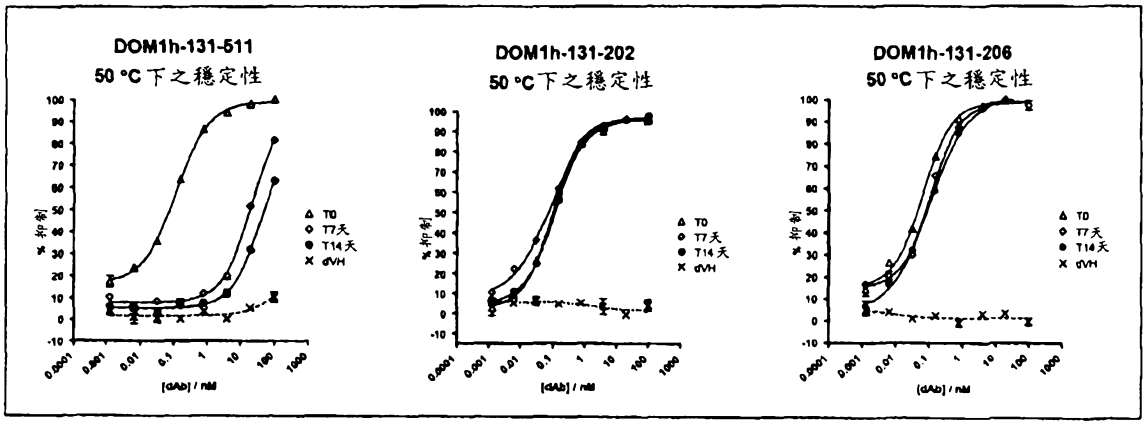

DOM1h-131-511
50 °C下之穩定性
DOM1h-131-202
50 °C下之穩定性
DOM1h-131-206
50 °C下之穩定性
% 抑制
[dAb] / nM
T0
T7天
T14天
dVH

圖28

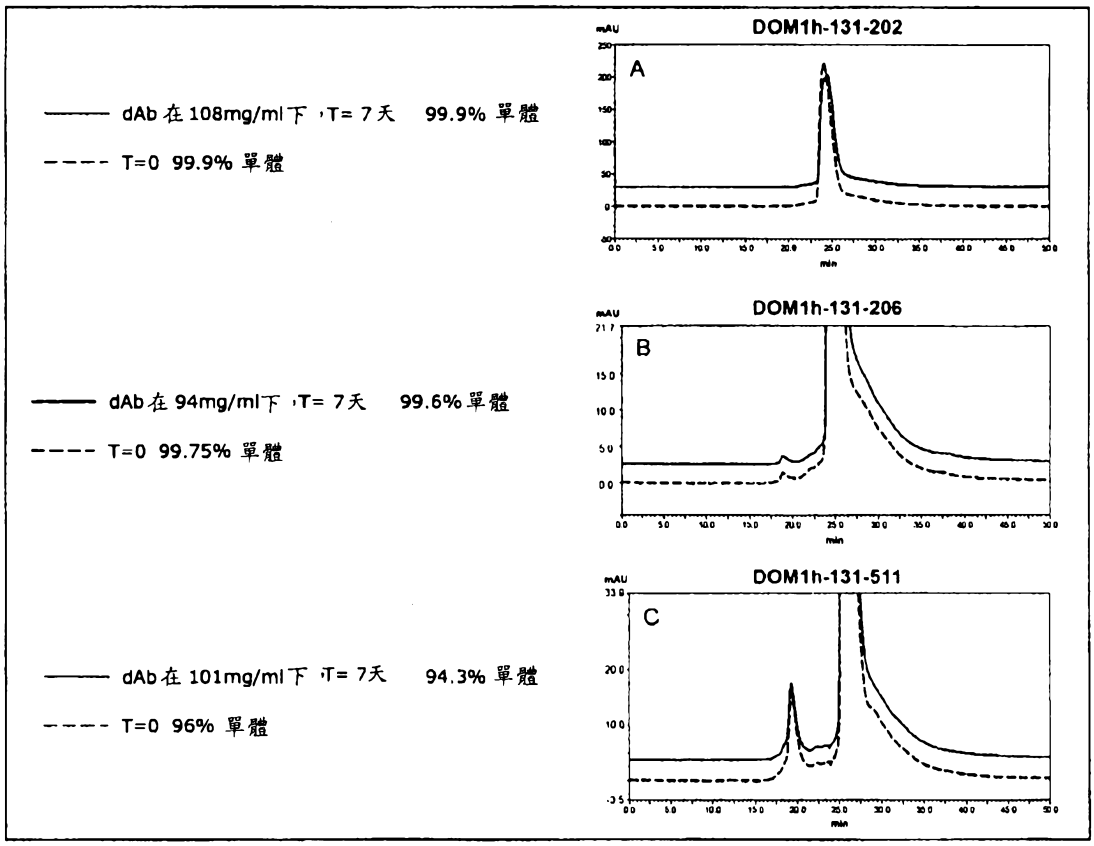

dAb 在 108mg/ml下 ,T= 7天 99.9% 單體
T=0 99.9% 單體
DOM1h-131-202
A
dAb在 94mg/ml下 ,T= 7天 99.6%單體
T=0 99.75% 單體
DOM1h-131-206
B
dAb在 101mg/ml下 ,T= 7天 94.3% 單體
T=0 96% 單體
DOM1h-131-511
C

圖29

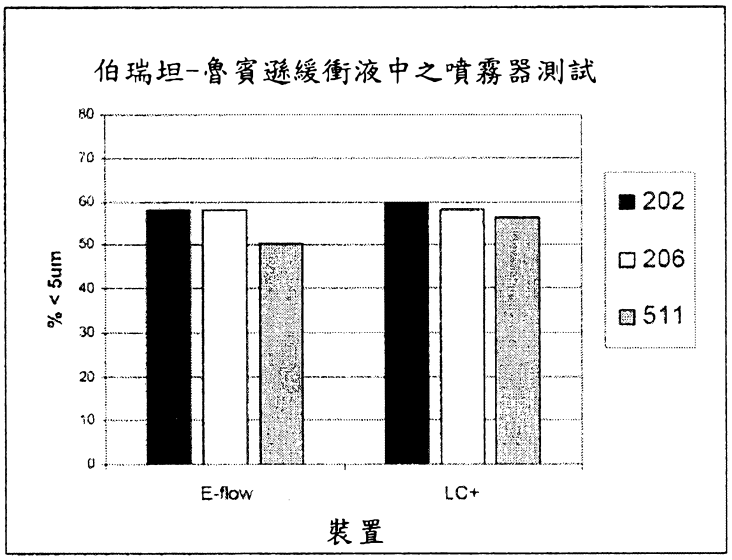

伯瑞坦-魯賓遜緩衝液中之噴霧器測試
80
70
60
50
40
30
20
10
0
% < 5um
202
206
511
E-flow
LC+
裝置

圖30

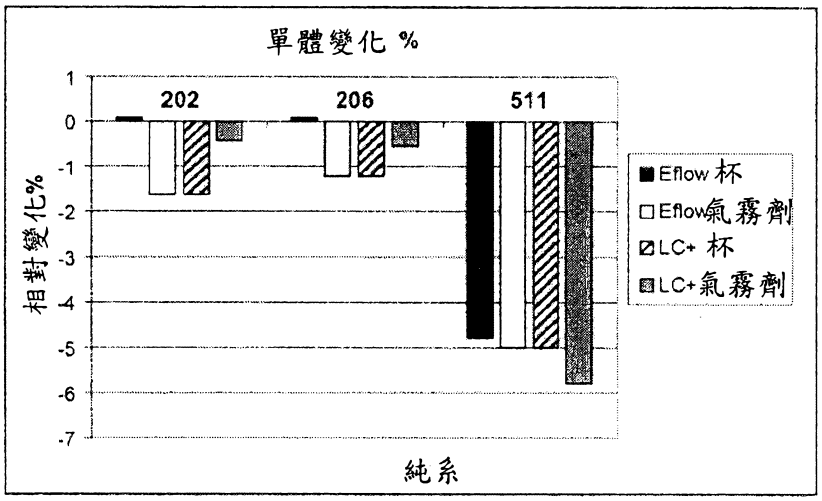

單體變化 %
1
0
-1
-2
-3
-4
-5
-6
-7
相對變化%
202
206
511
Eflow 杯
Eflow氣霧劑
LC+ 杯
LC+氣霧劑
純系

