



(10) 授权公告号 CN 114729036 B

(45) 授权公告日 2024. 07. 02

(21) 申请号 202080078693.X

(22) 申请日 2020.09.16

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114729036 A

(43) 申请公布日 2022.07.08

(30) 优先权数据
62/900,927 2019.09.16 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2022.05.12

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/050973 2020.09.16

(87) PCT国际申请的公布数据
W02021/055408 EN 2021.03.25

(73) 专利权人 奥普西迪奥有限责任公司
地址 美国宾夕法尼亚

(72) 发明人 M·菲利普斯

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038
专利代理师 李程达

(51) Int.Cl.
C07K 16/22 (2006.01)

(56) 对比文件
Wendy Fonseca等.“Group 2 innate lymphoid cells(ILC2)are regulated by stem cell factor during chronic asthmatic disease”.MucosalImmunology.2019,第12卷(第2期),第445-156页、摘要、图1,第446页第1栏、第448页右侧第2-3段.

审查员 敖愿

权利要求书1页 说明书25页
序列表29页 附图44页

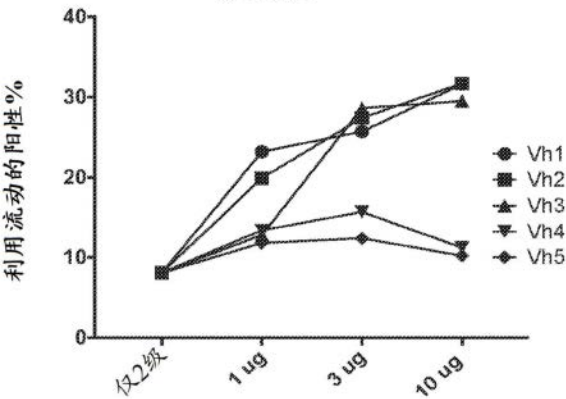
(54) 发明名称

抗干细胞因子抗体及其使用方法

(57) 摘要

本公开涉及与干细胞因子(SCF)结合的抗体及其抗原结合片段。所述抗体及其抗原结合片段与SCF248特异性结合。本公开还涉及用于制备抗体的方法,并且涉及使用所述抗体的方法,包括治疗炎性和/或纤维化疾病和病症的方法。

剂量反应



1. 一种与干细胞因子同种型248 (SCF248) 特异性结合的抗体, 其中所述抗体包含: 氨基酸序列分别由SEQ ID NO: 1、2和3组成的重链CDR1、CDR2和CDR3和氨基酸序列分别由SEQ ID NO: 4、5和6组成的轻链CDR1、CDR2和CDR3。

2. 如权利要求1所述的抗体, 其中所述抗体包含根据SEQ ID NO: 8的重链可变区氨基酸序列和根据SEQ ID NO: 16的轻链可变区氨基酸序列。

3. 如权利要求1所述的抗体, 其中所述抗体包含根据SEQ ID NO: 9的重链可变区氨基酸序列和根据SEQ ID NO: 16的轻链可变区氨基酸序列。

4. 如权利要求1所述的抗体, 其中所述抗体包含根据SEQ ID NO: 10的重链可变区氨基酸序列和根据SEQ ID NO: 16的轻链可变区氨基酸序列。

5. 如权利要求1所述的抗体, 其中所述抗体包含根据SEQ ID NO: 11的重链可变区氨基酸序列和根据SEQ ID NO: 16的轻链可变区氨基酸序列。

6. 如权利要求1所述的抗体, 其中所述抗体是人源化的。

7. 如权利要求1所述的抗体, 其中所述抗体是单克隆抗体。

8. 如权利要求7所述的抗体, 其中所述抗体包含人IgG4结构域。

9. 如权利要求8所述的抗体, 其中所述IgG4结构域包含氨基酸残基241处的S241P突变和氨基酸残基248处的L248E突变, 其中所述残基的编号是Kabat编号系统的编号。

10. 如权利要求1所述的抗体, 其中所述抗体包含根据SEQ ID NO: 42的重链和根据SEQ ID NO: 49的轻链。

11. 如权利要求1所述的抗体, 其中所述抗体包含根据SEQ ID NO: 43的重链和根据SEQ ID NO: 49的轻链。

12. 如权利要求1至11中任一项所述的抗体, 其中所述抗体阻断SCF与c-Kit之间的相互作用。

13. 如权利要求1至11中任一项所述的抗体, 其中所述抗体引起SCF的内化。

14. 如权利要求1至11中任一项所述的抗体, 其中所述抗体不结合SCF220。

15. 一种分离的核酸分子, 其编码如权利要求1至14中任一项所述的抗体。

16. 一种表达载体, 其包含编码如权利要求1至14中任一项所述的抗体的核酸。

17. 一种重组宿主细胞, 其包含如权利要求16所述的表达载体。

抗干细胞因子抗体及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2019年9月16日提交的美国临时申请第62/900,927号的优先权,其全部内容在此通过引用并入。

技术领域

[0003] 本发明涉及与干细胞因子(SCF)及其特定部分结合的抗体及其抗原结合片段,并且涉及使用这些抗体和抗原结合片段的方法。

[0004] 以电子方式提交的文本文件的描述

[0005] 随本文以电子方式提交的文本文件的内容通过引用整体并入本文:序列表的计算机可读格式副本(文件名:OPSL_001_01W0_SeqList_ST25,记录日期:2020年9月16日,文件大小:58kb)。

背景技术

[0006] 炎性疾病是全世界发病率和死亡率的主要原因。一些类型的慢性炎症可导致纤维化,所述纤维化是作为修复或反应过程的器官或组织中过量纤维结缔组织的形成或发展,与作为器官或组织的正常组分的纤维组织的形成相反。慢性炎症以及纤维化可影响几乎所有的组织和器官系统,并且纤维化组织重塑可影响癌症转移并加速移植接受者中的慢性移植排斥反应。

[0007] 干细胞因子(SCF)及其受体c-Kit是维持慢性炎症和纤维化疾病的重要因子(E1-Koraie等人,Kidney Int.60:167(2001);Powell等人,Am.J.Physiol.289:G2(2005);El Kossi等人,Am.J.Kidney Dis.41:785(2003);Powell等人,Am.J.Physiol.277:C183(1999)Ding等人J Pathol.2013年6月;230(2):205-14.,Berlin等人Lab Invest.2006年6月;86(6):557-65.c-Kit是存在于许多细胞类型中的III型受体-酪氨酸激酶(Orr-Urtreger等人,Development 109:911(1990))。免疫细胞(如肥大细胞、嗜酸性粒细胞和先天淋巴样细胞2和3(ILC2和ILC3))都是c-Kit+细胞,其可以驱动慢性炎症过程,这取决于所涉及疾病和器官。在炎症反应开始时,包括SCF的各种介质活化c-Kit+免疫细胞,其又产生使成纤维细胞变成活化的肌成纤维细胞的细胞因子。肌成纤维细胞分泌细胞外基质蛋白、胶原和纤连蛋白,从而引起组织纤维化。活化的肌成纤维细胞、活化的上皮细胞、内皮细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、单核细胞及其他细胞也在细胞表面上表达SCF,其活化更多的c-Kit+免疫细胞,从而引起更多的细胞因子释放并维持炎症。

