



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101874041 B

(45) 授权公告日 2013. 06. 19

(21) 申请号 200880118581. 1

C12N 15/09 (2006. 01)

(22) 申请日 2008. 09. 26

C12P 21/08 (2006. 01)

(30) 优先权数据

2007-250147 2007. 09. 26 JP

(56) 对比文件

CN 2005005604 A2, 2005. 01. 20, 序列 39.

WO 2005056606 A2, 2005. 06. 23, FIG 5.

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 05. 25

JOHNSON K. A et al. Cation exchange HPLC and mass spectrometry reveal C-terminal amidation of an IgG1 heavy chain.

《ScienceDirect》. 2007, 第 360 卷 75-83.

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2008/067483 2008. 09. 26

JOHNSON K. A et al. Cation exchange HPLC

(87) PCT申请的公布数据

W02009/041613 JA 2009. 04. 02

and mass spectrometry reveal C-terminal amidation of an IgG1 heavy chain.

《ScienceDirect》. 2007, 第 360 卷 75-83.

(73) 专利权人 中外制药株式会社

地址 日本东京都

审查员 吕茂平

(72) 发明人 井川智之 白岩宙丈

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 吴娟 李连涛

(51) Int. Cl.

C07K 16/00 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

A61P 37/00 (2006. 01)

C07K 16/28 (2006. 01)

C07K 16/46 (2006. 01)

权利要求书3页 说明书40页

序列表77页 附图15页

(54) 发明名称

抗体恒定区修饰体

(57) 摘要

本发明成功地改善了抗体恒定区在酸性条件下的稳定性、来自铰链区二硫键的异质性、来自H链C末端的异质性、在高浓度制剂中的稳定性。进一步成功地发现了在将新的T细胞表位肽的出现降至最小限度的同时降低与Fcγ受体结合的新的恒定区序列。由此,成功地发现了使物性(稳定性和均一性)、免疫原性、安全性以及药物动力学得到改善的抗体恒定区。

1. 下述 (a) ~ (c) 中任一项所述的人抗体恒定区：

(a) 人抗体恒定区,其特征而在于:在 SEQ ID NO:1 记载的氨基酸序列中,第 329 位 (EU 编号第 446 位) 的 Gly 和第 330 位 (EU 编号第 447 位) 的 Lys 均缺失；

(b) 人抗体恒定区,其特征而在于:在 SEQ ID NO:2 记载的氨基酸序列中,第 325 位 (EU 编号第 446 位) 的 Gly 和第 326 位 (EU 编号第 447 位) 的 Lys 均缺失；

(c) 人抗体恒定区,其特征而在于:在 SEQ ID NO:3 记载的氨基酸序列中,第 326 位 (EU 编号第 446 位) 的 Gly 和第 327 位 (EU 编号第 447 位) 的 Lys 均缺失。

2. IgG2 恒定区,其中,在 SEQ ID NO:2 记载的氨基酸序列中,第 209 位 (EU 编号第 330 位)、第 210 位 (EU 编号第 331 位) 和第 218 位 (EU 编号第 339 位) 的氨基酸分别被取代成 Ser、Ser 和 Ala。

3. IgG2 恒定区,其中,在 SEQ ID NO:2 记载的氨基酸序列中,第 276 位 (EU 编号第 397 位) 的氨基酸被取代成 Val。

4. IgG2 恒定区,其中,在 SEQ ID NO:2 记载的氨基酸序列中,第 14 位 (EU 编号第 131 位)、第 102 位 (EU 编号第 219 位) 和 / 或第 16 位 (EU 编号第 133 位) 的氨基酸分别被取代成 Ser、Ser 和 Lys。

5. 权利要求 4 所述的 IgG2 恒定区,其中,在 SEQ ID NO:2 记载的氨基酸序列中,第 20 位 (EU 编号第 137 位) 和第 21 位 (EU 编号第 138 位) 的氨基酸进一步被分别取代成 Gly 和 Gly。

6. IgG2 恒定区,其中,在 SEQ ID NO:2 记载的氨基酸序列中,第 147 位 (EU 编号第 268 位) 的 His、第 234 位 (EU 编号第 355 位) 的 Arg 和 / 或第 298 位 (EU 编号第 419 位) 的 Gln 分别被取代成 Gln、Gln 和 Glu。

7. IgG2 恒定区,其中,在 SEQ ID NO:2 记载的氨基酸序列中,第 209 位 (EU 编号第 330 位)、第 210 位 (EU 编号第 331 位)、第 218 位 (EU 编号第 339 位)、第 276 位 (EU 编号第 397 位)、第 14 位 (EU 编号第 131 位)、第 16 位 (EU 编号第 133 位)、第 102 位 (EU 编号第 219 位)、第 20 位 (EU 编号第 137 位) 和第 21 位 (EU 编号第 138 位) 的氨基酸分别被取代成 Ser、Ser、Ala、Val、Ser、Lys、Ser、Gly 和 Gly。

8. 权利要求 7 的 IgG2 恒定区,其进一步包括第 325 位 (EU 编号第 446 位) 的 Gly 和第 326 位 (EU 编号第 447 位) 的 Lys 的缺失。

9. IgG2 恒定区,其中,在 SEQ ID NO:2 记载的氨基酸序列中,第 276 位 (EU 编号第 397 位)、第 14 位 (EU 编号第 131 位)、第 16 位 (EU 编号第 133 位)、第 102 位 (EU 编号第 219 位)、第 20 位 (EU 编号第 137 位) 和第 21 位 (EU 编号第 138 位) 的氨基酸分别被取代成 Val、Ser、Lys、Ser、Gly 和 Gly。

10. 权利要求 9 的 IgG2 恒定区,其进一步包括第 325 位 (EU 编号第 446 位) 的 Gly 和第 326 位 (EU 编号第 447 位) 的 Lys 的缺失。

11. IgG2 恒定区,其中,在 SEQ ID NO:2 记载的氨基酸序列中,第 14 位 (EU 编号第 131 位) 的 Cys、第 16 位 (EU 编号第 133 位) 的 Arg、第 102 位 (EU 编号第 219 位) 的 Cys、第 20 位 (EU 编号第 137 位) 的 Glu、第 21 位 (EU 编号第 138 位) 的 Ser、第 147 位 (EU 编号第 268 位) 的 His、第 234 位 (EU 编号第 355 位) 的 Arg 和第 298 位 (EU 编号第 419 位) 的 Gln 分别被取代成 Ser、Lys、Ser、Gly、Gly、Gln、Gln 和 Glu。

12. 权利要求 11 的 IgG2 恒定区,其进一步包括第 325 位(EU 编号第 446 位)的 Gly 和第 326 位(EU 编号第 447 位)的 Lys 的缺失。

13. IgG2 恒定区,其中,在 SEQ ID NO :2 记载的氨基酸序列中,第 14 位(EU 编号第 131 位)的 Cys、第 16 位(EU 编号第 133 位)的 Arg、第 102 位(EU 编号第 219 位)的 Cys、第 20 位(EU 编号第 137 位)的 Glu、第 21 位(EU 编号第 138 位)的 Ser、第 147 位(EU 编号第 268 位)的 His、第 234 位(EU 编号第 355 位)的 Arg、第 298 位(EU 编号第 419 位)的 Gln 以及第 313 位(EU 编号第 434 位)的 Asn 被取代成 Ser、Lys、Ser、Gly、Gly、Gln、Gln、Glu 和 Ala。

14. 权利要求 13 的 IgG2 恒定区,其进一步包括第 325 位(EU 编号第 446 位)的 Gly 和第 326 位(EU 编号第 447 位)的 Lys 的缺失。

15. IgG4 恒定区,其中,在 SEQ ID NO :3 记载的氨基酸序列中,第 289 位(EU 编号第 409 位)的氨基酸被取代成 Lys。

16. IgG4 恒定区,其中,在 SEQ ID NO :3 记载的氨基酸序列中,第 14 位、第 16 位、第 20 位、第 21 位、第 97 位、第 100 位、第 102 位、第 103 位、第 104 位、第 105 位、第 113 位、第 114 位、第 115 位和第 289 位(EU 编号分别为第 131、133、137、138、214、217、219、220、221、222、223、234、235 和 409 位)的氨基酸分别被取代成 Ser、Lys、Gly、Gly、Thr、Arg、Ser、Cys、Val、Glu、Pro、Val、Ala 和 Lys,且第 116 位(EU 编号第 236 位)的氨基酸从 SEQ ID NO :3 的氨基酸序列中缺失。

17. 权利要求 16 的 IgG4 恒定区,其进一步包括第 326 位(EU 编号第 446 位)的 Gly 和第 327 位(EU 编号第 447 位)的 Lys 的缺失。

18. IgG2 恒定区,其中,在 SEQ ID NO :2 记载的氨基酸序列中,第 209 位(EU 编号第 330 位)的 Ala、第 210 位(EU 编号第 331 位)的 Pro、第 218 位(EU 编号第 339 位)的 Thr、第 14 位(EU 编号第 131 位)的 Cys、第 16 位(EU 编号第 133 位)的 Arg、第 102 位(EU 编号第 219 位)的 Cys、第 20 位(EU 编号第 137 位)的 Glu、第 21 位(EU 编号第 138 位)的 Ser 分别被取代成 Ser、Ser、Ala、Ser、Lys、Ser、Gly 和 Gly。

19. 权利要求 18 的 IgG2 恒定区,其进一步包括第 325 位(EU 编号第 446 位)的 Gly 和第 326 位(EU 编号第 447 位)的 Lys 的缺失。

20. IgG2 恒定区,其中,在 SEQ ID NO :2 记载的氨基酸序列中,第 14 位(EU 编号 131)的 Cys、第 16 位(EU 编号 133)的 Arg、第 102 位(EU 编号 219)的 Cys、第 20 位(EU 编号 137)的 Glu、第 21 位(EU 编号 138)的 Ser 分别被取代成 Ser、Lys、Ser、Gly 和 Gly。

21. 权利要求 20 的 IgG2 恒定区,其进一步包括第 325 位(EU 编号第 446 位)的 Gly 和第 326 位(EU 编号第 447 位)的 Lys 的缺失。

22. 在 SEQ ID NO :5 的氨基酸序列中所示的人抗体恒定区。

23. 在 SEQ ID NO :7 的氨基酸序列中所示的人抗体恒定区。

24. 在 SEQ ID NO :9 的氨基酸序列中所示的人抗体恒定区。

25. 在 SEQ ID NO :35 的氨基酸序列中所示的人抗体恒定区。

26. 在 SEQ ID NO :36 的氨基酸序列中所示的人抗体恒定区。

27. 在 SEQ ID NO :37 的氨基酸序列中所示的人抗体恒定区。

28. 在 SEQ ID NO :43 的氨基酸序列中所示的人抗体恒定区。

29. 在 SEQ ID NO :57 (M40 Δ GK) 的氨基酸序列中所示的人抗体恒定区。
30. 在 SEQ ID NO :55 (M86 Δ GK) 的氨基酸序列中所示的人抗体恒定区。
31. 抗体,其恒定区为权利要求 1 ~ 30 中任一项所述的恒定区。
32. 抗 IL-6 受体抗体,其恒定区为权利要求 1 ~ 30 中任一项所述的恒定区。
33. 药物组合物,其包含恒定区为权利要求 1 ~ 30 中任一项所述的恒定区的抗体。

抗体恒定区修饰体

技术领域

[0001] 本发明涉及物性（稳定性、异质性）、免疫原性（抗原性）、安全性和 / 或血浆中半衰期得到改善的抗体恒定区和包含该恒定区的抗体。

背景技术

[0002] 抗体在血浆中（血中）的稳定性高、副作用也少，因此作为药品而受到关注。其中，有多种 IgG 型抗体药物已上市，目前还有多种抗体药物正在开发中（非专利文献 1、非专利文献 2）。

[0003] 目前上市的抗体药物几乎都是 IgG1 亚型抗体。IgG1 型抗体可以与 Fc γ 受体结合，可以发挥 ADCC 活性，认为 IgG1 型抗体可以作为抗癌抗体药物。但是，在以中和抗原的生物学作用为目的的抗体药物中，与对 Fc 区的 ADCC 等效应子功能重要的 Fc γ 受体的结合有可能引发不必要的副作用，所以希望排除（非专利文献 3）。并且，有报道称：由于 Fc γ 受体在抗原提示细胞中表达，所以与 Fc γ 受体结合的分子容易被抗原提示，由于蛋白或肽与 IgG1 的 Fc 部分结合从而免疫原性增强（有可能使其增强）（非专利文献 4、专利文献 1）。另外，认为在 TGN1412 的 I 期临床试验中发现的重大副作用的原因之一是抗体的 Fc 部分与 Fc γ 受体的相互作用（非专利文献 5）。如上所述，从副作用和免疫原性的角度考虑，认为在以中和抗原的生物学作用为目的的抗体药物中不优选与 Fc γ 受体的结合。

[0004] 作为虽然无法完全消除与 Fc γ 受体的结合但可以使其降低的方法，有人考虑将 IgG 抗体的亚型由 IgG1 变为 IgG2 或 IgG4 的方法（非专利文献 6）。作为完全消除与 Fc γ 受体结合的方法，有人报道了向 Fc 区导入人工修饰的方法。例如，抗 CD3 抗体和抗 CD4 抗体的效应子功能会引起副作用。因此，在 Fc 区的 Fc γ 受体结合部分导入有野生型序列中不存在的氨基酸突变（非专利文献 3、7）的 Fc γ 受体非结合型的抗 CD3 抗体和抗 CD4 抗体的临床试验现在正在进行（非专利文献 5、8）。另外，通过将 IgG1 的 Fc γ R 结合位点（EU 编号第 233、234、235、236、327、330、331 位）形成 IgG2 和 IgG4 的序列，可以制备 Fc γ 受体非结合型抗体（非专利文献 9、专利文献 2）。但这些分子中均出现能够形成天然不存在的 T 细胞表位肽的 9 ~ 12 个氨基酸的新的肽序列，认为存在免疫原性的风险。迄今为止，还没有上述课题已解决的 Fc γ 受体非结合型抗体的报道。

[0005] 另一方面，在开发抗体作为药品时，其蛋白质的物性、其中尤其是均一性和稳定性极为重要。关于 IgG2 亚型，有人报道了来自铰链区的二硫键的异质性（ヘトロジエニテイ—heterogeneity）（非专利文献 10、专利文献 3）。难以在维持来源于此的目标物质 / 相关物质的异质性的批次间差异（製造間差）的同时作为药品进行大量制造。优选作为药物开发的抗体分子尽可能是单一物质。

[0006] 另外，IgG2 和 IgG4 在酸性条件下的稳定性不足。通常 IgG 型抗体在使用蛋白 A 的纯化工序和病毒灭活工序中被暴露在酸性条件下，所以必需注意 IgG2 和 IgG4 在同样的工序中的稳定性，作为药物开发的抗体分子优选在酸性条件下也稳定。在天然型的 IgG2 和 IgG4、以及来源于 IgG2 和 IgG4 的 Fc γ 受体非结合型抗体（非专利文献 6、7、专利文献 2）

中存在上述问题,在作为药品开发时希望得到解决。

[0007] 有报道称:IgG1 型抗体在酸性条件下比较稳定、来自铰链区的二硫键的异质性也少,但在制剂保存中,铰链区的肽键在溶液中进行非酶性分解,生成作为杂质的 Fab 片段(非专利文献 11)。在作为药品开发时,希望解决生成杂质的问题。

[0008] 作为抗体 C 末端序列的异质性,有人报道了:由 C 末端氨基酸的赖氨酸残基的缺失和 C 末端的 2 个氨基酸甘氨酸、赖氨酸的缺失引起的 C 末端氨基的酰胺化(非专利文献 12),作为药品开发时希望不存在上述异质性。

[0009] 如上所述,以中和抗原为目的的抗体药物的恒定区优选上述所有问题均得到解决的恒定区序列,但迄今为止还没有关于满足上述所有条件的恒定区的报道。

[0010] 关于抗体药物的给药方式,当在慢性自身免疫疾病等疾病的情况下,优选皮下给药制剂。为了能够发挥持续的治疗效果,认为通过延长抗体的血浆中半衰期来减少给药蛋白量、赋予高浓度制剂尽可能高的稳定性,从而可以以较长的给药间隔进行皮下给药,可以提供成本低且便利性高的抗体药物。

[0011] 通常皮下给药制剂必需是高浓度制剂,相对于此,当为 IgG 型抗体制剂时,从稳定性等方面考虑,通常认为 100mg/mL 左右的制剂是极限(非专利文献 13),确保高浓度中的稳定性成为课题。但迄今为止还没有通过向恒定区中导入氨基酸取代来改善高浓度中的 IgG 的稳定性的报道。作为延长抗体的血浆中半衰期的方法,有人报道了恒定区的氨基酸取代(非专利文献 14、非专利文献 15),但从免疫原性风险的角度考虑,并不优选向恒定区中导入天然不存在的序列。

[0012] 如上所述,以中和抗原为目的的抗体药物的恒定区优选上述所有问题均已解决的恒定区序列,但迄今为止未见满足上述条件的恒定区的报道。因此,人们希望开发上述问题得到改善的抗体恒定区。

[0013] 需要说明的是,与本发明有关的在先技术文献如下。

[0014] 非专利文献 1:Monoclonal antibody successes in the clinic, Janice M Reichert, Clark J Rosensweig, Laura B Faden & Matthew C Dewitz, Nature Biotechnology 23,1073-1078(2005)

[0015] 非专利文献 2:Pavlou AK, Belsey MJ., The therapeutic antibodies market to 2008., Eur J Pharm Biopharm. 2005Apr ;59(3) :389-96.

[0016] 非专利文献 3:Reddy MP, Kinney CA, Chaikin MA, Payne A, Fishman-Lobell J, Tsui P, Dal Monte PR, Doyle ML, Brigham-Burke MR, Anderson D, Reff M, Newman R, Hanna N, Sweet RW, Truneh A. Elimination of Fc receptor-dependent effector functions of a modified IgG4 monoclonal antibody to human CD4. J Immunol. 2000Feb 15 ;164(4) :1925-33.

[0017] 非专利文献 4:Guyre PM, Graziano RF, Goldstein J, Wallace PK, Morganelli PM, Wardwell K, Howell AL. Increased potency of Fc-receptor-targeted antigens. Cancer Immunol Immunother. 1997Nov-Dec ;45(3-4) :146-8.

[0018] 非专利文献 5:Strand V, Kimberly R, Isaacs JD. Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future directions. Nat Rev Drug Discov. 2007Jan ;6(1) :75-92.

- [0019] 非专利文献 6 :Gessner JE, Heiken H, Tamm A, Schmidt RE. The IgG Fc receptor family. Ann Hematol. 1998 Jun ;76(6) :231-48.
- [0020] 非专利文献 7 :Cole MS, Anasetti C, Tso JY. Human IgG2 variants of chimeric anti-CD3 are nonmitogenic to T cells. J Immunol. 1997 Oct 1 ;159(7) :3613-21.
- [0021] 非专利文献 8 :Chau LA, Tso JY, Melrose J, Madrenas J. HuM291 (Nuvion), a humanized Fc receptor-nonbinding antibody against CD3, anergizes peripheral blood T cells as partial agonist of the T cell receptor. Transplantation. 2001 Apr 15 ;71(7) :941-50.
- [0022] 非专利文献 9 :Armour KL, Clark MR, Hadley AG, Williamson LM. , Recombinant human IgG molecules lacking Fc gamma receptor I binding and monocyte triggering activities. Eur J Immunol. 1999 Aug ;29(8) :2613-24.
- [0023] 非专利文献 10 :Chu GC, Chelius D, Xiao G, Khor HK, Coulibaly S, Bondarenko PV. Accumulation of Succinimide in a Recombinant Monoclonal Antibody in Mildly Acidic Buffers Under Elevated Temperatures. Pharm Res. 2007 Mar 24 ;24(6) :1145-56
- [0024] 非专利文献 11 :A. J. Cordoba, B. J. Shyong, D. Breen, R. J. Harris, Nonenzymatic hinge region fragmentation of antibodies in solution, J. Chromatogr., B, Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 818(2005) 115-121.
- [0025] 非专利文献 12 :Johnson KA, Paisley-Flango K, Tangarone BS, Porter TJ, Rouse JC. Cation exchange-HPLC and mass spectrometry reveal C-terminal amidation of an IgG1 heavy chain. Anal Biochem. 2007 Jan 1 ;360(1) :75-83.
- [0026] 非专利文献 13 :Shire SJ, Shahrokh Z, Liu J. Challenges in the development of high protein concentration formulations. J Pharm Sci. 2004 Jun ;93(6) :1390-402.
- [0027] 非专利文献 14 :Hinton PR, Xiong JM, Johlf s MG, Tang MT, Keller S, Tsurushita N. , An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life. , J Immunol. 2006 Jan 1 ;176(1) :346-56.
- [0028] 非专利文献 15 :Ghetie V, Popov S, Borvak J, Radu C, Matesoi D, Medesan C, Ober RJ, Ward ES. , Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis. , Nat Biotechnol. 1997 Jul ;15(7) :637-40.
- [0029] 专利文献 1 :US 20050261229A1
- [0030] 专利文献 2 :WO 99/58572
- [0031] 专利文献 3 :US 2006/0194280

发明内容

[0032] 发明所要解决的课题

[0033] 本发明鉴于上述状况而进行,其目的在于提供:通过修饰抗体恒定区的氨基酸,使物性(稳定性和均一性)、免疫原性、安全性、以及药物动力学得到改善(改善血浆中(血中)滞留性)的抗体恒定区。

[0034] 解决课题的方法

[0035] 本发明人等为了通过修饰抗体恒定区的氨基酸序列来创制物性(稳定性和均一

性)、免疫原性、安全性、及药物动力学得到改善的抗体恒定区而进行深入研究。其结果,本发明人等成功地改善了抗体恒定区在酸性条件下的稳定性、来自铰链区二硫键的异质性、来自 H 链 C 末端的异质性、在高浓度制剂中的稳定性,进一步成功地发现了在将新的 T 细胞表位肽的出现降至最小限度的同时,降低与 Fc γ 受体结合的新的恒定区序列。

[0036] 本发明涉及抗体恒定区、均一性包含该抗体恒定区的抗体、含有该抗体的药物组合物以及它们的制造方法,所述恒定区通过修饰抗体的恒定区的氨基酸序列而具有更优异的安全性、免疫原性风险、物性(稳定性、均一性),具有更优异的药物动力学。更具体而言,本发明提供下述 [1] ~ [35]。

[0037] [1] 下述 (a) ~ (c) 中任一项所述的人抗体恒定区;

[0038] (a) 人抗体恒定区,其特征在于:在 SEQ ID NO:1 记载的氨基酸序列中,第 329 位(EU 编号第 446 位、参照 Sequences of proteins of immunological interest(目标免疫蛋白序列),NIH 出版 No. 91-3242) 的 Gly 和第 330 位(EU 编号第 447 位) 的 Lys 均缺失。

[0039] (b) 人抗体恒定区,其特征在于:在 SEQ ID NO:2 记载的氨基酸序列中,第 325 位(EU 编号第 446 位) 的 Gly 和第 326 位(EU 编号第 447 位) 的 Lys 均缺失。

[0040] (c) 人抗体恒定区,其特征在于:在 SEQ ID NO:3 记载的氨基酸序列中,第 326 位(EU 编号第 446 位) 的 Gly 和第 327 位(EU 编号第 447 位) 的 Lys 均缺失。

[0041] [2] IgG2 恒定区,其中,在 SEQ ID NO:2 记载的氨基酸序列中,第 209 位(EU 编号第 330 位)、第 210 位(EU 编号第 331 位) 和第 218 位(EU 编号第 339 位) 的氨基酸被取代成其他氨基酸。

[0042] [3] IgG2 恒定区,其中,在 SEQ ID NO:2 记载的氨基酸序列中,第 276 位(EU 编号第 397 位) 的氨基酸被取代成其他氨基酸。

[0043] [4] IgG2 恒定区,其中,在 SEQ ID NO:2 记载的氨基酸序列中,第 14 位(EU 编号第 131 位)、第 102 位(EU 编号第 219 位) 和 / 或第 16 位(EU 编号第 133 位) 的氨基酸被取代成其他氨基酸。

[0044] [5] [4] 所述的 IgG2 恒定区,其特征在于:在 SEQ ID NO:2 记载的氨基酸序列中,第 20 位(EU 编号第 137 位) 和第 21 位(EU 编号第 138 位) 的氨基酸进一步被取代成其他氨基酸。

[0045] [6] IgG2 恒定区,其中,在 SEQ ID NO:2 记载的氨基酸序列中,第 147 位(EU 编号第 268 位) 的 His、第 234 位(EU 编号第 355 位) 的 Arg 和 / 或第 298 位(EU 编号第 419 位) 的 Gln 被取代成其他氨基酸。

[0046] [7] IgG2 恒定区,该 IgG2 恒定区具有下述氨基酸序列:在 SEQ ID NO:2 记载的氨基酸序列中,第 209 位(EU 编号第 330 位)、第 210 位(EU 编号第 331 位)、第 218 位(EU 编号第 339 位)、第 276 位(EU 编号第 397 位)、第 14 位(EU 编号第 131 位)、第 16 位(EU 编号第 133 位)、第 102 位(EU 编号第 219 位)、第 20 位(EU 编号第 137 位) 和第 21 位(EU 编号第 138 位) 的氨基酸被取代成其他氨基酸的氨基酸序列。

[0047] [8] IgG2 恒定区,该 IgG2 恒定区具有下述氨基酸序列:在 [7] 所述的 IgG2 恒定区中,进一步缺失第 325 位(EU 编号第 446 位) 的 Gly 和第 326 位(EU 编号第 447 位) 的 Lys 的氨基酸序列。

[0048] [9] IgG2 恒定区,该 IgG2 恒定区具有下述氨基酸序列:在 SEQ ID NO:2 记载的氨

氨基酸序列中,第 276 位(EU 编号第 397 位)、第 14 位(EU 编号第 131 位)、第 16 位(EU 编号第 133 位)、第 102 位(EU 编号第 219 位)、第 20 位(EU 编号第 137 位)和第 21 位(EU 编号第 138 位)的氨基酸被取代成其他氨基酸的氨基酸序列。

[0049] [10]IgG2 恒定区,该 IgG2 恒定区具有下述氨基酸序列:在 [9] 所述的 IgG2 恒定区中,进一步缺失第 325 位(EU 编号第 446 位)的 Gly 和第 326 位(EU 编号第 447 位)的 Lys 的氨基酸序列。

[0050] [11]IgG2 恒定区,该 IgG2 恒定区具有下述氨基酸序列:在 SEQ ID NO:2 记载的氨基酸序列中,第 14 位(EU 编号第 131 位)的 Cys、第 16 位(EU 编号第 133 位)的 Arg、第 102 位(EU 编号第 219 位)的 Cys、第 20 位(EU 编号第 137 位)的 Glu、第 21 位(EU 编号第 138 位)的 Ser、第 147 位(EU 编号第 268 位)的 His、第 234 位(EU 编号第 355 位)的 Arg 和第 298 位(EU 编号第 419 位)的 Gln 被取代成其他氨基酸的氨基酸序列。

[0051] [12]IgG2 恒定区,该 IgG2 恒定区具有下述氨基酸序列:在 [11] 所述的 IgG2 恒定区中,进一步缺失第 325 位(EU 编号第 446 位)的 Gly 和第 326 位(EU 编号第 447 位)的 Lys 的氨基酸序列。

[0052] [13]IgG2 恒定区,该 IgG2 恒定区具有下述氨基酸序列:在 SEQ ID NO:2 记载的氨基酸序列中,第 14 位(EU 编号第 131 位)的 Cys、第 16 位(EU 编号第 133 位)的 Arg、第 102 位(EU 编号第 219 位)的 Cys、第 20 位(EU 编号第 137 位)的 Glu、第 21 位(EU 编号第 138 位)的 Ser、第 147 位(EU 编号第 268 位)的 His、第 234 位(EU 编号第 355 位)的 Arg、第 298 位(EU 编号第 419 位)的 Gln、以及第 313 位(EU 编号第 434 位)的 Asn 被取代成其他氨基酸的氨基酸序列。

[0053] [14]IgG2 恒定区,该 IgG2 恒定区具有下述氨基酸序列:在 [13] 所述的 IgG2 恒定区中,进一步缺失第 325 位(EU 编号第 446 位)的 Gly 和第 326 位(EU 编号第 447 位)的 Lys 的氨基酸序列。

[0054] [15]IgG4 恒定区,其特征在于:在 SEQ ID NO:3 记载的氨基酸序列中,第 289 位(EU 编号第 409 位)的氨基酸被取代成其他氨基酸。

[0055] [16]IgG4 恒定区,该 IgG4 恒定区具有下述氨基酸序列:在 SEQ ID NO:3 记载的氨基酸序列中,第 14 位、第 16 位、第 20 位、第 21 位、第 97 位、第 100 位、第 102 位、第 103 位、第 104 位、第 105 位(EU 编号第 131、133、137、138、214、217、219、220、221、222 位)、第 113 位、第 114 位、第 115 位(EU 编号第 233、234、235 位)和第 289 位(EU 编号 409)的氨基酸被取代成其他氨基酸且第 116 位(EU 编号第 236 位)的氨基酸缺失的氨基酸序列。

[0056] [17]IgG4 恒定区,其中在 [16] 所述的 IgG4 恒定区中,进一步缺失第 326 位(EU 编号第 446 位)的 Gly 和第 327 位(EU 编号第 447 位)的 Lys 的氨基酸序列。

[0057] [18]IgG1 恒定区,该 IgG1 恒定区具有下述氨基酸序列:在 SEQ ID NO:1 记载的 IgG1 恒定区中,第 317 位(EU 编号第 434 位)的 Asn 被取代成其他氨基酸的氨基酸序列。

[0058] [19]IgG1 恒定区,该 IgG1 恒定区具有下述氨基酸序列:在 [18] 所述的 IgG1 恒定区中,第 329 位(EU 编号第 446 位)的 Gly 和第 330 位(EU 编号第 447 位)的 Lys 缺失的氨基酸序列。

[0059] [20]IgG2 恒定区,该 IgG2 恒定区具有下述氨基酸序列:在 SEQ ID NO:2 记载的氨基酸序列中,第 209 位(EU 编号第 330 位)的 Ala、第 210 位(EU 编号第 331 位)的 Pro、第

218 位 (EU 编号第 339 位) 的 Thr、第 14 位 (EU 编号第 131 位) 的 Cys、第 16 位 (EU 编号第 133 位) 的 Arg、第 102 位 (EU 编号第 219 位) 的 Cys、第 20 位 (EU 编号第 137 位) 的 Glu、第 21 位 (EU 编号第 138 位) 的 Ser 被取代成其他氨基酸的氨基酸序列。

[0060] [21] IgG2 恒定区, 该 IgG2 恒定区具有下述氨基酸序列: 在 [20] 所述的 IgG2 恒定区中, 进一步缺失第 325 位 (EU 编号第 446 位) 的 Gly 和第 326 位 (EU 编号第 447 位) 的 Lys 的氨基酸序列。

[0061] [22] IgG2 恒定区, 该 IgG2 恒定区具有下述氨基酸序列: 在 SEQ ID NO:2 记载的氨基酸序列中, 第 14 位 (EU 编号 131) 的 Cys、第 16 位 (EU 编号 133) 的 Arg、第 102 位 (EU 编号 219) 的 Cys、第 20 位 (EU 编号 137) 的 Glu、第 21 位 (EU 编号 138) 的 Ser 被取代成其他氨基酸的氨基酸序列。

[0062] [23] IgG2 恒定区, 该 IgG2 恒定区具有下述氨基酸序列: 在 [22] 所述的 IgG2 恒定区中, 进一步缺失第 325 位 (EU 编号第 446 位) 的 Gly 和第 326 位 (EU 编号第 447 位) 的 Lys 的氨基酸序列。

[0063] [24] 人抗体恒定区, 其具有 SEQ ID NO:5 中记载的氨基酸序列。

[0064] [25] 人抗体恒定区, 其具有 SEQ ID NO:7 中记载的氨基酸序列。

[0065] [26] 人抗体恒定区, 其具有 SEQ ID NO:9 中记载的氨基酸序列。

[0066] [27] 人抗体恒定区, 其具有 SEQ ID NO:35 中记载的氨基酸序列。

[0067] [28] 人抗体恒定区, 其具有 SEQ ID NO:36 中记载的氨基酸序列。

[0068] [29] 人抗体恒定区, 其具有 SEQ ID NO:37 中记载的氨基酸序列。

[0069] [30] 人抗体恒定区, 其具有 SEQ ID NO:43 中记载的氨基酸序列。

[0070] [31] 人抗体恒定区, 其具有 SEQ ID NO:57 (M40 Δ GK) 中记载的氨基酸序列。

[0071] [32] 人抗体恒定区, 其具有 SEQ ID NO:55 (M86 Δ GK) 中记载的氨基酸序列。

[0072] [33] 抗体, 其具有 [1] ~ [32] 中任一项所述的恒定区。

[0073] [34] 抗 IL-6 受体抗体, 其具有 [1] ~ [32] 中任一项所述的恒定区。以及

[0074] [35] 药物组合物, 其包含具有 [1] ~ [32] 中任一项所述的恒定区的抗体。

附图说明

[0075] 图 1 是显示通过凝胶过滤层析分析经盐酸洗提法纯化的 WT-IgG1、WT-IgG2、WT-IgG4、IgG2-M397V、IgG4-R409K 的聚集物含量的结果的曲线图。