圖31

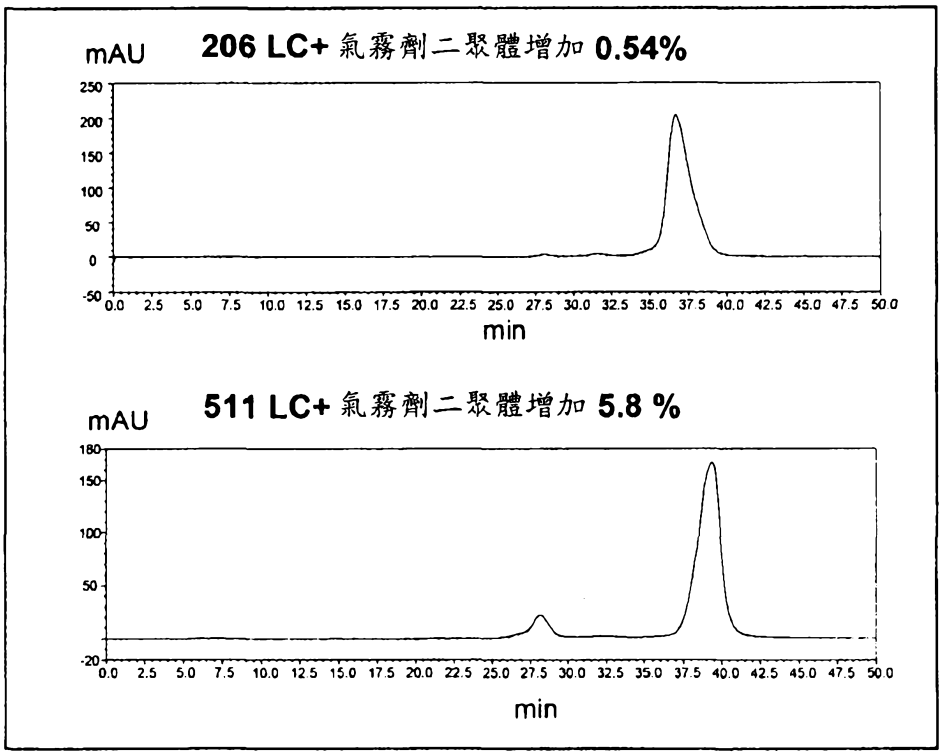

mAU
206 LC+ 氣霧劑二聚體增加 0.54%
250
200
150
100
50
0
-50
0.0 2.5 5.0 7.5 10.0 12.5 15.0 17.5 20.0 22.5 25.0 27.5 30.0 32.5 35.0 37.5 40.0 42.5 45.0 47.5 50.0
min
mAU
511 LC+ 氣霧劑二聚體增加 5.8 %
180
150
100
50
-20
0.0 2.5 5.0 7.5 10.0 12.5 15.0 17.5 20.0 22.5 25.0 27.5 30.0 32.5 35.0 37.5 40.0 42.5 45.0 47.5 50.0
min

圖32

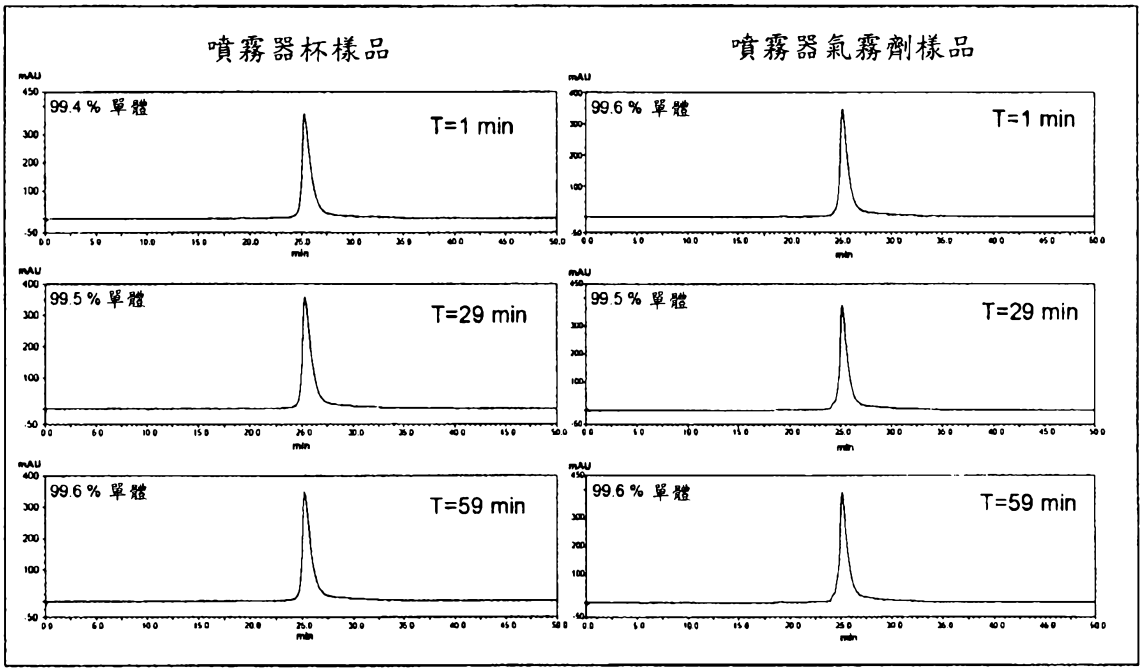

噴霧器杯樣品
噴霧器氣霧劑樣品
99.4 % 單體
T=1 min
99.6 % 單體
T=1 min
99.5 % 單體
T=29 min
99.5 % 單體
T=29 min
99.6 % 單體
T=59 min
99.6 % 單體
T=59 min