[0008] 本领域需要更有效和更特异性的炎性疾病治疗。本发明解决了这种及其他需要。

发明内容

[0009] 在一个方面,本公开提供了与干细胞因子(SCF)特异性结合的抗体及其片段。在一些实施方案中,抗体及其片段特异性结合SCF同种型SCF248。在一些实施方案中,抗体及其片段包含重链互补决定区(CDR),其中重链CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:1、2和3。

在一些实施方案中,抗体及其片段包含轻链CDR,其中轻链CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:4、5和6。在一些实施方案中,抗体及其片段包含分别包含SEQ ID NO:1、37和3的重链CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施方案中,抗体及其片段包含重链可变区,所述重链可变区与选自SEQ ID NO:7、8、9、10、11和12组成的组的序列包含至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%同一性。在一些实施方案中,抗体及其片段包含轻链可变区,所述轻链可变区与选自SEQ ID NO:13、14、15、16和17组成的组的序列包含至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%同一性。在一些实施方案中,抗体及其片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含选自SEQ ID NO:7、8、9、10、11和12组成的组的氨基酸序列,所述轻链可变区包含选自SEQ ID NO:13、14、15、16和17组成的组的氨基酸序列。

[0010] 在一些实施方案中,抗体或其片段包含根据SEQ ID NO:7的重链可变区氨基酸序列和根据SEQ ID NO:16的轻链可变区氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体或其片段包含根据SEQ ID NO:8的重链可变区氨基酸序列和根据SEQ ID NO:16的轻链可变区氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体或其片段包含根据SEQ ID NO:9的重链可变区氨基酸序列和根据SEQ ID NO:16的轻链可变区氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体或其片段包含根据SEQ ID NO:10的重链可变区氨基酸序列和根据SEQ ID NO:16的轻链可变区氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体或其片段包含根据SEQ ID NO:11的重链可变区氨基酸序列和根据SEQ ID NO:16的轻链可变区氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体或其片段包含根据SEQ ID NO:12的重链可变区氨基酸序列和根据SEQ ID NO:16的轻链可变区氨基酸序列。

[0011] 在一些实施方案中,抗体或其片段为人源化的。在一些实施方案中,抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中,抗体包含人IgG1结构域或人IgG4结构域。在一些实施方案中,抗体是抗原结合片段,其中所述片段选自Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv和单结构域抗体(sdAb)。

[0012] 在一些实施方案中,抗体或其片段阻断SCF (例如SCF248) 与c-Kit之间的相互作用。在一些实施方案中,抗体与SCF248特异性结合。在一些实施方案中,抗体不结合SCF220。在一些实施方案中,抗体通过引起SCF的内化防止SCF248与c-kit的相互作用,从而使其在细胞表面上不可用。

[0013] 在一个方面,本公开提供了药物组合物,其包含本文提供的抗体或其片段。在一些实施方案中,药物组合物包含药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0014] 在一些实施方案中,本公开提供了分离的核酸分子,其编码本文提供的抗体或其片段。在一些实施方案中,本公开提供了一种表达载体,其包含编码抗体或其片段的核酸。在一些实施方案中,本公开提供了一种重组宿主细胞,其包含表达载体。

[0015] 在一个方面,本公开提供了用于制备与干细胞因子同种型248 (SCF248) 特异性结合的抗体的方法,所述方法包括用包含SEQ ID NO:30 (ASSLRNDSSSSNRKAKNPPGD) 的肽或其片段免疫宿主动物,并且从免疫的宿主动物获得抗体。在一些实施方案中,宿主动物不是人。在一些实施方案中,SEQ ID NO:30的片段包含SEQ ID NO:30的至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个或20个连续氨基酸。在一些实施方案中,SEQ ID NO:30的片段包含SEQ ID NO:30的5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个或20个连续氨基酸。在一些实施方案中,SEQ ID NO:30的片段的N端氨基酸是在SEQ ID NO:30的N端的位置1处的丙氨酸。在一些实施方案中,所述方法包括用由

SEQ ID NO:30组成的肽免疫宿主动物。在一些实施方案中,来自免疫的宿主动物的抗体获自从宿主动物分离的免疫细胞。在一些实施方案中,所述方法还包括使用免疫细胞产生杂交瘤。因此,在一些实施方案中,本公开提供了产生本文所述的单克隆抗体的杂交瘤。

[0016] 在一个方面,本公开提供与SCF248特异性结合的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段与包含SEQ ID NO:33的至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个或至少13个连续氨基酸的表位结合,其中所述抗体抑制SCF248与c-Kit的相互作用。在另外的实施方案中,表位包含SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:36。在又另外的实施方案中,表位包含SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:36。

[0017] 在一个方面,本公开提供了用于抑制SCF与c-Kit之间的相互作用的组合物和方法。C-kit在免疫细胞、造血干细胞和一些结构性细胞上表达。C-kit配体SCF248可在肌成纤维细胞、活化的上皮细胞、内皮细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、单核细胞及其他细胞上上调。在一些实施方案中,组合物和方法特异性抑制SCF248与c-Kit之间的相互作用。例如,在一些实施方案中,组合物和方法特异性抑制肌成纤维细胞上的SCF248与免疫细胞上的c-Kit之间的相互作用。作为另一实例,在一些实施方案中,本文提供的组合物和方法特异性地抑制肌成纤维细胞、活化的上皮细胞、内皮细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞和/或单核细胞上的SCF248与免疫细胞和/或结构性细胞上的c-Kit之间的相互作用。在一些实施方案中,所述方法包括使肌成纤维细胞上的SCF248与本文提供的抗体或其片段接触。在一些实施方案中,本文提供的抗体或其片段阻断SCF248与c-Kit的结合。在一些实施方案中,所述阻断是经由空间位阻。在一些实施方案中,本文提供的抗体或其片段内化SCF248。

[0018] 在一些实施方案中,本公开提供了用于抑制有需要的受试者的炎症的方法,所述方法包括向受试者施用本文提供的抗体或其片段。在一些实施方案中,本公开提供了用于抑制有需要的受试者的炎症性疾病的方法,所述方法包括向受试者施用本文提供的抗体或其片段。在另外的实施方案中,所述炎症性疾病是慢性炎症性疾病。在一些实施方案中,本公开提供了用于治疗有需要的受试者的炎症和/或慢性炎症性疾病的方法,所述方法包括向受试者施用本文提供的抗体或其片段。