[0076] 图 2 是显示 WT-IgG1、WT-IgG2、WT-IgG4 的阳离子交换层析 (IEC) 分析结果的图。

[0077] 图 3 是显示 WT-IgG2 的铰链区的推定二硫键构象 (结合样式) 的图。

[0078] 图 4 是显示 IgG2-SKSC 的铰链区的推定二硫键结合样式的图。

[0079] 图 5 是显示 WT-IgG2 和 IgG2-SKSC 的阳离子交换层析 (IEC) 分析结果的图。

[0080] 图 6 是显示人源化 PM-1 抗体、H 链 C 末端 Δ K 抗体、H 链 C 末端 Δ GK 抗体的阳离子交换层析 (IEC) 分析结果的图。

[0081] 图 7 是显示 WT-IgG1、WT-IgG2、WT-IgG4、WT-M14 Δ GK、WT-M17 Δ GK、WT-M11 Δ GK 与 Fc γ RI 的结合量的比较的图。

[0082] 图 8 是显示 WT-IgG1、WT-IgG2、WT-IgG4、WT-M14 Δ GK、WT-M17 Δ GK、WT-M11 Δ GK 与 Fc γ RIIa 的结合量的比较的曲线图。

[0083] 图 9 是显示 WT-IgG1、WT-IgG2、WT-IgG4、WT-M14 Δ GK、WT-M17 Δ GK、WT-M11 Δ GK 与 Fc γ RIIb 的结合量的比较的曲线图。

[0084] 图 10 是显示 WT-IgG1、WT-IgG2、WT-IgG4、WT-M14 Δ GK、WT-M17 Δ GK、WT-M11 Δ GK 与 Fc γ RIIIa(Val) 的结合量的比较的曲线图。

[0085] 图 11 是显示 WT-IgG1、WT-M14 Δ GK、WT-M17 Δ GK、WT-M11 Δ GK 在高浓度稳定性试验中聚集物增加量的曲线图。

[0086] 图 12 是显示 WT-IgG1、WT-M14 Δ GK、WT-M17 Δ GK、WT-M11 Δ GK 在高浓度稳定性试验中 Fab 片段增加量的曲线图。

[0087] 图 13 是显示 WT-IgG2、WT-M14 Δ GK、WT-M31 Δ GK 的阳离子交换层析 (IEC) 分析结果的图。

[0088] 图 14 是显示将 WT-IgG1 和 WT-M14 对人 FcRn 转基因小鼠进行静脉内给药后血浆中浓度变化的曲线图。

[0089] 图 15 是显示将 WT-IgG1、WT-M44、WT-M58、WT-M73 对人 FcRn 转基因小鼠进行静脉内给药后血浆中浓度变化的曲线图。

[0090] 图 16 是通过阳离子交换层析评价抗 IL-6 受体抗体 WT、抗 IL-6 受体抗体 F2H/L39、抗 IL-31 受体抗体 HOLO、抗 RANKL 抗体 DNS 的恒定区对异质性的影响的图。

[0091] 图 17 是通过阳离子交换层析评价抗 IL-6 受体抗体 WT、抗 IL-6 受体抗体 F2H/L39 的 CH1 结构域的半胱氨酸对异质性的影响的图。

[0092] 图 18 是通过 DSC 评价抗 IL-6 受体抗体 WT、抗 IL-6 受体抗体 F2H/L39 的 CH1 结构域的半胱氨酸对变性峰的影响的图。

[0093] 图 19 是显示 TOCILIZUMAB、对照和 Fv5-M83 在 BaF/gp130 中的中和活性的曲线图。

[0094] 图 20 是显示 TOCILIZUMAB、Fv3-M73 和 Fv4-M73 在 BaF/gp130 中的中和活性的曲线图。

[0095] 图 21 是显示将 TOCILIZUMAB、对照、Fv3-M73、Fv4-M73 和 Fv5-M83 对食蟹猴进行静脉内给药后血浆中浓度变化的曲线图。

[0096] 图 22 是显示将 TOCILIZUMAB、对照、Fv3-M73、Fv4-M73 和 Fv5-M83 对食蟹猴进行静脉内给药后 CRP 浓度变化的曲线图。

[0097] 图 23 是显示将 TOCILIZUMAB、对照、Fv3-M73、Fv4-M73 和 Fv5-M83 对食蟹猴进行静脉内给药后非结合型的食蟹猴可溶型 IL-6 受体浓度变化的曲线图。

[0098] 图 24 是显示将 WT-IgG1、WT-M14 和 WT-M58 对人 FcRn 转基因小鼠进行静脉内给药后血浆中浓度变化的曲线图。

[0099] 发明的实施方式

[0100] 本发明提供：抗体恒定区、均一性包含该恒定区的抗体、包含该抗体的药物组合物以及它们的制造方法，所述恒定区通过修饰该抗体恒定区的氨基酸序列使物性（稳定性和均一性）、免疫原性、安全性及药物动力学得到改善。

[0101] 在本发明中，抗体恒定区是指 IgG1、IgG2、IgG4 型的恒定区。抗体恒定区优选为人抗体恒定区。人 IgG1 恒定区、人 IgG2 恒定区和人 IgG4 恒定区的氨基酸序列是公知的（人 IgG1 恒定区：SEQ ID NO：1、人 IgG2 恒定区：SEQ ID NO：2、人 IgG4 恒定区：SEQ ID NO：3）。需要说明的是，本发明的氨基酸被取代的抗体恒定区只要包含本发明的氨基酸取代即可，

还可以包含其他氨基酸取代及修饰。因此,在本发明中,对 SEQ ID NO:2 中记载的氨基酸序列中已经有 1 个或多个氨基酸被取代和 / 或修饰的 IgG2 恒定区进行本发明的氨基酸取代时、或者在进行本发明的氨基酸取代后对 1 个或多个氨基酸进行取代和 / 或修饰时,进行本发明的氨基酸取代的 IgG2 恒定区相当于具有 SEQ ID NO:2 中记载的氨基酸序列的 IgG2 恒定区。具有 SEQ ID NO:1 记载的氨基酸序列的 IgG1 恒定区、SEQ ID NO:3 记载的 IgG4 恒定区亦同。需要说明的是,人 IgG4 恒定区是导入了用于改善铰链部分的稳定性的修饰 (Mol Immunol. 1993 Jan;30(1):105-8.) 的序列。另外,EU 编号第 297 位的糖链可以是任何糖链构造,糖链也可以不进行结合 (例如可以在大肠杆菌中生产)。

[0102] <氨基酸修饰 IgG2>

[0103] 本发明提供在酸性下的稳定性得到改善的 IgG2 恒定区。

[0104] 更具体而言,本发明提供具有 SEQ ID NO:2 记载的氨基酸序列的 IgG2 恒定区,该 IgG2 恒定区中第 276 位 (EU 编号第 397 位) 的 Met 被取代成其他氨基酸。对取代后的氨基酸没有特别限定,但优选取代成 Val。通过将 SEQ ID NO:2 记载的氨基酸序列中第 276 位 (EU 编号第 397 位) 的 Met 取代成其他氨基酸,可以提高抗体在酸性条件下的稳定性。

[0105] 通过本发明提供的、在酸性下的稳定性得到改善的 IgG2 恒定区可至少进行上述氨基酸取代,也可以同时进行其他氨基酸取代、缺失、添加和 / 或插入等。

[0106] 本发明还提供铰链区的异质性得到改善的 IgG2 恒定区。

[0107] 更具体而言,本发明提供具有 SEQ ID NO:2 记载的氨基酸序列的 IgG2 恒定区,该 IgG2 恒定区中第 14 位 (EU 编号第 131 位) 的 Cys、第 16 位 (EU 编号第 133 位) 的 Arg 和 / 或第 102 位 (EU 编号第 219 位) 的 Cys 被取代成其他氨基酸。对取代后的氨基酸没有特别限定,但优选第 14 位 (EU 编号第 131 位) 的 Cys 取代成 Ser、第 16 位 (EU 编号第 133 位) 的 Arg 取代成 Lys、第 102 位 (EU 编号第 219 位) 的 Cys 取代成 Ser (IgG2-SKSC)。

[0108] 通过进行上述取代,可以降低来自 IgG2 铰链区的异质性。本发明的氨基酸被取代的 IgG2 恒定区包括:上述 3 种氨基酸取代中至少 1 种氨基酸被取代的 IgG2 恒定区,优选第 14 位的 Cys 和第 102 位的 Cys 被取代成其他氨基酸、或者上述 3 种氨基酸均被取代。

[0109] 通过本发明提供的、异质性得到改善的 IgG2 恒定区可至少进行上述氨基酸取代,但也可以同时进行其他氨基酸的取代、缺失、添加和 / 或插入等。

[0110] 例如,在具有 SEQ ID NO:2 记载的氨基酸序列的 IgG2 恒定区中,当向第 14 位的 Cys 和第 16 位的 Arg 中导入突变时,出现能够形成天然不存在的 T 细胞表位肽的 9 ~ 12 个氨基酸的新的肽序列,有可能产生免疫原性风险。因此,伴随着上述氨基酸取代,进一步将第 20 位 (EU 编号第 137 位) 的 Glu 和第 21 位 (EU 编号第 138 位) 的 Ser 取代成其他氨基酸,从而可以避免天然不存在的 T 细胞表位肽的表达。对取代后的氨基酸没有特别限定,但优选第 20 位的 Glu 取代成 Gly、第 21 位的 Ser 取代成 Gly。

[0111] 本发明还提供与 Fc γ 受体的结合活性降低的 IgG2 恒定区。

[0112] 更具体而言,本发明提供具有 SEQ ID NO:2 记载的氨基酸序列的 IgG2 恒定区,该 IgG2 恒定区中第 209 位 (EU330) 的 Ala 取代成 Ser、第 210 位 (EU331) 的 Pro 取代成 Ser 和 / 或第 218 位 (EU339) 的 Thr 取代成 Ala。已经有报道称:通过取代第 209 位 (EU330) 的 Ala、第 210 位 (EU331) 的 Pro,可以降低 IgG2 与 Fc γ 受体的结合 (Eur J Immunol. 1999 Aug; 29(8):2613-24.)。通过该修饰会出现能够形成 T 细胞表位的不来自于人的肽,所以从免疫

原性风险的角度考虑并不优选。于是,通过同时将第 218 位(EU339)的 Thr 取代成 Ala,可以在只使用来自人的肽作为能够形成 T 细胞表位的 9~12 个氨基酸的情况下降低 IgG2 与 Fc γ 受体的结合。

[0113] 本发明的氨基酸被取代的 IgG2 恒定区只要在上述 3 处氨基酸取代中的至少 1 处氨基酸被取代即可,但优选上述 3 处氨基酸均被取代。因此,作为本发明的氨基酸被取代的 IgG2 恒定区的优选方式,可列举:在具有 SEQ ID NO:2 记载的氨基酸序列的 IgG2 恒定区中,第 209 位(EU330)的 Ala 被取代成 Ser、第 210 位(EU331)的 Pro 被取代成 Ser 且第 218 位(EU339)的 Thr 被取代成 Ala。

[0114] 通过本发明提供的、与 Fc γ 受体的结合活性降低的 IgG2 恒定区可至少进行上述氨基酸取代,也可以同时进行其他氨基酸的取代、缺失、添加和/或插入等。

[0115] 本发明还提供 C 末端的异质性得到改善的 IgG2 恒定区。

[0116] 更具体而言,本发明提供具有 SEQ ID NO:2 记载的氨基酸序列的 IgG2 恒定区,该 IgG2 恒定区中第 325 位(EU 编号第 446 位)的 Gly 和第 326 位(EU 编号第 447 位)的 Lys 均缺失。通过缺失这两个氨基酸,首次可以降低来自抗体 H 链 C 末端的异质性。

[0117] 通过本发明提供的、C 末端的异质性得到改善的 IgG2 恒定区可至少进行上述氨基酸的缺失,也可以同时进行其他氨基酸的取代、缺失、添加和/或插入等。

[0118] 本发明还提供药物动力学提高的 IgG2 恒定区。

[0119] 更具体而言,本发明提供具有 SEQ ID NO:2 记载的氨基酸序列的 IgG2 恒定区,该 IgG2 恒定区中第 147 位(EU 编号第 268 位)的 His、第 234 位(EU 编号第 355 位)的 Arg、第 298 位(EU 编号第 419 位)的 Gln 被取代成其他氨基酸。通过上述氨基酸取代,可以使抗体的药物动力学提高。对取代后的氨基酸没有特别限定,但优选第 147 位(EU 编号第 268 位)的 His 取代成 Gln、第 234 位(EU 编号第 355 位)的 Arg 取代成 Gln、第 298 位(EU 编号第 419 位)的 Gln 取代成 Glu。本发明的氨基酸被取代的 IgG2 恒定区包括:上述 3 种氨基酸取代中至少 1 种氨基酸被取代的 IgG2 恒定区,但优选上述 3 种氨基酸均被取代。

[0120] 并且,在本发明中,作为在酸性下的稳定性得到改善、铰链区的异质性得到改善和/或与 Fc γ 受体的结合活性降低的 IgG2 的优选方式,可以列举下述 IgG2。

[0121] 抗体,其中在具有包含 SEQ ID NO:2 记载的氨基酸序列的恒定区的 IgG2 中,第 209 位的 Ala、第 210 位的 Pro、第 218 位的 Thr、第 276 位的 Met、第 14 位的 Cys、第 16 位的 Arg、第 102 位的 Cys、第 20 位的 Glu、第 21 位的 Ser 被取代成其他氨基酸。

[0122] 对取代后的氨基酸没有特别限定,但优选第 209 位(EU 编号 330)的 Ala 取代成 Ser、第 210 位(EU 编号 331)的 Pro 取代成 Ser、第 218 位(EU 编号 339)的 Thr 取代成 Ala、第 276 位(EU 编号 397)的 Met 取代成 Val、第 14 位(EU 编号 131)的 Cys 取代成 Ser、第 16 位(EU 编号 133)的 Arg 取代成 Lys、第 102 位(EU 编号 219)的 Cys 取代成 Ser、第 20 位(EU 编号 137)的 Glu 取代成 Gly、第 21 位(EU 编号 138)的 Ser 取代成 Gly。

[0123] 这样的 IgG2 恒定区的实例可列举:具有 SEQ ID NO:4(M14)的氨基酸序列的 IgG2 恒定区。

[0124] 本发明的 IgG2 恒定区的其他优选方式可列举:在上述 IgG2 恒定区中,进一步缺失第 325 位的 Gly 和第 326 位的 Lys 以降低 C 末端的异质性的 IgG2 恒定区。这样的抗体的实例可列举:具有包含 SEQ IDNO:5(M14 Δ GK)的氨基酸序列的恒定区的 IgG2。

[0125] 并且,本发明的铰链区的异质性得到改善和/或与Fc γ 受体的结合活性降低的IgG2的优选方式可列举下述IgG2。

[0126] 抗体,其中在具有包含SEQ ID NO:2记载的氨基酸序列的恒定区的IgG2中,第209位的Ala、第210位的Pro、第218位的Thr、第14位的Cys、第16位的Arg、第102位的Cys、第20位的Glu、第21位的Ser被取代成其他氨基酸。

[0127] 对取代后的氨基酸没有特别限定,但优选第209位(EU编号330)的Ala取代成Ser、第210位(EU编号331)的Pro取代成Ser、第218位(EU编号339)的Thr取代成Ala、第14位(EU编号131)的Cys取代成Ser、第16位(EU编号133)的Arg取代成Lys、第102位(EU编号219)的Cys取代成Ser、第20位(EU编号137)的Glu取代成Gly、第21位(EU编号138)的Ser取代成Gly。

[0128] 这样的IgG2恒定区的实例可列举:具有SEQ ID NO:54(M86)的氨基酸序列的IgG2恒定区。

[0129] 并且,本发明的IgG2恒定区的其他优选方式可列举:在上述IgG2恒定区中,进一步缺失第325位的Gly和第326位的Lys以降低C末端的异质性的IgG2恒定区。这样的抗体的实例可列举:具有包含SEQ ID NO:55(M86 Δ GK)的氨基酸序列的恒定区的IgG2。

[0130] 并且,本发明的在酸性下的稳定性得到改善、铰链区的异质性得到改善的IgG2恒定区的优选方式可列举下述IgG2恒定区。

[0131] IgG2恒定区,该IgG2恒定区具有SEQ ID NO:2记载的氨基酸序列,其中第276位的Met、第14位的Cys、第16位的Arg、第102位的Cys、第20位的Glu、第21位的Ser被取代成其他氨基酸。

[0132] 对取代后的氨基酸没有特别限定,但优选第276位(EU编号397)的Met取代成Val、第14位(EU编号131)的Cys取代成Ser、第16位(EU编号133)的Arg取代成Lys、第102位(EU编号219)的Cys取代成Ser、第20位(EU编号137)的Glu取代成Gly、第21位(EU编号138)的Ser取代成Gly。

[0133] 这样的IgG2恒定区的实例可列举:具有SEQ ID NO:6(M31)的氨基酸序列的IgG2恒定区。

[0134] 本发明的IgG2恒定区的其他优选方式可列举:在上述IgG2恒定区中,进一步缺失第325位的Gly和第326位的Lys的IgG2恒定区。这样的抗体的实例可列举:具有SEQ ID NO:7(M31 Δ GK)的氨基酸序列的IgG2恒定区。

[0135] 并且,本发明的铰链区异质性得到改善的IgG2恒定区的优选方式可列举下述IgG2恒定区。

[0136] IgG2恒定区,该IgG2恒定区具有SEQ ID NO:2记载的氨基酸序列,其中第14位的Cys、第16位的Arg、第102位的Cys、第20位的Glu、第21位的Ser被取代成其他氨基酸。

[0137] 对取代后的氨基酸没有特别限定,但优选第14位(EU编号131)的Cys取代成Ser、第16位(EU编号133)的Arg取代成Lys、第102位(EU编号219)的Cys取代成Ser、第20位(EU编号137)的Glu取代成Gly、第21位(EU编号138)的Ser取代成Gly。

[0138] 这样的IgG2恒定区的实例可列举:具有SEQ ID NO:56(M40)的氨基酸序列的IgG2恒定区。

[0139] 本发明的 IgG2 恒定区的其他优选方式可列举：在上述 IgG2 恒定区中，进一步缺失第 325 位的 Gly 和第 326 位的 Lys 的 IgG2 恒定区。这样的抗体的实例可列举：具有 SEQ ID NO :57 (M40 Δ GK) 的氨基酸序列的 IgG2 恒定区。

[0140] 本发明提供 IgG2 恒定区，该 IgG2 恒定区具有下述氨基酸序列：在 SEQ ID NO :2 记载的氨基酸序列中，第 14 位 (EU 编号第 131 位) 的 Cys、第 16 位 (EU 编号第 133 位) 的 Arg、第 102 位 (EU 编号第 219 位) 的 Cys、第 20 位 (EU 编号第 137 位) 的 Glu、第 21 位 (EU 编号第 138 位) 的 Ser、第 147 位 (EU 编号第 268 位) 的 His、第 234 位 (EU 编号第 355 位) 的 Arg 和第 298 位 (EU 编号第 419 位) 的 Gln 被取代成其他氨基酸、且第 325 位 (EU 编号第 446 位) 的 Gly 和第 326 位 (EU 编号第 447 位) 的 Lys 缺失的氨基酸序列。

[0141] 对取代后的氨基酸没有特别限定，但优选第 14 位的 Cys 取代成 Ser、第 16 位的 Arg 取代成 Lys、第 102 位的 Cys 取代成 Ser、第 20 位的 Glu 取代成 Gly、第 21 位的 Ser 取代成 Gly、第 147 位的 His 取代成 Gln、第 234 位的 Arg 取代成 Gln、第 298 位的 Gln 取代成 Glu。

[0142] 具体而言，本发明提供具有 SEQ ID NO :35 记载的氨基酸序列的恒定区 (M58)。

[0143] 本发明提供 IgG2 恒定区，该 IgG2 恒定区具有下述氨基酸序列：在 SEQ ID NO :2 记载的氨基酸序列中，第 14 位 (EU 编号第 131 位) 的 Cys、第 16 位 (EU 编号第 133 位) 的 Arg、第 102 位 (EU 编号第 219 位) 的 Cys、第 20 位 (EU 编号第 137 位) 的 Glu、第 21 位 (EU 编号第 138 位) 的 Ser、第 147 位 (EU 编号第 268 位) 的 His、第 234 位 (EU 编号第 355 位) 的 Arg、第 298 位 (EU 编号第 419 位) 的 Gln 和第 313 位 (EU 编号第 434 位) 的 Asn 被取代成其他氨基酸、且第 325 位 (EU 编号第 446 位) 的 Gly 和第 326 位 (EU 编号第 447 位) 的 Lys 缺失的氨基酸序列。

[0144] 对取代后的氨基酸没有特别限定，但优选第 14 位的 Cys 取代成 Ser、第 16 位的 Arg 取代成 Lys、第 102 位的 Cys 取代成 Ser、第 20 位的 Glu 取代成 Gly、第 21 位的 Ser 取代成 Gly、第 147 位的 His 取代成 Gln、第 234 位的 Arg 取代成 Gln、第 298 位的 Gln 取代成 Glu、第 313 位的 Asn 取代成 Ala。

[0145] 具体而言，本发明提供具有 SEQ ID NO :37 记载的氨基酸序列的恒定区 (M73)。

[0146] 上述抗体恒定区具有与 Fc γ 受体的结合活性降低、免疫原性风险降低、酸性条件下的稳定性提高、异质性降低、药物动力学提高和 / 或与 IgG1 恒定区相比在制剂中的稳定性高的性质，是最优化的抗体恒定区。

[0147] < 氨基酸修饰 IgG4 >

[0148] 本发明提供在酸性下的稳定性得到改善的 IgG4 恒定区。

[0149] 更具体而言，本发明提供具有 SEQ ID NO :3 记载的氨基酸序列的 IgG4 恒定区，该 IgG4 恒定区中第 289 位 (EU 编号第 409 位) 的 Arg 被取代成其他氨基酸。对取代后的氨基酸没有特别限定，但优选取代成 Lys。通过将 SEQ ID NO :3 记载的氨基酸序列中第 277 位 (EU 编号第 409 位) 的 Arg 取代成其他氨基酸，可以提高抗体在酸性条件下的稳定性。

[0150] 通过本发明提供的、在酸性下的稳定性得到改善的 IgG4 恒定区，对其至少可以进行上述氨基酸取代，也可以同时进行其他氨基酸的取代、缺失、添加和 / 或插入等。

[0151] 本发明还提供 C 末端的异质性得到改善的 IgG4 恒定区。

[0152] 更具体而言，本发明提供具有 SEQ ID NO :3 记载的氨基酸序列的 IgG4 恒定区，该 IgG4 恒定区中第 326 位 (EU 编号第 446 位) 的 Gly 和第 327 位 (EU 编号第 447 位) 的 Lys

均缺失。通过使这两个氨基酸缺失,首次可以降低来自抗体 H 链 C 末端的异质性。

[0153] 通过本发明提供的、C 末端的异质性得到改善的 IgG4 恒定区可至少进行上述氨基酸缺失,也可以同时进行其他氨基酸的取代、缺失、添加和 / 或插入等。

[0154] 并且,作为本发明的在酸性下的稳定性得到改善、异质性得到改善和 / 或与 Fc γ 受体的结合活性降低的 IgG4 的优选方式,可以列举下述包含恒定区的 IgG4。

[0155] IgG4 恒定区,该 IgG4 恒定区具有 SEQ ID NO :3 记载的氨基酸序列,其中第 14 位的 Cys、第 16 位的 Arg、第 20 位的 Glu、第 21 位的 Ser、第 97 位的 Arg、第 100 位的 Ser、第 102 位的 Tyr、第 103 位的 Gly、第 104 位的 Pro、第 105 位的 Pro、第 113 位的 Glu、第 114 位的 Phe、第 115 位的 Leu、以及第 289 位的 Arg 被取代成其他氨基酸且第 116 位的 Gly 缺失。

[0156] 对取代后的氨基酸没有特别限定,但优选第 14 位 (EU 编号 131) 的 Cys 取代成 Ser、第 16 位 (EU 编号 133) 的 Arg 取代成 Lys、第 20 位 (EU 编号 137) 的 Glu 取代成 Gly、第 21 位 (EU 编号 138) 的 Ser 取代成 Gly、第 97 位 (EU 编号 214) 的 Arg 取代成 Thr、第 100 位 (EU 编号 217) 的 Ser 取代成 Arg、第 102 位 (EU 编号 219) 的 Tyr 取代成 Ser、第 103 位 (EU 编号 220) 的 Gly 取代成 Cys、第 104 位 (EU 编号 221) 的 Pro 取代成 Val、第 105 位 (EU 编号 222) 的 Pro 取代成 Glu、第 113 位 (EU 编号 233) 的 Glu 取代成 Pro、第 114 位 (EU 编号 234) 的 Phe 取代成 Val、第 115 位 (EU 编号 235) 的 Leu 取代成 Ala、第 289 位 (EU 编号 409) 的 Arg 取代成 Lys。

[0157] 这样的 IgG4 恒定区的实例可列举:具有 SEQ ID NO :8 (M11) 的氨基酸序列的 IgG4 恒定区。

[0158] 本发明的 IgG4 恒定区的其他优选方式可列举:在上述 IgG4 恒定区中进一步缺失第 325 位 (EU 编号第 446 位) 的 Gly 和第 326 位 (EU 编号第 447 位) 的 Lys 的 IgG4 恒定区。这样的抗体的实例可列举:具有 SEQ ID NO :9 (M11 Δ GK) 的氨基酸序列的 IgG4 恒定区。

[0159] <氨基酸修饰 IgG1>

[0160] 本发明提供 C 末端的异质性得到改善的 IgG1 恒定区。

[0161] 更具体而言,本发明提供具有 SEQ ID NO :1 记载的氨基酸序列的 IgG4 恒定区,该 IgG4 恒定区中第 329 位 (EU 编号第 446 位) 的 Gly 和第 330 位 (EU 编号第 447 位) 的 Lys 缺失。通过使这两个氨基酸均缺失,首次可以降低来自抗体 H 链 C 末端的异质性。

[0162] 本发明还提供药物动力学有所提高的 IgG1 恒定区。

[0163] 更具体而言,本发明提供具有 SEQ ID NO :1 记载的氨基酸序列的 IgG1 恒定区,该 IgG4 恒定区中第 317 位 (EU 编号第 434 位) 的 Asn 被取代成其他氨基酸的氨基酸序列。对取代后的氨基酸没有特别限定,但优选取代成 Ala。

[0164] 本发明还提供从 SEQ ID NO :36 记载的氨基酸序列中缺失第 329 位的 Gly 和第 330 位的 Lys 的恒定区。更具体而言,本发明提供具有 SEQ ID NO :43 (M83) 记载的氨基酸序列的恒定区 (M83)。

[0165] 通过本发明提供的、C 末端的异质性得到改善的 IgG1 恒定区可至少进行上述氨基酸缺失,也可以同时进行其他氨基酸的取代、缺失、添加和 / 或插入等。

[0166] 本发明还提供抗体,该抗体包括上述任意抗体恒定区。本发明的抗体只要具有上述抗体恒定区即可,对抗原种类、抗体的来源等没有限定,可以是任何抗体。

[0167] 本发明的抗体还包括:包含上述任意氨基酸取代的抗体修饰物。对抗体的来源没

有特别限定,可列举人抗体、小鼠抗体、大鼠抗体、兔抗体等。本发明的抗体还可以是嵌合抗体、人源化抗体、完全人源化抗体等。作为本发明抗体的优选方式,可以列举:人源化抗体。

[0168] 另外,上述抗体恒定区和/或包含上述抗体恒定区的抗体分子还可以与抗体样结合分子(支架分子 scaffold 分子)、生理活性肽、结合肽等以 Fc 融合分子的形式结合。

[0169] 只要是包含上述任意恒定区的抗体,其修饰物也包括在本发明的抗体中。

[0170] 作为抗体修饰物的实例,例如可列举:与聚乙二醇(PEG)或细胞毒性物质等各种分子结合的抗体。这样的抗体修饰物可以通过对本发明的抗体进行化学修饰而得到。抗体的修饰方法在该领域已经确立。

[0171] 并且,本发明的抗体可以是双特异性抗体(bispecific antibody)。双特异性抗体是指在同一抗体分子内具有识别不同表位的可变区的抗体,该表位可以存在于不同分子中,也可以存在于同一分子中。

[0172] 上述抗体恒定区可以用作抗任意抗原的抗体的恒定区,对抗原没有特别限定。

[0173] 本发明的抗体可以如下得到。在取得本发明的抗体的一个方式中,首先,在抗体恒定区中,将1个或多个氨基酸残基取代成其他目标氨基酸、或使其缺失。作为将1个或多个氨基酸残基取代成其他目标氨基酸的方法,例如可列举:位点特异性诱变法(Hashimoto-Gotoh, T, Mizuno, T, Ogasahara, Y, 和 Nakagawa, M. (1995) An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis(寡脱氧核糖核苷酸定向双琥珀法位点定向诱变). Gene 152, 271-275、Zoller, MJ, 和 Smith, M. (1983) Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors(DNA 片段克隆到 M13 载体的寡聚核苷酸定向诱变). Methods Enzymol. 100, 468-500、Kramer, W, Drutsa, V, Jansen, HW, Kramer, B, Pfluggelder, M, 和 Fritz, HJ(1984) The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction(带缺口的双链体 DNA 接近寡聚核苷酸定向突变结构). Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456、Kramer W, 和 Fritz HJ(1987) Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA Methods(经由带缺口的双链体 DNA 法突变的寡聚核苷酸定向结构). Enzymol. 154, 350-367、Kunkel, TA(1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection(无表型筛选的迅速及高效的位点特异性诱变法). Proc Natl Acad Sci U S A. 82, 488-492)。利用上述方法可以将抗体恒定区所期望的氨基酸取代成其他目标氨基酸。

[0174] 作为用于取得抗体的另一方式,首先,按照本领域技术人员所周知的方法得到与目标抗原结合的抗体。所取得的抗体为非人动物抗体时,还可以将其人源化。抗体的结合活性可以按照本领域技术人员所公知的方法进行测定。之后,将抗体恒定区中的1个或多个氨基酸残基取代成其他目标氨基酸、或使其缺失。

[0175] 更具体而言,本发明涉及抗体的制造方法,该制造方法包括下述工序(a)和(b)。

[0176] (a) 使编码 H 链的 DNA 和编码 L 链的 DNA 表达的工序,所述 H 链的恒定区中1个或多个氨基酸残基被取代成其他目标氨基酸或缺失;

[0177] (b) 回收工序(a)的表达产物的工序。

[0178] 在本发明的制造方法中,首先,使编码抗体 H 链的 DNA 和编码抗体 L 链的 DNA 表达,所述 H 链的恒定区中1个或多个氨基酸残基被取代成其他目标氨基酸或缺失。编码恒定区

中的 1 个或多个氨基酸残基被取代成其他目标氨基酸或缺失的 H 链的 DNA 可如下得到：取得编码野生型 H 链的 DNA 的恒定区部分，之后导入适当的取代使该恒定区中编码特定氨基酸的密码子编码其他目标氨基酸，即可得到。

[0179] 此外，通过预先设计编码蛋白的 DNA，之后化学合成该 DNA，也可以得到编码恒定区中的 1 个或多个氨基酸残基被取代成其他目标氨基酸或缺失的 H 链的 DNA，所述蛋白的野生型 H 链的恒定区中 1 个或多个氨基酸残基被取代成其他目标氨基酸或缺失。

[0180] 氨基酸取代的种类并不限于此，还可列举本说明书中记载的取代。

[0181] 另外，编码 H 链的 DNA 可以分成部分 DNA 来制造，所述 H 链恒定区中的 1 个或多个氨基酸残基被取代成其他目标氨基酸或缺失。作为部分 DNA 的组合，例如可列举：编码可变区的 DNA 与编码恒定区的 DNA、或者编码 Fab 区的 DNA 与编码 Fc 区的 DNA 等，但并不限于这些组合。编码 L 链的 DNA 也同样可以分成部分 DNA 来制造。