圖33

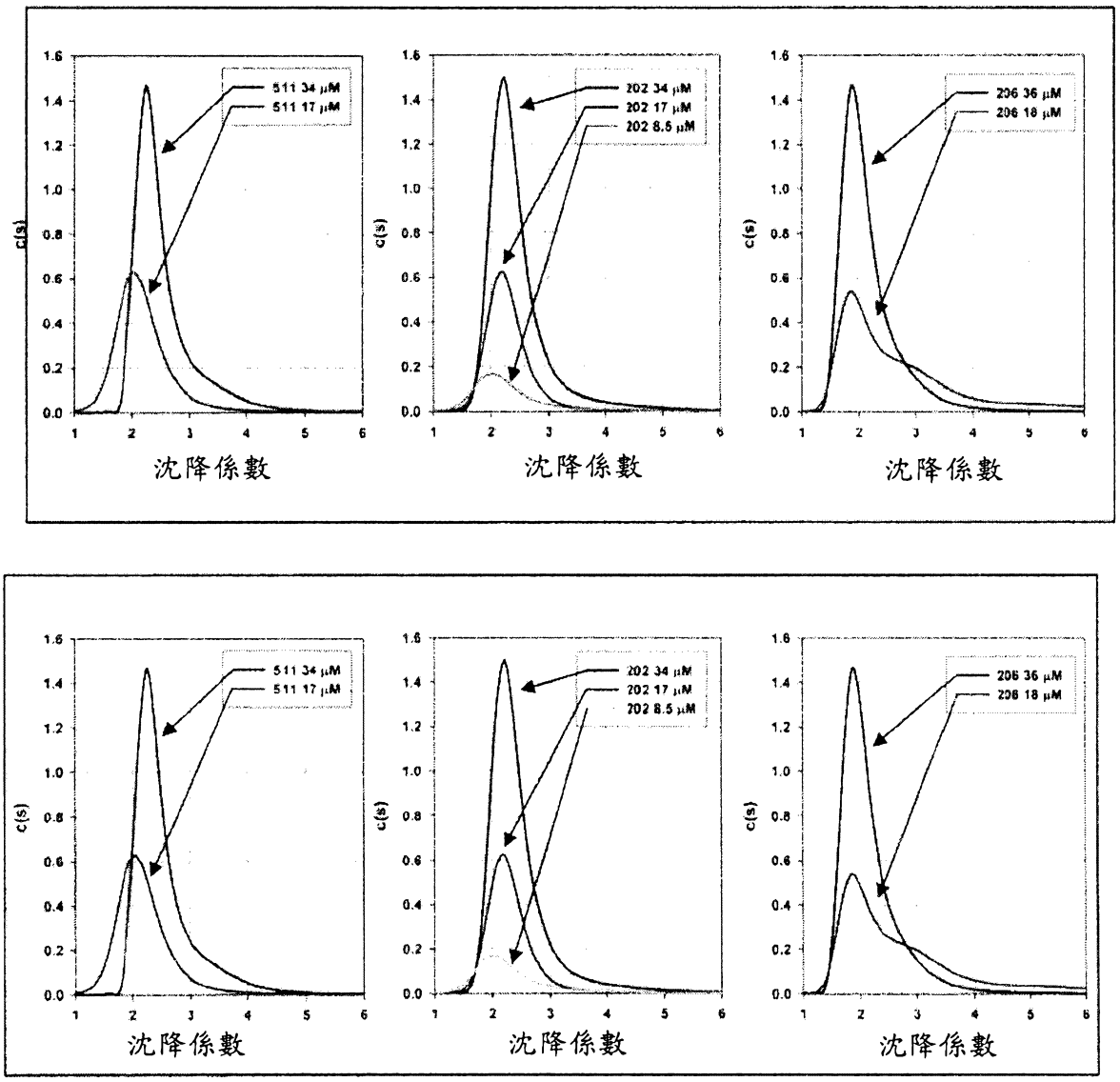

511 34 μM
511 17 μM
202 34 μM
202 17 μM
202 8.5 μM
206 36 μM
206 18 μM
c(s)
沈降係數

圖34

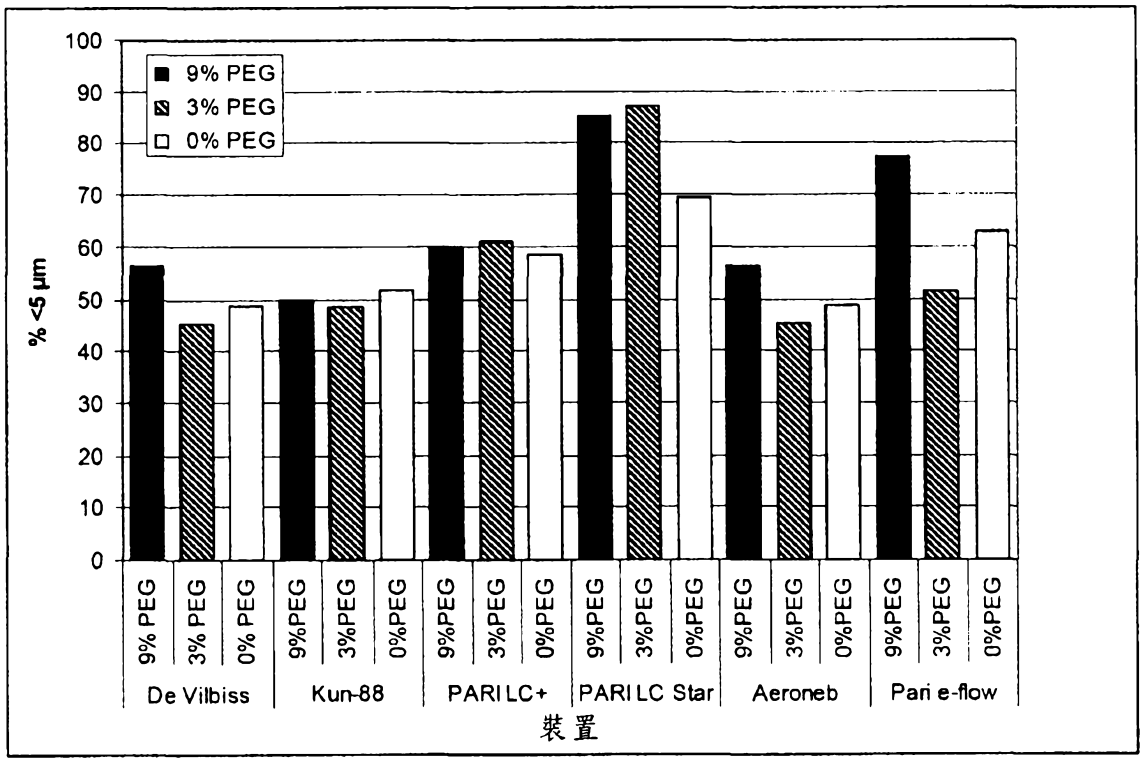
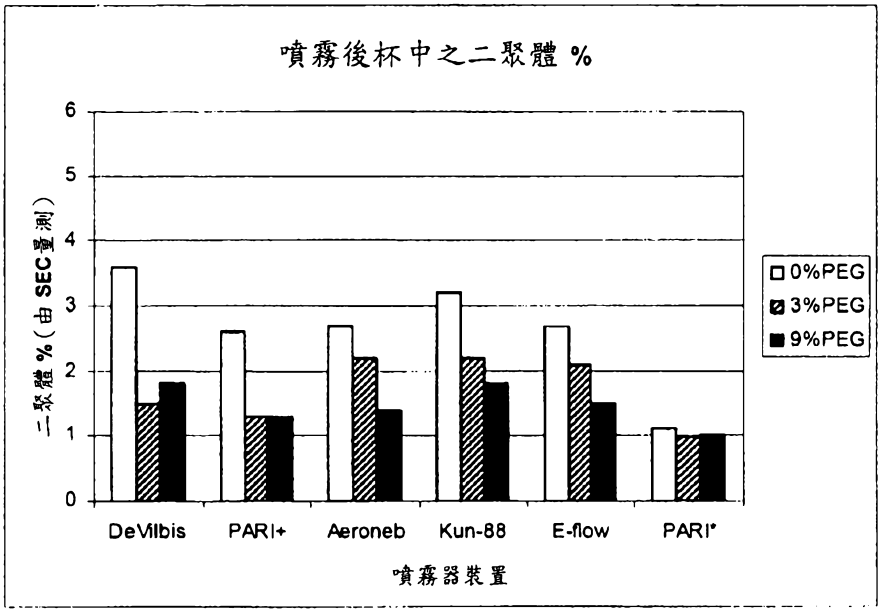

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
% <5 µm
9% PEG
3% PEG
0% PEG
9% PEG
3% PEG
0% PEG
9%PEG
3%PEG
0%PEG
9%PEG
3%PEG
0%PEG
9%PEG
3%PEG
0%PEG
9%PEG
3%PEG
0%PEG
9%PEG
3%PEG
0%PEG
De Vilbiss
Kun-88
PARI LC+
PARI LC Star
Aeroneb
Pari e-flow
裝置

圖35


噴霧後杯中之二聚體 %
二聚體 %（由 SEC量測）
0
1
2
3
4
5
6
DeVilbis
PARI+
Aeroneb
Kun-88
E-flow
PARI*
噴霧器裝置
0%PEG
3%PEG
9%PEG

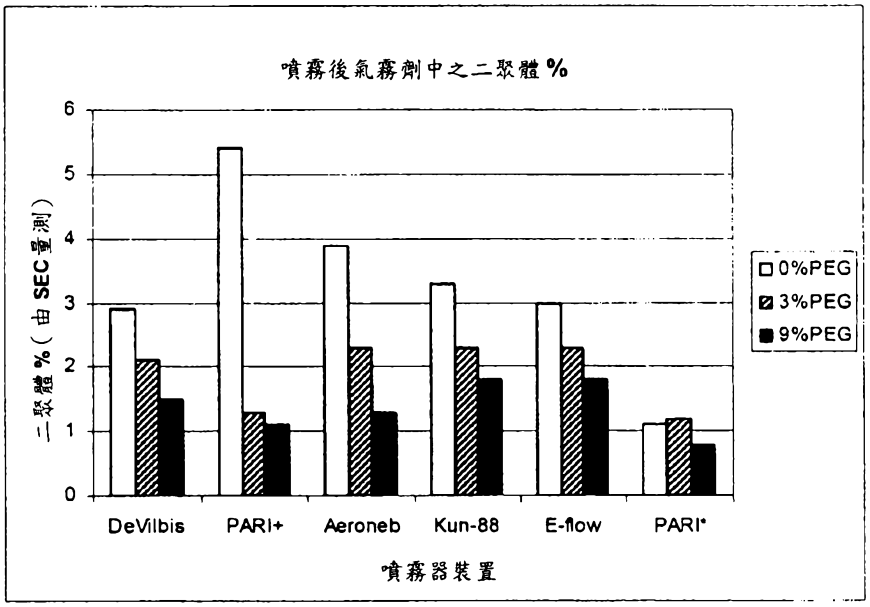
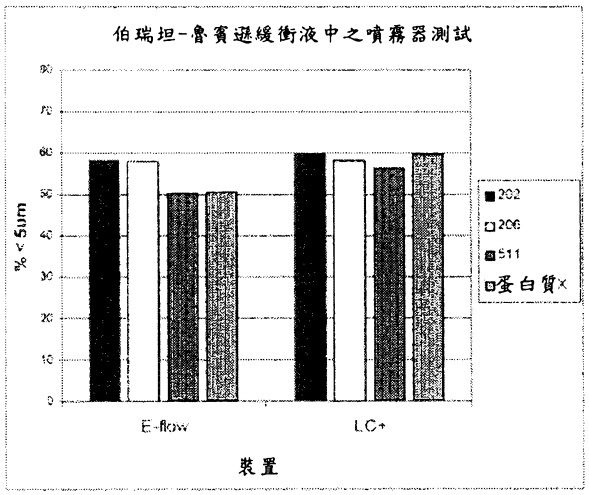

噴霧後氣霧劑中之二聚體 %
二聚體 %（由 SEC量測）
0
1
2
3
4
5
6
DeVilbis
PARI+
Aeroneb
Kun-88
E-flow
PARI*
噴霧器裝置
0%PEG
3%PEG
9%PEG