[0019] 在一些实施方案中,本公开提供了用于抑制有需要的受试者的纤维化的方法,所述方法包括向受试者施用本文提供的抗体或其片段。在一些实施方案中,本公开提供了用于治疗有需要的受试者的纤维化的方法,所述方法包括向受试者施用本文提供的抗体或其片段。在实施方案中,所述方法还包括施用一种或多种另外的疗法和/或治疗剂。

[0020] 在一些实施方案中,炎症性疾病或纤维化疾病选自以下组成的组:荨麻疹、特应性皮炎、大疱性类天疱疮、硬皮病、系统性硬化症、非酒精性脂肪肝炎(NASH)、原发性硬化性胆管炎、肝硬化、肺纤维化(例如,特发性肺纤维化(IPF)、硬皮病肺纤维化)、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、囊性纤维化、支气管周围纤维化、高敏性肺炎、哮喘、博来霉素肺(bleomycin lung)、心内膜心肌纤维化、纤维肌痛、嗜酸性食管炎、放射性纤维化、类风湿性关节炎和炎症肠病。

[0021] 附图简述

[0022] 图1提供了组织损伤/炎症疾病过程的示意图。

[0023] 图2显示了本公开的抗SCF248抗体5H10的示例性机制。5H10抗体在图中称为

“OpSCF”。

[0024] 图3显示SCF、SCF220和SCF248的同种型；和单体裂解的细胞外结构域SCF165。SCF165在外显子6区域内在裂解SCF248后在其裂解位点处释放。

[0025] 图4A是一组直方图，其显示鼠5H10抗体与不表达SCF的对照细胞（左图）、表达SCF220但不表达SCF248的细胞（中图）和表达SCF248但不表达SCF220的细胞（右图）的结合。

[0026] 图4B显示鼠5H10抗体与165个氨基酸裂解的SCF细胞外结构域（ECD）的结合相比于与完整的194个氨基酸SCFECD的结合。

[0027] 图5显示培养的人IPF肌成纤维细胞与pHrodo红标记的2G8、5H10或对照IgG抗体接触后如通过流式细胞术测量的平均荧光强度（MFI）。

[0028] 图6显示在存在5H10抗体或IgG对照的情况下，在嗜酸性粒细胞与表达SCF248的细胞接触后，c-kit信号传导的P13K/AKT途径和MEK/ERK途径的活化。5H10抗体显著降低两种途径的活化。

[0029] 图7A至图7B通过流式细胞术显示鼠2G8和鼠5H10抗体与早期（图7A）和晚期（图7B）传代S1/S14 hSCF248（ATCC®CRL2454™）细胞的结合。

[0030] 图8A至图8B显示了鼠2G8和鼠5H10在早期传代时与S1/S14hSCF220（ATCC®CRL2453™）细胞（图8A）和S1/S14hSCF248细胞（图8B）的结合以及与潮霉素B处理的细胞的结合。

[0031] 图9A至图9B显示通过流式细胞术在不同抗体浓度下2G8人源化变体与S1/S14 hSCF220细胞（图9A）和S1/S14 hSCF248细胞（图9B）的结合。

[0032] 图10A至图10B显示通过流式细胞术在不同抗体浓度下5H10人源化变体与S1/S14 hSCF248细胞（图10A）和S1/S14 hSCF220细胞（图10B）的结合。

[0033] 图11A至图11D显示了通过流式细胞术在不同抗体浓度下2G8人源化变体（图11A）和5H10人源化变体（图11B、11C、11D）与S1/S14hSCF248细胞的结合。在图11C中，所示VH与VK3配对。在图11D中，示出的5H10抗体是VH1/VK3。

[0034] 图12A至12C显示了在人IPF肌成纤维细胞（Mfb）与阳性对照（无关抗体）或在图中各条下所示的抗体预温育后，CCL11（图12A）、胶原1A1（图12B）、纤连蛋白（图12C）或胶原3（图12D）的mRNA水平的变化。鼠亲本抗体在图中表示为“5H10”；人源化5H10抗体VH1/VK3、VH2/VK3、VH3/VK3、VH4/VK3和VH5/VK3也如所示进行测试。测试的抗体浓度为1μg/mL或10μg/mL。

[0035] 图13显示了pHrodo红标记的鼠5H10抗体、VH0/VK0嵌合抗体和人源化变体VH1/VK3和VH2/VK3的内化。箭头指向展示内化抗体的示例性细胞。

[0036] 图14显示5H10人源化变体对PBMC生存力的影响。

[0037] 图15A至图15H显示在EpiScreen™时间过程T细胞增殖测定中由所示5H10人源化变体诱导的CD4+T细胞反应。分别如图15G和15H所示的艾塞那肽（Exenatide）和KLH是阳性对照。

[0038] 图16显示了EpiScreen™时间过程T细胞增殖测定的方差分析（ANOVA）。

[0039] 图17显示博来霉素对照动物（左图）和用博来霉素和5H10（20mg/kg）处理的动物的肺组织学。

[0040] 图18显示用博来霉素和对照IgG处理的动物相比于用博来霉素和5H10（20mg/kg；

在图中称为抗SCF248)处理的动物中,肺羟脯氨酸降低。

[0041] 图19显示了在第0天随时间推移在未处理小鼠、用博来霉素处理以诱导肺纤维化的小鼠和对照Ig抗体(Bleo+cIg)以及用博来霉素和鼠5H10抗体处理的小鼠(在图中称为抗SCF248)中测量的体重(体重%)。在指定的时间点施用抗体。

[0042] 图20显示用博来霉素和对照IgG处理的动物相比于用博来霉素和5H10(20mg/kg;在图中称为抗SCF248)处理的动物中炎性细胞因子和肌成纤维细胞活化标记(TGF β 、CCL2、Colla1、纤连蛋白(fn)、平滑肌肌动蛋白(acta2)和干细胞因子(kitlg))的mRNA降低。

[0043] 图21显示用博来霉素和对照IgG处理的动物相比于用博来霉素和5H10(20mg/kg;在图中称为抗SCF248)处理的动物中肺肥大细胞、嗜酸性粒细胞和ILC2淋巴细胞减少。

[0044] 图22显示如通过用力呼气量(forced expiratory volume)(左图)、用力呼气流量(forced expiratory flow)(中图)和肺压变化(change in pulmonary pressure)(右图)测量的肺功能测试在用博来霉素和5H10(20mg/kg;在图中称为抗SCF248)相较于用博来霉素和对照IgG处理的动物中得到显著改善。