[0182] 作为使上述 DNA 表达的方法，可列举下述方法。例如，将编码 H 链可变区的 DNA 与编码 H 链恒定区的 DNA 同时整合到表达载体中，构建 H 链表达载体。同样，将编码 L 链可变区的 DNA 与编码 L 链恒定区的 DNA 同时整合到表达载体中，构建 L 链表达载体。这些 H 链和 L 链的基因也可以整合到单一载体中。作为表达载体，例如可以使用 SV40 病毒载体 (SV40virus-based vectors)、EB 病毒载体 (EBvirus-based vectors) 和 BPV (乳头瘤病毒) 载体 (BPV (papillomavirus)-based vectors) 等，但并不限于这些。

[0183] 利用按照上述方法制备的抗体表达载体共转化宿主细胞。作为宿主细胞，除 CHO 细胞 (中国仓鼠卵巢) 等上述细胞外，还可使用大肠杆菌、酵母或枯草杆菌等微生物或动植物个体 (Nature Biotechnology 25, 563-565 (2007)、Nature Biotechnology 16, 773-777 (1998)、Biochemical and Biophysical Research Communications 255, 444-450 (1999)、Nature Biotechnology 23, 1159-1169 (2005)、Journal of Virology 75, 2803-2809 (2001)、Biochemical and Biophysical Research Communications 308, 94-100 (2003))。进行转化时优选采用脂质转染法 (R. W. Malone 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6077 (1989) ; P. L. Felgner 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7413 (1987))、电穿孔法、磷酸钙法 (F. L. Graham & A. J. van der Eb, Virology 52, 456-467 (1973))、DEAE-葡聚糖法等。

[0184] 制造抗体时，接下来，回收工序 (a) 中得到的表达产物。表达产物的回收例如可以通过在培养转化体后，从转化体的细胞内或培养液中分离表达产物来进行。在抗体的分离、纯化中可以适当组合离心、硫酸铵分级分离、盐析、超滤、Iq、FcRn、蛋白 A、蛋白 G 柱、亲和色谱、离子交换色谱、凝胶过滤层析等方法来进行。

[0185] < 提高 IgG2 恒定区在酸性条件下的稳定性的方法 >

[0186] 本发明还涉及提高抗体在酸性条件下的稳定性的方法，该方法包括：将 SEQ ID NO : 2 记载的氨基酸序列 (IgG2) 中第 276 位 (EU 编号第 397 位) 的 Met 取代成其他氨基酸的工序。本发明的提高抗体在酸性条件下的稳定性的方法只要包括将 SEQ ID NO : 2 记载的氨基酸序列 (IgG2) 中第 276 位 (EU 编号第 397 位) 的 Met 取代成其他氨基酸的工序即可，还可以包括其他氨基酸取代。对取代后的氨基酸没有特别限定，但优选取代成 Val。对氨基酸取代的方法没有特别限定，例如可以按照上述位点特异性诱变法或实施例记载的方法进行。

[0187] <改善来自 IgG2 恒定区铰链部分的异质性的方法>

[0188] 本发明还涉及改善抗体异质性的方法,该方法包括:将 SEQ ID NO:2 记载的氨基酸序列(IgG2)中第 14 位(EU 编号第 131 位)的 Cys 取代成其他氨基酸的工序、将第 16 位(EU 编号第 133 位)的 Arg 取代成其他氨基酸的工序和/或将第 102 位(EU 编号第 219 位)的 Cys 取代成其他氨基酸的工序。对取代后的氨基酸没有特别限定,但优选第 14 位的 Cys 取代成 Ser、第 16 位的 Arg 取代成 Lys、第 102 位的 Cys 取代成 Ser。本发明的改善抗体异质性的方法只要包括对 SEQ ID NO:2 记载的氨基酸序列(IgG2)中第 14 位(EU 编号第 131 位)的 Cys 进行取代的工序、对 16 位(EU 编号第 133 位)的 Arg 进行取代的工序和/或对第 102 位(EU 编号第 219 位)的 Cys 进行取代的工序即可,还可以包括其他氨基酸取代。对氨基酸取代的方法没有特别限定,例如可以按照上述位点特异性诱变法或实施例记载的方法进行。被取代的氨基酸可以是上述 3 个氨基酸均被取代,也可以是 1 个或 2 个(例如第 14 位和第 102 位等)氨基酸被取代。

[0189] <降低来自 IgG2 恒定区的 C 末端氨基酸缺失的异质性的方法>

[0190] 本发明还涉及改善抗体异质性的方法,该方法包括:使具有 SEQ ID NO:2 记载的氨基酸序列的 IgG2 恒定区中第 325 位(EU 编号第 446 位)的 Gly 和第 326 位(EU 编号第 447 位)的 Lys 缺失的工序。本发明的改善抗体异质性的方法只要包括使具有 SEQ ID NO:2 记载的氨基酸序列的 IgG2 恒定区中第 325 位(EU 编号第 446 位)的 Gly 和第 326 位(EU 编号第 447 位)的 Lys 缺失的工序即可,还可以包括其他氨基酸取代。对氨基酸取代的方法没有特别限定,例如可以按照上述位点特异性诱变法或实施例记载的方法进行。

[0191] <通过取代 IgG2 恒定区的氨基酸来提高药物动力学的方法>

[0192] 本发明还涉及提高抗体药物动力学的方法,该方法包括:将具有 SEQ ID NO:2 记载的氨基酸序列的 IgG2 恒定区中第 147 位(EU268)的 His、第 234 位(EU355)的 Arg 和/或第 298 位(EU419)的 Gln 取代成其他氨基酸的工序。本发明的提高药物动力学的方法只要包括上述工序即可,还可以包括其他氨基酸取代。对取代后的氨基酸没有特别限定,但优选第 147 位(EU268)的 His 取代成 Gln、第 234 位(EU355)的 Arg 取代成 Gln、第 298 位(EU419)的 Gln 取代成 Glu。

[0193] 本发明还涉及提高抗体药物动力学的方法,该方法包括:将具有 SEQ ID NO:20 或 SEQ ID NO:35(M58)的氨基酸序列的 IgG2 恒定区中第 313 位(EU434)的 Asn 取代成其他氨基酸的工序。对取代后的氨基酸没有特别限定,但优选取代成 Ala。本发明的提高药物动力学的方法只要包括上述工序即可,还可以包括其他氨基酸取代。

[0194] <通过取代 IgG1 恒定区的氨基酸来提高药物动力学的方法>

[0195] 本发明还涉及提高抗体药物动力学的方法,该方法包括将具有 SEQ ID NO:1 记载的氨基酸序列的 IgG1 恒定区中第 317 位(EU434)的 Asn 取代成其他氨基酸的工序。对取代后的氨基酸没有特别限定,但优选取代成 Ala。本发明的提高药物动力学的方法只要包括上述工序即可,还可以包括其他氨基酸取代。

[0196] 本发明还涉及提高抗体的药物动力学、降低来自 C 末端氨基酸缺失的异质性的方法,该方法包括:将具有 SEQ ID NO:1 记载的氨基酸序列的 IgG1 恒定区中第 317 位(EU434)的 Asn 取代成其他氨基酸的工序、以及使第 329 位(EU446)的 Gly 和第 330 位(EU447)的 Lys 缺失的工序。对取代后的氨基酸没有特别限定,但优选取代成 Ala。本发明的提高药物

动力学的方法只要包括上述工序即可,还可以包括其他氨基酸取代。

[0197] <在维持 IgG2 恒定区的人序列不变的情况下降低与 Fc γ R 结合的方法>

[0198] 本发明还涉及降低抗体与 Fc γ R 结合的方法,该方法包括:将具有 SEQ ID NO:2 记载的氨基酸序列的 IgG2 恒定区中第 209 位 (EU330) 的 Ala 取代成 Ser 的工序、将第 210 位 (EU331) 的 Pro 取代成 Ser 的工序、以及将第 218 位 (EU339) 的 Thr 取代成 Ala 的工序。本发明的降低抗体与 Fc γ R 结合的方法只要包括将具有 SEQ ID NO:2 记载的氨基酸序列的 IgG2 恒定区中第 209 位 (EU330) 的 Ala 取代成 Ser 的工序、将第 210 位 (EU331) 的 Pro 取代成 Ser 的工序、以及将第 218 位 (EU339) 的 Thr 取代成 Ala 的工序即可,还可以包括其他氨基酸取代。对氨基酸取代的方法没有特别限定,例如可以按照上述位点特异性诱变法或实施例中记载的方法进行。

[0199] 本发明还涉及降低来自 IgG2 铰链部分的异质性的方法、提高在酸性条件下的稳定性的方法、降低来自 C 末端异质性的方法和/或降低抗体与 Fc γ R 结合的方法 (M14 Δ GK),上述方法均包括对具有 SEQ ID NO:2 记载的氨基酸序列的 IgG2 恒定区进行下述工序:

[0200] (a) 将 SEQ ID NO:2 的第 209 位 (EU 编号第 330 位) 的 Ala 取代成其他氨基酸的工序;

[0201] (b) 将 SEQ ID NO:2 的第 210 位 (EU 编号第 331 位) 的 Pro 取代成其他氨基酸的工序;

[0202] (c) 将 SEQ ID NO:2 的第 218 位 (EU 编号第 339 位) 的 Thr 取代成其他氨基酸的工序;

[0203] (d) 将 SEQ ID NO:2 的第 276 位 (EU 编号第 397 位) 的 Met 取代成其他氨基酸的工序;

[0204] (e) 将 SEQ ID NO:2 的第 14 位 (EU 编号第 131 位) 的 Cys 取代成其他氨基酸的工序;

[0205] (f) 将 SEQ ID NO:2 的第 16 位 (EU 编号第 133 位) 的 Arg 取代成其他氨基酸的工序;

[0206] (g) 将 SEQ ID NO:2 的第 102 位 (EU 编号第 219 位) 的 Cys 取代成其他氨基酸的工序;

[0207] (h) 将 SEQ ID NO:2 的第 20 位 (EU 编号第 137 位) 的 Glu 取代成其他氨基酸的工序;

[0208] (i) 将 SEQ ID NO:2 的第 21 位 (EU 编号第 138 位) 的 Ser 取代成其他氨基酸的工序;以及

[0209] (j) 使 SEQ ID NO:2 的第 325 位的 Gly 和第 326 位的 Lys (分别为 EU 编号第 446 位和第 447 位) 缺失的工序。

[0210] 对取代后的氨基酸没有特别限定,但优选第 209 位 (EU 编号 330) 的 Ala 取代成 Ser、第 210 位 (EU 编号 331) 的 Pro 取代成 Ser、第 218 位 (EU 编号 339) 的 Thr 取代成 Ala、第 276 位 (EU 编号 397) 的 Met 取代成 Val、第 14 位 (EU 编号 131) 的 Cys 取代成 Ser、第 16 位 (EU 编号 133) 的 Arg 取代成 Lys、第 102 位 (EU 编号 219) 的 Cys 取代成 Ser、第 20 位 (EU 编号 137) 的 Glu 取代成 Gly、第 21 位 (EU 编号 138) 的 Ser 取代成 Gly。

[0211] 本发明还涉及降低来自 IgG2 铰链部分的异质性的方法、降低来自 C 末端的异质性的方法和 / 或降低抗体与 Fc γ R 结合的方法 (M86 Δ GK), 上述方法均包括对具有 SEQ ID NO: 2 记载的氨基酸序列的 IgG2 恒定区进行下述工序:

[0212] (a) 将 SEQ ID NO: 2 的第 209 位 (EU 编号第 330 位) 的 Ala 取代成其他氨基酸的工序;

[0213] (b) 将 SEQ ID NO: 2 的第 210 位 (EU 编号第 331 位) 的 Pro 取代成其他氨基酸的工序;

[0214] (c) 将 SEQ ID NO: 2 的第 218 位 (EU 编号第 339 位) 的 Thr 取代成其他氨基酸的工序;

[0215] (d) 将 SEQ ID NO: 2 的第 14 位 (EU 编号第 131 位) 的 Cys 取代成其他氨基酸的工序;

[0216] (e) 将 SEQ ID NO: 2 的第 16 位 (EU 编号第 133 位) 的 Arg 取代成其他氨基酸的工序;

[0217] (f) 将 SEQ ID NO: 2 的第 102 位 (EU 编号第 219 位) 的 Cys 取代成其他氨基酸的工序;

[0218] (g) 将 SEQ ID NO: 2 的第 20 位 (EU 编号第 137 位) 的 Glu 取代成其他氨基酸的工序;

[0219] (h) 将 SEQ ID NO: 2 的第 21 位 (EU 编号第 138 位) 的 Ser 取代成其他氨基酸的工序; 以及

[0220] (i) 使 SEQ ID NO: 2 的第 325 位的 Gly 和第 326 位的 Lys (分别为 EU 编号第 446 位和第 447 位) 缺失的工序。

[0221] 对取代后的氨基酸没有特别限定, 但优选第 209 位 (EU 编号 330) 的 Ala 取代成 Ser、第 210 位 (EU 编号 331) 的 Pro 取代成 Ser、第 218 位 (EU 编号 339) 的 Thr 取代成 Ala、第 14 位 (EU 编号 131) 的 Cys 取代成 Ser、第 16 位 (EU 编号 133) 的 Arg 取代成 Lys、第 102 位 (EU 编号 219) 的 Cys 取代成 Ser、第 20 位 (EU 编号 137) 的 Glu 取代成 Gly、第 21 位 (EU 编号 138) 的 Ser 取代成 Gly。

[0222] 本发明的方法只要包括上述工序即可, 还可以包括其他氨基酸取代和缺失的其他工序。对氨基酸的取代和缺失的方法没有特别限定, 例如可以按照上述位点特异性诱变法或实施例记载的方法进行。

[0223] 本发明还涉及降低来自 IgG2 铰链部分的异质性的方法、提高在酸性条件下的稳定性的方法和 / 或降低来自 C 末端的异质性的方法 (M31 Δ GK), 上述方法均包括对具有 SEQ ID NO: 2 记载的氨基酸序列的 IgG2 恒定区进行下述工序:

[0224] (a) 将 SEQ ID NO: 2 的第 276 位 (EU 编号第 397 位) 的 Met 取代成其他氨基酸的工序;

[0225] (b) 将 SEQ ID NO: 2 的第 14 位 (EU 编号第 131 位) 的 Cys 取代成其他氨基酸的工序;

[0226] (c) 将 SEQ ID NO: 2 的第 16 位 (EU 编号第 133 位) 的 Arg 取代成其他氨基酸的工序;

[0227] (d) 将 SEQ ID NO: 2 的第 102 位 (EU 编号第 219 位) 的 Cys 取代成其他氨基酸的

工序；

[0228] (e) 将 SEQ ID NO :2 的第 20 位 (EU 编号第 137 位) 的 Glu 取代成其他氨基酸的工序；

[0229] (f) 将 SEQ ID NO :2 的第 21 位 (EU 编号第 138 位) 的 Ser 取代成其他氨基酸的工序；以及

[0230] (g) 使 SEQ ID NO :2 的第 325 位的 Gly 和第 326 位的 Lys (分别为 EU 编号第 446 位和第 447 位) 缺失的工序。

[0231] 对取代后的氨基酸没有特别限定,但优选第 276 位 (EU 编号 397) 的 Met 取代成 Val、第 14 位 (EU 编号 131) 的 Cys 取代成 Ser、第 16 位 (EU 编号 133) 的 Arg 取代成 Lys、第 102 位 (EU 编号 219) 的 Cys 取代成 Ser、第 20 位 (EU 编号 137) 的 Glu 取代成 Gly、第 21 位 (EU 编号 138) 的 Ser 取代成 Gly。

[0232] 本发明还涉及降低来自 IgG2 铰链部分的异质性的方法和 / 或降低来自 C 末端的异质性的方法 (M40 Δ GK), 上述方法均包括对具有 SEQ ID NO :2 记载的氨基酸序列的 IgG2 恒定区进行下述工序：

[0233] (a) 将 SEQ ID NO :2 的第 14 位 (EU 编号第 131 位) 的 Cys 取代成其他氨基酸的工序；

[0234] (b) 将 SEQ ID NO :2 的第 16 位 (EU 编号第 133 位) 的 Arg 取代成其他氨基酸的工序；

[0235] (c) 将 SEQ ID NO :2 的第 102 位 (EU 编号第 219 位) 的 Cys 取代成其他氨基酸的工序；

[0236] (d) 将 SEQ ID NO :2 的第 20 位 (EU 编号第 137 位) 的 Glu 取代成其他氨基酸的工序；

[0237] (e) 将 SEQ ID NO :2 的第 21 位 (EU 编号第 138 位) 的 Ser 取代成其他氨基酸的工序；以及

[0238] (f) 使 SEQ ID NO :2 的第 325 位的 Gly 和第 326 位的 Lys (分别为 EU 编号第 446 位和第 447 位) 缺失的工序。

[0239] 对取代后的氨基酸没有特别限定,但优选第 14 位 (EU 编号 131) 的 Cys 取代成 Ser、第 16 位 (EU 编号 133) 的 Arg 取代成 Lys、第 102 位 (EU 编号 219) 的 Cys 取代成 Ser、第 20 位 (EU 编号 137) 的 Glu 取代成 Gly、第 21 位 (EU 编号 138) 的 Ser 取代成 Gly。

[0240] 本发明还涉及降低来自 IgG2 铰链部分的异质性的方法、提高药物动力学的方法和 / 或降低来自 C 末端的异质性的方法 (M58), 上述方法均包括对具有 SEQ ID NO :2 记载的氨基酸序列的 IgG2 恒定区中进行下述工序：

[0241] (a) 将 SEQ ID NO :2 的第 14 位 (EU 编号第 131 位) 的 Cys 取代成 Ser 的工序；

[0242] (b) 将 SEQ ID NO :2 的第 16 位 (EU 编号第 133 位) 的 Arg 取代成 Lys 的工序；

[0243] (c) 将 SEQ ID NO :2 的第 102 位 (EU 编号第 219 位) 的 Cys 取代成 Ser 的工序；

[0244] (d) 将 SEQ ID NO :2 的第 20 位 (EU 编号第 137 位) 的 Glu 取代成 Gly 的工序；

[0245] (e) 将 SEQ ID NO :2 的第 21 位 (EU 编号第 138 位) 的 Ser 取代成 Gly 的工序；

[0246] (f) 将 SEQ ID NO :2 的第 147 位 (EU 编号第 268 位) 的 His 取代成 Gln 的工序；

[0247] (g) 将 SEQ ID NO :2 的第 234 位 (EU 编号第 355 位) 的 Arg 取代成 Gln 的工序；

[0248] (h) 将 SEQ ID NO :2 的第 298 位 (EU 编号第 419 位) 的 Gln 取代成 Glu 的工序;
以及

[0249] (i) 使 SEQ ID NO :2 的第 325 位的 Gly 和第 326 位的 Lys (分别为 EU 编号第 446 位和第 447 位) 缺失的工序。

[0250] 本发明还涉及降低来自 IgG2 铰链部分的异质性的方法、提高药物动力学的方法、和 / 或降低来自 C 末端的异质性的方法 (M73), 上述方法均包括对具有 SEQ ID NO :2 记载的氨基酸序列的 IgG2 恒定区进行下述工序:

[0251] (a) 将 SEQ ID NO :2 的第 14 位 (EU 编号第 131 位) 的 Cys 取代成 Ser 的工序;

[0252] (b) 将 SEQ ID NO :2 的第 16 位 (EU 编号第 133 位) 的 Arg 取代成 Lys 的工序;

[0253] (c) 将 SEQ ID NO :2 的第 102 位 (EU 编号第 219 位) 的 Cys 取代成 Ser 的工序;

[0254] (d) 将 SEQ ID NO :2 的第 20 位 (EU 编号第 137 位) 的 Glu 取代成 Gly 的工序;

[0255] (e) 将 SEQ ID NO :2 的第 21 位 (EU 编号第 138 位) 的 Ser 取代成 Gly 的工序;

[0256] (f) 将 SEQ ID NO :2 的第 147 位 (EU 编号第 268 位) 的 His 取代成 Gln 的工序;

[0257] (g) 将 SEQ ID NO :2 的第 234 位 (EU 编号第 355 位) 的 Arg 取代成 Gln 的工序;

[0258] (h) 将 SEQ ID NO :2 的第 298 位 (EU 编号第 419 位) 的 Gln 取代成 Glu 的工序;

[0259] (i) 将 SEQ ID NO :2 的第 313 位 (EU 编号第 434 位) 的 Asn 取代成 Ala 的工序;
以及

[0260] (j) 使 SEQ ID NO :2 的第 325 位 (EU 编号第 446 位) 的 Gly 和第 326 位 (EU 编号第 447 位) 的 Lys 缺失的工序。

[0261] 本发明的方法只要包括上述工序即可, 还可以包括其他氨基酸取代和缺失的其他工序。对氨基酸的取代和缺失的方法没有特别限定, 例如可以按照上述位点特异性诱变法或实施例中记载的方法进行。

[0262] < 提高 IgG4 恒定区在酸性条件下的稳定性的方法 >

[0263] 本发明还涉及提高抗体在酸性条件下的稳定性的方法, 该方法包括将具有 SEQ ID NO :3 记载的氨基酸序列的 IgG4 恒定区 (Mol Immunol. 1993 Jan ;30(1) :105-8) 中第 289 位 (EU 编号第 409 位) 的 Arg 取代成其他氨基酸的工序。本发明的提高抗体在酸性条件下的稳定性的方法只要包括将 SEQ ID NO :3 记载的氨基酸序列 (人 IgG4 恒定区) 中第 289 位 (EU 编号第 409 位) 的 Arg 取代成其他氨基酸的工序即可, 还可以包括其他氨基酸取代。对取代后的氨基酸没有特别限定, 但优选取代成 Lys。对氨基酸取代的方法没有特别限定, 例如可以按照上述位点特异性诱变法或实施例中记载的方法进行。

[0264] < 降低来自 IgG4 恒定区的 C 末端氨基酸缺失的异质性的方法 >

[0265] 本发明还涉及改善抗体异质性的方法, 该方法包括使具有 SEQ ID NO :3 记载的氨基酸序列的 IgG4 恒定区 (Mol Immunol. 1993 Jan ;30(1) :105-8) 中第 326 位 (EU 编号第 446 位) 的 Gly 和第 327 位 (EU 编号第 447 位) 的 Lys 缺失的工序。本发明的改善抗体异质性的方法只要包括使具有 SEQ ID NO :3 记载的氨基酸序列的 IgG4 恒定区中第 327 位 (EU 编号第 447 位) 的 Lys 和 / 或第 326 位 (EU 编号第 446 位) 的 Gly 缺失的工序即可, 还可以包括其他氨基酸取代。对氨基酸取代的方法没有特别限定, 例如可以按照上述位点特异性诱变法或实施例中记载的方法进行。

[0266] 本发明还涉及提高 IgG4 在酸性条件下的稳定性的方法、降低来自 C 末端的异质性

的方法、减少抗体与 Fc γ R 结合的方法 (M11 Δ GK), 上述方法均包括对具有 SEQ ID NO:3 记载的氨基酸序列的 IgG4 恒定区进行下述工序:

[0267] (a) 将 SEQ ID NO:3 的第 14 位 (EU 编号第 131 位) 的 Cys 取代成其他氨基酸的工序;

[0268] (b) 将 SEQ ID NO:3 的第 16 位 (EU 编号第 133 位) 的 Arg 取代成其他氨基酸的工序;

[0269] (c) 将 SEQ ID NO:3 的第 20 位 (EU 编号第 137 位) 的 Glu 取代成其他氨基酸的工序;

[0270] (d) 将 SEQ ID NO:3 的第 21 位 (EU 编号第 138 位) 的 Ser 取代成其他氨基酸的工序;

[0271] (e) 将 SEQ ID NO:3 的第 97 位 (EU 编号第 214 位) 的 Arg 取代成其他氨基酸的工序;

[0272] (f) 将 SEQ ID NO:3 的第 100 位 (EU 编号第 217 位) 的 Ser 取代成其他氨基酸的工序;

[0273] (g) 将 SEQ ID NO:3 的第 102 位 (EU 编号第 219 位) 的 Tyr 取代成其他氨基酸的工序;

[0274] (h) 将 SEQ ID NO:3 的第 103 位 (EU 编号第 220 位) 的 Gly 取代成其他氨基酸的工序;

[0275] (i) 将 SEQ ID NO:3 的第 104 位 (EU 编号第 221 位) 的 Pro 取代成其他氨基酸的工序;

[0276] (j) 将 SEQ ID NO:3 的第 105 位 (EU 编号第 222 位) 的 Pro 取代成其他氨基酸的工序;

[0277] (k) 将 SEQ ID NO:3 的第 113 位 (EU 编号第 233 位) 的 Glu 取代成其他氨基酸的工序;

[0278] (l) 将 SEQ ID NO:3 的第 114 位 (EU 编号第 234 位) 的 Phe 取代成其他氨基酸的工序;

[0279] (m) 将 SEQ ID NO:3 的第 115 位 (EU 编号第 235 位) 的 Leu 取代成其他氨基酸的工序;

[0280] (n) 使 SEQ ID NO:3 的第 116 位 (EU 编号第 236 位) 的 Gly 缺失的工序;

[0281] (o) 将 SEQ ID NO:3 的第 289 位 (EU 编号第 409 位) 的 Arg 取代成其他氨基酸的工序;以及

[0282] (p) 使 SEQ ID NO:3 的第 236 位 (EU 编号第 446 位) 的 Gly 和第 237 位 (EU 编号第 447 位) 的 Lys 缺失的工序。

[0283] 对取代后的氨基酸没有特别限定, 但优选第 14 位 (EU 编号 131) 的 Cys 取代成 Ser、第 16 位 (EU 编号 133) 的 Arg 取代成 Lys、第 20 位 (EU 编号 137) 的 Glu 取代成 Gly、第 21 位 (EU 编号 138) 的 Ser 取代成 Gly、第 97 位 (EU 编号 214) 的 Arg 取代成 Thr、第 100 位 (EU 编号 217) 的 Ser 取代成 Arg、第 102 位 (EU 编号 219) 的 Tyr 取代成 Ser、第 103 位 (EU 编号 220) 的 Gly 取代成 Cys、第 104 位 (EU 编号 221) 的 Pro 取代成 Val、第 105 位 (EU 编号 222) 的 Pro 取代成 Glu、第 113 位 (EU 编号 233) 的 Glu 取代成 Pro、第 114 位 (EU 编号

234) 的 Phe 取代成 Val、第 115 位 (EU 编号 235) 的 Leu 取代成 Ala、第 289 位 (EU 编号 409) 的 Arg 取代成 Lys。

[0284] 本发明的方法只要包括上述工序即可,还可以包括其他氨基酸取代和缺失的其他工序。对氨基酸的取代和缺失的方法没有特别限定,例如可以按照上述位点特异性诱变法或实施例中记载的方法进行。

[0285] <降低来自 IgG1 恒定区的 C 末端氨基酸缺失的异质性的方法>

[0286] 本发明还涉及改善抗体异质性的方法,该方法包括使具有 SEQ ID NO:1 记载的氨基酸序列的 IgG1 恒定区中第 329 位 (EU 编号第 446 位) 的 Gly 和第 330 位 (EU 编号第 447 位) 的 Lys 缺失的工序。本发明的改善抗体异质性的方法只要包括使具有 SEQ ID NO:1 记载的氨基酸序列的 IgG1 恒定区中第 330 位 (EU 编号第 447 位) 的 Lys 和第 329 位 (EU 编号第 446 位) 的 Gly 缺失的工序即可,还可以包括其他氨基酸取代。对氨基酸取代的方法没有特别限定,例如可以按照上述位点特异性诱变法或实施例中记载的方法进行。

[0287] 对上述抗体恒定区没有特别限定,可用于任何抗体,但作为本发明的使用恒定区的抗体的实例,例如有以下抗体。

[0288] (a) SEQ ID NO:48 (具有 (VH4-M73) 的氨基酸序列的重链);

[0289] (b) SEQ ID NO:46 (具有 (VH3-M73) 的氨基酸序列的重链);

[0290] (c) SEQ ID NO:44 (具有 (VH5-M83) 的氨基酸序列的重链);

[0291] (d) SEQ ID NO:49 (具有 (VL1-kappa) 的氨基酸序列的轻链);

[0292] (e) SEQ ID NO:47 (具有 (VL3-kappa) 的氨基酸序列的轻链);

[0293] (f) SEQ ID NO:45 (具有 (VL5-kappa) 的氨基酸序列的轻链);

[0294] (g) 包含 (a) 的重链和 (d) 的轻链的抗体 (FV3-M73);

[0295] (h) 包含 (b) 的重链和 (e) 的轻链的抗体 (FV4-M73);

[0296] (i) 包含 (c) 的重链和 (f) 的轻链的抗体 (FV5-M83)。

[0297] <包含抗体的药物组合物>

[0298] 本发明提供包含本发明抗体的药物组合物。

[0299] 本发明的药物组合物除包含抗体外,还可以导入药物上可接受的载体,按照公知的方法制成制剂。例如可以和水或除水以外的药学上可接受的液体制成无菌溶液或混悬液等注射剂的形式,进行胃肠外给药。例如,考虑将其与药理学上可接受的载体或介质适当组合,按照通常认可的制药操作(製藥实施)所要求的单位用量形式进行混合,从而制成制剂,所述载体和介质具体有灭菌水或生理盐水、植物油、乳化剂、悬浮剂、表面活性剂、稳定剂、香味剂、赋形剂、媒介物、防腐剂、粘合剂等。这些制剂中的有效成分量为在所指示的范围内得到适当容量的量。

[0300] 注射用无菌组合物可以使用注射用蒸馏水这样的媒介物,按照通常的制剂操作制成处方。

[0301] 作为注射用水溶液,例如有生理盐水、含有葡萄糖或其他辅剂(例如 D-山梨醇、D-甘露糖、D-甘露醇、氯化钠)的等渗溶液。上述注射用水溶液可以和适当的助溶剂(例如醇,具体有乙醇、多元醇(例如丙二醇、聚乙二醇))、非离子性表面活性剂(例如聚山梨酯 80(TM)、HCO-50)结合使用。

[0302] 作为油性液体,可列举芝麻油、大豆油。上述油性液体可以和作为助溶剂的苯甲酸

苯酯、苯甲醇结合使用。还可以与缓冲剂（例如磷酸盐缓冲液、乙酸钠缓冲液）、镇痛剂（例如盐酸普鲁卡因）、稳定剂（例如苯甲醇、苯酚）、抗氧剂混合。所制备的注射液通常填充在适当的安瓿中。

[0303] 给药方式优选为胃肠外给药，具体有注射剂型、经鼻给药剂型、经肺给药剂型、经皮给药剂型等。注射剂型的实例有：例如可以通过静脉内注射、肌肉内注射、腹腔内注射、皮下注射等进行全身或局部给药。

[0304] 可以根据患者的年龄、症状选择适当的给药方法。作为含有抗体或编码抗体的多核苷酸的药物组合物的给药量，例如可以在每次 0.0001mg ~ 1000mg/kg 体重的范围内选择。或者，例如可以按照每名患者 0.001 ~ 100000mg/ 人的范围选择给药量，但并不限于上述数值。给药量、给药方法可以根据患者的体重、年龄和症状等而变动，本领域技术人员可以适当选择。

[0305] 本说明书中使用的氨基酸的三字母表示与单字母表示的对应关系如下。

[0306] 丙氨酸 :Ala (A)

[0307] 精氨酸 :Arg (R)

[0308] 天冬酰胺 :Asn (N)

[0309] 天冬氨酸 :Asp (D)

[0310] 半胱氨酸 :Cys (C)

[0311] 谷氨酰胺 :Gln (Q)

[0312] 谷氨酸 :Glu (E)

[0313] 甘氨酸 :Gly (G)

[0314] 组氨酸 :His (H)

[0315] 异亮氨酸 :Ile (I)

[0316] 亮氨酸 :Leu (L)

[0317] 赖氨酸 :Lys (K)

[0318] 甲硫氨酸 :Met (M)

[0319] 苯丙氨酸 :Phe (F)

[0320] 脯氨酸 :Pro (P)

[0321] 丝氨酸 :Ser (S)

[0322] 苏氨酸 :Thr (T)

[0323] 色氨酸 :Trp (W)

[0324] 酪氨酸 :Tyr (Y)

[0325] 缬氨酸 :Val (V)

[0326] 需要说明的是，本说明书中引用的所有在先技术文献均作为参照而纳入本说明书中。

[0327] 实施例

[0328] 以下，通过实施例来进一步具体说明本发明，但本发明并不限于这些实施例。

[0329] [实施例 1] 提高 IgG2 和 IgG4 在酸性条件下的稳定性

[0330] IgG2、IgG4 化人源化 IL-6 受体抗体表达载体的制备、表达

[0331] 虽然人源化抗人 IL-6 受体抗体、即人源化 PM1 抗体 (Cancer Res. 1993Feb 15 ;