圖36

A


伯瑞坦-魯賓遜緩衝液中之噴霧器測試
% < 5um
E-flow
LC+
裝置
202
206
511
蛋白質X

B

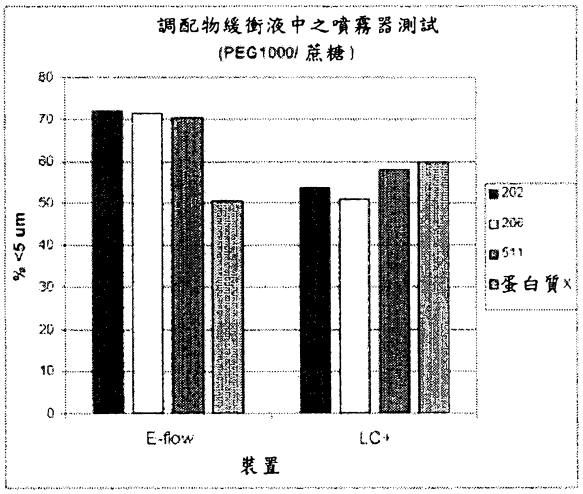

調配物緩衝液中之噴霧器測試
(PEG1000/ 蔗糖)
% <5 um
E-flow
LC+
裝置
202
206
511
蛋白質X

圖37

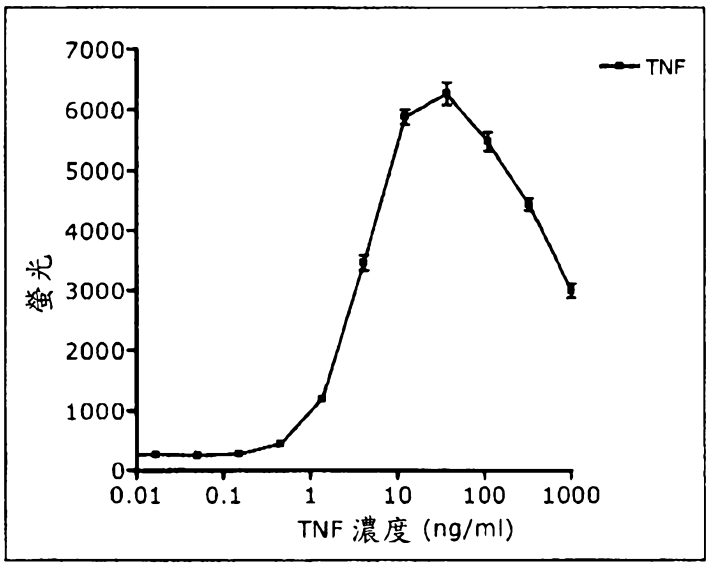

7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
螢光
TNF
0.01
0.1
1
10
100
1000
TNF 濃度 (ng/ml)

圖38

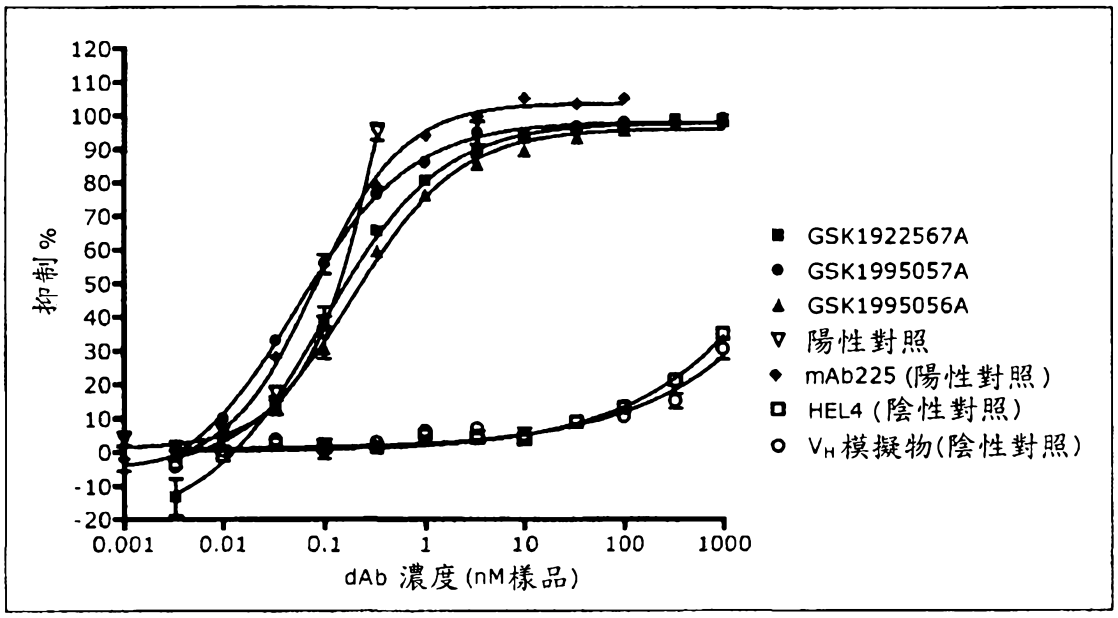

120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
-20
抑制 %
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
dAb 濃度 (nM樣品)
GSK1922567A
GSK1995057A
GSK1995056A
陽性對照
mAb225 (陽性對照)
HEL4 (陰性對照)
V_H 模擬物(陰性對照)

圖39

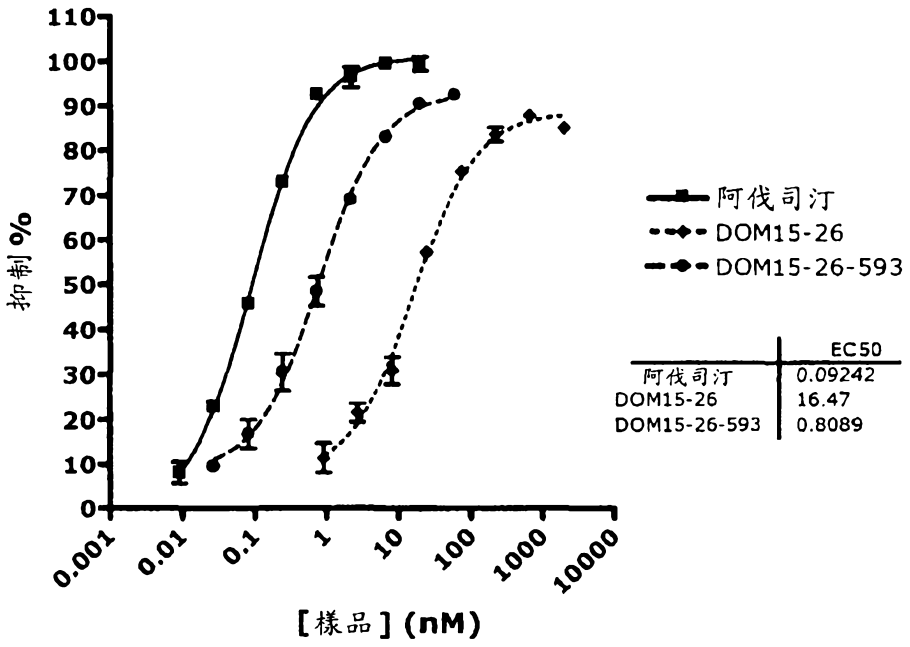

110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
抑制 %
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
[樣品] (nM)
阿伐司汀
DOM15-26
DOM15-26-593
EC50
阿伐司汀 0.09242
DOM15-26 16.47
DOM15-26-593 0.8089