[0045] 图23显示了用于测试人源化抗体的体内慢性过敏性哮喘模型中的研究设计的示意图。

[0046] 图24A至24E提供了在慢性过敏性哮喘的体内模型中用人源化5H10抗体处理的结果。图24A显示与PBS对照相比,如所测量的气道阻力在用VH1/VK3处理的动物中显著降低。与慢性哮喘(PBS)对照相比,肺组织中的IL-13mRNA(图24B)、胶原1mRNA(图24C)和胶原3mRNA(图24D)也在用VH1/VK3处理的动物中减少。图24E显示与PBS对照相比,SCF248 mRNA表达也在用VH1/VK3 5H10抗体处理的动物中降低。

[0047] 图25A至25C显示抗体VH1/VK3在1mg/kg和5mg/kg的浓度下体内降低粘液蛋白Gob5(图25)、IL-13(图25B)和IL-5(图25C)的mRNA水平。

具体实施方式

[0048] 干细胞因子(SCF)是急性和慢性炎症、纤维化疾病和组织重塑疾病的关键介质。SCF与免疫细胞上的c-Kit的相互作用引发并维持炎症和纤维化。本公开提供了用于抑制SCF与c-Kit的相互作用的组合物和方法。在一个方面,本公开提供了用于防止炎症形式的SCF、SCF248与c-Kit相互作用并因此减少和/或防止免疫细胞活化的组合物和方法。因此,本公开提供了用于治疗慢性炎症以及纤维化和组织重塑疾病的方法。在一个方面,本公开提供了用于减少免疫细胞在器官或组织中的积累(例如,增殖和/或保留)的组合物和方法。例如,本公开提供了防止SCF248与c-Kit相互作用并因此减少和/或防止免疫细胞在器官或组织中积累的组合物和方法。在一些实施方案中,本公开提供用于减少和/或预防肥大细胞、嗜酸性粒细胞,2型先天淋巴样(ILC2)细胞和3型先天淋巴样(ILC3)细胞在器官或组织中的活化和/或积累的组合物和方法。

[0049] 特别地,本公开提供了特异性结合SCF并阻断或抑制其与c-Kit相互作用的抗体及其片段。在一些实施方案中,本文提供的抗体和片段结合SCF并抑制c-Kit和c-Kit+细胞的活性。本公开还提供了用于产生特异性结合SCF的抗体及其片段的方法,以及使用其的诊断和治疗方法。在一方面,本文提供的抗体及其片段特异性结合驱动炎症的SCF同种型SCF248。因此,本公开提供了用于抑制炎症和纤维化以及治疗慢性炎症性疾病和纤维化疾病

的特定、有效的组合物和方法。

[0050] 定义

[0051] 如本文所用,术语“抗体”是指具有至少一个抗原结合结构域的结合蛋白。本发明的抗体及其片段可以是完整抗体或其任何片段。因此,本发明的抗体和片段包括单克隆抗体或其片段和抗体变体或其片段,以及免疫缀合物。抗原结合片段包括Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、双特异性Fab二聚体(Fab₂)、三特异性Fab三聚体(Fab₃)、Fv、单链Fv蛋白(“scFv”)、双scFv、(scFv)₂、微抗体、双抗体、三抗体、四抗体、二硫键稳定化的Fv蛋白(“dsFv”)、单结构域抗体(sdAb,纳米抗体)、仅重链抗体(例如,骆驼VHH、骆驼纳米抗体、鲨鱼Ig NAR)和负责抗原结合的全长抗体的部分。分离的抗体或其抗原结合片段是已经从其天然环境的组分中鉴定和分离和/或回收的抗体或其抗原结合片段。

[0052] 在一些实施方案中,抗体及其抗原结合片段是分离的抗体及其片段。因此,本发明提供分离的抗体及其抗原结合片段,和编码此类抗体和片段的核酸,以及包含此类分离的抗体、片段和核酸的组合物。术语“分离的”是指已经从其天然环境中分离的目标化合物(例如,抗体或核酸)。本发明还提供了药物组合物,其包含分离的抗体或其片段,或编码此类抗体或片段的核酸,并且还包含一种或多种药学上可接受的载体。药学上可接受的载体包括例如赋形剂、稀释剂、包封材料、填充剂、缓冲剂或其他试剂。

[0053] 如本文所用,术语“衍生的”当用于指相对于参考抗体或其他结合蛋白的分子或多肽时,是指对与参考抗体或其他结合蛋白相同的表位具有特异性并能够与之结合的分子或多肽。

[0054] 如本文所用,短语“对...具有特异性”可以指抗体由于仅非特异性相互作用而不结合靶标,并且这种特性可以通过与同种型对照或类似物比较来确定。特异性结合不一定需要,但其可以包括与单个靶标的排他性结合。在实施方案中,本文提供的抗体与SCF248特异性结合,而不结合SCF220。

[0055] 术语“宿主细胞”是指已经用核酸序列转化或能够被转化并从而表达所关注基因的细胞。所述术语包括亲代细胞的后代,无论所述后代在形态或遗传组成上是否与原始亲本细胞相同,只要存在所关注基因。

[0056] 多肽(例如,抗原结合蛋白或抗体)的“变体”包含这样的氨基酸序列,其中相对于另一多肽序列,一个或多个氨基酸残基被插入、缺失和/或取代到氨基酸序列中。变体包括与本文提供的抗体或片段或与具有所列举DNA或氨基酸序列的抗体或片段具有所列举同一性百分比的抗体及其片段。

[0057] 术语“同一性”是指两个或更多个多肽分子或两个或更多个核酸分子的序列之间的关系,如通过比对和比较序列所确定。“同一性百分比”、“同源性百分比”、“序列同一性”或“序列同源性”等意指所比较的分子中氨基酸或核苷酸之间的相同残基的百分比,并且基于所比较的最小分子的大小来计算。对于这些计算,比对中的间隙(如果有的话)优选地通过特定的数学模型或计算机程序(即,“算法”)来解决。可用于计算比对的核酸或多肽的同一性的方法包括描述于以下中的方法:Computational Molecular Biology, (Lesk, A.M. 编), 1988, New York: Oxford University Press; Biocomputing Informatics and Genome Projects, (Smith, D.W. 编), 1993, New York: Academic Press; Computer Analysis of Sequence Data, 第I部分, (Griffin, A.M. 和 Griffin, H.G. 编), 1994, New Jersey: Humana

Press; von Heinje, G., 1987, Sequence Analysis in Molecular Biology, New York: Academic Press; Sequence Analysis Primer, (Gribskov, M. 和 Devereux, J. 编), 1991, New York: M. Stockton Press; 和 Carillo 等人, 1988, SIAM J. Applied Math. 48:1073。在计算同一性百分比时, 被比较的序列通常以给出序列之间的最大匹配的方式进行比对。

[0058] 术语“轻链”包括具有足够可变区序列以赋予结合特异性的全长轻链及其片段。全长轻链包括可变区结构域和恒定区结构域。轻链的可变区结构域位于多肽的氨基末端。轻链包括 κ 链和 λ 链。