53(4):851-6) 的恒定区是 IgG1 同种型,但为了降低 Fc γ 受体结合性,制备将恒定区取代成 IgG2 的分子 (WT-IgG2、SEQ ID NO:13) 和取代成 IgG4 (Mol Immunol.1993 Jan;30(1):105-8.) 的分子 (WT-IgG4、SEQ ID NO:14)。在 IgG 的表达中使用动物细胞表达用载体。如下构建表达载体:通过参考例 1 中使用的人源化 PM1 抗体 (IgG1) 的恒定区部分的 NheI/NotI 消化并通过连接反应 (ligation) 将恒定区取代成 IgG2 或 IgG4。各 DNA 片段的核苷酸序列通过使用 BigDyeTerminator 循环测序试剂盒 (Applied Biosystems),利用 DNA 序列分析仪 ABI PRISM 3730xL DNA 序列分析仪或 ABI PRISM 3700DNA 序列分析仪 (Applied Biosystems),按照所附说明书中所述的方法进行确定。使用 WT (SEQ ID NO:15) 作为 L 链,按照下述方法进行 WT-IgG1、WT-IgG2、WT-IgG4 的表达。将来自人胚肾癌细胞的 HEK293H 株 (Invitrogen) 悬浮于含有 10% 胎牛血清 (Invitrogen) 的 DMEM 培养基 (Invitrogen) 中,以 $5 \sim 6 \times 10^5$ 个/mL 的细胞密度在粘附细胞用培养皿 (直径 10cm;CORNING) 的各皿中分别接种 10mL,在 37℃、5% CO₂ 的培养箱内培养一昼夜,之后吸除培养基,添加 6.9mL CHO-S-SFM-II (Invitrogen) 培养基。将制备的质粒 DNA 混合液 (总计 13.8 μ g) 与 20.7 μ L 1 μ g/mL 的聚乙烯亚胺 (Polysciences Inc.) 和 690 μ L CHO-S-SFMII 培养基混合,在室温下静置 10 分钟,之后投入各皿的细胞中,在 37℃、5% CO₂ 的 CO₂ 培养箱内孵育 4~5 小时。之后,添加 6.9mL CHO-S-SFM-II (Invitrogen) 培养基,在 CO₂ 培养箱内培养 3 天。回收培养上清,之后以约 2000g 的离心力在室温下离心 5 分钟以除去细胞,再通过 0.22 μ m 的滤器 MILLEX^(R)-GV (Millipore) 进行灭菌。该安瓿使用前一直在 4℃ 下保存。

[0332] (1) 人源化 PM1 抗体 (PM-1VH+IgG1)H 链:SEQ ID NO:12 (氨基酸序列)

[0333] (2) 人源化 PM-1VH+IgG2H 链:SEQ ID NO:13 (氨基酸序列)

[0334] (3) 人源化 PM-1VH+IgG4H 链:SEQ ID NO:14 (氨基酸序列)

[0335] 通过盐酸洗提从蛋白 A 中纯化 WT-IgG1、WT-IgG2、WT-IgG4

[0336] 向得到的培养上清中添加悬浮于 TBS 中的 50 μ L rProteinA SepharoseTM Fast Flow (Amersham Biosciences),在 4℃ 下倒置混合 (転倒混合 mixed by inversion) 4 小时以上。将该溶液移至 0.22 μ m 滤杯 Ultrafree^(R)-MC (Millipore) 中,用 500 μ L TBS 清洗 3 次,之后将 rProteinA SepharoseTM 树脂悬浮于 100 μ L 的 10mM HCl、150mM NaCl (pH 2.0) 中,静置 2 分钟,之后洗提抗体 (盐酸洗提法)。立即加入 6.7 μ L 的 1.5M Tris-HCl (pH7.8) 进行中和。洗提 2 次,得到 200 μ L 的纯化抗体。

[0337] 通过盐酸洗提法纯化的 WT-IgG1、WT-IgG2、WT-IgG4 的凝胶过滤层析分析

[0338] 为了评价通过盐酸洗提法得到的纯品的聚集物含量,进行凝胶过滤层析分析。

[0339] 聚集物评价方法:

[0340] 系统:Waters Alliance

[0341] 柱:G3000SWx1 (TOSOH)

[0342] 流动相:50mM 磷酸钠、300mM KCl、pH7.0

[0343] 流速、波长:0.5ml/分钟、220nm

[0344] 结果见图 1。WT-IgG1 纯化后的聚集物含量为约 2% 左右,相对于此,WT-IgG2 和 WT-IgG4 纯化后的聚集物含量均为约 25% 左右。由此认为:IgG1 对盐酸洗提时的酸稳定,而 IgG2 和 IgG4 对盐酸洗提时的酸不稳定,发生变性、聚集化,由此可知:与 IgG1 相比,IgG2 和 IgG4 在酸性条件下的稳定性低。在 IgG 分子的纯化中往往会使用蛋白 A,而从蛋白 A 中洗

提 IgG 分子时则在酸性条件下进行。此外,开发 IgG 分子作为药品时必需将病毒灭活,该灭活通常在酸性条件下进行。由此可知:虽然希望 IgG 分子在酸性条件下的稳定性高,但 IgG2 和 IgG4 分子在酸性条件下的稳定性较 IgG1 差,首次明确了在开发 IgG2 和 IgG4 分子作为药品时存在酸性条件下的变性、聚集化的问题。认为在开发 IgG2 和 IgG4 分子作为药品时希望解决变性、聚集化的问题,但迄今为止通过氨基酸取代来解决此问题的方法未见报道。

[0345] WT-IgG2、WT-IgG4 的 CH3 结构域改变体的制备和评价

[0346] 由于已显示出 IgG2 和 IgG4 分子在酸性条件下的稳定性较 IgG1 差,所以研究 IgG2 和 IgG4 分子在酸性条件下的稳定性得到改善的改变体。根据 IgG2 和 IgG4 分子的恒定区模型,认为在酸性条件下不稳定的要因在于 CH3 结构域中 CH3/CH3 界面的不稳定性,认为 IgG2 中 EU 编号第 397 位的甲硫氨酸、IgG4 中 EU 编号第 409 位的精氨酸分别使 IgG2 和 IgG4 的 CH3/CH3 界面不稳定。由于 IgG1 中 EU 编号第 397 位是缬氨酸、EU 编号第 409 位是赖氨酸,因此制备了将 IgG2 的 EU 编号第 397 位的甲硫氨酸变成缬氨酸的抗体 (IgG2-M397V, SEQ ID NO:16 (氨基酸序列)) 和将 IgG4 的 EU 编号第 409 位的精氨酸变成赖氨酸的抗体 (IgG4-R409K, SEQ ID NO:17 (氨基酸序列))。

[0347] 目标抗体的表达载体的制备、表达、纯化采用上述盐酸洗提法来进行。为了评价通过盐酸洗提法由蛋白 A 得到的纯品的聚集物含量,进行凝胶过滤层析分析。

[0348] 聚集物评价方法:

[0349] 系统:Waters Alliance

[0350] 柱:G3000SWx1 (TOSOH)

[0351] 流动相:50mM 磷酸钠、300mM KCl、pH7.0

[0352] 流速、波长:0.5ml/分钟、220nm

[0353] 结果见图 1。WT-IgG1 纯化后的聚集物含量为约 2%,而 WT-IgG2 和 WT-IgG4 纯化后的聚集物含量均为约 25%。相对于此,作为 CH3 结构域改变体的 IgG2-M397V 和 IgG4-R409K 的聚集物含量均为约 2%,与 IgG1 在同等水平。研究表明:通过将 IgG2 的 EU 编号第 397 位的甲硫氨酸变成缬氨酸、或者通过将 IgG4 的 EU 编号第 409 位的精氨酸变成赖氨酸,可以提高 IgG2 抗体和 IgG4 抗体在酸性条件下的稳定性。将纯化抗体用 20mM 乙酸钠、150mM NaCl、pH6.0 的溶液进行透析 (EasySEP, TOMY),在约 0.1mg/mL 蛋白浓度下,在 40℃~100℃ 之间以 1℃/分钟的升温速度进行 DSC 测定 (测定热变性中间温度、T_m 值)。测定 WT-IgG2、WT-IgG4、IgG2-M397V 和 IgG4-R409K 的热变性中间温度,结果表明:与 WT-IgG2 和 WT-IgG4 相比,IgG2-M397V 和 IgG4-R409K 中分别导入有改变的 CH3 结构域的 T_m 值均较高。由此可知:与 WT-IgG2 和 WT-IgG4 相比,IgG2-M397V 和 IgG4-R409K 的热稳定性也均优异。

[0354] 由于 IgG2 和 IgG4 在使用了蛋白 A 的纯化工序和病毒灭活工序中被暴露在酸性条件下,所以上述工序中的变性、聚集化成了问题。但发现通过使用 IgG2-M397V 和 IgG4-R409K 作为 IgG2 和 IgG4 的恒定区序列,可以解决上述问题。可知上述改变在开发 IgG2 和 IgG4 抗体作为药品时极为有用。从 IgG2-M397V 和 IgG4-R409K 的热稳定性也优异的观点出发,也可知两者有用。

[0355] [实施例 2] 改善来自 IgG2 的二硫键的异质性

[0356] 通过乙酸洗提从蛋白 A 中纯化 WT-IgG1、WT-IgG2、WT-IgG4

[0357] 向实施例 1 中得到的培养上清中添加 50 μL 悬浮于 TBS 中的 rProteinA

Sepharose™ Fast Flow(Amersham Biosciences),在4℃下倒置混合4小时以上。将该溶液移至0.22 μm 滤杯 Ultrafree^(R)-MC(Millipore)中,用500 μL TBS清洗3次,之后将rProtein A Sepharose™树脂悬浮于100 μL的50mM 乙酸钠水溶液(pH3.3)中,静置2分钟,之后洗提抗体。立即加入6.7 μL的1.5M Tris-HCl(pH7.8)进行中和。洗提2次,得到200 μL的纯化抗体。

[0358] WT-IgG1、WT-IgG2、WT-IgG4的阳离子交换色谱(IEC)分析

[0359] 为了评价纯化的WT-IgG1、WT-IgG2、WT-IgG4的均一性,通过阳离子交换色谱进行分析。

[0360] IEC评价方法:

[0361] 系统:Waters Alliance

[0362] 柱:ProPac WCX-10(Dionex)

[0363] 流动相A:25mM MES-NaOH、pH6.1

[0364] B:25mM MES-NaOH、250mM 乙酸钠、pH6.1

[0365] 流速、波长:0.5ml/分钟、280nm

[0366] 梯度B:分析WT-IgG1时,50%-75%(75分钟)

[0367] B:分析WT-IgG2和WT-IgG4时,30%-55%(75分钟)

[0368] 结果见图2。由结果可知:在离子交换分析中,WT-IgG1和WT-IgG4为单峰,而WT-IgG2存在多个峰,与IgG1和IgG4相比,IgG2分子的异质性多。实际上,有人报道了IgG2的同种型的来自铰链区二硫键的异质性(不均一性)(非专利文献10),认为图2所示的IgG2的杂峰也是来源于此的目标物质/相关物质。难以在维持目标物质/相关物质的异质性的批次间差异的同时作为药品大量制造,希望开发作为药品的抗体分子尽可能是均一(异质性少)的物质,因此,对于野生型IgG2而言,当将抗体作为药品开发时,在重要的均一性方面存在问题。实际上,US20060194280(A1)中报道了:天然型IgG2在离子交换色谱分析中观察到了来自二硫键的各种杂峰,这些峰之间生物活性不同。作为将该杂峰单一化的方法,US20060194280(A1)中报道了在纯化工序中进行重折叠的方法,但由于在制造中采用上述工序会使成本增加且繁杂,所以优选通过氨基酸取代将杂峰单一化的方法。虽然认为在作为药品进行开发时,希望解决来自铰链区二硫键的异质性,但迄今为止通过氨基酸取代来解决此问题的方法未见报道。

[0369] WT-IgG2的CH1结构域、铰链区的改变体的制备和评价

[0370] 如图3所示,认为IgG2分子存在各种二硫键构象。认为来自IgG2铰链区的异质性的原因是二硫键的不一致和游离半胱氨酸的存在。IgG2在上铰链区存在2个半胱氨酸(EU编号第219位和第220位),作为与该上铰链的2个半胱氨酸相邻的半胱氨酸,有存在于H链CH1结构域的EU编号第131位的半胱氨酸和L链C末端的半胱氨酸、以及二聚化的伙伴H链(相手H鎖)的相同上铰链的2个半胱氨酸。即,在IgG2的上铰链周边在H2L2缔合状态下总计有8个半胱氨酸相邻,由此认为存在由于二硫键的不一致和游离半胱氨酸产生的各种异质性。

[0371] 为了降低来自IgG2铰链区的异质性,对IgG2的铰链区序列和CH1结构域进行了改变。进行了用于避免IgG2中由于二硫键的不一致和游离半胱氨酸产生的异质性的研究。对各种改变体进行研究的结果认为:通过将野生型IgG2恒定区序列中存在于H链CH1结

构域的 EU 编号第 131 位的半胱氨酸和第 133 位的精氨酸分别改变成丝氨酸和赖氨酸、并将存在于 H 链上铰链的 EU 编号第 219 位的半胱氨酸改变成丝氨酸（以下记作 IgG2-SKSC）（IgG2-SKSC, SEQ ID NO:18），可以在不降低热稳定性的情况下避免异质性。认为通过上述改变，IgG2-SKSC 的 H 链和 L 链的共价键通过 EU 编号第 220 位的半胱氨酸与 L 链 C 末端的半胱氨酸之间的二硫键来均一地形成（图 4）。

[0372] IgG2-SKSC 的表达载体的制备、表达、纯化按照参考例 1 所述的方法进行。为了评价纯化的 IgG2-SKSC 和野生型 IgG2 (WT-IgG2) 的均一性，通过阳离子交换色谱进行分析。

[0373] IEC 评价方法：

[0374] 系统：Waters Alliance

[0375] 柱：ProPac WCX-10 (Dionex)

[0376] 流动相 A：25mM MES-NaOH、pH5.6

[0377] B：25mM MES-NaOH、250mM 乙酸钠、pH5.6

[0378] 流速、波长：0.5ml/分钟、280nm

[0379] 梯度 B：50% -100% (75 分钟)

[0380] 结果见图 5。如上所述，由结果可知：WT-IgG2 存在多个峰，而 IgG2-SKSC 以单峰的形式洗脱。这表明：通过导入 IgG2-SKSC 的改变使在 EU 编号第 220 位的半胱氨酸与 L 链 C 末端的半胱氨酸之间形成单一的二硫键，可以避免来自 IgG2 铰链区二硫键的异质性。按照与实施例 1 相同的方法测定 WT-IgG1、WT-IgG2 和 IgG2-SKSC 的热变性中间温度，结果：在 WT-IgG2 中观察到 T_m 值较 WT-IgG1 低的 Fab 结构域的峰，而在 IgG2-SKSC 中没有确认到这样的峰。由此可知：与 WT-IgG2 相比，IgG2-SKSC 的热稳定性优异。

[0381] 在开发抗体作为药品时，认为野生型 IgG2 在重要的均一性方面存在问题，但已经明确：通过使用 IgG2-SKSC 作为 IgG2 的恒定区序列可以解决此问题，在开发 IgG2 作为药品时非常有用。此外，从 IgG2-SKSC 的热稳定性优异方面考虑，其也是有用的。

[0382] [实施例 3] IgG 分子的 C 末端异质性的改善

[0383] WT-IgG1 的 H 链 C 末端 Δ GK 抗体的表达载体的构建

[0384] 作为抗体 C 末端序列的异质性，有人报道了：由 C 末端氨基酸的赖氨酸残基的缺失和 C 末端的 2 个氨基酸甘氨酸和赖氨酸的缺失引起的 C 末端氨基的酰胺化（非专利文献 12），在开发抗体作为药品时，希望不存在上述异质性。实际上，即使在作为人源化 PM-1 抗体的 TOCILIZUMAB 中，其主要成分也是存在于核苷酸序列上的 C 末端氨基酸的赖氨酸在翻译后通过修饰而缺失的序列，残留有赖氨酸的副成分也以异质性的形式存在。因此，为了降低 C 末端氨基酸的异质性，对 C 末端氨基酸进行改变。具体而言，通过预先使野生型 IgG1 的 H 链恒定区 C 末端的赖氨酸和甘氨酸从核苷酸序列上缺失，来研究是否可以抑制由 C 末端的 2 个氨基酸甘氨酸和赖氨酸的缺失引起的 C 末端氨基的酰胺化。

[0385] 使用参考例 1 中得到的人源化 PM-1 抗体 (WT) 的 pB-CH 载体，向 H 链 C 末端序列中导入突变。使用 QuikChange 位点定向诱变试剂盒 (Stratagene)，按照所附说明书中所述的方法，向编码 EU 编号第 447 位的 Lys 和 / 或 EU 编号第 446 位的 Gly 的核苷酸序列中导入突变，使其成为终止密码子。由此制备 C 末端的 1 个氨基酸赖氨酸 (EU 编号第 447 位) 预先缺失的抗体和 C 末端的 2 个氨基酸甘氨酸 (EU 编号第 446 位) 和赖氨酸 (EU 编号第 447 位) 预先缺失的抗体的表达载体。通过表达人源化 PM1 抗体的 L 链，得到了 H 链 C 末端 Δ K

抗体和 H 链 C 末端 Δ GK 抗体。抗体的表达、纯化按照参考例 1 所述的方法进行。

[0386] 纯化的 H 链 C 末端 Δ GK 抗体的阳离子交换色谱分析如下进行。使用纯化的 H 链 C 末端 Δ GK 抗体,按照下述方法通过阳离子交换色谱进行分析,评价 C 末端缺失对异质性的影响。阳离子交换色谱分析条件如下,比较人源化 PM1 抗体、H 链 C 末端 Δ K 抗体、H 链 C 末端 Δ GK 抗体的色谱图。

[0387] 柱:ProPac WCX-10 (Dionex)

[0388] 流动相 A:25mmol/L MES/NaOH、pH6.1

[0389] B:25mmol/L MES/NaOH、250mmol/L NaCl、pH6.1

[0390] 流速:0.5ml/分钟

[0391] 梯度:25% B(5 分钟) $\rightarrow$ (105 分钟) $\rightarrow$ 67% B $\rightarrow$ (1 分钟) $\rightarrow$ 100% B(5 分钟)

[0392] 检测:280nm

[0393] 未改变的人源化 PM-1 抗体、H 链 C 末端 Δ K 抗体和 H 链 C 末端 Δ GK 抗体的分析结果见图 6。根据非专利文献 10,保留时间较主峰延迟的碱性峰中包含 H 链 C 末端第 449 位的 Lys 残留体和第 447 位的 Pro 酰胺体,在 H 链 C 末端 Δ K 抗体中没有确认到碱性峰的大幅减少,但在 H 链 C 末端 Δ GK 抗体中确认到了碱性峰的大幅减少,由此可知:通过使 H 链 C 末端的 2 个氨基酸缺失,首次可以降低 H 链 C 末端异质性。

[0394] 为了评价 H 链 C 末端的 2 个残基的缺失对热稳定性的影响,通过 DSC 测定 H 链 C 末端 Δ GK 抗体的热变性温度。作为 DSC 测定用,通过用含 150mM NaCl 的 20mM 乙酸缓冲液 (pH6.0) 进行透析来置换缓冲液。将人源化 PM-1 抗体、H 链 C 末端 Δ GK 抗体和参比溶液(透析外液)充分脱气,之后将上述溶液分别封入量热计盒中,在 40℃下充分进行热平衡。接下来,以约 1K/分钟的扫描速度在 40℃~100℃进行 DSC 扫描。参考非专利文献 (Rodolfo 等人, Immunology Letters, 1999, 第 47-52 页),对所得变性峰进行峰指定时,确认 C 末端缺失对 CH3 结构域的热变性温度没有影响。

[0395] 由此,通过预先使 H 链恒定区的 C 末端的赖氨酸和甘氨酸从核苷酸序列上缺失,可以在不影响抗体热稳定性的情况下降低 C 末端氨基酸的异质性。由于在人抗体恒定区 IgG1、IgG2、IgG4 中 C 末端序列的 EU 编号第 447 位均为 Lys、EU 编号第 446 位均为 Gly,所以认为在本实施例中发现的降低 C 末端氨基酸异质性的方法也可适用于 IgG2 恒定区和 IgG4 恒定区。

[0396] [实施例 4] 新型最优化恒定区 M14 Δ GK 序列的制备

[0397] 在以中和抗原为目的的抗体药物中,不需要 Fc 区所具有的 ADCC 等效应子功能,所以不必与 Fc γ 受体结合。从免疫原性和副作用的角度考虑,认为可能也不优选与 Fc γ 受体的结合(非专利文献 5、6)。作为人源化抗 IL-6 受体 IgG1 抗体的 TOCILIZUMAB 与 IL-6 受体进行特异性结合,通过中和其生物学作用,可以用作类风湿性关节炎等与 IL-6 有关的疾病的治疗药,不必与 Fc γ 受体结合。

[0398] Fc γ 受体非结合的最优化恒定区 M14 Δ GK、M11 Δ GK、M17 Δ GK 的制备和评价

[0399] 作为降低与 Fc γ 受体结合的方法,认为有将 IgG 抗体的同种型由 IgG1 变为 IgG2 或 IgG4 同种型的方法 (Ann Hematol. 1998 Jun; 76(6):231-48)。作为完全消除与 Fc γ 受体结合的方法,有人报道了:向 Fc 区导入人工改变的方法。例如,由于抗 CD3 抗体和抗 CD4 抗体的效应子功能会引起副作用,所以向 Fc 区的 Fc γ 受体结合部分导入野生型序列中不

存在的氨基酸突变（非专利文献 3、7），所得的 Fc γ 受体非结合型的抗 CD3 抗体和抗 CD4 抗体的临床试验正在进行中（非专利文献 5、8）。有报道称：通过将 IgG1 的 Fc γ R 结合位点（EU 编号第 233、234、235、236、327、330、331 位）转换成 IgG2（EU 编号第 233、234、235、236 位）和 IgG4（EU 编号第 327、330、331 位）的序列，可以制备 Fc γ 受体非结合型抗体（专利文献 3）。但若将上述所有突变导入 IgG1 中，则认为会出现能够形成天然不存在的 T 细胞表位肽的 9 个氨基酸的新型肽序列，免疫原性风险会升高。在开发抗体作为药品时，希望免疫原性风险极低。

[0400] 为了解决上述课题，研究了 IgG2 恒定区的改变。在 IgG2 恒定区的 Fc γ R 结合位点中，EU 编号第 233、234、235、236 位是非结合型，而 Fc γ R 结合位点中 EU 编号第 327、330、331 位是不同于非结合型 IgG4 的序列，所以必需将 EU 编号第 327、330、331 位的氨基酸变成 IgG4 的序列（Eur J Immunol. 1999Aug ;29(8) :2613-24 中的 G2 Δ a）。但 IgG4 中 EU 编号第 339 位的氨基酸是丙氨酸，而 IgG2 中是苏氨酸，所以只将 EU 编号第 327、330、331 位的氨基酸变成 IgG4 的序列，就可出现能够形成天然不存在的 T 细胞表位肽的 9 个氨基酸的新型肽序列，产生免疫原性风险。于是，发现：除上述改变外，还创新地将 IgG2 的 EU 编号第 339 位的苏氨酸改变成丙氨酸，从而可以防止新的肽序列的出现。

[0401] 除了导入上述突变外，还导入了下述突变：实施例 1 中发现的提高 IgG2 在酸性条件下的稳定性的、IgG2 中 EU 编号第 397 位的甲硫氨酸取代成缬氨酸的突变；实施例 2 中发现的改善来自铰链区二硫键的异质性的、EU 编号第 131 位的半胱氨酸取代成丝氨酸的突变、EU 编号第 133 位的精氨酸取代成赖氨酸的突变、以及 EU 编号第 219 位的半胱氨酸取代成丝氨酸的突变。并且，由于随着第 131 位和第 133 位的突变的导入，出现能够形成天然不存在的 T 细胞表位肽的 9 个氨基酸的新型肽序列，产生免疫原性风险，所以通过导入 EU 编号第 137 位的谷氨酸取代成甘氨酸的突变、第 138 位的丝氨酸取代成甘氨酸的突变，使第 131 位～第 139 位附近的肽序列与天然存在的人序列相同。并且，为了降低来自 C 末端的异质性，使 H 链 C 末端 EU 编号第 446、447 位的甘氨酸和赖氨酸缺失。将导入有上述所有突变的恒定区序列作为 M14 Δ GK（M14 Δ GK，SEQ ID NO :5）。虽然 M14 Δ GK 中存在 1 个导入有由第 219 位的半胱氨酸取代成丝氨酸的突变而作为能够形成 T 细胞表位肽的 9 个氨基酸的新的肽序列的位点，但由于半胱氨酸和丝氨酸作为氨基酸序列的性质近似，所以认为免疫原性的风险极小，在利用 TEPITOPE 进行的免疫原性预测中，也没有确认到免疫原性的变化。

[0402] 按照参考例 1 所述的方法制备具有 WT 作为可变区序列、具有 M14 Δ GK 作为恒定区序列的抗体 H 链序列（M14 Δ GK，SEQ ID NO :5；WT-M14 Δ GK，SEQ ID NO :19）的表达载体，使用 WT-M14 Δ GK 作为 H 链、使用 WT 作为 L 链，按照参考例 1 所述的方法进行表达、纯化。

[0403] 按照相同的方法制备 WT-M11 Δ GK（M11 Δ GK，SEQ ID NO :8；WT-M11 Δ GK，SEQ ID NO :21）的表达载体，在所述 WT-M11 Δ GK 中，向 IgG4 恒定区的 EU 编号第 233、234、235、236 位中导入突变，以降低与 Fc γ 受体的结合（Eur J Immunol. 1999Aug ;29(8) :2613-24 中的 G4 Δ b；在该改变中，由于产生新的非人序列，所以免疫原性风险提高）；为了降低免疫原性风险，除上述改变外，还向 EU 编号第 131、133、137、138、214、217、219、220、221、222 位中导入突变，使铰链区二硫键的构象与 M14 Δ GK 的相同；并且，向 EU 编号第 409 位中导入突变，以提高在酸性条件下的稳定性（实施例 1）；使 EU 编号第 446 位和第 447 位的氨基酸缺失，以降低 C 末端异质性（实施例 3）。

[0404] 进一步制备 WT-M17 Δ GK (M17 Δ GK, SEQ ID NO :10 ;WT-M17 Δ GK, SEQ ID NO :20), 在所述 WT-M17 Δ GK 中, 向 IgG1 恒定区的 EU 编号第 233、234、235、236、327、330、331、339 位中导入突变 (Eur J Immunol. 1999Aug ;29 (8) :2613-24 中的 G1 Δ ab), 以降低与 Fc γ 受体的结合, 并且使 EU 编号第 446 位和第 447 位的氨基酸缺失, 以降低 C 末端的异质性 (实施例 3)。

[0405] 使用 WT-M17 Δ GK 或 WT-M11 Δ GK 作为 H 链、使用 WT 作为 L 链, 按照实施例 1 所述的方法进行表达、纯化。

[0406] WT-M14 Δ GK、WT-M17 Δ GK、WT-M11 Δ GK 的 Fc γ 受体结合性的评价

[0407] 与 Fc γ RI 结合的评价如下进行。使用 Biacore T100, 使固定在传感器芯片上的来源于人的 Fc γ 受体 I (以下记作 Fc γ RI) 与用作分析物的 IgG1、IgG2、IgG4、M11 Δ GK、M14 Δ GK、M1 Δ GK 7 进行相互作用, 比较其结合量。来源于人的 Fc γ RI 使用重组人 FcRIA/CD64 (R&Dsystems), 使用 IgG1、IgG2、IgG4、M11 Δ GK、M14 Δ GK、M17 Δ GK 作为样品进行测定。利用胺耦合法将 Fc γ RI 固定在传感器芯片 CM5 (BIACORE) 上。hFc γ RI 的最终固定量为约 13000RU (resonance units, 共振单位)。运行缓冲液使用 HBS-EP+, 流速为 20 μ L/ 分钟。将样品用 HBS-EP+ 调节为 100 μ g/mL 的浓度。分析包括下述两个工序: 注射 10 μ L 抗体溶液的 2 分钟作为结合相, 之后切换成 HBS-EP+, 作为 4 分钟的解离相。解离相结束后, 注射 20 μ L 的 5mM 氢氧化钠, 由此使传感器芯片再生。以上述结合、解离、再生作为 1 个分析周期, 注射各种抗体溶液, 得到传感图。依次注入作为分析物的 IgG4、IgG2、IgG1、M11、M14、M17, 重复操作 2 次。测定的结合量数据的比较结果见图 7。其结果, 结合量按 IgG1 > IgG4 >> IgG2 = M11 Δ GK = M14 Δ GK = M17 Δ GK 的顺序递减, 由此可知: 与野生型 IgG1、IgG4 相比, 野生型 IgG2、M11 Δ GK、M14 Δ GK、M17 Δ GK 与 Fc γ RI 的结合弱。

[0408] 与 Fc γ RIIa 结合的评价如下进行。使用 Biacore T100, 使固定在传感器芯片上的来源于人的 Fc γ 受体 IIa (以下记作 Fc γ RIIa) 与用作分析物的 IgG1、IgG2、IgG4、M11 Δ GK、M14 Δ GK、M17 Δ GK 发生相互作用, 之后比较其结合量。来源于人的 Fc γ RIIa 使用重组人 FcRIIA/CD32a (R&D systems), 使用 IgG1、IgG2、IgG4、M11 Δ GK、M14 Δ GK、M17 Δ GK 作为样品进行测定。利用胺耦合法将 Fc γ RIIa 固定在传感器芯片 CM5 (BIACORE) 上。Fc γ RIIa 的最终固定量为约 3300RU。运行缓冲液使用 HBS-EP+, 流速为 20 μ L/ 分钟。之后, 注入运行缓冲液直至基线稳定, 基线稳定后开始测定。使作为分析物的各 IgG 同种型 (IgG1、IgG2、IgG4) 和导入有突变的抗体 (M11 Δ GK、M14 Δ GK、M17 Δ GK) 与固定的 Fc γ RIIa 发生相互作用, 观察其结合量。运行缓冲液使用 HBS-EP+, 流速为 20 μ L/ 分钟, 测定温度为 25 $^{\circ}$ C。将各 IgG 和改变体调节为 100 μ g/mL, 注入 20 μ L 分析物, 使其与固定的 Fc γ RIIa 发生相互作用。进行相互作用后, 注入 200 μ L 运行缓冲液, 从而使分析物自 Fc γ RIIa 上解离, 使传感器芯片再生。依次注入分析物 IgG4、IgG2、IgG1、M11 Δ GK、M14 Δ GK、M17 Δ GK, 重复操作 2 次。测定的结合量数据的比较结果见图 8。其结果, 结合量按 IgG1 > IgG2 = IgG4 > M11 Δ GK = M14 Δ GK = M17 Δ GK 的顺序递减, 由此可知: 与野生型 IgG1、IgG2、IgG4 相比, M11 Δ GK、M14 Δ GK、M17 Δ GK 与 Fc γ RIIa 的结合弱。

[0409] 与 Fc γ RIIb 结合的评价如下进行。使用 Biacore T100, 使固定在传感器芯片上的、来源于人的 Fc γ 受体 IIb (以下记作 Fc γ RIIb) 与作为分析物的 IgG1、IgG2、IgG4、M11 Δ GK、M14 Δ GK、M17 Δ GK 发生相互作用, 比较其结合量。来源于人的 Fc γ RIIb 使用重组

人 FcRIIB/C(R&D systems), 使用 IgG1、IgG2、IgG4、M11 Δ GK、M14 Δ GK、M17 Δ GK 作为样品进行测定。通过胺耦合法将 Fc γ RIIb 固定在传感器芯片 CM5(BIACORE) 上。Fc γ RIIb 的最终固定量为约 4300RU。之后, 注入运行缓冲液直至基线稳定, 基线稳定后开始测定。使作为分析物的各 IgG 同种型 (IgG1、IgG2、IgG4) 和导入有突变的抗体 (M11 Δ GK、M14 Δ GK、M17 Δ GK) 与固定的 Fc γ RIIb 发生相互作用, 观察其结合量。运行缓冲液使用 HBS-EP+, 流速为 20 μ L/ 分钟, 测定温度为 25℃。将各 IgG 及其改变体调节为 200 μ g/mL, 注入 20 μ L 作为分析物, 使其与固定的 Fc γ RIIb 发生相互作用。发生相互作用后, 注入 200 μ L 运行缓冲液, 使分析物自 Fc γ RIIb 上解离, 使传感器芯片再生。依次注入分析物 IgG4、IgG2、IgG1、M11 Δ GK、M14 Δ GK、M17 Δ GK, 重复操作 2 次。测定的结合量数据的比较结果见图 9。其结果, 结合量按 IgG4 > IgG1 > IgG2 > M11 Δ GK = M14 Δ GK = M17 Δ GK 的顺序递减, 由此可知: 与野生型 IgG1、IgG2、IgG4 相比, M11 Δ GK、M14 Δ GK、M17 Δ GK 与 Fc γ RIIb 的结合弱。