圖40

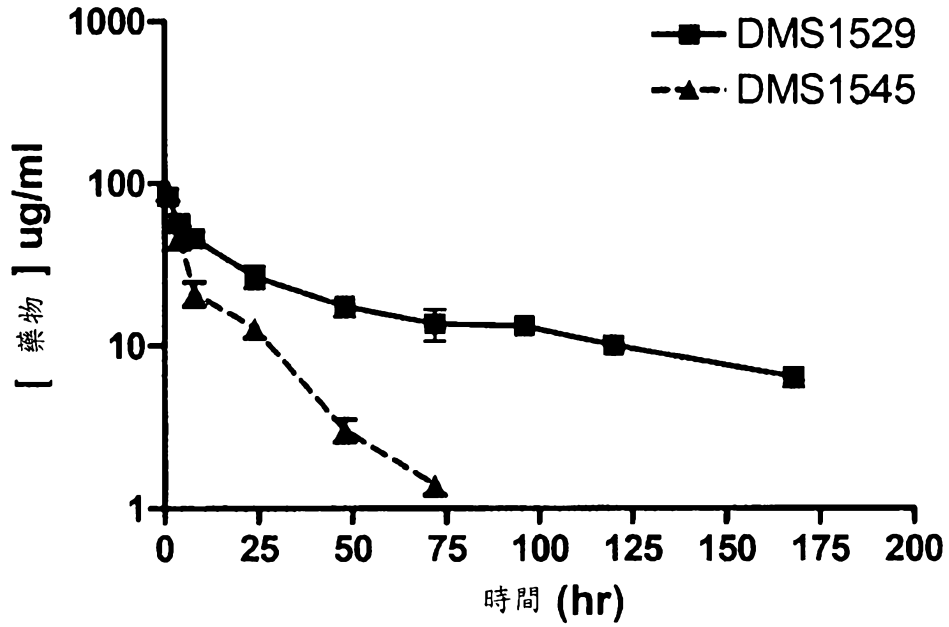

1000
100
10
1
[藥物] ug/ml
0
25
50
75
100
125
150
175
200
時間 (hr)
DMS1529
DMS1545

圖41

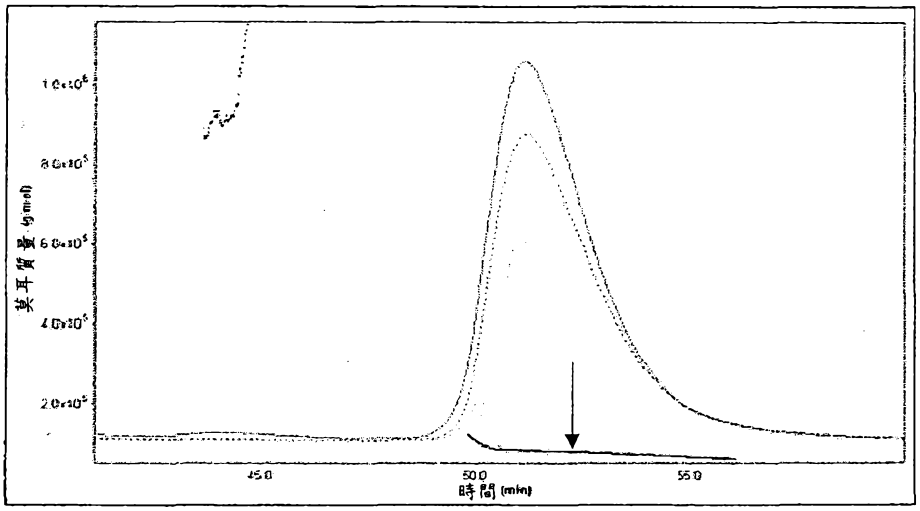


圖42a

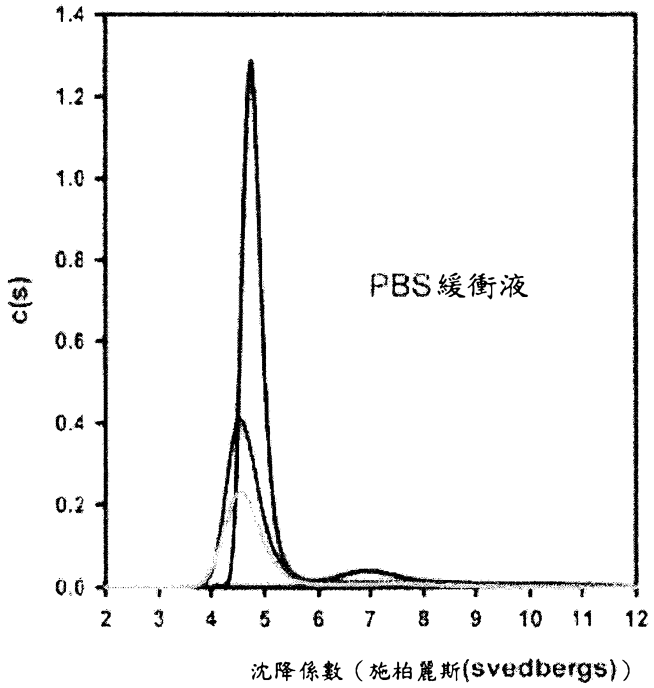

1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
c(s)
PBS緩衝液
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
沈降係數（施柏麗斯(svedbergs)）

圖42b

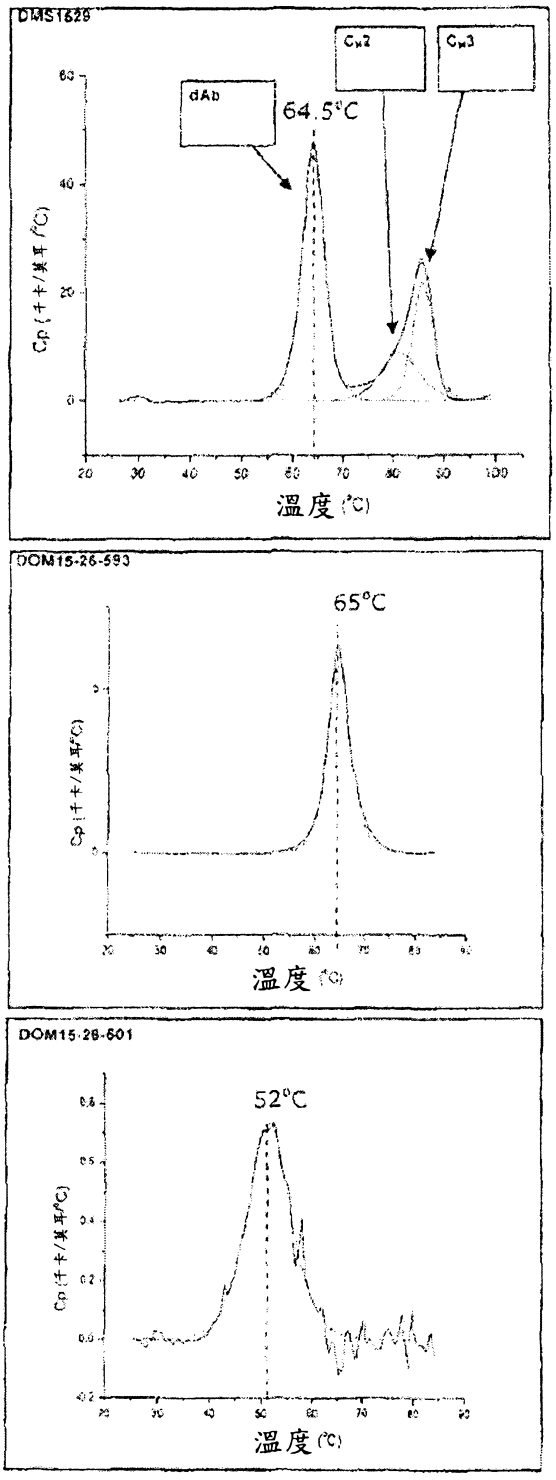
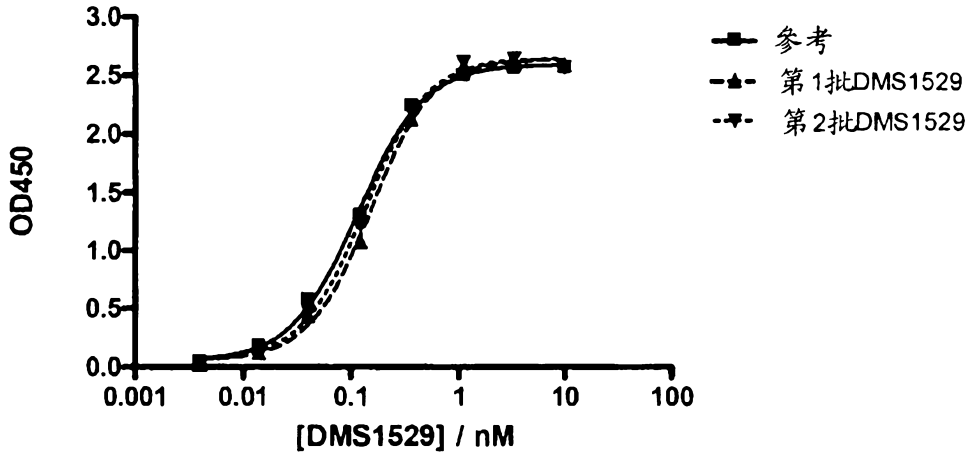

DMS1628
dAb
Cw2
Cw3
64.5°C
Cp (千卡/莫耳/°C)
溫度 (°C)
DOM15-26-593
65°C
Cp (千卡/莫耳/°C)
溫度 (°C)
DOM15-26-601
52°C
Cp (千卡/莫耳/°C)
溫度 (°C)