[0059] 术语“重链”包括具有足够可变区序列以赋予结合特异性的全长重链及其片段。全长重链包括可变区结构域、三个恒定区结构域 C_H1 、 C_H2 和 C_H3 。可变重链结构域位于多肽的氨基末端, 并且 C_H 结构域位于羧基末端, CH_3 最接近多肽的羧基末端。重链可以是任何同种型, 包括IgG (包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4亚型)、IgA (包括IgA1和IgA2亚型)、IgM和IgE。术语“同种型”指由重链恒定区基因编码的抗体类别。在一些实施方案中, 本文提供的抗体具有IgG4重链或包含某些氨基酸突变的IgG4重链。例如, 在一些实施方案中, IgG4包含位置228处的突变(EU编号方案, Kabat等人Sequence of proteins of immunologic interest, 第5版Bethesda, MD, NIH 1991)以抑制Fab臂交换。例如, 在一些实施方案中, IgG4重链是IgG4S228P重链。在一些实施方案中, 重链包含一个或多个减少与Fc受体的结合的氨基酸突变, 并且从而减少或消除抗体的效应子功能。例如, 重链可包含位置233、234、235、236、237、265、309、331和409(EU编号)中的一个或多个处的突变。

[0060] 术语“可变区”或“可变结构域”是指抗体的轻链和/或重链的一部分, 通常包括重链中氨基末端120至130个氨基酸和轻链中约100至110个氨基末端氨基酸。在某些实施方案中, 不同抗体的可变区甚至在相同物种的抗体中在氨基酸序列上广泛不同。抗体的可变区通常决定特定抗体对其靶标的特异性。如本文所用的术语“靶标”是指能够被抗原结合蛋白结合的分子或分子的一部分。在某些实施方案中, 靶标可具有一个或多个表位。在某些实施方案中, 靶标是抗原。短语“抗原结合蛋白”中使用“抗原”仅表示包含抗原的蛋白质序列可以被抗体结合。在本文中, 不要求蛋白质是外源的或能够诱导免疫反应。

[0061] 术语“表位”包括能够被抗原结合蛋白结合的任何决定簇, 例如抗体或T细胞受体。表位是靶向抗原的抗原结合蛋白结合的抗原区域, 当抗原是蛋白质时, 表位包括直接接触抗原结合蛋白的特定氨基酸。最常见的是, 表位存在于蛋白质上, 但在某些情况下可存在于其他种类的分子, 例如核酸上。表位决定簇可以包括分子的化学活性表面基团, 例如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基, 并且可以具有特定的三维结构特征和/或特定的电荷特征。通常, 对特定靶抗原具有特异性的抗体将优先识别蛋白质和/或大分子的复杂混合物中的靶抗原上的表位。抗体表位可以是线性的或构象的。在实施方案中, 本文提供的表位是线性表位。

[0062] 除非另外具体说明, 否则单数的使用包括复数。除非另外具体说明, 否则词语“一个/种(a/an)”是指“至少一个/种”。除非另外说明, 否则“或”的使用意指“和/或”。短语“至少一个/种”的含义等同于短语“一个/种或多个/种”的含义。此外, 术语“包括(including)”以及例如“包括(includes)”和“包括(included)”的其他形式的使用不是限制性的。另外, 除非另外具体说明, 否则例如“元件”或“组分”的术语既涵盖包含一个单元的元件和组分, 又涵盖包含超过一个子单元的元件和组分。如本文所用, 术语“约”是指大于或小于所陈述

参数值的量,例如加或减“约”修饰的对象的5%或10%,或者如本领域技术人员从上下文将认识到的(例如,值之间的间隔的约50%)。术语“约”还包括所提及的值。

[0063] 干细胞因子

[0064] 在人类中,存在至少两种形式的SCF,其具有不同的结构和活性。SCF220在几种稳态功能中起作用,包括造血和精子发生,并且发现于骨髓、睾丸以及其他组织和器官中。SCF220可缓慢裂解,有时称为“膜SCF”。相反,SCF248可快速裂解并在外显子6中包含位于N端c-kit结合结构域与跨膜结构域之间的裂解位点。SCF248可称为“可溶性SCF”。外显子6通过可变剪接从SCF220中排除,因此SCF220缺乏此裂解位点。单体细胞外结构域(SCF165)是裂解产物并在血浆中用作慢性炎症性疾病的生物标记物。血浆也可含有来自SCF220的可检测水平的SCF细胞外结构域,但预期大部分可检测细胞外结构域是SCF165。SCF248是在肌成纤维细胞、活化的上皮细胞及其他细胞上发现的同种型,其在炎症期间活化免疫细胞并有助于维持纤维化。更具体地,SCF248与免疫细胞上的c-Kit结合,启动细胞因子的产生,所述细胞因子活化成纤维细胞变成肌成纤维细胞,其分泌细胞外基质蛋白质、胶原和纤连蛋白。活化的肌成纤维细胞以及活化的上皮细胞、内皮细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、单核细胞及其他细胞也在细胞表面上表达SCF,活化更多的c-Kit⁺免疫细胞,引起进一步的细胞因子释放和免疫活化和纤维化反应。

[0065] 本文公开的抗体及其抗原结合片段对SCF具有特异性。在一些实施方案中,抗体及其片段对人SCF具有特异性。在一些实施方案中,抗体及其片段对SCF248具有特异性。在一些实施方案中,抗体结合SCF248而不结合SCF的其他同种型。在一些实施方案中,抗体结合SCF248而不结合SCF220。在一些实施方案中,本公开提供了用于制备对SCF248具有特异性的抗体或其片段的方法。本公开提供了对SCF248具有特异性的示例性抗体及片段,以及制备和使用所述抗体及片段的方法。在一些实施方案中,本文提供的抗体及其片段通过与SCF248结合并阻断SCF248与c-Kit之间的相互作用而破坏在各种细胞类型上表达的SCF248与cKit⁺免疫细胞之间的正反馈环。

[0066] 抗体和片段

[0067] 本公开提供抗体,包括单克隆抗体及其片段。本文提供的对SCF(例如,SCF248)具有特异性的抗体片段有时在本文中称为抗原结合片段,这意味着其包含能够结合靶抗原(SCF,例如SCF248)的亲本抗体的部分。“抗体片段”,“抗原结合片段”等在本文中可互换使用。抗体片段的实例包括Fab片段、Fab'片段、F(ab)'片段、Fv片段、分离的CDR区、双特异性Fab二聚体(Fab₂)、三特异性Fab三聚体(Fab₃)、单链Fv蛋白(“scFv”)、双scFv、(scFv)₂、微抗体、双抗体、三抗体、四抗体、二硫键稳定化的Fv蛋白(“dsFv”)、单结构域抗体(sdAb,纳米抗体)、仅重链抗体(例如,骆驼VHH、骆驼纳米抗体,鲨鱼Ig NAR)和负责抗原结合的全长抗体的部分。