[0410] 与 Fc γ RIIIa 结合的评价如下进行。使用 Biacore T100, 使固定在传感器芯片上的、来源于人的 Fc γ 受体 IIIa(以下记作 Fc γ RIIIa) 与用作分析物的 IgG1、IgG2、IgG4、M11 Δ GK、M14 Δ GK、M17 Δ GK 发生相互作用, 比较其结合量。来源于人的 Fc γ RIIIa 使用 hFc γ RIIIaV-His6(重组 hFc γ RIIIaV-His6: 本公司制品), 使用 IgG1、IgG2、IgG4、M11 Δ GK、M14 Δ GK、M17 Δ GK 作为样品进行测定。通过胺耦合法将 Fc γ RIIIa 固定在传感器芯片 CM5(BIACORE) 上。hFc γ RIIIaV-His6 的最终固定量为约 8200RU(resonance units, 共振单位)。运行缓冲液使用 HBS-EP+, 流速为 5 μ L/ 分钟。将样品用 HBS-EP+ 调节为 250 μ g/mL 的浓度。分析包括下述 2 个工序: 注射 10 μ L 抗体溶液的 2 分钟作为结合相, 之后切换成 HBS-EP+, 作为 4 分钟的解离相。解离相结束后, 注入 20 μ L 的 5mM 盐酸, 从而使传感器芯片再生。将上述结合、解离、再生作为 1 个分析周期, 注射各种抗体溶液, 得到传感图。依次注射作为分析物的 IgG4、IgG2、IgG1、M11 Δ GK、M14 Δ GK、M17 Δ GK。测定的结合量数据的比较结果见图 10。其结果, 结合量按 IgG1 >> IgG4 > IgG2 > M17 Δ GK > M11 Δ GK = M14 Δ GK 的顺序递减, 这表明: 与野生型 IgG1、IgG2、IgG4 相比, M11 Δ GK、M14 Δ GK、M17 Δ GK 与 Fc γ RIIIa 的结合弱。此外, 与 Eur J Immunol. 1999Aug ;29(8) ;2613-24 中报道的、包含 G1 Δ ab 的突变的 M17 Δ GK 相比, 可知 M11 Δ GK、M14 Δ GK 与 Fc γ RIIIa 的结合更弱。

[0411] 由上述结果确认: 与野生型 IgG1 相比, WT-M14 Δ GK、WT-M17 Δ GK、WT-M11 Δ GK 与各种 Fc γ 受体的结合明显降低。通过使用 WT-M14 Δ GK、WT-M17 Δ GK、WT-M11 Δ GK 作为恒定区, 可以避免来自经由 Fc γ 受体进入到 APC 中的免疫原性风险和来自 ADCC 等效应子功能的副作用, WT-M14 Δ GK、WT-M17 Δ GK、WT-M11 Δ GK 作为以中和抗原为目的的抗体药物的恒定区序列是有用的。

[0412] WT-M14 Δ GK、WT-M17 Δ GK、WT-M11 Δ GK 的高浓度稳定性试验

[0413] 评价 WT-M14 Δ GK、WT-M17 Δ GK、WT-M11 Δ GK 在高浓度制剂中的稳定性。将 WT-IgG1、WT-M14 Δ GK、WT-M17 Δ GK、WT-M11 Δ GK 的纯化抗体用 20mM 组氨酸、150mM NaCl、pH6.5 的溶液进行透析 (EasySEP, TOMY), 之后用超滤膜进行浓缩, 进行高浓度稳定性试验。试验条件如下。

[0414] 抗体: WT-IgG1、WT-M14 Δ GK、WT-M17 Δ GK、WT-M11 Δ GK

[0415] 缓冲液: 20mM 组氨酸、150mM NaCl、pH6.5

[0416] 浓度: 61mg/mL

[0417] 保存温度和保存时间 :40℃下 2 周、40℃下 1 个月、40℃下 2 个月

[0418] 聚集物评价方法 :

[0419] 系统 :Waters Alliance

[0420] 柱 :G3000SWx1 (TOSOH)

[0421] 流动相 :50mM 磷酸钠、300mM KCl、pH7.0

[0422] 流速、波长 :0.5ml/ 分钟、220nm

[0423] 将样品稀释 100 倍后进行分析

[0424] 利用上述凝胶过滤层析法评价原始制剂(刚制成的制剂)和在各种条件下保存后的制剂的聚集物含量,原始制剂中聚集物含量的变化量见图 11。其结果,与 WT-IgG1 相比,WT-M14 Δ GK、WT-M17 Δ GK、WT-M11 Δ GK 的聚集物增加量低,为 WT 中聚集物增加量的约 1/2。如图 12 所示,就 Fab 片段的增加量而言,WT-IgG1 和 WT-M17 Δ GK 程度相同,但 WT-M14 Δ GK 和 WT-M11 Δ GK 中 Fab 片段的增加量为 WT 的 Fab 片段增加量的约 1/4。作为 IgG 型抗体制剂的变性途径(劣化経路 degeneration pathway),如 WO 2003/039485 所述,主要可列举聚集物的生成和 Fab 分解物的生成。研究发现:与 WT-IgG1 相比,WT-M14 Δ GK 和 WT-M11 Δ GK 在聚集物的生成及 Fab 片段的生成这两个方面制剂的稳定性均优异。由此认为:即使是在 IgG1 恒定区的稳定性不充分、无法制成可以开发作为药品的高浓度溶液制剂的抗体,通过使用 WT-M14 Δ GK、WT-M17 Δ GK、WT-M11 Δ GK 作为恒定区,也可以制备具有高稳定性的高浓度溶液制剂。

[0425] 特别是 M14 Δ GK,认为其作为新的恒定区序列极为有用,所述新的恒定区序列使原始 IgG2 分子所具有的酸性条件下的不稳定性提高、改善了来自铰链区二硫键的异质性、不与 Fc γ 受体结合、将能够形成 T 细胞表位肽的 9 个氨基酸的新的肽序列抑制在最低限度、并且在高浓度制剂中的稳定性优于 IgG1。

[0426] [实施例 5]M31 Δ GK 的制备和评价

[0427] 将实施例 4 中制备的 M14 Δ GK 的 EU 编号第 330、331、339 位的氨基酸变成 IgG2 的序列,来制备 M31 Δ GK (M31 Δ GK, SEQ ID NO :7)。按照参考例 1 所述的方法制备具有 WT 作为可变区序列、具有 M31 Δ GK 作为恒定区序列的抗体 H 链序列 (WT-M31 Δ GK, SEQ ID NO :22) 的表达载体,使用 WT-M31 Δ GK 作为 H 链、使用 WT 作为 L 链,按照参考例 1 所述的方法表达、纯化 WT-M31 Δ GK。

[0428] 除 WT-M31 Δ GK 外,同时表达、纯化的 WT-IgG2 和 WT-M14 Δ GK 的阳离子交换色谱分析如下进行。阳离子交换色谱分析条件如下,比较 WT-IgG2、WT-M14 Δ GK、WT-M31 Δ GK 的色谱图。

[0429] 柱 :ProPac WCX-10 (Dionex)

[0430] 流动相 A :25mmol/L MES/NaOH、pH6.1

[0431] B :25mmol/L MES/NaOH、250mmol/L NaCl、pH6.1

[0432] 流速 :0.5mL/ 分钟

[0433] 梯度 :0% B (5 分钟) → (65 分钟) → 100% B → (1 分钟)

[0434] 检测 :280nm

[0435] WT-IgG2、WT-M14 Δ GK、WT-M31 Δ GK 的分析结果见图 13。可知:WT-IgG2 存在多个峰,但 WT-M31 Δ GK 和 WT-M14 Δ GK 一样以单峰的形式洗脱。这表明:即使在 WT-M31 Δ GK 中

也可以避免来自 IgG2 的铰链区二硫键的异质性。

[0436] [实施例 6]WT-M14 的血浆中滞留性的评价

[0437] 人体内的血浆中滞留性的预测方法

[0438] IgG 分子的血浆中滞留性长（消除慢），这是由于作为 IgG 分子的补救受体（サルベージレセプター salvage receptor）而已知的 FcRn 在起作用（Nat Rev Immunol. 2007Sep ;7(9) :715-25）。通过胞饮作用进入核内体中的 IgG 分子，其在核内体内的酸性条件下（pH6.0 附近）与在核内体内表达的 FcRn 结合。无法与 FcRn 结合的 IgG 分子进入溶酶体内，被溶酶体分解，但与 FcRn 结合的 IgG 分子向细胞表面移动，在血浆中的中性条件下（pH7.4 附近）自 FcRn 上解离，又返回到血浆中。

[0439] 作为 IgG 型抗体，已知有 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 同种型，有报道称，上述同种型在人体内的血浆中半衰期分别为：IgG1、IgG2 的半衰期为约 36 天；IgG3 的半衰期为约 29 天；IgG4 的半衰期为 16 天（Nat. Biotechnol. 2007Dec ;25(12) :1369-72），认为 IgG1 和 IgG2 的血浆中滞留性最长。通常，抗体药物的同种型为 IgG1、IgG2、IgG4，作为进一步提高上述 IgG 抗体的药物动力学的方法，有人报道了：通过改变 IgG 恒定区的序列来提高上述的与人 FcRn 的结合性的方法（JBiol Chem. 2007Jan 19 ;282(3) :1709-17；J Immunol. 2006Jan 1 ;176(1) :346-56）。

[0440] 由于小鼠 FcRn 与人 FcRn 之间存在种特异性差异（Proc Natl AcadSci USA. 2006Dec 5 ;103(49) :18709-14），所以为了预测恒定区序列已发生改变的 IgG 抗体在人体内的血浆中滞留性，认为希望评价与人 FcRn 的结合以及在人 FcRn 转基因小鼠体内的血浆中滞留性（IntImmunol. 2006Dec ;18(12) :1759-69）。

[0441] 与人 FcRn 结合的评价

[0442] FcRn 是 FcRn 与 $\beta 2$ -微球蛋白的复合体。根据公开的人 FcRn 基因序列（J. Exp. Med. 180(6), 2377-2381(1994)）制备寡 DNA 引物。以人 cDNA (Human Placenta Marathon-Ready cDNA, Clontech) 为模板，使用制备的引物，通过 PCR 法调整编码全长基因的 DNA 片段。以得到的 DNA 片段为模板，通过 PCR 法扩增编码包含信号区的胞外区（Met1-Leu290）的 DNA 片段，之后将其插入动物细胞表达载体中（人 FcRn 氨基酸序列、SEQ ID NO :24）。同样，根据公开的人 $\beta 2$ -微球蛋白基因序列（Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99(26), 16899-16903(2002)）制备寡 DNA 引物。以人 cDNA (Hu-Placenta Marathon-Ready cDNA, CLONTECH) 为模板，使用制备的引物，利用 PCR 法制备编码全长基因的 DNA 片段。以所得的 DNA 片段为模板，通过 PCR 法扩增编码包含信号区的全长 $\beta 2$ -微球蛋白（Met1-Met119）的 DNA 片段，之后将其插入动物细胞表达载体中（人 $\beta 2$ -微球蛋白氨基酸序列、SEQ ID NO :25）。

[0443] 可溶型人 FcRn 的表达按照下述程序进行。采用使用了 10 % 胎牛血清（Invitrogen）的脂质转染法，将已制备的人 FcRn 和人 $\beta 2$ -微球蛋白的质粒导入来自人胚肾癌细胞的 HEK293H 株（Invitrogen）细胞中。回收所得的培养上清，之后使用 IgG Sepharose 6 Fast Flow (Amersham Biosciences)，按照（J Immunol. 2002 Nov 1 ;169(9) :5171-80）的方法进行纯化。之后，使用 HiTrap Q HP (GE Healthcare) 进行纯化。

[0444] 评价与人 FcRn 的结合时使用 Biacore 3000，通过使作为分析物的人 FcRn 与抗体相互作用时的人 FcRn 的结合量算出亲和性 (KD)，所述抗体与固定在传感器芯片上的蛋白 L

或兔抗人 IgG Kappa 链抗体结合。具体而言,使用含有 150mM NaCl 的 50mM 磷酸钠缓冲液 (pH6.0) 作为运行缓冲液,利用胺耦合法将蛋白 L 或兔抗人 IgG Kappa 链抗体固定在传感器芯片 CM5 (BIAcore) 上。之后,用含有 0.02% Tween20 的运行缓冲液稀释抗体并注入,使抗体与芯片结合,之后注入人 FcRn,评价人 FcRn 与抗体的结合性。

[0445] 计算亲和性时使用 BIA 评估 (BIA evaluation) 软件。由得到的传感图求出在人 FcRn 注射即将结束前与抗体结合的 hFcRn 的量,通过稳态亲和法进行拟合,算出抗体与人 FcRn 的亲和性。

[0446] 人 FcRn 转基因小鼠体内的血浆中滞留性的评价

[0447] 在人 FcRn 转基因小鼠 (B6.mFcRn^{-/-}.hFcRn Tg line 276^{+/+} 小鼠; Jackson Laboratories) 体内的动力学评价如下进行。将抗体以 1mg/kg 的给药量对小鼠进行静脉内单次给药,在适当的时间点采血。采集的血液立即在 4℃ 下以 15,000rpm 的转速离心 15 分钟,得到血浆。分离的血浆在实施测定前一直保存在被设定为 -20℃ 以下的冷库中。血浆中浓度按照 ELISA 法来测定。

[0448] WT-M14 在人体内的血浆中滞留性的预测评价

[0449] 利用 BIAcore 评价 WT-IgG1 和 WT-M14 与人 FcRn 的结合性,结果如表 1 所示,与 WT-IgG1 相比,WT-M14 的结合性略强。

[0450] [表 1]

[0451] KD (μM)

[0452] WT-IgG 12.07

[0453] WT-M14 1.85

[0454] 但是,对 WT-IgG1 和 WT-M14 在人 FcRn 转基因小鼠体内的血浆中滞留性进行了评价,结果如图 14 所示,WT-IgG1 和 WT-M14 显示出同等的血浆中滞留性,由此认为:即使在人体内 M14 恒定区也显示出与 IgG1 恒定区同等的血浆中滞留性。

[0455] [实施例 7] 药物动力学得到提高的 WT-M44、WT-M58、WT-M73 的制备

[0456] WT-M58 分子的制备

[0457] 如实施例 6 所示,WT-M14 在人 FcRn 转基因小鼠体内的血浆中滞留性与 WT-IgG1 同等。作为提高药物动力学的方法,已知有降低抗体等电点的方法和增强 FcRn 结合性的方法,但为了提高 WT-M14 的药物动力学,导入下述的改变。具体而言,将实施例 4 中由 WT-M14 制备的 WT-M31 Δ GK 的 EU 编号第 397 位的缬氨酸取代成甲硫氨酸、将第 268 位的组氨酸取代成谷氨酰胺、将第 355 位的精氨酸取代成谷氨酰胺、将第 419 位的谷氨酰胺取代成谷氨酸。将上述 4 处改变导入 WT-M31 Δ GK 中,制备 WT-M58 (SEQ ID NO:26 (氨基酸序列))。表达载体的制备按照实施例 1 的方法进行。使用 WT-M58 作为 H 链、使用 L (WT) 作为 L 链。WT-M58 的表达、纯化按照实施例 1 所述的方法进行。

[0458] WT-M73 分子的制备

[0459] 另一方面,将 IgG1 的 EU 编号第 434 位的氨基酸取代成丙氨酸,来制备 WT-M44 (SEQ ID NO:27 (氨基酸序列))。再制备为了降低 H 链 C 末端的异质性而使 M44 的第 446 位的甘氨酸和第 447 位的赖氨酸缺失的 WT-M83 (SEQ ID NO:58 (氨基酸序列))。将 WT-M58 的 EU 编号第 434 位的氨基酸取代成丙氨酸,来制备 WT-M73 (SEQ ID NO:28 (氨基酸序列))。

[0460] 上述抗体的表达载体的制备按照实施例 1 的方法进行,使用 WT-M44、WT-M58 或

WT-M73 作为 H 链,使用 L(WT) 作为 L 链。WT-M44、WT-M58 和 WT-M73 的表达、纯化按照实施例 1 所述的方法进行。

[0461] WT-M44、WT-M58、WT-M73 在人体内的血浆中滞留性的预测评价

[0462] 使用 BIAcore 评价 WT-IgG 1、WT-M44、WT-M58 和 WT-M73 与人 FcRn 的结合性,结果如表 2 所示,WT-M44、WT-M58 和 WT-M73 的结合性均较 WT-IgG1 优异,分别为 WT-IgG1 的约 2.7 倍、约 1.4 倍和约 3.8 倍左右。

[0463] [表 2]

[0464] KD (μ M)

[0465] WT-IgG1 1.62

[0466] WT-M44 0.59

[0467] WT-M58 1.17

[0468] WT-M73 0.42

[0469] 对 WT-IgG1、WT-M14 和 WT-M58 在人 FcRn 转基因小鼠体内的血浆中滞留性进行了评价,其结果如图 24 所示,确认到与 WT-IgG1 和 WT-M14 相比,WT-M58 的药物动力学有所提高。并且,对 WT-IgG1、WT-M44、WT-M58 和 WT-M73 在人 FcRn 转基因小鼠体内的血浆中滞留性进行了评价,其结果如图 15 所示,确认与 WT-IgG1 相比,WT-M44、WT-M58 和 WT-M73 的药物动力学均有所改善,其药物动力学的改善效果与人 FcRn 结合能力相关。其中,与 WT-IgG1 相比,WT-M73 在 28 天后的血浆中浓度改善约 16 倍,由此认为:即使在人体内,与具有 IgG1 恒定区的抗体相比,具有 M73 恒定区的抗体的药物动力学也大幅提高。

[0470] [实施例 8] 各种抗体中新的恒定区 M14 和 M58 降低异质性的效果

[0471] 如实施例 4 所示,确认到在作为抗 IL-6 受体抗体的人源化 PM1 抗体 (WT) 中,通过将恒定区由 IgG2 变成 M14,可以降低来自 IgG2 的铰链区的异质性。因此,对于除人源化 PM1 抗体以外的 IgG2 型抗体,也进行了下述的研究:即通过将恒定区变成 M14 或 M58,来研究其能否降低异质性。

[0472] 作为除人源化 PM1 抗体以外的抗体,使用了作为抗 IL-6 受体抗体的 F2H/L39 (F2H/L39_VH 氨基酸序列,SEQ ID NO:29;F2H/L39VL 氨基酸序列,SEQ ID NO:30)、作为抗 IL-31 受体抗体的 H0L0 (H0L0_VH 氨基酸序列,SEQ ID NO:31;H0L0_VL 氨基酸序列,SEQ ID NO:32)、作为抗 RANKL 抗体的 DNS (DNS_VH 氨基酸序列,SEQ ID NO:33;DNS_VL 氨基酸序列,SEQ ID NO:34)。对于各抗体,制备恒定区为 IgG1 (SEQ ID NO:1)、IgG2 (SEQ ID NO:2) 和 M14 (SEQ ID NO:5) 或 M58 (SEQ ID NO:35) 的抗体。

[0473] 作为异质性的评价方法,通过阳离子交换色谱进行评价。评价制备的抗体的异质性时,柱使用 ProPac WCX-10 (Dionex),流动相 A 使用 20mM 乙酸钠 (pH5.0),流动相 B 使用 20mM 乙酸钠 /1M NaCl (pH5.0),采用适当的流速和梯度进行评价。通过阳离子交换色谱 (IEC) 进行评价的结果见图 16。

[0474] 如图 16 所示,确认到不仅在作为抗 IL-6 受体抗体的人源化 PM1 抗体 (WT) 中,即使在作为抗 IL-6 受体抗体的 F2H/L39、作为抗 IL-31 受体抗体的 H0L0、作为抗 RANKL 抗体的 DNS 中,通过将恒定区由 IgG1 变成 IgG2,异质性增大;通过将恒定区变成 M14 或 M58,在所有抗体中均可降低异质性。由此表明:通过将存在于 H 链 CH1 结构域的 EU 编号第 131 位的半胱氨酸和存在于 H 链上铰链的 EU 编号第 219 位的半胱氨酸取代成丝氨酸,不管可变区

的抗体序列和抗原种类如何,均可降低来自天然型 IgG2 的异质性。

[0475] [实施例 9] 新的恒定区 M58 改善各种抗体的药物动力学的效果

[0476] 如实施例 7 所示,发现在作为抗 IL-6 受体抗体的人源化 PM1 抗体 (WT) 中,通过将恒定区由 IgG1 变成 M58,与人 FcRn 的结合性得到提高,在人 FcRn 转基因小鼠中药物动力学得到提高。因此,对于除人源化 PM1 抗体以外的 IgG1 抗体,也进行了下述的研究:即通过将恒定区变成 M58,能否提高药物动力学。

[0477] 作为除人源化 PM1 抗体 (WT) 以外的抗体,使用作为抗 IL-31 受体抗体的 H0L0 (H0L0_VH 氨基酸序列, SEQ ID NO:31;H0L0_VL 氨基酸序列, SEQ ID NO:32)、作为抗 RANKL 抗体的 DNS (DNS_VH 氨基酸序列, SEQ ID NO:33;DNS_VL 氨基酸序列, SEQ ID NO:34)。相对于各抗体,制备恒定区为 IgG1 (SEQ ID NO:1) 和 M58 (SEQ ID NO:35) 的抗体,按照实施例 6 所述的方法评价其与人 FcRn 的结合性。结果见表 3。

[0478] [表 3]

	KD (μ M)		
	WT	H0L0	DNS
[0479] IgG1	1.42	1.07	1.36
M58	1.03	0.91	1.03

[0480] 如表 3 所示,确认到即使在作为抗 IL-31 受体抗体的 H0L0、作为抗 RANKL 抗体的 DNS 中,通过将恒定区由 IgG1 变成 M58,与作为抗 IL-6 受体抗体的 WT 一样,与人 FcRn 的结合性提高。由此表明:不管可变区的抗体序列和抗原种类如何,通过将恒定区由 IgG1 变成 M58,可以提高在人体内的药物动力学。

[0481] [实施例 10] CH1 结构域的半胱氨酸对异质性和稳定性的影响

[0482] 如实施例 2 所示,为了降低天然型 IgG2 的异质性,对 IgG2 铰链部分的半胱氨酸和存在于 CH1 结构域的半胱氨酸进行改变。研究各种改变体,结果发现:在野生型 IgG2 恒定区序列中,通过使用 SKSC (SEQ ID NO:38),可以在不降低稳定性的情况下降低异质性,所述 SKSC 是将存在于 H 链 CH1 结构域的 EU 编号第 131 位的半胱氨酸和第 133 位的精氨酸分别取代成丝氨酸和赖氨酸、将存在于 H 链上铰链的 EU 编号第 219 位的半胱氨酸取代成丝氨酸而得到的恒定区。

[0483] 另一方面,作为降低异质性的方法,认为有只将存在于 H 链上铰链的 EU 编号第 219 位的半胱氨酸取代成丝氨酸的方法以及只将 EU 编号第 220 位的半胱氨酸取代成丝氨酸的方法。制备具有将 IgG2 的 EU 编号第 219 位的半胱氨酸取代成丝氨酸的恒定区 SC (SEQ ID NO:39) 和将 IgG2 的 EU 编号第 220 位的半胱氨酸取代成丝氨酸的恒定区 CS (SEQ ID NO:40) 作为恒定区的 WT-SC (SEQ ID NO:41) 和 WT-CS (SEQ ID NO:42),并与 WT-IgG1、WT-IgG2、WT-SKSC 和 WT-M58 比较异质性和热稳定性。另外,对不同于 WT 的抗体的抗 IL-6 受体抗体、即 F2H/L39 (F2H/L39VH 氨基酸序列, SEQ ID NO:29;F2H/L39_VL 氨基酸序列, SEQ ID NO:30) 制备分别具有恒定区 IgG1 (SEQ ID NO:1)、IgG2 (SEQ ID NO:2)、SC (SEQ ID NO:39)、CS (SEQ ID NO:40)、SKSC (SEQ ID NO:38)、M14 (SEQ ID NO:5) 的 F2H/L39-IgG1、F2H/L39-IgG2、F2H/L39-SC、F2H/L39-CS、F2H/L39-SKSC、F2H/L39-M14,比较上述抗体的异质性和稳定性。

[0484] 作为 WT-IgG1、WT-IgG2、WT-SC、WT-CS、WT-SKSC、WT-M58、F2H/L39-IgG1、F2H/

L39-IgG2、F2H/L39-SC、F2H/L39-CS、F2H/L39-SKSC、F2H/L39-M14 的异质性的评价方法,通过阳离子交换色谱进行评价。柱使用 ProPac WCX-10 (Dionex),流动相 A 使用 20mM 乙酸钠 (pH5.0),流动相 B 使用 20mM 乙酸钠 /1M NaCl (pH5.0),采用适当的流量和梯度进行评价。利用阳离子交换色谱进行评价的结果见图 17。

[0485] 其结果,如图 17 所示,在 WT 和 F2H/L39 的任一个中,通过将恒定区由 IgG1 变成 IgG2,异质性均增大;但通过将恒定区变成 SKSC 和 M14 或 M58,异质性均大幅下降。另一方面,当恒定区为 SC 时,与恒定区为 SKSC 时的情形一样,异质性大幅下降;而当恒定区为 CS 时,异质性没有得到充分改善。

[0486] 通常,为了开发抗体作为药品,除了希望异质性少以外,还希望具有高稳定性,以制备稳定的制剂。因此,作为稳定性的评价方法,利用差示扫描量热法 (DSC) 测定热变性中间温度 (T_m 值) (VP-DSC、Microcal 社制)。热变性中间温度 (T_m 值) 是稳定性的指标,为了制备稳定的制剂作为药品,希望热变性中间温度 (T_m 值) 高 (J Pharm Sci. 2008Apr; 97(4):1414-26)。将 WT-IgG1、WT-IgG2、WT-SC、WT-CS、WT-SKSC、WT-M58 用 20mM 乙酸钠、150mM NaCl、pH6.0 的溶液进行透析 (EasySEP;TOMY),在约 0.1mg/mL 的蛋白浓度下以 1℃/分钟的升温速度在 40℃~100℃之间进行 DSC 测定。所得的 DSC 变性曲线见图 18, Fab 部分的 T_m 值见下表 4。

[0487] [表 4]

[0488]		T _m /℃
[0489]	WT-IgG1	94.8
[0490]	WT-IgG2	93.9
[0491]	WT-SC	86.7
[0492]	WT-CS	86.4
[0493]	WT-SKSC	93.7
[0494]	WT-M58	93.7

[0495] WT-IgG1 和 WT-IgG2 的 T_m 值大致相等,均为约 94℃左右 (IgG2 的 T_m 值低约 1℃),而 WT-SC 和 WT-CS 的 T_m 值均为约 86℃,与 WT-IgG1 和 WT-IgG2 相比,T_m 值显著降低。另一方面,WT-M58 和 WT-SKSC 的 T_m 值均为约 94℃,与 WT-IgG1 和 WT-IgG2 大致相等。由于与 IgG2 相比,WT-SC 和 WT-CS 的稳定性明显低,所以为了开发抗体作为药品,认为优选 CH1 结构域的半胱氨酸也取代成丝氨酸的 WT-SKSC 和 WT-M58。与 IgG2 相比,WT-SC 和 WT-CS 的 T_m 值均大幅下降,认为其原因在于 WT-SC 和 WT-CS 在二硫键构象方面不同于 IgG2。

[0496] 比较 DSC 变性曲线时,确认 WT-IgG1、WT-SKSC、WT-M58 的 Fab 部分的变性峰窄且单一,相对于此,WT-SC 和 WT-CS 的 Fab 部分的变性峰宽,WT-IgG2 在 Fab 部分的变性峰的低温侧出现肩峰。认为 DSC 在变性峰为单一成分时,通常显示窄变性峰,而当存在 T_m 值不同的多种成分 (即异质性) 时,变性峰变宽。即,上述结果表明:WT-IgG2、WT-SC 和 WT-CS 中有可能存在多种成分,所以 WT-SC 和 WT-CS 的天然型 IgG2 的异质性没有得到充分的降低。由此认为:野生型 IgG2 的异质性不仅与铰链部分的半胱氨酸有关,还与存在于 CH1 结构域的半胱氨酸有关,为了降低 DSC 上的异质性,不仅必需改变铰链部分的半胱氨酸,还必需改变 CH1 结构域的半胱氨酸。如上所述,通过不仅改变铰链部分的半胱氨酸、还改变 CH1 结构域的半胱氨酸,首次有可能具有与野生型 IgG2 同等的稳定性。

[0497] 根据上述结果认为：作为降低来自 IgG2 铰链区的异质性的恒定区，只将铰链部分的半胱氨酸取代成丝氨酸的恒定区 SC 和 CS，从异质性和稳定性的角度考虑并不充分，发现除了将铰链部分的半胱氨酸取代成丝氨酸以外，还将存在于 CH1 结构域的 EU 编号第 131 位的半胱氨酸也取代成丝氨酸，从而首次可以在维持与 IgG2 同等的稳定性的同时大幅降低异质性。作为这样的恒定区，有上述 M14、M31、M58、M73 等，特别是 M58 和 M73 的药物动力学提高、稳定性高、异质性下降，因此认为其作为抗体药物的恒定区非常有用。

[0498] [实施例 11]PK/PD 得到改善的完全人源化抗 IL-6 受体抗体的制备

[0499] 为了制备 PK/PD 得到改善的完全人源化抗 IL-6 受体抗体，通过改变 TOCILIZUMAB(H 链,WT-IgG1(SEQ ID NO:12);L 链,WT(SEQ ID NO:15)),制备以下所示的分子。作为完全人源化 IL-6 受体抗体，制备恒定区中使用了实施例 7 中制备的 M73 或 M83 的 Fv3-M73(H 链 VH4-M73SEQ ID NO:48;L 链 VL1-kappa SEQ ID NO:49)、Fv4-M73(H 链 VH3-M73 SEQ ID NO:46;L 链 VL3-kappa SEQ ID NO:47)、Fv5-M83(H 链 VH5-M83SEQ ID NO:44;L 链 VL5-kappa SEQ ID NO:45)。

[0500] 将制备的 Fv3-M73、Fv4-M73 及 Fv5-M83 与 IL-6 受体的亲和性和 TOCILIZUMAB 进行比较。测定上述抗体与 IL-6 受体的亲和性，结果见表 5(方法参照参考例)。此外，比较了 TOCILIZUMAB 和对照(参考例的公知的高亲和性抗 IL-6 受体抗体、US 2007/0280945 中的 VQ8F11-21 hIgG1)的 BaF/gp130 中和活性(方法参照参考例)。测定这些抗体在 BaF/gp130 中的生物活性，结果见图 19(IL-6 的终浓度为 300ng/mL:TOCILIZUMAB、对照、Fv5-M83)和图 20(IL-6 的终浓度为 30ng/mL:TOCILIZUMAB、Fv3-M73、Fv4-M73)。如表 5 所示，与 TOCILIZUMAB 相比，Fv3-M73 和 Fv4-M73 具有约 2~3 倍强的亲和性；与 TOCILIZUMAB 相比，Fv5-M83 显示出约 100 倍强的亲和性(由于 Fv5-M83 的亲和性难以测定，所以使用恒定区为 IgG1 的 Fv5-IgG1 来测定亲和性，认为恒定区通常对亲和性没有影响)。如图 20 所示，与 TOCILIZUMAB 相比，Fv3-M73、Fv4-M73 显示出稍强的活性；如图 19 所示，与 TOCILIZUMAB 相比，Fv5-M83 在 50%抑制浓度下具有 100 倍以上的极强的活性，并且，与作为对照的公知的高亲和性抗 IL-6 受体抗体相比，Fv5-M83 在 50%抑制浓度下也显示出约 10 倍高的中和活性。

[0501] [表 5]

	$k_a(1/Ms)$	$k_d(1/s)$	KD (M)
TOCILIZUMAB	4.0E+05	1.1E-03	2.7E-09
Fv3-M73	8.5E+05	8.7E-04	1.0E-09
Fv4-M73	7.5E+05	1.0E-03	1.4E-09
Fv5-M83	1.1E+06	2.8E-05	2.5E-11