圖43



	參考	第1批DMS1529	第2批DMS1529
EC50	0.1167	0.1539	0.1358

圖44

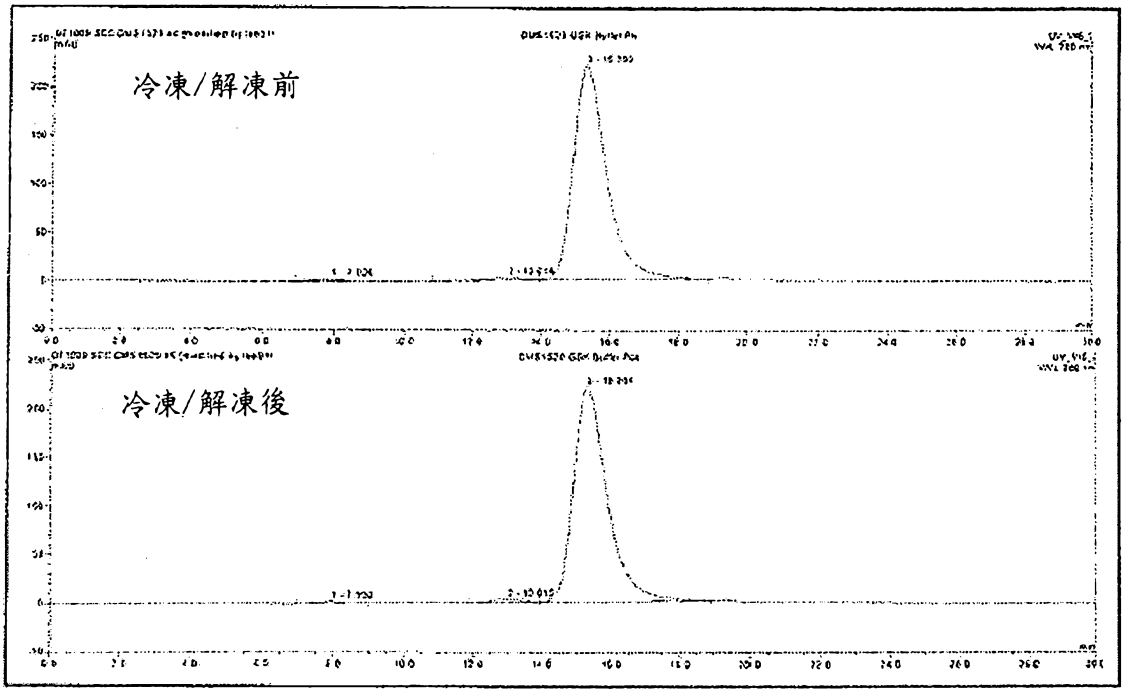
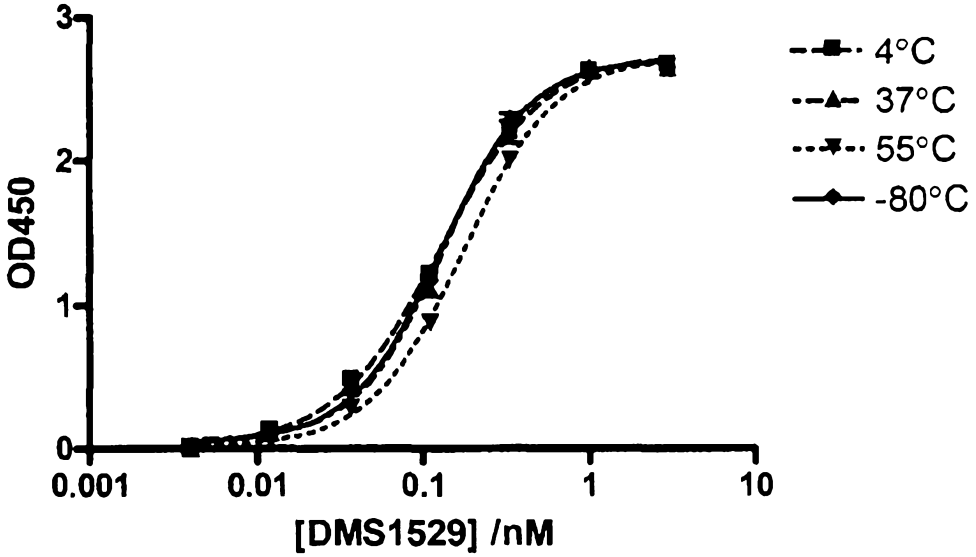
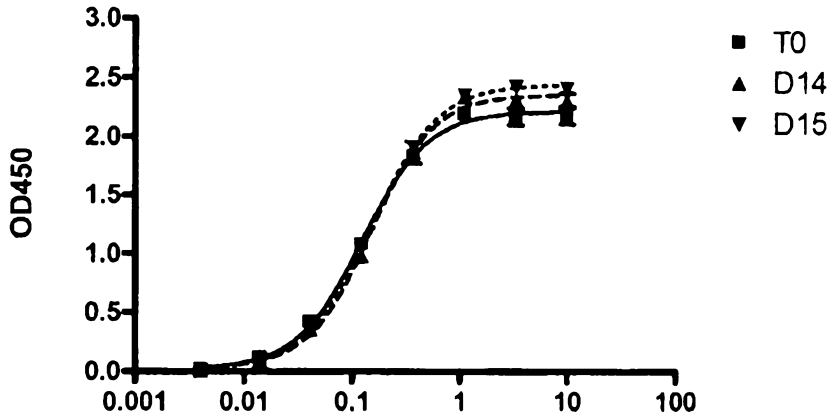


圖45



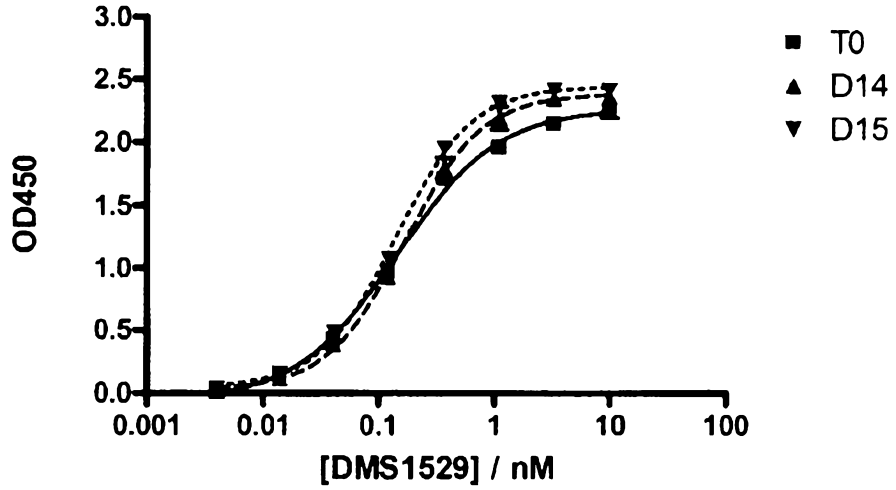
	4°C	37°C	55°C	-80°C
EC50	0.1269	0.1334	0.1748	0.1288

圖46



	T0	D14	D15
EC50	0.1253	0.1520	0.1495

圖47A



	T0	D14	D15
EC50	0.1453	0.1681	0.1422

圖47B

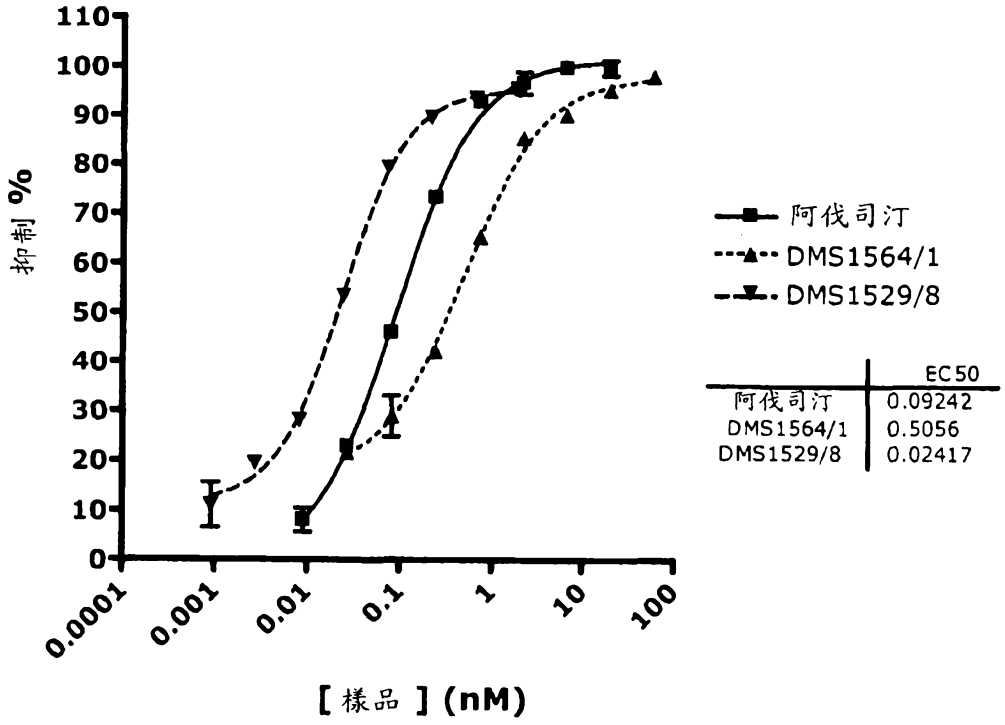

110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
抑制 %
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
[樣品] (nM)
阿伐司汀
DMS1564/1
DMS1529/8
EC50
阿伐司汀 0.09242
DMS1564/1 0.5056
DMS1529/8 0.02417