[0068] “Fab片段”包含一条轻链和一条重链的C_H1和可变区。Fab分子的重链不能与另一重链分子形成二硫键。“Fab'片段”包含一条轻链和一条重链的一部分,其含有VH结构域和C_H1结构域以及C_H1与C_H2结构域之间的区域,使得在两个Fab'片段的两条重链之间可以形成链间二硫键以形成F(ab')₂分子。“F(ab')₂片段”含有两条轻链和两条重链,其含有C_H1和C_H2结构域之间的恒定区的一部分,使得在两条重链之间形成链间二硫键。因此,F(ab')₂片段由通过两条重链之间的二硫键结合在一起的两个Fab'片段组成。“Fv片段”包含重链和轻链

的可变区,但缺少恒定区。“scFv”是Fv分子,其中重链和轻链可变区通过柔性接头连接以形成单个多肽链,其形成抗原结合区。

[0069] 在一些方面,本文提供的抗体及其片段由其的互补决定区(CDR)限定。CDR是抗体中的可变链的一部分;每个轻链和重链可变区包含三个CDR、CDR1、CDR2和CDR3。抗体的CDR决定抗原特异性。在某些实施方案中,通过解析抗体的结构和/或解析抗体-配体复合物的结构来完成CDR的明确描绘和包含抗体的结合位点的残基的鉴定。在某些实施方案中,这可以通过本领域技术人员已知的多种技术中的任一种来实现,例如X射线晶体学。在某些实施方案中,可以使用各种分析方法来鉴定或接近CDR区。此类方法的实例包括但不限于Kabat定义、Chothia定义、AbM定义和contact定义。

[0070] Kabat定义是对抗体中的残基进行编号的标准并通常用于鉴定CDR区。参见例如,Johnson&Wu, *Nucleic Acids Res.*, 28:214-8 (2000)。Chothia定义类似于Kabat定义,但Chothia定义考虑了某些结构环区域的位置。参见例如Chothia等人, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-17 (1986); Chothia等人, *Nature*, 342:877-83 (1989)。AbM定义使用由模拟抗体结构的牛津分子集团(Oxford Molecular Group)产生的一组集成的计算机程序。参见例如Martin等人, *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 86:9268-9272 (1989); “AbM™, A Computer Program for Modeling Variable Regions of Antibodies,” Oxford, UK; Oxford Molecular, Ltd. AbM定义使用知识数据库和从头开始方法的组合从一级序列建模抗体的三级结构,例如Samudrala等人, “Ab Initio Protein Structure Prediction Using a Combined Hierarchical Approach,” *PROTEINS, Structure, Function and Genetics Suppl.*, 3:194-198 (1999) 中描述的那些。Contact定义基于对可用的复杂晶体结构的分析。参见例如MacCallum等人, *J. Mol. Biol.*, 5:732-45 (1996)。

[0071] 抗体及其片段还可以包括重组多肽、融合蛋白和双特异性抗体。本文公开的抗SCF抗体及其片段可以是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型。在一个实施方案中,本文公开的抗SCF抗体及其片段是IgG1或IgG4同种型。本发明的抗SCF抗体及其片段可以衍生自任何物种,包括但不限于小鼠、大鼠、兔、灵长类动物、美洲驼、骆驼、山羊、鲨鱼、鸡和人。SCF抗体及其片段可以是嵌合的、人源化的或完全人抗体。在一个实施方案中,抗SCF抗体是鼠抗体。在另一个实施方案中,抗SCF抗体是嵌合抗体。在另一个实施方案中,嵌合抗体是小鼠-人嵌合抗体。在另一个实施方案中,抗体衍生自小鼠并且是人源化的。

[0072] “嵌合抗体”是具有衍生自一个物种的重链可变区的至少一部分和轻链可变区的至少一部分的抗体;以及衍生自另一物种的恒定区的至少一部分。例如,在一个实施方案中,嵌合抗体可以包含鼠可变区和人恒定区。

[0073] “人源化抗体”是含有衍生自非人抗体的互补决定区(CDR)的抗体;以及衍生自人抗体的框架区以及恒定区。例如,本文提供的抗SCF抗体可以包含衍生自一种或多种鼠抗体和人框架区和恒定区的CDR。因此,在一个实施方案中,本文提供的人源化抗体结合SCF上与衍生抗体CDR的鼠抗体相同的表位。

[0074] 在一些实施方案中,本文提供的抗体及其片段包含重链和轻链,其各自包含三个CDR。示例性重链CDR1、CDR2和CDR3(分别为HCDR1、HCDR2和HCDR3)和轻链CDR1、CDR2和CDR3(分别为LCDR1、LCDR2和LCDR3)的氨基酸序列提供于下表1中。表1还提供了示例性重链和轻链可变区的氨基酸序列。在一些实施方案中,本公开提供本文称为“5H10”和“2G8”的抗体。

人源化5H10或2G8的重链可变区在本文中称为VH1、VH2、VH3、VH4和VH5。5H10 VH0是通过本文所述的方法产生的鼠亲本抗体的可变重链。VH1、VH2、VH3、VH4和VH5各自是衍生自5H10 VH0或2G8 VH0的人源化重链可变区。5H10抗体包含κ轻链。鼠亲本抗体可变轻链在本文中称为5H10 VK0。VK1、VK2、VK3和VK4各自是衍生自VK0的人源化轻链可变区。2G8抗体包含λ轻链。鼠亲本抗体可变轻链在本文中称为2G8 VL0。VL1、VL2、VL3和VL4各自是衍生自VL0的人源化轻链可变区。

[0075] 表1. 示例性抗SCF抗体序列

[0076]	SEQ ID NO	描述	
	1	5H10 重链 CDR1	SYWMN
	2	5H10 重链 CDR2	QIYPGDGDTHYNGKFKG
	3	5H10 重链 CDR3	SNWVGSY

[0077]