[0503] 利用本领域技术人员公知的方法，通过等电电泳来测定 TOCILIZUMAB、对照、Fv3-M73、Fv4-M73 和 Fv5-M83 的等电点，结果：TOCILIZUMAB 的等电点为约 9.3、对照的等电点为约 8.4~8.5、Fv3-M73 的等电点为约 5.7~5.8、Fv4-M73 的等电点为约 5.6~5.7、Fv5-M83 的等电点为约 5.4~5.5，与 TOCILIZUMAB 和对照相比，这些抗体的等电点均大幅下降。另外，利用 GENETYX(GENETYXCORPORATION)来计算可变区 VH/VL 的理论等电点时，TOCILIZUMAB 的理论等电点为 9.20、对照的理论等电点为 7.79、Fv3-M73 的理论等电点为 5.49、Fv4-M73 的理论等电点为 5.01、Fv5-M83 的理论等电点为 4.27，与 TOCILIZUMAB 和

对照相比,这些抗体的理论等电点均大幅下降。由此认为:与 TOCILIZUMAB 和对照相比,Fv3-M73、Fv4-M73、Fv5-M83 的药物动力学有所提高。

[0504] 使用 TEPITOPE (Methods. 2004Dec ;34(4) :468-75) 对存在于 TOCILIZUMAB、Fv3-M73、Fv4-M73 和 Fv5-M83 的可变区序列的 T 细胞表位进行分析。其结果,虽然预测 TOCILIZUMAB 的多个序列存在与 HLA 结合的 T 细胞表位,但在 Fv3-M73、Fv4-M73 和 Fv5-M83 中被预测与 T 细胞表位结合的序列大幅减少。另外,Fv3-M73、Fv4-M73 和 Fv5-M83 在构架中没有残留小鼠序列,被完全人源化。由此表明:与 TOCILIZUMAB 相比,Fv3-M73、Fv4-M73 和 Fv5-M83 的免疫原性风险有可能大幅降低。

[0505] [实施例 12] 完全人源化抗 IL-6 受体抗体在猴体内的 PK/PD 试验

[0506] 将 TOCILIZUMAB、对照、Fv3-M73、Fv4-M73 和 Fv5-M83 以 1mg/kg 对食蟹猴进行静脉内单次给药,评价血浆中浓度变化(方法参照参考例)。TOCILIZUMAB、Fv3-M73、Fv4-M73 和 Fv5-M83 静脉内给药后的血浆中浓度变化见图 21。其结果,与 TOCILIZUMAB 和对照相比,Fv3-M73、Fv4-M73 和 Fv5-M83 在食蟹猴体内的血浆中滞留性大幅改善。其中,与 TOCILIZUMAB 相比,Fv3-M73 和 Fv4-M73 的药物动力学大幅改善。

[0507] 为了评价中和膜型食蟹猴 IL-6 受体的药效,在抗体给药后第 6 天~第 18 天(给予 TOCILIZUMAB 后第 3 天~第 10 天)将食蟹猴 IL-6 以 5 μ g/kg 对腰背部连日进行皮下给药,测定 24 小时后各个体的 CRP 浓度(方法参照参考例)。各抗体给药时的 CRP 浓度变化见图 22。为了评价中和可溶型食蟹猴 IL-6 受体的药效,测定食蟹猴血浆中非结合型的可溶型食蟹猴 IL-6 受体的浓度,计算可溶型 IL-6 受体的中和率(方法参照参考例)。各抗体给药后可溶型 IL-6 受体的中和率变化见图 23。

[0508] 与 TOCILIZUMAB 和作为对照的公知的高亲和性抗 IL-6 受体抗体相比,Fv3-M73、Fv4-M73 和 Fv5-M83 均能更持续地中和膜型食蟹猴 IL-6 受体,长期抑制 CRP 的增加。而且,与 TOCILIZUMAB 和对照相比,Fv3-M73、Fv4-M73 和 Fv5-M83 均能更持续地中和可溶型食蟹猴 IL-6 受体,长期抑制非结合型的可溶型食蟹猴 IL-6 受体的增加。由此发现:在中和膜型 IL-6 受体和可溶型 IL-6 受体的持续性方面,Fv3-M73、Fv4-M73 和 Fv5-M83 均较 TOCILIZUMAB 和对照优异。其中,Fv3-M73 和 Fv4-M73 的中和的持续性极其优异。另一方面,与 Fv3-M73 和 Fv4-M73 相比,Fv5-M83 将 CRP 和非结合型的可溶型食蟹猴 IL-6 受体抑制在更低水平。由此认为:与 Fv3-M73、Fv4-M73 和作为对照的公知的高亲和性抗 IL-6 受体抗体相比,Fv5-M83 更强效地中和膜型 IL-6 受体和可溶型 IL-6 受体。认为这是 Fv5-M83 与 IL-6 受体的亲和性较对照强、且 Fv5-M83 在 BaF/gp130 中的生物活性强的情况在食蟹猴体内得到反映的结果。

[0509] 上述研究表明:与 TOCILIZUMAB 和对照相比,Fv3-M73 和 Fv4-M73 作为抗 IL-6 受体中和抗体的作用持续性极其优异,可以大幅降低给药频率和给药量;另外,Fv5-M83 作为抗 IL-6 受体中和抗体的作用强度极其优异,作用持续性也优异。因此,认为 Fv3-M73、Fv4-M73 和 Fv5-M83 可以以 IL-6 拮抗剂的形式用作药物。

[0510] [参考例]

[0511] 重组可溶型食蟹猴 IL-6 受体(cIL-6R)的制备

[0512] 根据公开的恒河猴 IL-6 受体基因序列(Birney 等人,Ensembl 2006,Nucleic Acids Res. 2006Jan 1 ;34(Database issue) :D556-61) 制备寡 DNA 引物,以由食蟹猴胰脏

制备的 cDNA 为模板,使用引物,通过 PCR 法制备编码食蟹猴 IL-6 受体全长基因的 DNA 片段。将得到的 DNA 片段插入动物细胞表达载体中,使用该载体制备 CHO 恒定表达株(产生食蟹猴 sIL-6R 的 CHO 细胞)。将产生食蟹猴 sIL-6R 的 CHO 细胞的培养液用 HisTrap 柱(GE Healthcare Bioscience)纯化,之后使用 Amicon Ultra-15 Ultracel-10k(Millipore)进行浓缩,用 Superdex200pg16/60 凝胶过滤柱(GE Healthcare Bioscience)进一步纯化,得到可溶型食蟹猴 IL-6 受体(以下记作 cIL-6R)的最终纯品。

[0513] 重组食蟹猴 IL-6(cIL-6) 的制备

[0514] 食蟹猴 IL-6 如下制备。制成编码在 SWISSPROT Accession No.P79341 中注册的 212 个氨基酸的核苷酸序列,将其克隆到动物细胞表达载体中,再将所得载体导入 CHO 细胞中,从而制备恒定表达细胞株(产生食蟹猴 IL-6 的 CHO 细胞)。将产生食蟹猴 IL-6 的 CHO 细胞的培养液用 SP-Sepharose/FF 柱(GE Healthcare Bioscience)纯化,之后用 Amicon Ultra-15 Ultracel-5k(Millipore)浓缩,再用 Superdex75pg26/60 凝胶过滤柱(GE Healthcare Bioscience)进一步纯化,并用 Amicon Ultra-15 Ultracel-5k(Millipore)进行浓缩,得到食蟹猴 IL-6(以下记作 cIL-6)的最终纯品。

[0515] 公知高亲和性抗 IL-6 受体抗体的制备

[0516] 为了表达公知的高亲和性抗 IL-6 受体抗体、即 US 2007/0280945A1 中所述的高亲和性抗 IL-6 受体抗体 VQ8F11-21 hIgG1(US2007/0280945 A1,H 链氨基酸序列、SEQ ID NO:19;L 链氨基酸序列、SEQ ID NO:27),构建动物细胞表达用载体。抗体可变区通过组合有合成寡 DNA 的 PCR 法(装配 PCR)来制备,恒定区则使用 IgG1。利用装配 PCR 法使抗体可变区与恒定区结合,之后插入动物细胞表达用载体中,制备目标 H 链表达载体和 L 链表达载体。所得表达载体的核苷酸序列按照本领域技术人员公知的方法来确定。使用制备的表达载体进行表达、纯化。表达、纯化按照实施例 1 所述的方法进行,得到高亲和性抗 IL-6 受体抗体(以下记作对照)。

[0517] 利用人 gp130 表达 BaF3 细胞(BaF/gp130)进行的生物活性评价

[0518] 使用显示 IL-6/IL-6 受体依赖性增殖的 BaF3/gp130,评价 IL-6 受体中和活性。将 BaF3/gp130 用含有 10% FBS 的 RPMI1640 培养基清洗 3 次,之后悬浮于含有 600ng/mL 或 60ng/mL 人白介素 -6(TORAY)(终浓度为 300ng/mL 或 30ng/mL)、适量的重组可溶性人 IL-6 受体(SR344)和 10% FBS 的 RPMI1640 培养基中,达到 5×10^4 细胞/mL,再向 96 孔平板(CORNING)的各孔中分别注入 50 μ L。接下来,将纯化的抗体用含有 10% FBS 的 RPMI1640 培养基稀释,向各孔中分别混合 50 μ L。在 37°C、5% CO₂ 的条件下培养 3 天,以 20 μ L/孔加入用 PBS 稀释至 2 倍的 WST-8 试剂(细胞计数试剂盒 8;株式会社同仁化学研究所),之后立即使用 SUNRISE CLASSIC(TECAN)测定 450nm 的吸光度(参比波长为 620nm)。培养 2 小时后,再次测定 450nm 的吸光度(参比波长为 620nm),以 2 小时的吸光度变化为指标,评价 IL-6 受体中和活性。

[0519] 利用 Biacore 评价与 IL-6 胺体的结合

[0520] 使用 Biacore T100(GE Healthcare),进行抗原抗体反应的速度论的分析。通过胺耦合法将适量的抗 IgG(γ -链特异性)F(ab')₂ 固定在传感器芯片上,接下来,在 pH7.4 下使目标抗体结合,再于 pH7.4 下使调节为各种浓度的 IL-6 受体、即 SR344 作为分析物流动,测定抗体与 SR344 的相互作用。所有测定均在 37°C 下进行。由测定中得到的传感图算出动

力学参数、即结合速度常数 k_a (1/Ms) 和解离速度常数 k_d (1/s), 根据该值算出 K_D (M)。使用 Biacore T100 评估软件 (GE Healthcare) 计算各参数。

[0521] 通过猴 PK/PD 试验测定血浆中抗体浓度、CRP 浓度以及非结合型的可溶型 IL-6 受体浓度

[0522] 食蟹猴血浆中浓度测定按照 ELISA 法、利用本领域技术人员公知的方法进行测定。CRP 浓度利用 Cias R CRP (关东化学株式会社)、使用自动分析装置 (TBA-120FR、东芝 Medical Systems 株式会社) 进行测定。

[0523] 食蟹猴血浆中非结合型的可溶型食蟹猴 IL-6 受体浓度如下测定。将 30 μ L 食蟹猴的血浆添加到 0.22 μ m 的滤杯 (Millipore) 中已干燥的适量 rProtein A 琼脂糖快速流动树脂 (rProtein A Sepharose Fast Flow resin GE Healthcare) 上, 使血浆中存在的所有 IgG 型抗体 (食蟹猴 IgG、抗人 IL-6 受体抗体、抗人 IL-6 受体抗体-可溶型食蟹猴 IL-6 受体复合体) 均吸附在蛋白 A 上。之后, 用高速离心机进行旋转来使血浆流下, 回收通过的溶液。由于通过的溶液中不含与蛋白 A 结合的抗人 IL-6 受体抗体-可溶型食蟹猴 IL-6 受体复合体, 所以通过测定通过蛋白 A 的溶液中的可溶型食蟹猴 IL-6 受体浓度, 即可测定非结合型的可溶型 IL-6 受体浓度。至于可溶型食蟹猴 IL-6 受体浓度, 以上述制备的可溶型食蟹猴 IL-6 受体 (cIL-6R) 作为标准品, 利用测定人 IL-6 受体浓度的本领域技术人员公知的方法进行测定。可溶型 IL-6 受体的中和率通过下式来计算。

[0524] (抗体给予后的非结合型的可溶性 IL-6 受体浓度 $\div$ 抗体给予前的可溶性 IL-6 受体浓度) $\times 100$

[0525] 产业实用性

[0526] 通过本发明提供适合作为药品的抗体恒定区, 所述抗体恒定区通过改变抗体恒定区的氨基酸序列, 以使物性 (稳定性和均一性)、免疫原性、安全性及药物动力学得到改善。

序列表

<110> 中外制药株式会社

<120> 修饰的抗体恒定区

<130> C1-A0709P

<150> JP 2007-250147

<151> 2007-09-26

<160> 58

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 330

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 1

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35					40					45		
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
			50					55					60		
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70					75					80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
				85						90				95	
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
			100							105				110	
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
			115							120				125	
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
			130							135				140	
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145					150					155					160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
				165						170				175	
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu

180	185	190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
195	200	205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu		
225	230	235
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
245	250	255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
260	265	270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
275	280	285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
290	295	300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
305	310	315
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
325	330	

<210>2

<211>326

<212>PRT

<213>人

<400>2

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

47

325

<210>4

<211>326

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>4

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35					40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr
65				70					75					80	
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85						90				95		
Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Ser	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
		100						105				110			
Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
	115						120					125			
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
	130					135					140				
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
145				150					155					160	
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn
			165						170				175		
Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp
		180						185				190			
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro
	195						200					205			
Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
	210					215					220				
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
225					230				235					240	

Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
				245					250					255	
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
				260				265						270	
Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
				275				280						285	
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
				290				295					300		
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
305						310				315					320
Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
						325									

<210>5

<211>324

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>5

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
				20				25						30	
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
				35				40					45		
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
				50				55					60		
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr
65						70				75					80
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
				85						90					95
Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Ser	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
				100						105				110	
Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
				115						120				125	
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
				130						135					140

Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
145						150				155					160
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn
				165					170					175	
Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp
			180						185					190	
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro
		195						200					205		
Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
	210						215					220			
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
225					230					235				240	
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
				245					250					255	
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
				260					265					270	
Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
		275					280						285		
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
	290						295				300				
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
305					310					315				320	

Ser Leu Ser Pro

<210>6

<211>326

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>6

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

50	55	60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr		
65	70	75
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
85	90	95
Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro		
100	105	110
Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp		
115	120	125
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp		
130	135	140
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly		
145	150	155
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn		
165	170	175
Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp		
180	185	190
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro		
195	200	205
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu		
210	215	220
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn		
225	230	235
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile		
245	250	255
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr		
260	265	270
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys		
275	280	285
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys		
290	295	300
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu		
305	310	315
Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
325		

<210>7

<211>324

<212>PRT

<213>人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>7

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35				40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70					75					80
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85							90				95	
Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Ser	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
			100						105				110		
Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
		115					120					125			
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
	130					135					140				
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
145					150					155					160
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn
			165							170				175	
Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp
			180						185				190		
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro
		195					200					205			
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
	210					215					220				
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
225					230					235				240	
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
			245						250					255	
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
			260					265						270	

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Pro
 <210>8
 <211>326
 <212>PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工合成肽序列

 <400>8
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140
 Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp

				180				185				190			
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro
195				200				205							
Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
210				215				220							
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
225				230				235				240			
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
245				250				255							
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
260				265				270							
Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
275				280				285							
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
290				295				300							
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
305				310				315				320			
Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys										
325															

 $\langle 210 \rangle_9$ $\langle 211 \rangle 324$

<212>PRT

〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 人工合成肽序列

 $\langle 400 \rangle_9$

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

	85		90		95
Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro					
100		105		110	
Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp					
115		120		125	
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp					
130		135		140	
Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly					
145		150		155	
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn					
165		170		175	
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp					
180		185		190	
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro					
195		200		205	
Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu					
210		215		220	
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn					
225		230		235	
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile					
245		250		255	
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr					
260		265		270	
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys					
275		280		285	
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys					
290		295		300	
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu					
305		310		315	
Ser Leu Ser Leu					

<210>10

<211>329

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>10

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35					40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70				75					80	
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85						90					95	
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
		100						105					110		
Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys
	115					120					125				
Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val
	130					135					140				
Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr
145					150				155					160	
Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu
			165						170				175		
Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His
		180						185					190		
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys
	195					200						205			
Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln
	210					215					220				
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu
225				230					235					240	
Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro
			245					250					255		
Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn
		260						265					270		
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu
	275					280						285			
Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val
	290					295					300				
Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln

305	310	315	320
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
	325		
<210>11			
<211>327			
<212>PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工合成肽序列			
<400>11			
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys			
1	5	10	15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr			
	20	25	30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser			
	35	40	45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			
	50	55	60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr			
65	70	75	80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
	85	90	95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys			
	100	105	110
Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys			
	115	120	125
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val			
	130	135	140
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr			
145	150	155	160
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu			
	165	170	175
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His			
	180	185	190
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys			
	195	200	205
Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln			

210	215	220	
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu			
225	230	235	240
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro			
	245	250	255
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn			
	260	265	270
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu			
	275	280	285
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val			
290	295	300	
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln			
305	310	315	320
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro			
	325		

<210>12

<211>449

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>12

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

115	120	125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu		
130	135	140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp		
145	150	155
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu		
165	170	175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser		
180	185	190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro		
195	200	205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys		
210	215	220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro		
225	230	235
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser		
245	250	255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
260	265	270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
275	280	285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
290	295	300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
305	310	315
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys		
325	330	335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
340	345	350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr		
355	360	365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
370	375	380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
385	390	395
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
405	410	415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
420	425	430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210>13

<211>445

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>13

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30
 His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205

Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu
210						215					220				
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu
225					230					235					240
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu
			245						250					255	
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln
		260						265					270		
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys
	275					280						285			
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu
	290					295					300				
Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys
305				310						315					320
Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys
			325						330					335	
Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser
		340						345					350		
Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys
	355						360					365			
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln
	370					375					380				
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly
385					390					395					400
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln
			405						410					415	
Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn
		420						425					430		
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys			
	435						440					445			

<210>14

<211>446

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>14

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp

20 25 30

His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu

50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser

65 70 75 80

Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

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

<210>16

<211>445

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>16

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30
His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp
35 40 45
Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60
Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80
Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu

210	215	220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu		
225	230	235
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		240
	245	250
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln		255
	260	265
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		270
	275	280
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu		285
	290	295
Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		300
	305	310
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		315
	325	330
Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		335
	340	345
Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		350
	355	360
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		365
	370	375
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly		380
	385	390
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		395
	405	410
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn		415
	420	425
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		430
	435	440
		445

<210>17

<211>446

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>17

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Arg	Pro	Ser	Gln
1				5					10					15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	Ser	Asp
			20					25					30		
His	Ala	Trp	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp
		35					40					45			
Ile	Gly	Tyr	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Thr	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu
	50					55					60				
Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Met	Leu	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser
65					70					75				80	
Leu	Arg	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90				95		
Ala	Arg	Ser	Leu	Ala	Arg	Thr	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
		100						105					110		
Ser	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
	115						120					125			
Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu
	130					135					140				
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
145					150					155				160	
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
			165					170					175		
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
		180						185					190		
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro
	195					200						205			
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro
	210					215					220				
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
225					230					235				240	
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro
				245					250				255		
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val
		260						265					270		
Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr
	275						280					285			
Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val
	290					295					300				
Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys

305				310				315				320			
Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser
				325				330				335			
Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro
				340				345				350			
Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val
				355				360				365			
Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly
				370				375				380			
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp
385				390				395				400			
Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp
				405				410				415			
Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His
				420				425				430			
Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys		
				435				440				445			

<210>18

 $\langle 211 \rangle 445$

<212>PRT

〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 人工合成肽序列

 $\langle 400 \rangle_{18}$

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

100	105	110
Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe		
115	120	125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu		
130	135	140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp		
145	150	155
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu		
165	170	175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser		
180	185	190
Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro		
195	200	205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu		
210	215	220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu		
225	230	235
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		
245	250	255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln		
260	265	270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
275	280	285
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu		
290	295	300
Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
305	310	315
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
325	330	335
Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
340	345	350
Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
355	360	365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
370	375	380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly		
385	390	395
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		
405	410	415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210>19

<211>443

<212>PRT

<213> 人序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>19

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30
 His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195	200	205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu		
210	215	220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu		
225	230	235
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		
245	250	255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln		
260	265	270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
275	280	285
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu		
290	295	300
Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
305	310	315
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
325	330	335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
340	345	350
Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
355	360	365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
370	375	380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly		
385	390	395
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		
405	410	415
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn		
420	425	430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
435	440	

<210>20

<211>446

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>20

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Arg	Pro	Ser	Gln
1			5					10					15		
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	Ser	Asp
			20					25					30		
His	Ala	Trp	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp
			35				40					45			
Ile	Gly	Tyr	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Thr	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu
			50				55				60				
Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Met	Leu	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser
65					70					75				80	
Leu	Arg	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85				90					95	
Ala	Arg	Ser	Leu	Ala	Arg	Thr	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Ser	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
			115				120					125			
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu
			130				135				140				
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
145					150					155				160	
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
					165				170				175		
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
			180					185					190		
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro
			195				200					205			
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys
			210				215				220				
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser
225					230					235				240	
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
					245				250					255	
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro
			260					265					270		
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
			275					280					285		
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val

290	295	300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
305	310	315
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr		320
	325	330
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		335
	340	345
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		350
	355	360
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		365
370	375	380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
385	390	395
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		400
	405	410
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		415
	420	425
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		430
435	440	445

<210>21

<211>443

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>21

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

Leu	Arg	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85				90						95
Ala	Arg	Ser	Leu	Ala	Arg	Thr	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Ser	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
			115				120					125			
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu
			130				135					140			
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
145					150					155					160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
					165				170					175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
			180					185					190		
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro
			195				200					205			
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Ser	Cys	Val	Glu
			210				215				220				
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu
225					230					235					240
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu
					245				250					255	
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln
			260					265					270		
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys
			275				280					285			
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu
			290				295				300				
Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys
305					310					315					320
Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys
					325				330					335	
Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser
			340					345					350		
Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys
			355				360					365			
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln
			370				375				380				
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly

385	390	395	400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln			
	405	410	415
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn			
	420	425	430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu			
	435	440	

<210>22

<211>443

<212>PRT

<213>人工序列

<220>

<223>人工合成肽序列

<400>22

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln			
1	5	10	15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp			
	20	25	30
His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp			
	35	40	45
Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu			
	50	55	60
Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser			
65	70	75	80
Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
	100	105	110
Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe			
	115	120	125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu			
	130	135	140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp			
145	150	155	160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu			
	165	170	175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser		
180	185	190
Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro		
195	200	205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu		
210	215	220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu		
225	230	235
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		
245	250	255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln		
260	265	270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
275	280	285
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu		
290	295	300
Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
305	310	315
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
325	330	335
Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
340	345	350
Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
355	360	365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
370	375	380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly		
385	390	395
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		
405	410	415
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn		
420	425	430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
435	440	

<210>23

<211>15

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>23

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210>24

<211>267

<212>PRT

<213> 人

<400>24

Ala Glu Ser His Leu Ser Leu Leu Tyr His Leu Thr Ala Val Ser Ser
 1 5 10 15
 Pro Ala Pro Gly Thr Pro Ala Phe Trp Val Ser Gly Trp Leu Gly Pro
 20 25 30
 Gln Gln Tyr Leu Ser Tyr Asn Ser Leu Arg Gly Glu Ala Glu Pro Cys
 35 40 45
 Gly Ala Trp Val Trp Glu Asn Gln Val Ser Trp Tyr Trp Glu Lys Glu
 50 55 60
 Thr Thr Asp Leu Arg Ile Lys Glu Lys Leu Phe Leu Glu Ala Phe Lys
 65 70 75 80
 Ala Leu Gly Gly Lys Gly Pro Tyr Thr Leu Gln Gly Leu Leu Gly Cys
 85 90 95
 Glu Leu Gly Pro Asp Asn Thr Ser Val Pro Thr Ala Lys Phe Ala Leu
 100 105 110
 Asn Gly Glu Glu Phe Met Asn Phe Asp Leu Lys Gln Gly Thr Trp Gly
 115 120 125
 Gly Asp Trp Pro Glu Ala Leu Ala Ile Ser Gln Arg Trp Gln Gln Gln
 130 135 140
 Asp Lys Ala Ala Asn Lys Glu Leu Thr Phe Leu Leu Phe Ser Cys Pro
 145 150 155 160
 His Arg Leu Arg Glu His Leu Glu Arg Gly Arg Gly Asn Leu Glu Trp
 165 170 175
 Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu Lys Ala Arg Pro Ser Ser Pro Gly
 180 185 190
 Phe Ser Val Leu Thr Cys Ser Ala Phe Ser Phe Tyr Pro Pro Glu Leu
 195 200 205

Gln Leu Arg Phe Leu Arg Asn Gly Leu Ala Ala Gly Thr Gly Gln Gly
210 215 220
Asp Phe Gly Pro Asn Ser Asp Gly Ser Phe His Ala Ser Ser Ser Leu
225 230 235 240
Thr Val Lys Ser Gly Asp Glu His His Tyr Cys Cys Ile Val Gln His
245 250 255
Ala Gly Leu Ala Gln Pro Leu Arg Val Glu Leu
260 265

<210>25

<211>99

<212>PRT

<213> 人

<400>25

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

<210>26

<211>443

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>26

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln

1	5	10	15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp			
20	25	30	
His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp			
35	40	45	
Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu			
50	55	60	
Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser			
65	70	75	80
Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
100	105	110	
Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe			
115	120	125	
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu			
130	135	140	
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp			
145	150	155	160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu			
165	170	175	
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser			
180	185	190	
Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro			
195	200	205	
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu			
210	215	220	
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu			
225	230	235	240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu			
245	250	255	
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln			
260	265	270	
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys			
275	280	285	
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu			
290	295	300	
Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys			
305	310	315	320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
325	330	335
Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
340	345	350
Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
355	360	365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
370	375	380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly		
385	390	395
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		
405	410	415
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn		
420	425	430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
435	440	

<210>27

<211>449

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>27

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

100	105	110
Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe		
115	120	125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu		
130	135	140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp		
145	150	155
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu		
165	170	175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser		
180	185	190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro		
195	200	205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys		
210	215	220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro		
225	230	235
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser		
245	250	255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
260	265	270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
275	280	285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
290	295	300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
305	310	315
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys		
325	330	335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
340	345	350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr		
355	360	365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
370	375	380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
385	390	395
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
405	410	415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys

<210>28

<211>443

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>28

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30
 His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro		
195	200	205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu		
210	215	220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu		
225	230	235 240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		
	245	250 255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln		
	260	265 270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
	275	280 285
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu		
	290	295 300
Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
305	310	315 320
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
	325	330 335
Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
	340	345 350
Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
	355	360 365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
	370	375 380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly		
385	390	395 400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		
	405	410 415
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala		
	420	425 430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
	435	440

<210>29

<211>119

<212>PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400>29

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

<210>30

<211>107

<212>PRT

<213> 小家鼠

<400>30

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

<210>31

<211>120

<212>PRT

<213> 小家鼠

<400>31

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Ile Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Gly Tyr Asp Asp Gly Pro Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120

<210>32

<211>107

<212>PRT

<213> 小家鼠

<400>32

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 Thr Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Phe
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Lys 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 His His Tyr Glu Ser Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210>33

<211>122

<212>PRT

<213> 小家鼠

<400>33

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 Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Gly Ile Thr Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Asp Pro Gly Thr Thr Val Ile Met Ser Trp Phe Asp Pro Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210>34

<211>108

<212>PRT

<213> 小家鼠

<400>34

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

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

<210>35

<211>324

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>35

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys			
1	5	10	15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr			
20	25	30	
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser			
35	40	45	
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			
50	55	60	
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr			
65	70	75	80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
85	90	95	
Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro			
100	105	110	
Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp			
115	120	125	
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp			
130	135	140	
Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly			
145	150	155	160
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn			
165	170	175	

Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp
180				185				190							
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro
195				200				205							
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
210				215				220							
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
225				230				235				240			
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
245				250				255							
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
260				265				270							
Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
275				280				285							
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
290				295				300							
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
305				310				315				320			
Ser Leu Ser Pro															

<210>36

<211>330

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>36

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

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
85	90	95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys		
100	105	110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
115	120	125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
130	135	140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
145	150	155
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
165	170	175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
180	185	190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
195	200	205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu		
225	230	235
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
245	250	255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
260	265	270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
275	280	285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
290	295	300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr		
305	310	315
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
325	330	

<210>37

<211>324

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>37

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35					40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr
65				70					75					80	
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85					90					95		
Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Ser	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
		100					105					110			
Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
	115					120					125				
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
	130				135				140						
Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
145				150					155					160	
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn
			165					170					175		
Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp
	180						185					190			
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro
	195					200					205				
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
	210				215						220				
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
225				230					235				240		
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
			245					250					255		
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
	260					265					270				
Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
	275					280						285			

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Pro

<210>38

<211>326

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>38

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175
 Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro		
195	200	205
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu		
210	215	220
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn		
225	230	235
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile		
245	250	255
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr		
260	265	270
Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys		
275	280	285
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys		
290	295	300
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu		
305	310	315
Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
325		

<210>39

<211>326

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>39

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

Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro		
100	105	110
Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp		
115	120	125
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp		
130	135	140
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly		
145	150	155
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn		
165	170	175
Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp		
180	185	190
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro		
195	200	205
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu		
210	215	220
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn		
225	230	235
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile		
245	250	255
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr		
260	265	270
Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys		
275	280	285
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys		
290	295	300
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu		
305	310	315
Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
325		

<210>40

<211>326

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>40

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35					40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr
65				70					75					80	
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85					90					95		
Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Ser	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
		100						105				110			
Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
	115					120					125				
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
	130					135					140				
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
145				150					155					160	
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn
			165					170					175		
Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp
		180						185				190			
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro
	195					200					205				
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
	210					215					220				
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
225				230					235				240		
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
			245					250				255			
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
		260					265					270			
Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
		275					280					285			
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
	290					295					300				

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210>41

<211>445

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>41

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30
 His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195	200	205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu		
210	215	220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu		
225	230	235
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		
245	250	255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln		
260	265	270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
275	280	285
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu		
290	295	300
Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
305	310	315
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
325	330	335
Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
340	345	350
Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
355	360	365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
370	375	380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly		
385	390	395
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		
405	410	415
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn		
420	425	430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
435	440	445

<210>42

<211>445

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>42

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Arg	Pro	Ser	Gln
1				5					10					15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	Ser	Asp
			20					25					30		
His	Ala	Trp	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp
	35						40					45			
Ile	Gly	Tyr	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Thr	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu
	50					55					60				
Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Met	Leu	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser
65					70					75				80	
Leu	Arg	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Ser	Leu	Ala	Arg	Thr	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Ser	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
	115						120					125			
Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu
	130					135				140					
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
145					150					155				160	
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
				165					170					175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
			180					185					190		
Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro
	195					200						205			
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Ser	Val	Glu
	210					215					220				
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu
225					230					235				240	
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu
				245					250					255	
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln
			260					265					270		
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys
	275					280						285			
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu

290	295	300
Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
305	310	315
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
325	330	335
Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
340	345	350
Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
355	360	365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
370	375	380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly		
385	390	395
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		
405	410	415
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn		
420	425	430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
435	440	445

<210>43

<211>328

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>43

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

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
85	90	95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys		
100	105	110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
115	120	125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
130	135	140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
145	150	155
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
165	170	175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
180	185	190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
195	200	205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu		
225	230	235
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
245	250	255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
260	265	270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
275	280	285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
290	295	300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr		
305	310	315
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
325		

<210>44

<211>447

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>44

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu
1				5					10					15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Ser	Asp	Asp
				20					25					30	
His	Ala	Val	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Glu	Gly	Leu	Glu	Trp
				35					40					45	
Ile	Gly	Phe	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Thr	Leu
				50					55					60	
Gln	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65									70					75	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Leu	Leu	Ala	Arg	Ala	Thr	Ala	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Glu	Gly
				100					105					110	
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
				115					120					125	
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu
				130					135					140	
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
145									150					155	
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
				165					170					175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
				180					185					190	
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro
				195					200					205	
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys
				210					215					220	
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro
225									230					235	
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
				245					250					255	
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp
				260					265					270	
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn
				275					280					285	

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
290	295	300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
305	310	315 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys		
	325	330 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
	340	345 350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr		
	355	360 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
	370	375 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
385	390	395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
	405	410 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
	420	425 430
Ala Leu His Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
	435	440 445

<210>45

<211>214

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>45

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

65	70	75	80
Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr			
	85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu Arg Thr Val Ala Ala			
	100	105	110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly			
	115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala			
	130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln			
145	150	155	160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser			
	165	170	175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr			
	180	185	190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser			
	195	200	205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
210			