圖48

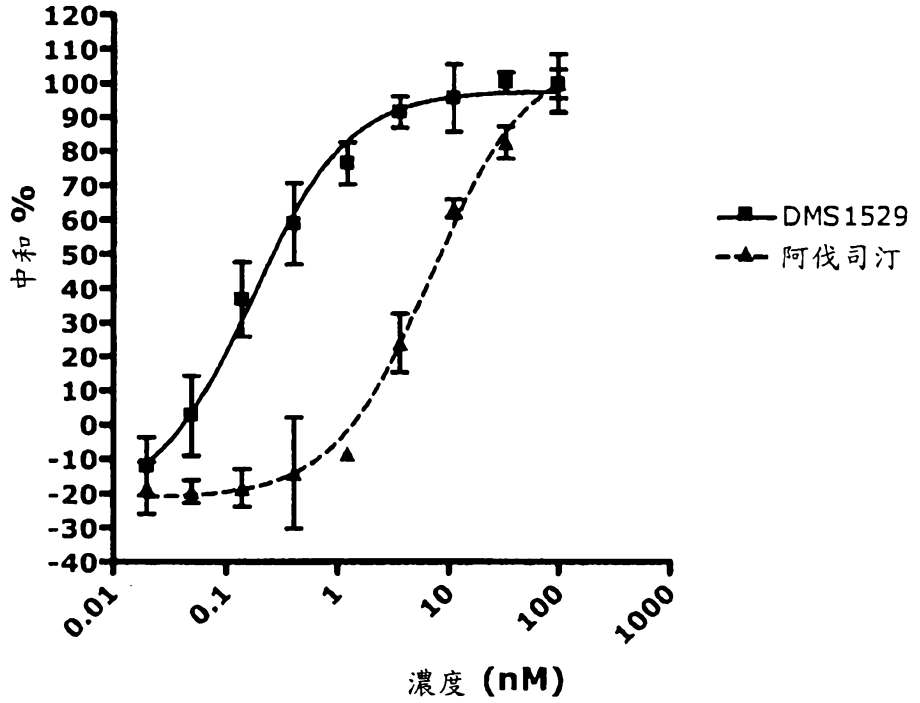

120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
中和 %
0.01
0.1
1
10
100
1000
濃度 (nM)
DMS1529
阿伐司汀

圖49

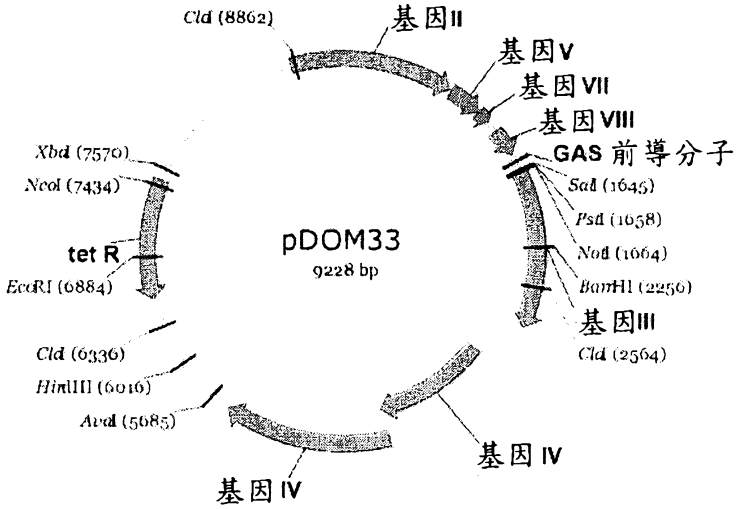

ClaI (8862)
基因II
基因V
基因VII
基因VIII
GAS 前導分子
SalI (1645)
PstI (1658)
NotI (1664)
BamHI (2256)
基因III
ClaI (2564)
基因IV
基因IV
ClaI (6336)
HindIII (6016)
AvaI (5685)
XbaI (7570)
NcoI (7434)
tet R
EcoRI (6884)
pDOM33
9228 bp

圖50

dAb 2, 4, 7, 41
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASPLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYSVPPTFGQGTKVEIKR

dAb 38, 54
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYRASPLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYRIPPTFGQGTKVEIKR

dAb 46, 47, 52, 56
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIFKSLKWYQQKPGKAPKLLIYNASYLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVVYWPVTFGQGTKVEIKR

dAb 13, 15
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIYYHLKWYQQKPGKAPKLLIYKSTLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVRKVPRTFGQGTKVEIKR

dAb 30, 35
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIRRYLKWYQQKPGKAPKLLIYQASVLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGLYPPITFGQGTKVEIKR

dAb 19,
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIYNWLKWYQQKPGKAPKLLIYRASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQNVVIPRTFGQGTKVEIKR

dAb22
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSILWHLRWYQQKPGKAPKLLIYHASLLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSAVYPKTFGQGTKVEIKR

dAb23
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIFRYLAWYQQKPGKAPKLLIYHASHLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQRLLYPKTFGQGTKVEIKR

dAb24
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIFYHLAWYQQKPGKAPKLLIYPASKLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQRARWPRTFGQGTKVEIKR

dAb31
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIIWHLNWYQQKPGKAPKLLIYRASRLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVARVPRTFGQGTKVEIKR

dAb33
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIYRYLRWYQQKPGKAPKLLIYKASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYVGYPRTFGQGTKVEIKR

dAb34
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSILKYLKWYQQKPGKAPKLLIYNASHLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTTYYPITFGQGTKVEIKR

dAb53
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSILRYLRWYQQKPGKAPKLLIYKASWLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVLYYPQTFGQGTKVEIKR

dAb11
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSILRSLKWYQQKPGKAPKLLIYAASRLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVVYWPATFGQGTKVEIKR

圖51a續

dAb12
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIFRHLKWYQQKPGKAPKLLIYAASRLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVALYPKTFGQGTKVEIKR

dAb17
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIRKYLRWYQQKPGKAPKLLIYTASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQNLFWPRTFGQGTKVEIKR

dAb18
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIRRYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQMLFYPKTFGQGTKVEIKR

dAb16, 21
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIIKHLKWYQQKPGKAPKLLIYGASRLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGARWPQTFGQGTKVEIKR

dAb25, 26
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIYYHLKWYQQKPGKAPKLLIYKASTLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVRKVPRTFGQGTKVEIKR

dAb27
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIYKHLKWYQQKPGKAPKLLIYNASHLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVGRYPKTFGQGTKVEIKR

dAb55
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIFKSLKWYQQKPGKAPKLLIYNASYLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVVYWPVTFGQGTKVEIKR

dAb 8, 10
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFWVYQMDWVRQAPGKGLEWVSSISAFGAKTL
YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLSGKFDYWGQGTLVTVSS

dAb 36
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFWSYQMTWVRQAPGKGLEWVSSISSFGSSTL
YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGRDHNYSLFDYWGQGTLVTVSS

圖51a續

>DOM7h-1

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTAGC AGCTATTTAA ATTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCGG AATTCCTTTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCC
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACGTATACTG TTCCTCCTAC GTTTGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACAG

>DOM7h-10

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCACCCTCC CTGTCCGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTAGC AGCTATTTAA ATTGGTATCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCGG AATTCCCCTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGGTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACTTATTCGA TTCCTCCTAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7h-11

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCG TCCGATTGGG ACGACGTTAA GTTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTGGTTT GGTTCCCGGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTGCGCAG GCTGGGACGC ATCCTACGAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7h-12

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTAA GTATATTGGT TCGCAGTTAA ATTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCGCTTGG GCGTCCGTTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCGTCAG GGTGCTGCGT CGCCTCGGAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7h-13

GACATTCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTTTATTTAT CGGTATTTAT CGTGGTATCA GCAGAAACCA
GGGAAAGTCC CTAAGCTCCT GATCTATAAT GCGTCCTATT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CATGCTCATT TGCCTCGTAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

圖51b

>DOM7h-14

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTGGATTGGG TCTCAGTTAT CTTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCATGTGG CGTTCCTCGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT

GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTGCTCAG GGTGCGGCGT TGCCTAGGAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

圖51b續

>DOM7h-2
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAAGATTGCT ACTTATTTAA ATTGGTATCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAGG TCTTCCTCTT TGCAAAGCGC GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGTT TTCACACTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACGTATGCTG TTCCTCCTAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7h-3
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTGGATTGAT ACTGGGTTAG CGTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAGGCTCCT GATCTATAAT GTGTCCAGGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATTGGGGTA GTCCTACGAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7h-4
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGAGATTTAT TCGTGGTTAG CGTGGTACCA GCAGAGACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAAT GCTTCCCATT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG GTGATTGGTG ATCCTGTTAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7h-6
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTAGC AGCTATTTAA ATTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTACGCTCCT GATCTATCGG TTGTCCGTGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACTTATAATG TTCCTCCTAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7h-7
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTAGC AGCTATCTAA ATTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAGG AATTCCCAGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACTTTTGCGG TTCCTCCTAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAGATCAA ACGG