4	5H10 轻链 CDR1	KSSQSLLESDGKTYLN
5	5H10 轻链 CDR2	LVSRLDS
6	5H10 轻链 CDR3	WQGTHLPQT
7	5H10 重链可变区 VH0 (鼠亲本)	QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKSS GYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWI GQIYPGDGDTHYNGKFKGKATLTA DKSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCS SSNWVGSYWGQGTLVTVSA
8	5H10 重链可变区 VH1 (人源化的)	QVQLVQSGAELKKPGSSVKISCKSS GYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWI GQIYPGDGDTHYNGKFKGKATLTA DKSTSTAYMELSSLTSEDSAVYFCS SSNWVGSYWGQGTLVTVSS
9	5H10 重链可变区 VH2 (人源化的)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKISCKSS GYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWI GQIYPGDGDTHYNGKFKGKATLTA DKSTSTAYMELSSLRSED TAVYFCS SSNWVGSYWGQGTLVTVSS
10	5H10 重链可变区 VH3 (人源化的)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKS SGYAFSSYWMNWVRQRPGQGLEW IGQIYPGDGDTHYNGKFKGKATLT ADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYFC SSSNWVGSYWGQGTLVTVSS
11	5H10 重链可变区 VH4 (人源化的)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKS SGYAFSSYWMNWVRQRPGQGLEW IGQIYPGDGDTHYNGKFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSED TAVYFCS SSNWVGSYWGQGTLVTVSS
12	5H10 重链可变区 VH5 (人源化的)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKS SGYAFSSYWMNWVRQRPGQGLEW IGQIYPGDGDTHYNGKFQGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCS SSNWVGSYWGQGTLVTVSS
13	5H10 轻链可变区 VK0 (鼠亲本)	DVVMQTQPLTSLVTIGQTASISCKSS QSLLESDGKTYLNWLSQRPGQSPK RLIYLVSRLD SGVPDRFTGSGSGTD FTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHL PQTFGGGGTKLEIK
14	5H10 轻链可变区 VK1 (人源化的)	DVVMTQSPLTSLVTLGQPASISCKS SLSLLESDGKTYLNWLQQRPGQSP RRLIYLVSRLD SGVPDRFTGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTH

[0078]		LPQTFGGGTKVEIK
	15	5H10 轻链可变区 VK2 (人源化的)
	16	5H10 轻链可变区 VK3 (人源化的)
	17	5H10 轻链可变区 VK4 (人源化的)
	37	5H10 VH5 CDR2

[0079] 本领域技术人员将理解,可变重链和可变轻链可以独立地从本文提供的抗体中选择,或混合和匹配。因此,在一些实施方案中,本文提供的抗体及其片段包含选自以下组成的组的重链和轻链组合:VH0/VK0、VH0/VK1、VH0/VK2、VH0/VK3、VH0/VK4、VH1/VK0、VH1/VK1、VH1/VK2、VH1/VK3、VH1/VK4、VH2/VK0、VH2/VK1、VH2/VK2、VH2/VK3、VH2/VK4、VH3/VK0、VH3/VK1、VH3/VK2、VH3/VK3、VH3/VK4、VH4/VK0、VH4/VK1、VH4/VK2、VH4/VK3、VH4/VK4、VH5/VK0、VH5/VK1、VH5/VK2、VH5/VK3和VH5/VK4。

[0080] 在一些实施方案中,本公开提供包含与选自由SEQ ID NO:7-12组成的组的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%同源性的氨基酸序列的抗体或片段。在一些实施方案中,本公开提供包含根据选自由SEQ ID NO:7-12组成的组的序列的重链可变区的抗体或其片段。在一些实施方案中,本公开提供包含与选自由SEQ ID NO:7-11组成的组的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%同源性的氨基酸序列的抗体或片段,其中所述抗体或片段包含分别与SEQ ID NO:1、2和3相同的重链CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施方案中,本公开提供包含与SEQ ID NO:12的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%同源性的氨基酸序列的抗体或片段,其中所述抗体或片段包含分别与SEQ ID NO:1、37和3相同的重链CDR1、CDR2和CDR3。

[0081] 在一些实施方案中,本公开提供包含与选自由SEQ ID NO:13-17组成的组的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%同源性的氨基酸序列的抗体或片段。在一些实施方案中,本公开提供了包含根据选自由SEQ ID NO:13-17组成的组的序列的轻链可变区的抗体或其片段。在一些实施方案中,本公开提供包含与选自由SEQ ID NO:13-17组成的组的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%同源性的氨基酸序列的抗体或片段,其中所述抗体或片段包含分别与SEQ ID NO:4、5和6相同的轻链CDR1、CDR2和CDR3。

[0082] 在一些实施方案中,本公开提供包含与以下序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%同源性的氨基酸序列的抗体或片段:SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:13;SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:15;SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:16;SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:17;SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:13;SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:15;SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:16;SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:17;SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:13;SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:15;SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:16;SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:17;SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:13;SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:15;SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:16;SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:17;SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:13;SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:15;SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:16;SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:17;SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:13;SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:15;SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:16;SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:17;SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13;SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:15;SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:16;或SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:17。

[0083] 在特定实施方案中,抗体及其片段包含选自自由以下组成的组的重链和轻链组合:VH1/VK1、VH1/VK2、VH1/VK3、VH2/VK1、VH2/VK2、VH2/VK3、VH3/VK1、VH3/VK2、VH3/VK3、VH4/VK1、VH4/VK2、VH4/VK3、VH5/VK1、VH5/VK2和VH5/VK3。在一些实施方案中,抗体包含与SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%序列同一性的氨基酸序列;和与SEQ ID NO:16具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体或其片段包含与SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%序列同一性的氨基酸序列;和与SEQ ID NO:16具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%序列同一性的氨基酸序列;其中所述抗体或片段包含分别与SEQ ID NO:1、2和3相同的重链CDR1、CDR2和CDR3,以及分别与SEQ ID NO:4、5和6相同的轻链CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施方案中,抗体或其片段包含与SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9具有至少95%或至少99%序列同一性的氨基酸序列;和与SEQ ID NO:16具有至少95%或至少99%序列同一性的氨基酸序列;其中所述抗体或片段包含分别与SEQ ID NO:1、2和3相同的重链CDR1、CDR2和CDR3,以及分别与SEQ ID NO:4、5和6相同的轻链CDR1、CDR2和CDR3。抗体或其片段可与SCF248特异性结合,但可不结合SCF220。在一些实施方案中,抗体包含根据SEQ ID NO:8的重链可变区和根据SEQ ID NO:16的轻链可变区。在一些实施方案中,抗体包含根据SEQ ID NO:9的重链可变区和根据SEQ ID NO:16的轻链可变区。

[0084] 在一些实施方案中,本文提供的抗体和片段包含根据SEQ ID NO:7、8、9、10、11或12的重链可变区氨基酸序列或其变体;和/或包含根据SEQ ID NO:13、14、15、16或17的轻链可变区氨基酸序列或其变体。变体可包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸取代或缺失或其组合。在一些实施方案中,氨基酸取代是保守取代。相对于本文提供的序列,在CDR或可变轻链或重链区中具有一个或多个氨基酸取代、插入、缺失或其组合的本文公开的抗SCF抗体保留了不具有氨基酸取代、插入或缺失的相应抗SCF抗体的生物活性。因此,本文提供的变体抗SCF抗体保持与SCF248特异性结合。术语同源性百分比、序列同一性、序列同源性等在本文中可互换使用,并且是指两个参考序列共有的相同氨基酸序列的数目除以氨基酸位置