<210>46

<211>443

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>46

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

Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
Ala	Arg	Ser	Leu	Ala	Arg	Thr	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Glu	Gly	
				100					105					110		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
				115					120					125		
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	
				130					135					140		
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	
				145					150					155		
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	
				165					170					175		
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	
				180					185					190		
Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	
				195					200					205		
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Ser	Cys	Val	Glu	
				210					215					220		
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	
				225					230					235		
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	
				245					250					255		
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	
				260					265					270		
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	
				275					280					285		
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	
				290					295					300		
Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	
				305					310					315		
Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	
				325					330					335		
Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	
				340					345					350		
Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	
				355					360					365		
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	
				370					375					380		
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	

385	390	395	400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln			
405	410	415	
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala			
420	425	430	
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro			
435	440		

<210>47

<211>214

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>47

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Thr Asp Ile Ser Ser His			
20	25	30	
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile			
35	40	45	
Tyr Tyr Gly Ser His Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala			
65	70	75	80
Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr			
85	90	95	
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu Arg Thr Val Ala Ala			
100	105	110	
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly			
115	120	125	
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala			
130	135	140	
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln			
145	150	155	160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser			
165	170	175	

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210>48

<211>443

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>48

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
 20 25 30
 His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Thr Leu
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180	185	190
Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro		
195	200	205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu		
210	215	220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu		
225	230	235
240		
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		
245	250	255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln		
260	265	270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
275	280	285
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu		
290	295	300
Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
305	310	315
320		
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
325	330	335
Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
340	345	350
Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
355	360	365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
370	375	380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly		
385	390	395
400		
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		
405	410	415
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala		
420	425	430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
435	440	