圖51b續

>DOM7h-8

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTAGC AGCTATTTAA ATTGGTATCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCGG AATTCCCCTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACGTATAGGG TGCCTCCTAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

圖51b續

>DOM7h-9

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GCATATTGGG TTGTGGTTAC ATTGGTATCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAGG TCTTCCTTGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG AAGTATAATT TGCCTTATAC GTCCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7m-12

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTTTT CGGCATTTAA AGTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGCG GCATCCCGTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG GTTGCGCTGT ATCCTAAGAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7m-16

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTATT AAGCATTTAA AGTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGGT GCATCCCGGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG GGGGCTCGGT GGCCTCAGAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7m-26

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTTAT TATCATTTAA AGTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAAG GCATCCACGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG GTTCGGAAGG TGCCTCGGAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7r-1

GACATCCAGA CGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTATATTGGT AGGTATTTAC GTTGGTATCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGAT TCTTCCGTGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CGTTATCGTA TGCCTTATAC GTTCGGCCAA
GGGACCAGGG TAGAAATCAA ACGG

圖51b續

>DOM7r-13

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GCATATTCAT AGGGAGTTAA GGTGGTATCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCAG GCGTCCCGTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG AAGTATCTGC CTCCTTATAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

圖51b續

>DOM7r-14
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GCATATTCAT AGGGAGTTAA GGTGGTATCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCAG GCGTCCCGTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CGTTATAGGG TGCCTTATAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7r-15
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGTATTGGG CGGAGGTTAA AGTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGGCAGCCC CTAGGCTCCT GATCTATCGT ACGTCCTGGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACGTCGCAGT GGCCTCATAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7r-16
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAAGATTTAT AAGAATTTAC GTTGGTATCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAAT TCTTCCATTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG AGGTATCTGT CGCCTTATAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7r-17
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAAGATTTAT AATAATTTAA GGTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAAT ACTTCCATTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CGATGGCGTG CGCCTTATAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7r-18
GACATTCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTGGATTTAT AAGTCGTTAG GGTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCAG TCTTCTTTGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATCATCAGA TGCCTCGGAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

圖51b續

>DOM7r-19

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTATCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTGGATTTAT AGGCATTTAA GGTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGAT GCGTCCAGGT TGCAAAGTGG GGTCCCAACA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACTCATAATC CTCCTAAGAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

圖51b續

>DOM7r-3

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTATATTGGT AGGTATTTAC GTTGGTATCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGAT TCTTCCGTGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG AGGTATATGC AGCCTTTTAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7r-4

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCCGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTGGATTGGT CGGTATTTAC GGTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAAT GGGTCCCAGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CGGTATCTTC AGCCTTATAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7r-7

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTATATTGGT AGGTATTTAC GTTGGTATCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGAT TCTTCCGTGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CGTTATTCTT CGCCTTATAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA GCGG

>DOM7r-5

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTATATTTCG CGTCAGTTAA GGTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAGGCTCCT GATCTATGGG GCGTCCGTTT TGCAAAGCGG GATCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG AGGTATATTA CTCCTTATAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAGTCAA ACGG

>DOM7r-8

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTGGATTCAT AGGCAGTTAA AGTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATTAT GCTTCCATTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACGTTTTCTA AGCCTTCTAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

圖51b續

>DOM7h-23

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTAT GATTATAATA TGTCTTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACT ATTACGCATA CGGGTGGGGT TACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACAGAAT
CCTTCTTATC AGTTTGACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGC

圖51b續

>DOM7h-21
GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGAT CTTTATGATA TGTCGTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCG ATTGTTAATT CGGGTGTTAG GACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACTTAAT
CAGAGTTATC ATTGGGATTT TGACTACTGG GGTCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCGAGC

>DOM7h-22
GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTCG AAGTATTGGA TGTCGTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCT ATTGATTTTA TGGGTCCGCA TACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGGGAGG
ACGTCGATGT TGCCGATGAA GGGGAAGTTT GACTACTGGG GTCAGGGAAC CCTGGTCACC
GTCTCGAGC

>DOM7h-24
GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTCAT CGTTATTCGA TGTCTTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTTGCCTG GTGGTGATGT TACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACAGACG
CCTGATTATA TGTTTGACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGC

>DOM7h-25
GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG AAGTATAATA TGGCGTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACT ATTCTTGGTG AGGGTAATAA TACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAACGATG
GATTATAAGT TTGACTACTG GGGTCAGGGA ACCCTGGTCA CCGTCTCGAG C

>DOM7h-26
GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
TCCTGTACAG CCTCCGGATT CACCTTTGAT GAGTATAATA TGTCTTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTCTGCCGC ATGGTGATCG GACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACAGGAT
CCTTTGTATA GGTTTGACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGC

圖51b續

>DOM7h-27
GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTCG GATTATCGGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTATTTCGA ATGGTAAGTT TACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACAGGAT
TGGATGTATA TGTTTGACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGC

>DOM7h-30
GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTCGG ACGTATACTA TGGCTTGGGT CCGCCAGGCC
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCG ATTACTAGTA GTGGTTCTTC TACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGTGAAT
TCTTTGTATA AGTTTGACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGC

>DOM7h-31
GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTCGG CCGACTAATA TGTCGTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACT ATTACTGGTA CTGGTGCTGC GACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACAGAAT
TCTCGTTATA GGTTTGACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGCG

>DOM7r-20
GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG CCGTATACGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTCGCCGT TTGGTTCGAC TACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGGGGGG
AAGGATTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGCG

>DOM7r-27
GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG CCGTATACGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTCGCCGT TTGGTTCGAC TACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAAGTGAT
GTTCTTAAGA CGGGTCTGGA TGGTTTTGAC TACTGGGGTC AGGGAACCCT GGTCACCGTC
TCGAGCG

圖51b續

>DOM7r-28

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTATG GCGTATCAGA TGGCTTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACT ATTCATCAGA CGGGTTTTTC TACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGTGCGT
TCTATGCGTC CTTATAAGTT TGACTACTGG GGTCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCGAGC
G

>DOM7r-21

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG CCGTATACGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTCGCCGT TTGGTTCGAC TACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGGTAAT
CTTGAGCCGT TTGACTACTG GGGTCAGGGA ACCCTGGTCA CCGTCTCGAG CG

圖51b續

>DOM7r-25
GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG CCGTATACGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTCGCCGT TTGGTTCGAC TACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAAAGACG
GGTCCGTCGT CGTTTGACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGCG

>DOM7r-22
GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGT TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG CCGTATACGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTCGCCGT TTGGTTCGAC TACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAAAGCTT
AGTAATGGTT TTGACTACTG GGGTCAGGGA ACCCTGGTCA CCGTCTCGAG CG

>DOM7r-23
GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG CCGTATACGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTCGCCGT TTGGTTCGAC TACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGTGGTT
AAGGATAATA CGTTTGACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGCG

>DOM7r-24
GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG CCGTATACGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTCGCCGT TTGGTTCGAC TACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATT TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAAATACT
GGGGGTAAGC AGTTTGACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGCG

>DOM7r-26
GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG CCGTATACGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTCGCCGT TTGGTTCGAC TACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAAGGACT
GAGAATAGGG GGGTTTCTTT TGACTACTGG GGTCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCGAGC
G

圖51b續

>DOM7r-29

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTAAG GATTATGATA TGACTTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAATG ATTTCTTCGT CGGGTCTTTG GACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGGTTTT
AGGCTGTTTC CTCGGACTTT TGACTACTGG GGTCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCGAGC
G

圖51b續

Dom 15-26-593-FC 融合物

EVQLLVSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKAYPMMWVRQAPGKGLEWVSEISPSGSY
TYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPRKLDYWGQGTLVTV
SSASTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

圖52A

人類 IgG1 Fc

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

圖52B

Dom 15-26-593-FC 融合物

GAGGTGCAGCTGTTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGT
CTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTTTCAGAGATTTCGCCTTCGGGTTCTTAT
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTAC
TGTGCGAAAGATCCTCGGAAGTTAGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
TCGAGCGCTAGCACCCACACCTGCCCCCCCTGCCCTGCCCCCGAGCTGCTGGGCGGA
CCTAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACC
CCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTC
AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAG
CAGTACAACAGCACCTACCGCGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGG
CTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGAGCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCTATC
GAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGAGAGCCCCAGGTCTACACCCTG
CCTCCCTCCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAG
GGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAAC
AACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTACTCC
AAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGTCTGAGCCTGTCCCCTGGC
AAG

圖52C

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（ 5 ）圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

（無元件符號說明）

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

（無）