<210>49

<211>214

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>49

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Arg Asp Ile Ser Ser His
          20           25           30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile
          35           40           45
Tyr Tyr Gly Ser His Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
65           70           75           80
Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr
          85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu Arg Thr Val Ala Ala
          100          105          110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
          115          120          125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
          130          135          140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145          150          155          160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
          165          170          175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
          180          185          190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
          195          200          205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          210

```

<210>50

<211>445

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>50

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Arg	Pro	Ser	Gln
1				5					10					15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	Ser	Asp
				20					25					30	
His	Ala	Trp	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp
				35					40					45	
Ile	Gly	Tyr	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Thr	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu
				50					55					60	
Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Met	Leu	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser
65															
Leu	Arg	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Ser	Leu	Ala	Arg	Thr	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
				100					105					110	
Ser	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
				115					120					125	
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu
				130											
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
145															
				150					155					160	
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
				165					170					175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
				180					185					190	
Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro
				195					200					205	
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Ser	Cys	Val	Glu
				210											
									215					220	
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu
225															
				230					235					240	
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu
				245					250					255	
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln
				260					265					270	
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys
				275					280					285	

Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu
290						295					300				
Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys
305				310					315					320	
Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys
			325						330					335	
Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser
		340						345					350		
Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys
	355					360						365			
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln
	370					375					380				
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly
385				390						395				400	
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln
			405						410					415	
Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn
		420						425					430		
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys			
	435					440						445			

<210>51

<211>443

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>51

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

65	70	75	80
Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
	100	105	110
Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe			
	115	120	125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu			
	130	135	140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp			
145	150	155	160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu			
	165	170	175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser			
	180	185	190
Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro			
	195	200	205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu			
	210	215	220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu			
225	230	235	240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu			
	245	250	255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln			
	260	265	270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys			
	275	280	285
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu			
	290	295	300
Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys			
305	310	315	320
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys			
	325	330	335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser			
	340	345	350
Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys			
	355	360	365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln			
	370	375	380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440

<210>52

<211>445

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>52

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30
 His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

	165		170		175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser					
	180		185		190
Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro					
	195		200		205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu					
	210		215		220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu					
225		230		235	240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu					
	245		250		255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln					
	260		265		270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys					
	275		280		285
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu					
	290		295		300
Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys					
305		310		315	320
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys					
	325		330		335
Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser					
	340		345		350
Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys					
	355		360		365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln					
	370		375		380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly					
385		390		395	400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln					
	405		410		415
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn					
	420		425		430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys					
	435		440		445

<210>53

<211>443

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>53

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Arg	Pro	Ser	Gln
1				5					10					15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	Ser	Asp
				20				25					30		
His	Ala	Trp	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp
				35			40					45			
Ile	Gly	Tyr	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Thr	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu
	50					55					60				
Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Met	Leu	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser
65					70					75				80	
Leu	Arg	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90				95		
Ala	Arg	Ser	Leu	Ala	Arg	Thr	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Ser	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
		115					120					125			
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu
	130					135					140				
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
145					150					155				160	
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
				165					170					175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
			180					185					190		
Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro
		195					200						205		
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Ser	Cys	Val	Glu
	210					215					220				
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu
225					230					235				240	
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu
				245					250					255	
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln

260	265	270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
275	280	285
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu		
290	295	300
Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
305	310	315
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
325	330	335
Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
340	345	350
Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
355	360	365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
370	375	380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly		
385	390	395
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		
405	410	415
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn		
420	425	430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
435	440	

<210>54

<211>326

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>54

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
50	55	60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr		
65	70	75
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
85	90	95
Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro		
100	105	110
Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp		
115	120	125
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp		
130	135	140
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly		
145	150	155
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn		
165	170	175
Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp		
180	185	190
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro		
195	200	205
Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu		
210	215	220
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn		
225	230	235
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile		
245	250	255
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr		
260	265	270
Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys		
275	280	285
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys		
290	295	300
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu		
305	310	315
Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
325		

<210>55

<211>324

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>55

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35					40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr
65				70					75					80	
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85						90				95		
Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Ser	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
		100						105				110			
Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
	115						120					125			
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
	130					135					140				
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
145				150					155					160	
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn
			165						170				175		
Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp
		180						185				190			
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro
	195						200					205			
Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
	210					215					220				
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
225				230					235					240	
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
			245						250					255	

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Pro

<210>56

<211>326

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>56

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160

Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn
				165					170					175	
Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp
			180					185					190		
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro
		195					200					205			
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
		210					215				220				
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
225					230				235					240	
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
			245					250						255	
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
			260					265					270		
Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
		275					280					285			
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
	290					295				300					
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
305					310					315				320	
Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
				325											

<210>57

<211>324

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>57

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

50	55	60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr		
65	70	75
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
85	90	95
Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro		
100	105	110
Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp		
115	120	125
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp		
130	135	140
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly		
145	150	155
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn		
165	170	175
Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp		
180	185	190
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro		
195	200	205
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu		
210	215	220
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn		
225	230	235
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile		
245	250	255
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr		
260	265	270
Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys		
275	280	285
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys		
290	295	300
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu		
305	310	315
Ser Leu Ser Pro		320

<210>58

<211>447

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400>58

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Arg	Pro	Ser	Gln
1				5					10					15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	Ser	Asp
				20					25					30	
His	Ala	Trp	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp
				35					40					45	
Ile	Gly	Tyr	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Thr	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu
				50					55					60	
Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Met	Leu	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser
65						70					75				80
Leu	Arg	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
						85					90				95
Ala	Arg	Ser	Leu	Ala	Arg	Thr	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
						100					105				110
Ser	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
						115					120				125
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu
						130									140
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
145						150					155				160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
						165					170				175
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
						180					185				190
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro
						195					200				205
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys
						210					215				220
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro
225						230					235				240
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
						245					250				255
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp
						260					265				270

Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn
275							280					285			
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
290						295					300				
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu
305					310					315				320	
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys
				325					330				335		
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr
			340					345					350		
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr
		355					360					365			
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu
	370					375					380				
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu
385				390						395				400	
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys
			405						410				415		
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu
		420						425				430			
Ala	Leu	His	Ala	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	
	435						440					445			

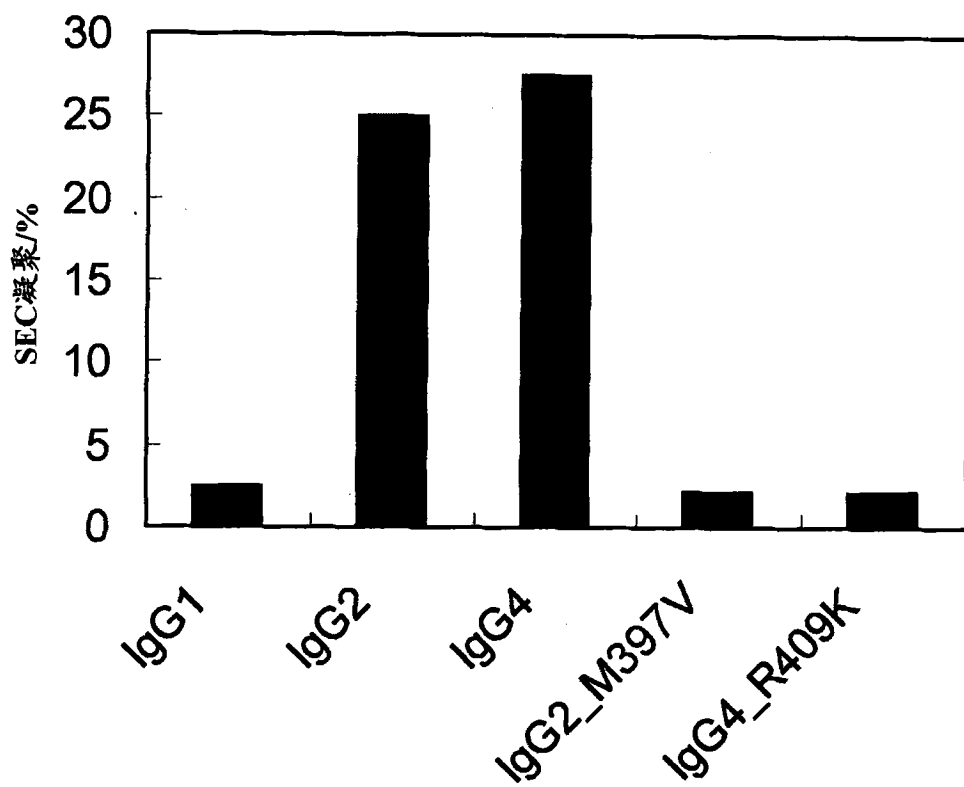


图 1

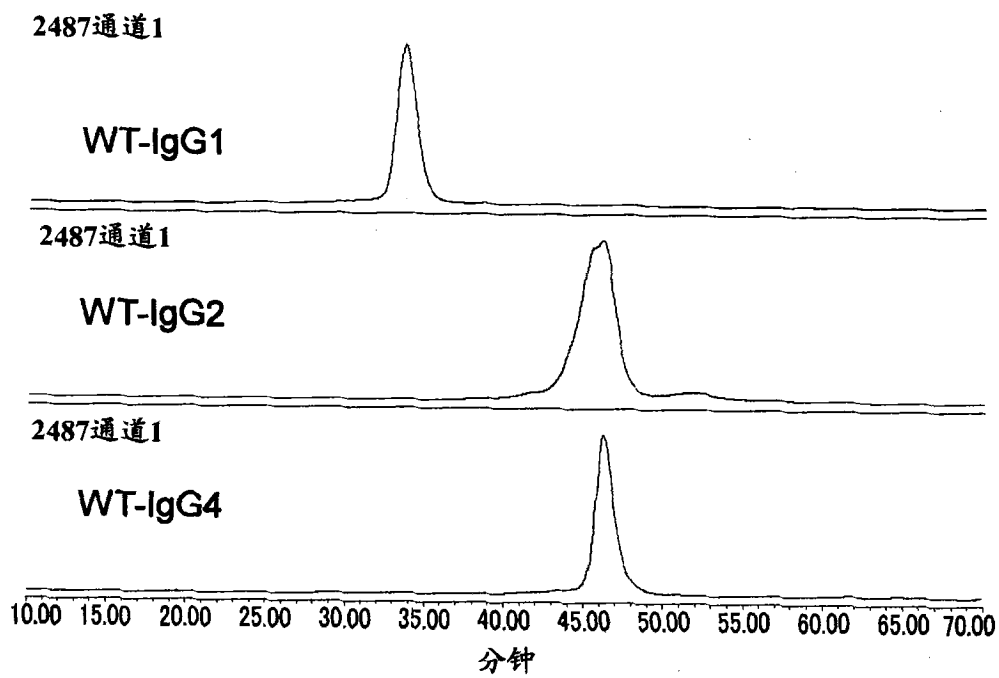
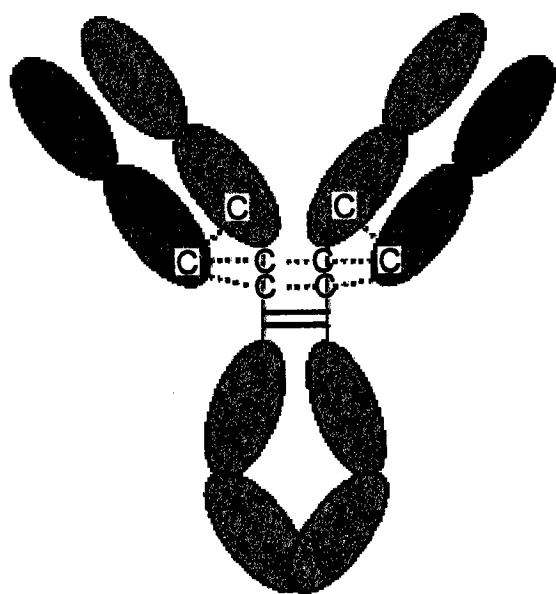
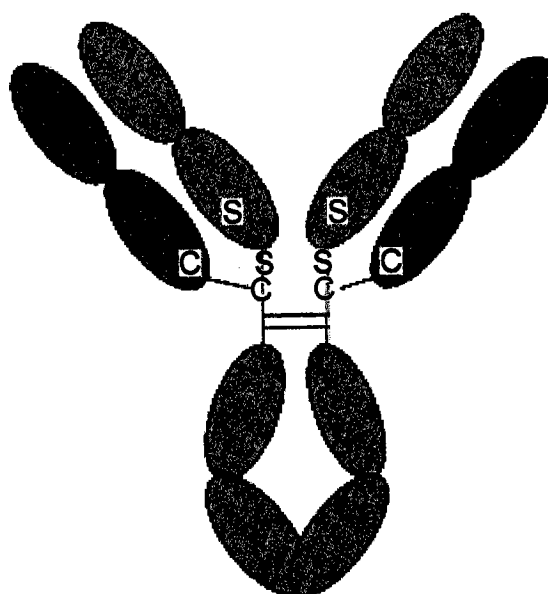


图 2



IgG2

图 3



IgG2_SKSC

图 4

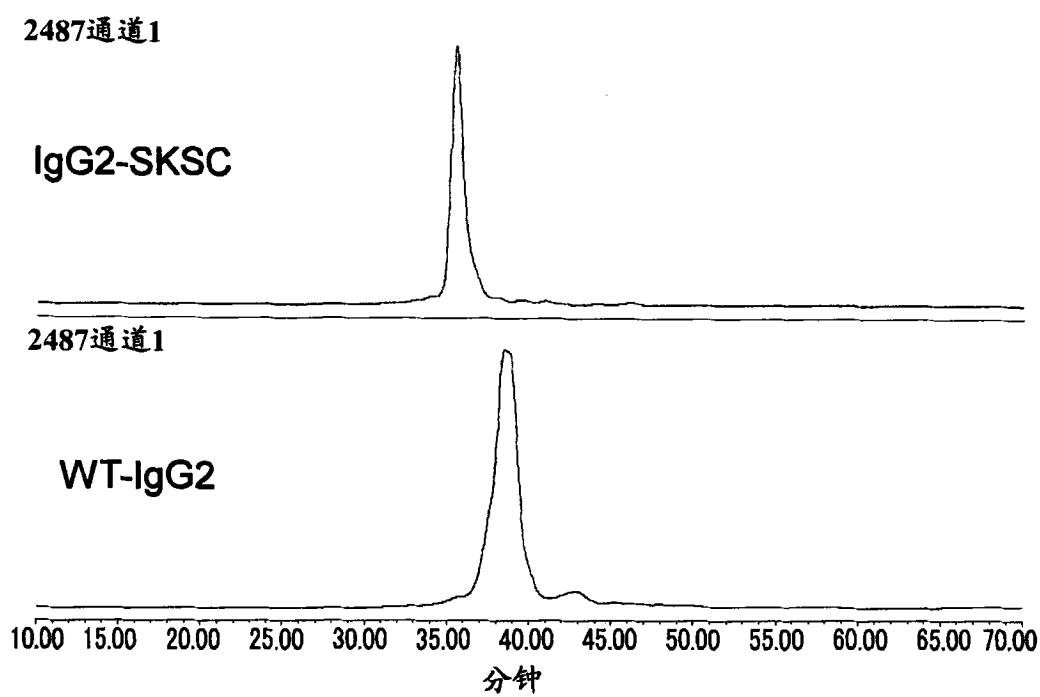


图 5

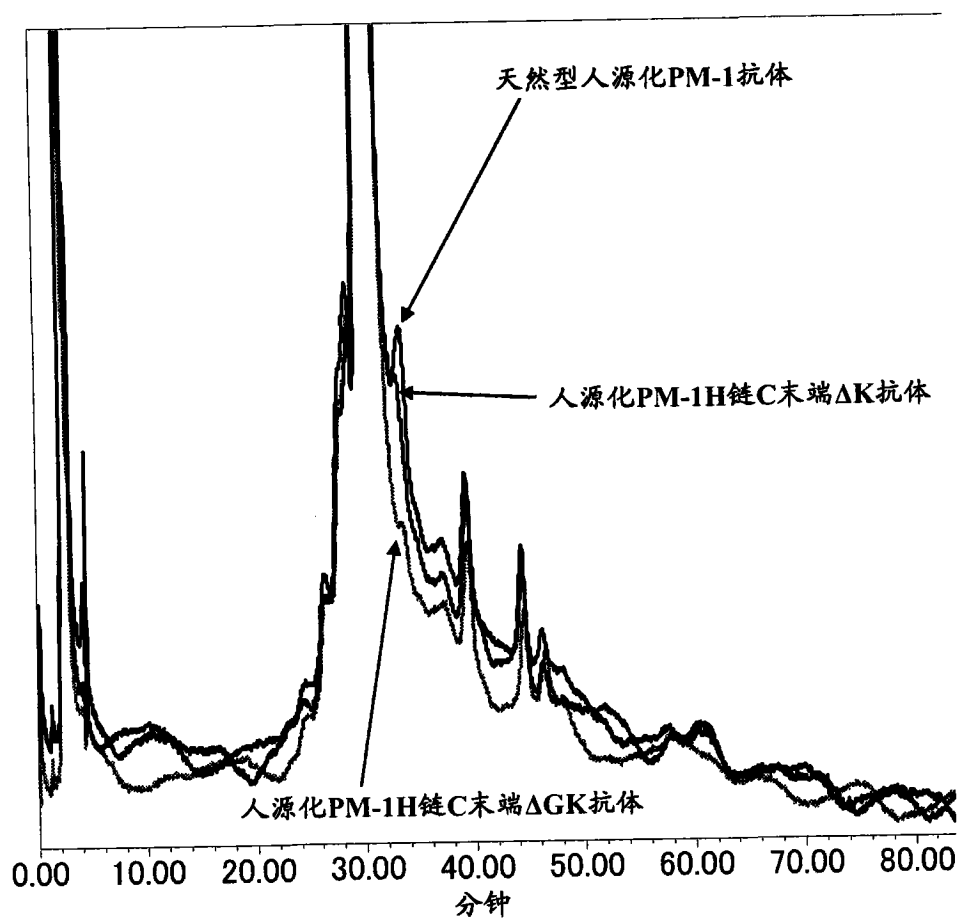


图 6

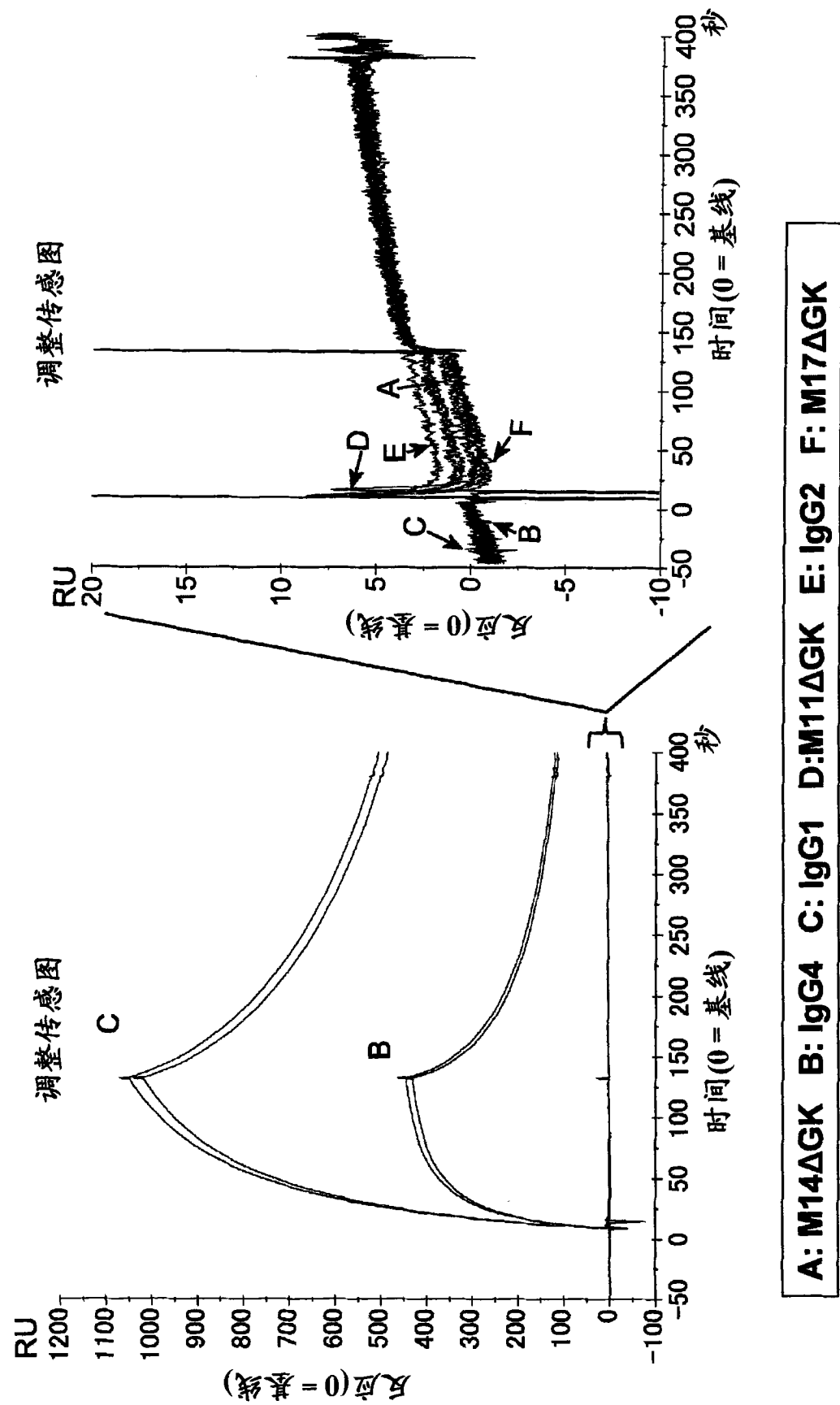


图 7

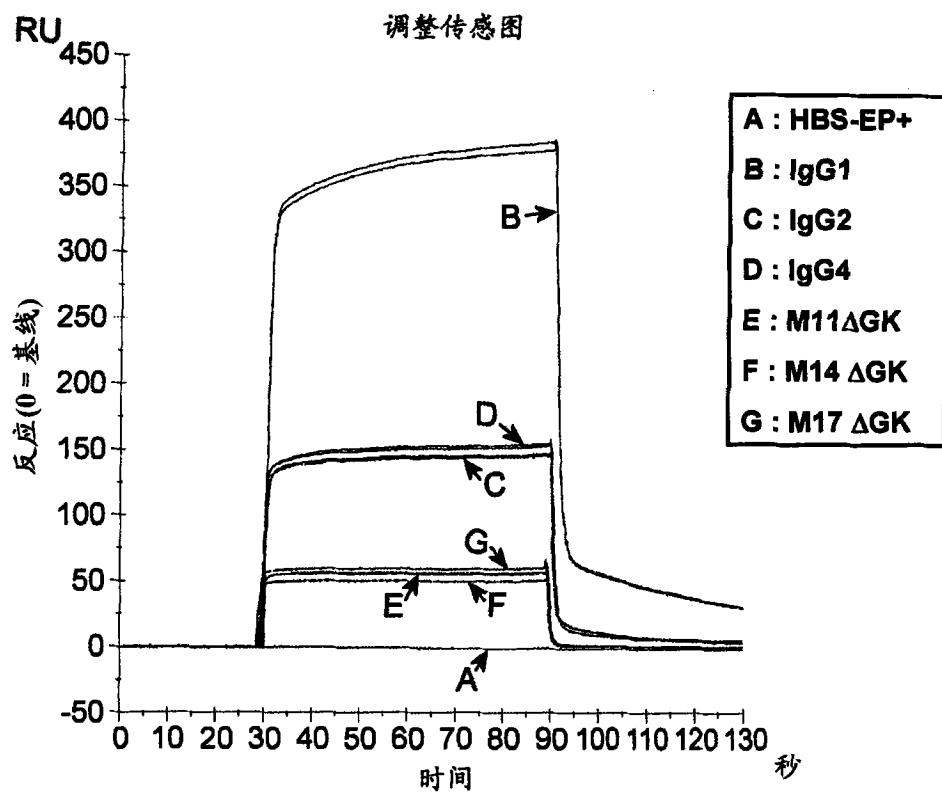


图 8

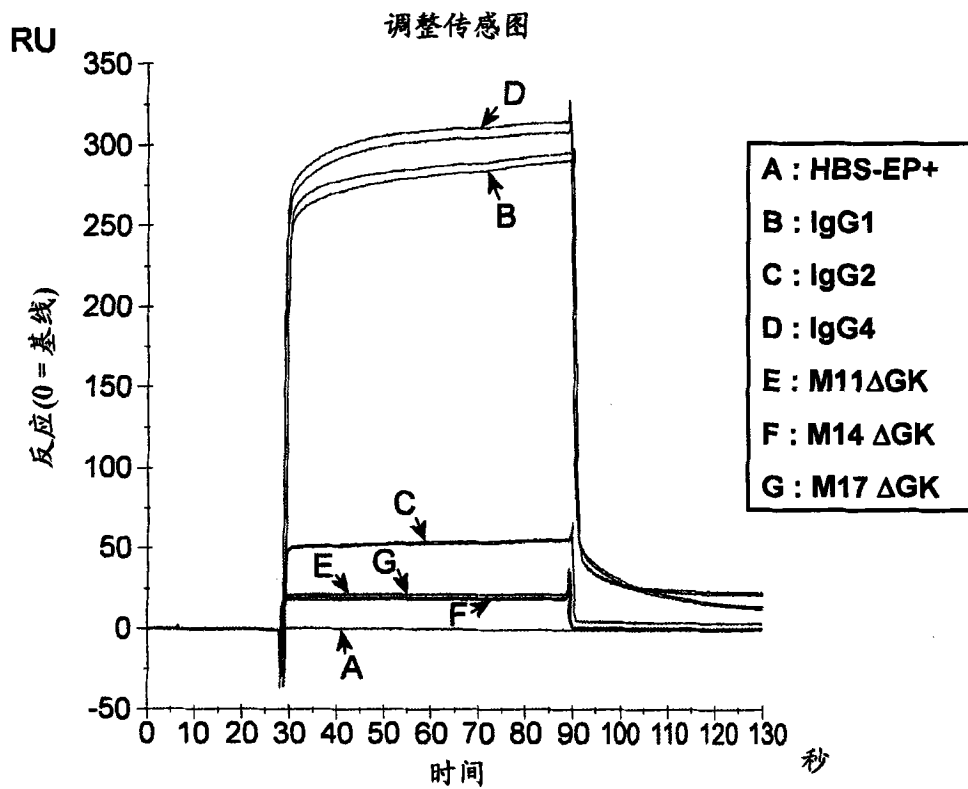


图 9

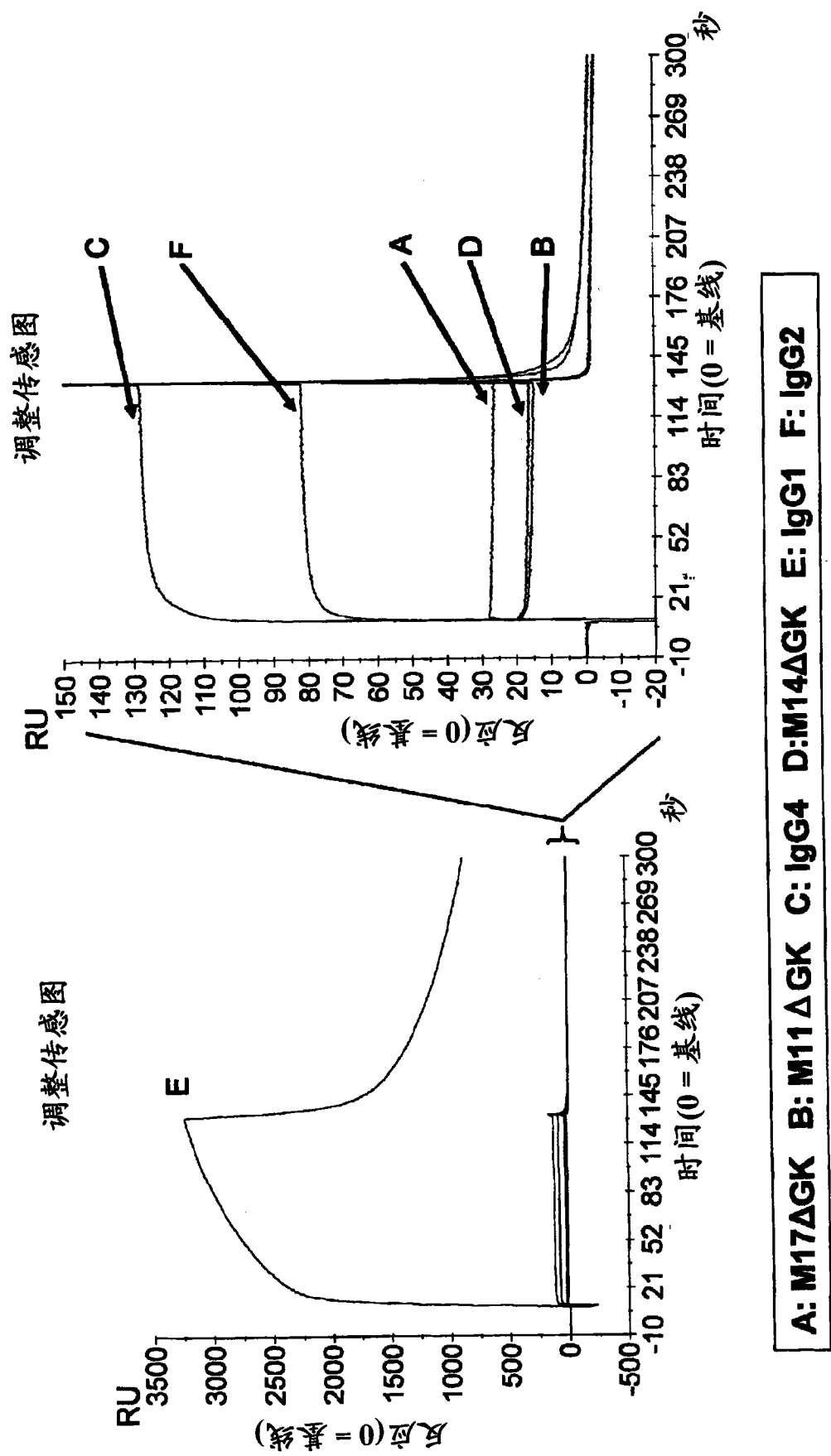


图 10

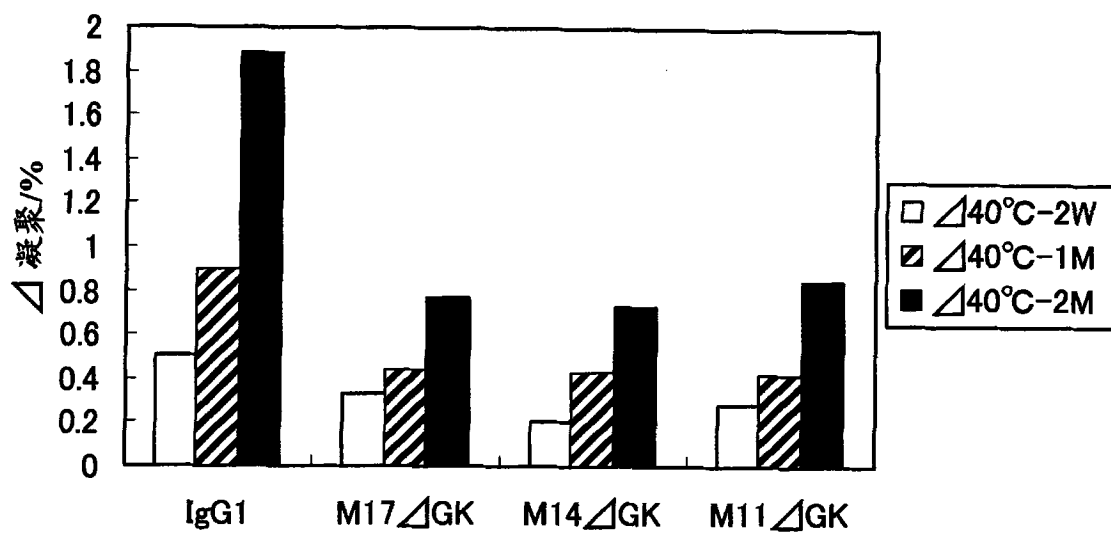


图 11

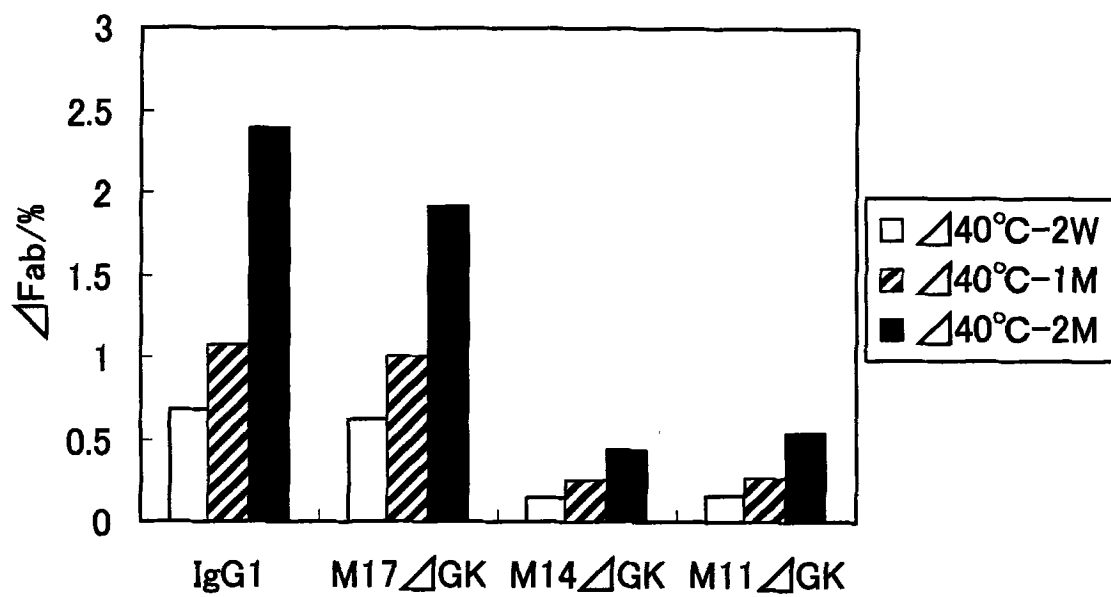


图 12

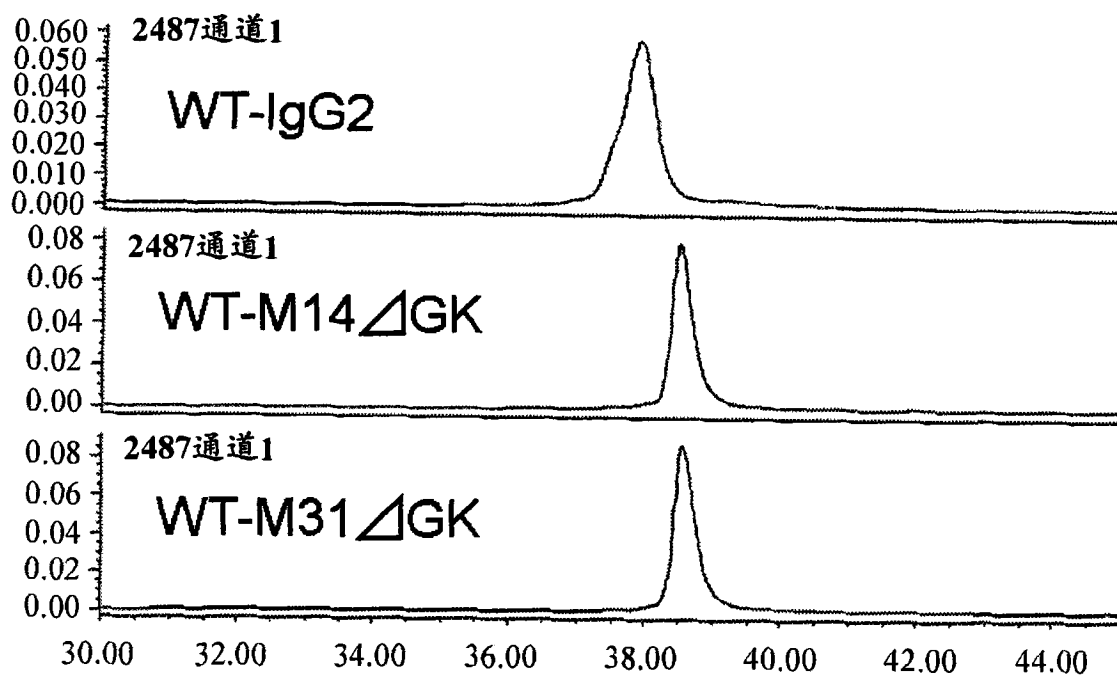


图 13

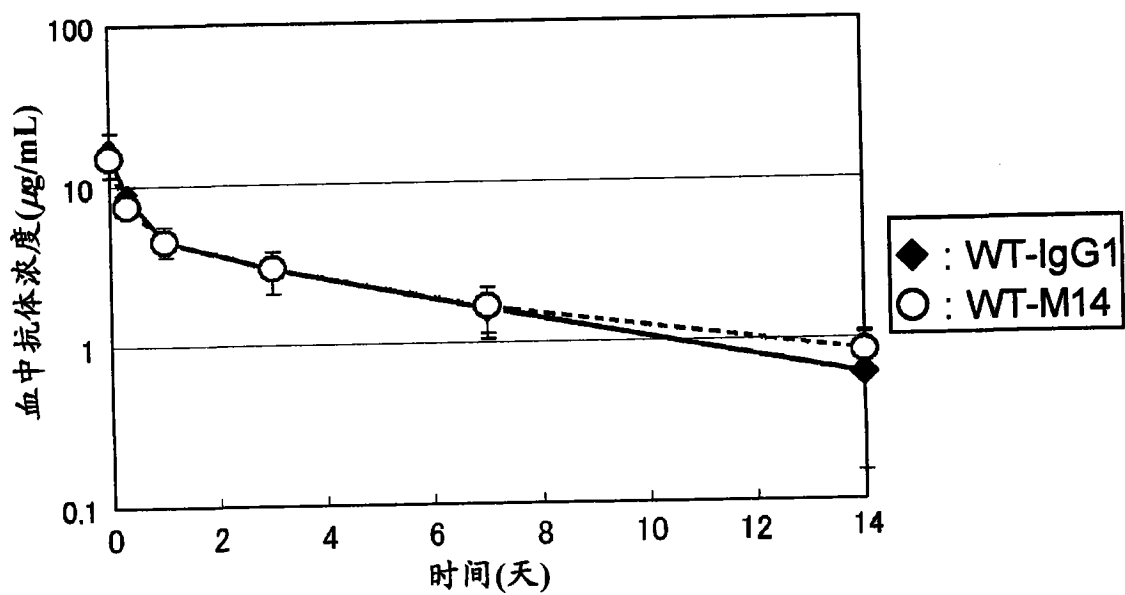


图 14

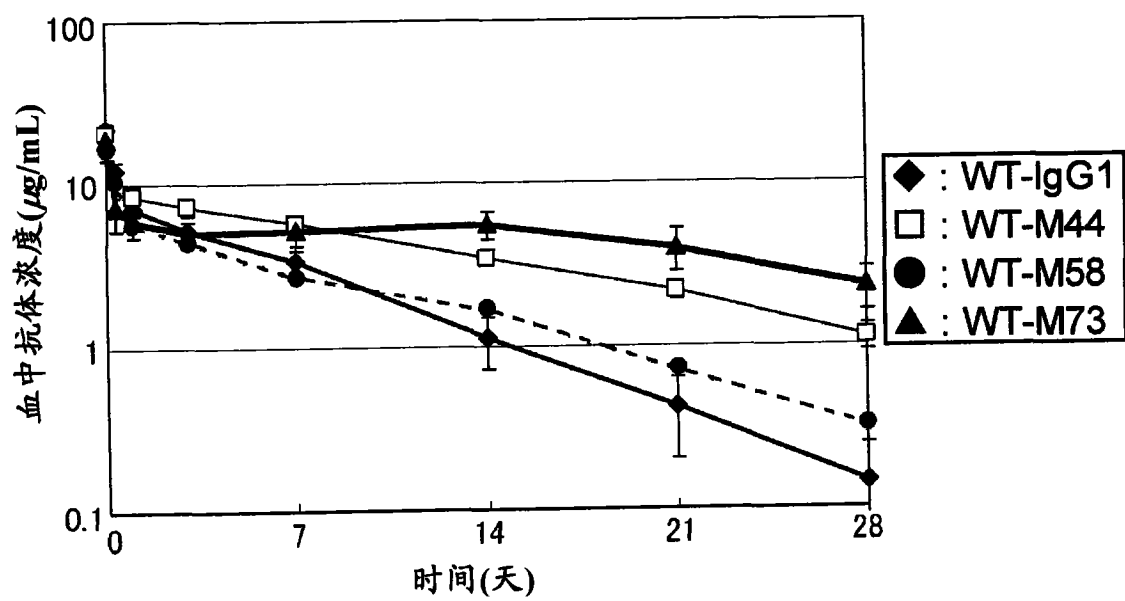


图 15

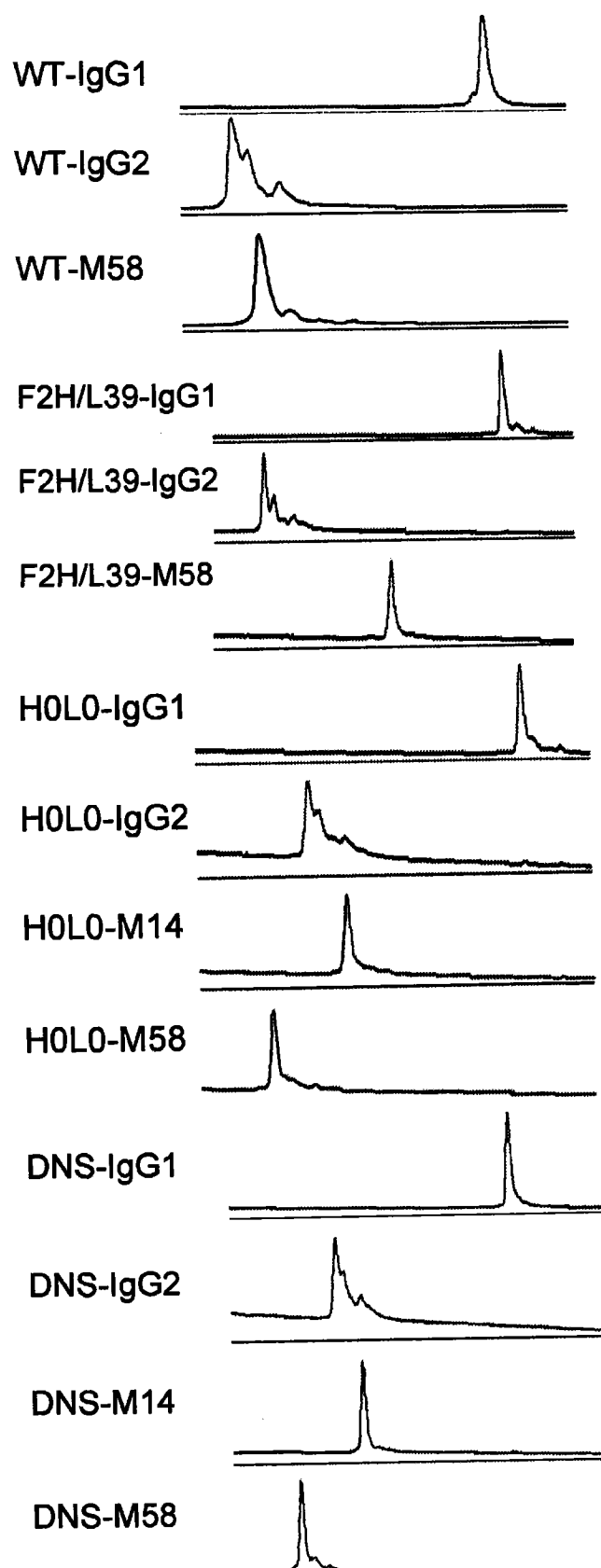


图 16

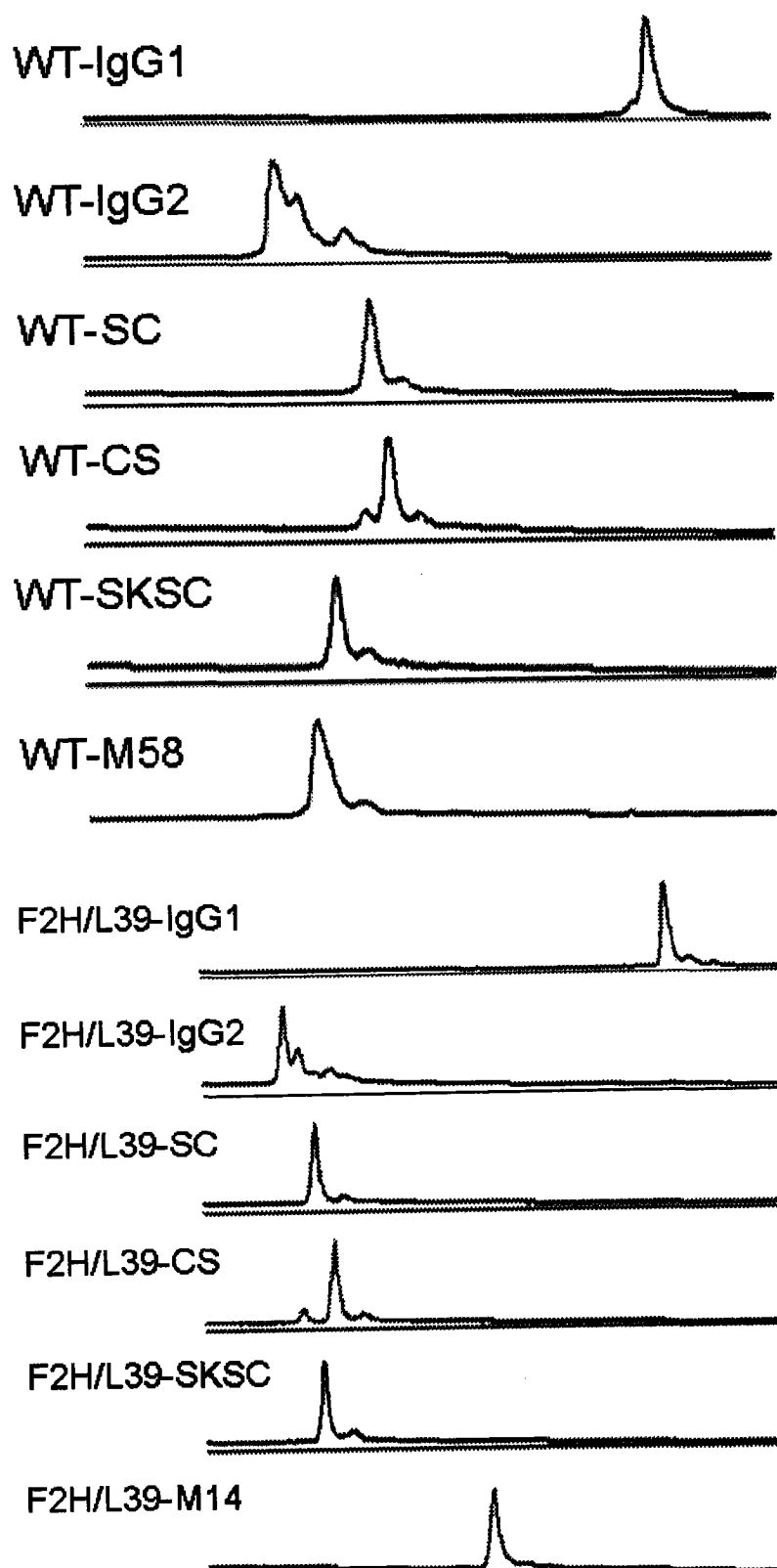


图 17

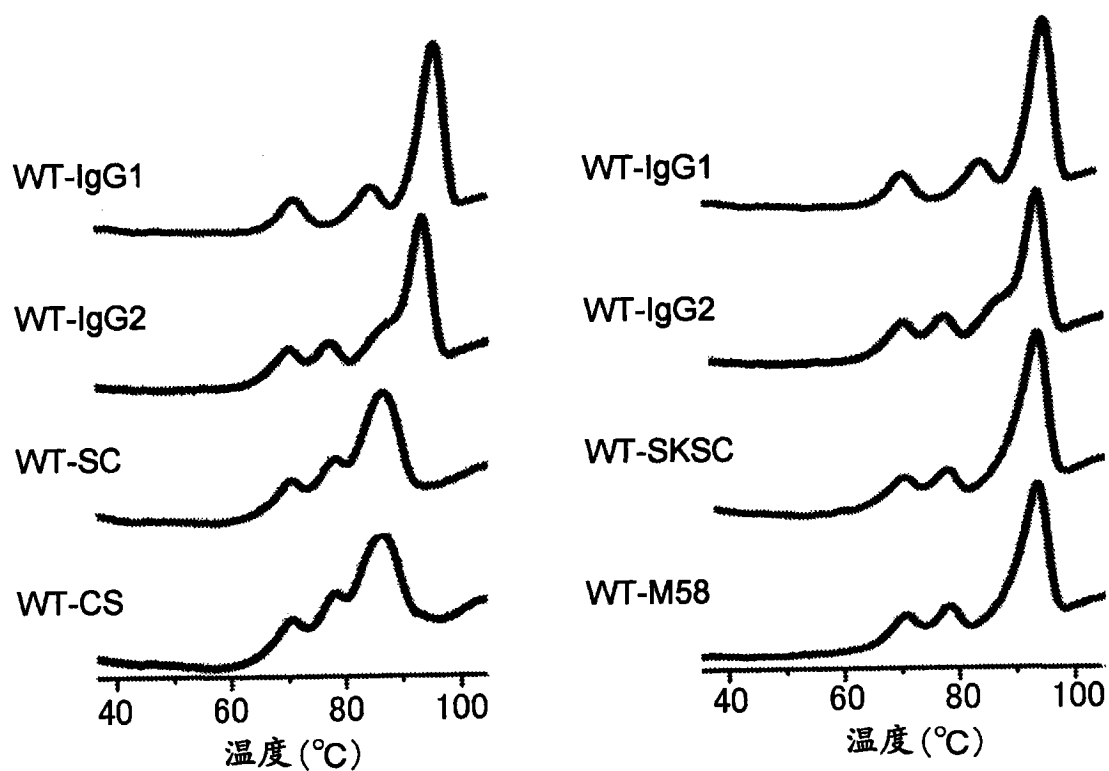


图 18

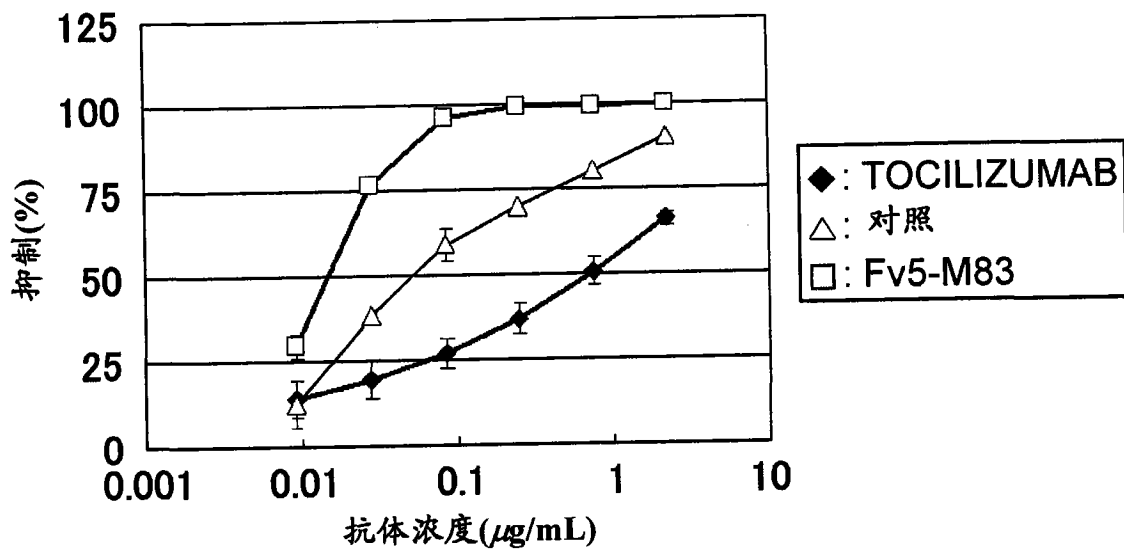


图 19

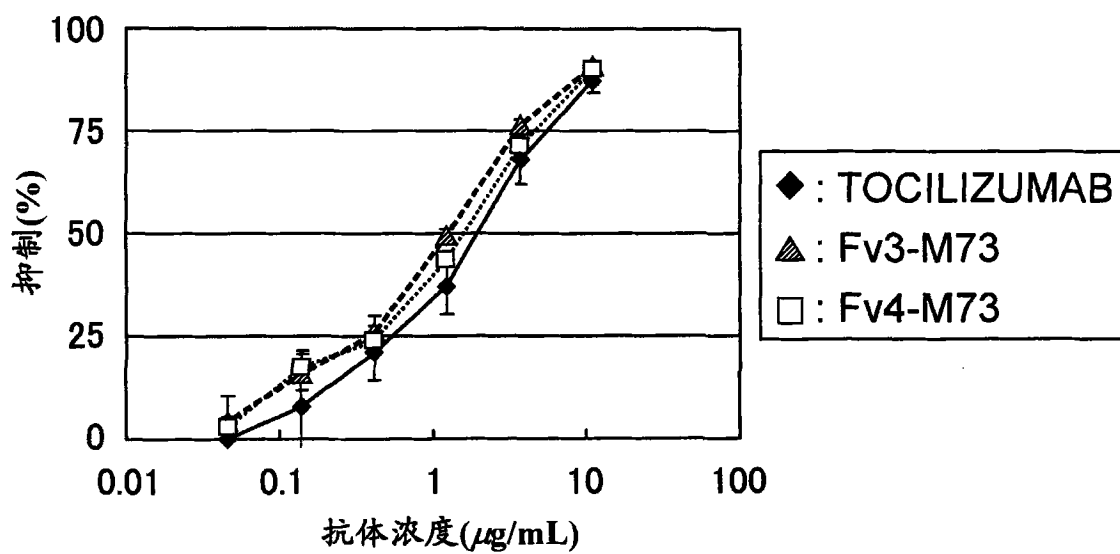


图 20

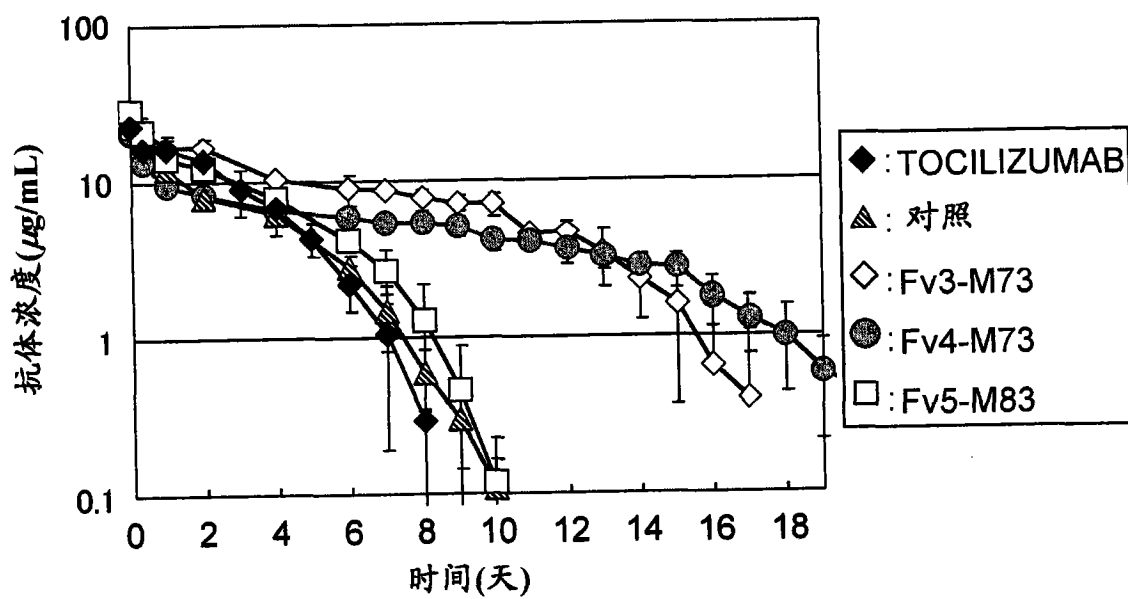


图 21

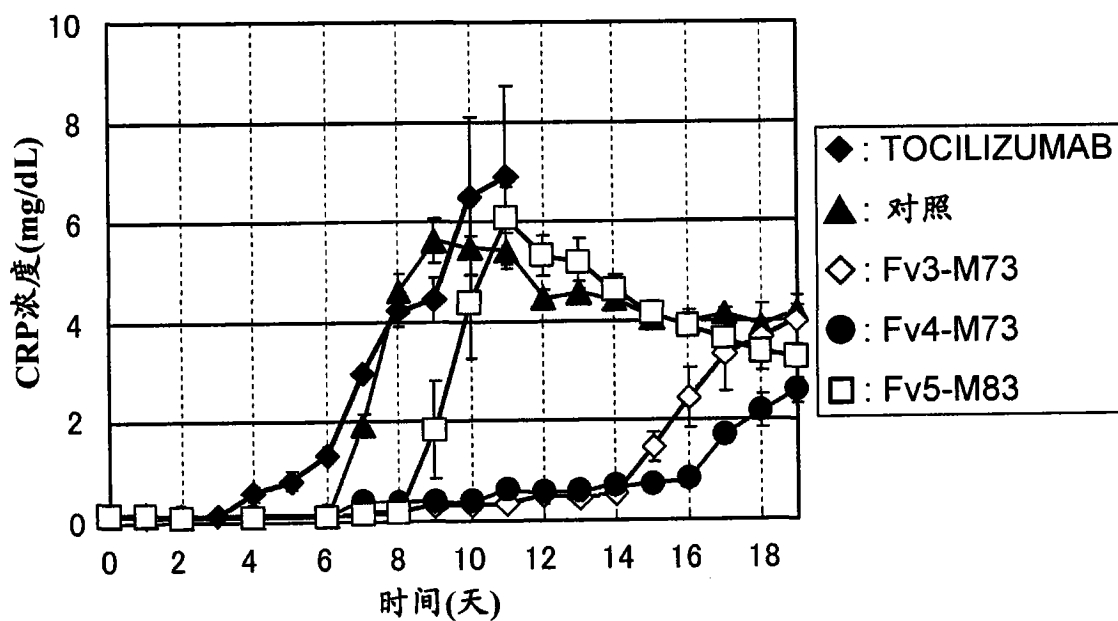


图 22

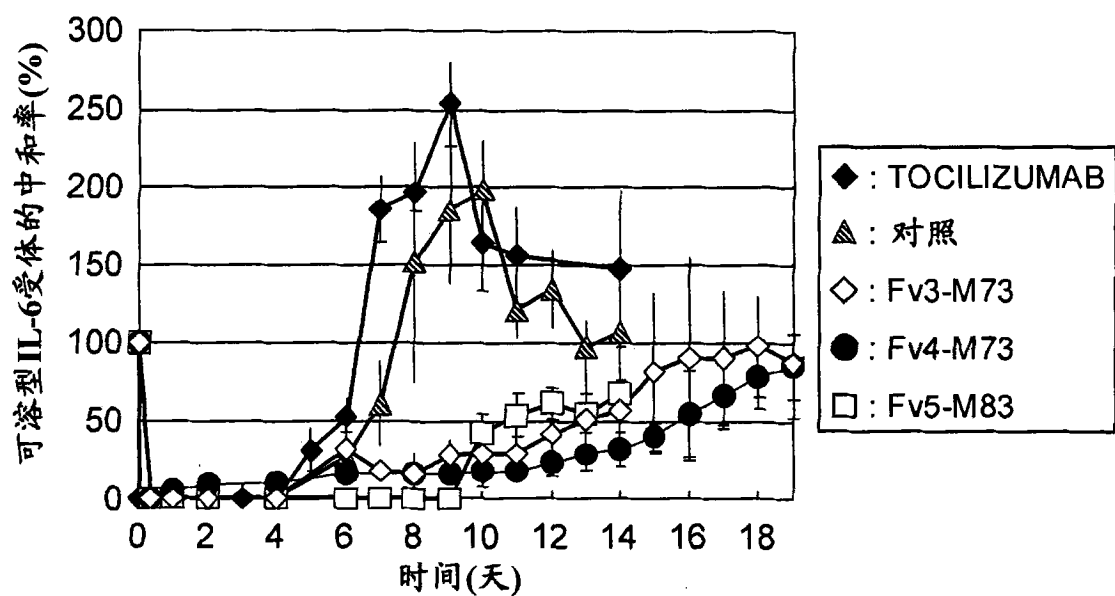


图 23

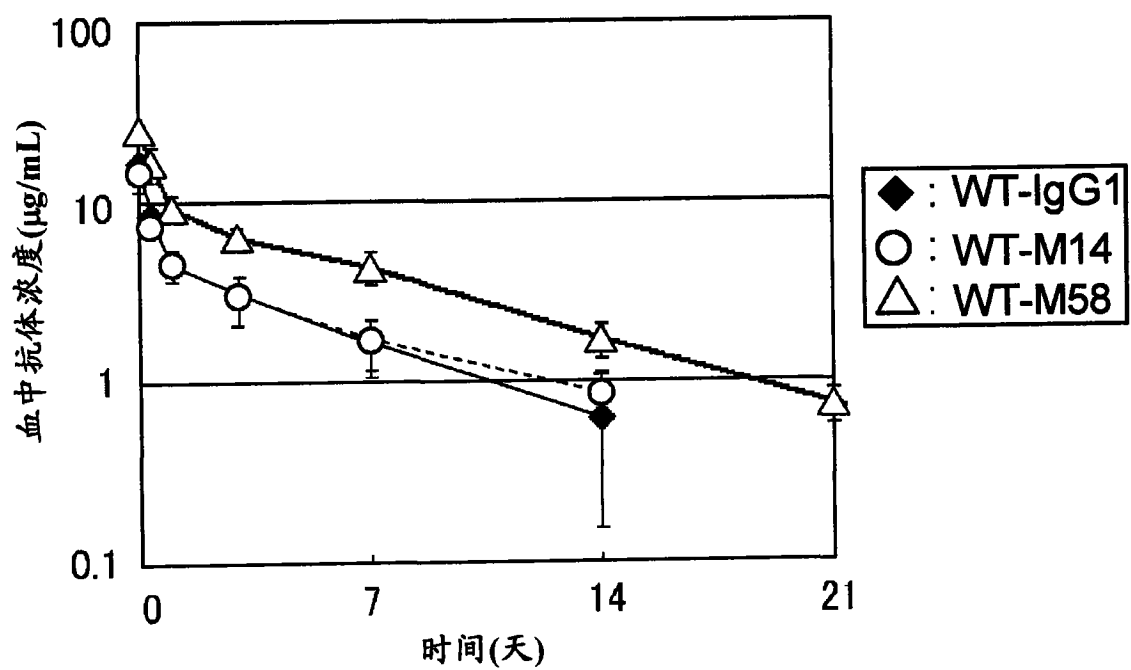


图 24