的总数再乘以100。

[0085] 在一些实施方案中,本发明提供了结合与本文公开的任何一种示例性抗体相同的表位的抗体。因此,在一些实施方案中,本发明提供了与本文提供的示例性抗体竞争结合SCF的抗体。例如,在一些实施方案中,本公开提供特异性结合本文提供为SEQ ID NO:29的氨基酸序列的区域的抗体。在一些实施方案中,本文提供的抗体与包含SEQ ID NO:33 (ASSLRNDSSSSNRK)或SEQ ID NO:36

[0086] ASSLRNDSSSSNR)的氨基酸序列的表位特异性结合。在一些实施方案中,本公开提供了特异性结合由根据SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:36的氨基酸序列组成的组的表位的抗体。在一些实施方案中,本公开提供了与包含SEQ ID NO:33的至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个或至少10个连续氨基酸的表位的抗体特异性结合。

[0087] 在一些实施方案中,本文提供的抗体及其片段包含本文提供的重链和轻链可变区的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和/或LCDR3,或其变体。因此,在一些实施方案中,本文提供的抗体及其片段包括其中HCDR是SEQ ID NO:7、8、9、10、11或12的HCDR的抗体;和/或其中LCDR是SEQ ID NO:13、14、15、16或17的LCDR。例如,在一些实施方案中,抗体及其片段包含本文提供的任一个重链可变区的氨基酸31-35、50-65和95-102,如Kabat编号方案所定义。在一些实施方案中,抗体及其片段包含本文提供的任一个轻链可变区的氨基酸24-34、50-56和89-97,如Kabat编号方案所定义。

[0088] 本文提供了示例性人源化抗体。包含本文提供的重链和轻链CDR或其变体的另外的抗SCF抗体可以使用任何人框架序列产生,并且也包括在本发明中。在一个实施方案中,适用于本发明的框架序列包括结构上与本文提供的框架序列相似的那些框架序列。可以对框架区进行进一步修饰以改善本文提供的抗体的特性。这种进一步的框架修饰可以包括化学修饰;降低免疫原性或去除T细胞表位的点突变;或原始种系序列中的残基的回复突变。

[0089] 在一些实施方案中,此类框架修饰包括对应于本文示例的突变的那些框架修饰,包括种系序列的回复突变。例如,在一个实施方案中,本文提供的人源化抗体的VH和/或VL的人框架区中的一个或多个氨基酸回复突变成亲本鼠抗体中的相应氨基酸。本发明还包括人源化抗体,其结合SCF(例如,SCF248)并包含对应于本文所述的关于任何合适的框架序列的示例性修饰的框架修饰,以及另外改善抗体的特性的其他框架修饰。在其他实施方案中,本文提供的抗体包含一个或多个突变以改善稳定性,改善溶解性,改变糖基化和/或降低免疫原性,例如通过减少脱酰胺或氧化,减少异构化,优化疏水核心和/或电荷簇残基,去除疏水表面残基,优化参与可变重链和可变轻链之间的界面的残基和/或修饰等电点的靶向氨基酸改变。

[0090] 本文提供的抗SCF抗体及其片段还可包含Fc区修饰以改变效应子功能。Fc修饰可以是氨基酸插入、缺失或取代,或可以是化学修饰。例如,可进行Fc区修饰以增加或减少补体结合,增加或减少抗体依赖性细胞毒性,或增加或减少抗体的半衰期。一些Fc修饰增加或降低抗体对Fc γ 受体,例如Fc γ RI、Fc γ RII、Fc γ RIII或FcRn的亲和力。各种Fc修饰已描述于本领域中,例如Shields等人,J Biol.Chem 276;6591(2001);Tai等人Blood 119;2074(2012);Spiekermann等人JExp.Med 196;303(2002);Moore等人mAbs 2:2;181(2010);Medzihradsky Methods in Molecular Biology 446;293(2008);Mannan等人Drug Metabolism and Disposition 35;86(2007);和Idusogie等人J Immunol 164;4178

(2000)。在一些实施方案中,Fc区糖基化模式被改变。在其他实施方案中,通过聚乙二醇化(例如,通过使抗体或其片段与聚乙二醇(PEG)反应)修饰Fc区。示例性Fc修饰包括选自由228、233、234、235、236、241、248、265、297、309、331和409组成的组的一个或多个氨基酸位置处的修饰(Kabat编号;Kabat等人,Sequences of Immunological Interest,第五版,National Institute of Health,Bethesda,Md.(1991))。在实施方案中,抗体具有降低或消除效应子功能的修饰。在实施方案中,抗体是具有一个或多个选自由以下组成的组的Fc修饰的IgG1抗体:E233P、L234V、L234A、L235V、L235A、G236(缺失)、D265A、D270A、N297A和N297Q。在实施方案中,抗体是具有一个或多个选自由以下组成的组的Fc修饰的IgG4抗体:S228P、E233P、F234A、F234V、L235A、L235V、S241P、L248E、D265A、D265T、L309L和R409K。在实施方案中,本文提供的抗SCF抗体包含S241P突变和L248E突变。

[0091] 在实施方案中,本公开提供了本文提供的抗体,其包含根据SEQ ID NO:40和41的人IgG4恒定区。在实施方案中,本公开提供了与SEQ ID NO:40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50包含至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或约99%序列同一性的抗体。在实施方案中,本公开提供包含根据SEQ ID NO:40的重链和根据SEQ ID NO:41的轻链的抗体。在实施方案中,本公开提供包含根据SEQ ID NO:42、43、44、45或46的重链和根据SEQ ID NO:47、48、49或50的轻链的抗体。在实施方案中,本公开提供了包含根据SEQ ID NO:42的重链和根据SEQ ID NO:49的轻链的抗体。在实施方案中,本公开提供了包含根据SEQ ID NO:43的重链和根据SEQ ID NO:49的轻链的抗体。在实施方案中,本公开提供了包含根据SEQ ID NO:44的重链和根据SEQ ID NO:49的轻链的抗体。在实施方案中,本公开提供了包含根据SEQ ID NO:45的重链和根据SEQ ID NO:49的轻链的抗体。在实施方案中,本公开提供了包含根据SEQ ID NO:46的重链和根据SEQ ID NO:49的轻链的抗体。

[0092] 在一些实施方案中,本公开提供了用于制备与SCF248特异性结合的抗体的方法。SCF248同种型SCF包括外显子6,其包含两个丙氨酸残基之间的裂解位点(SEQ ID NO:34的氨基酸16和17,其提供外显子6的氨基酸序列)。先前的抗SCF抗体通过用跨越外显子6和外显子7的一部分的肽免疫小鼠而产生(参见例如美国专利第8,911,729号,其出于所有目的通过引用整体并入本文)。由于SCF220与体内平衡活性相关,与SCF220的任何交叉反应性将是有害的,因为其将在受试者中引起各种脱靶效应。有利地,本公开中提供的抗体以极高的特异性与SCF248结合。在一些实施方案中,本文提供的抗体对SCF248具有特异性并且不结合SCF220。因此,本文提供的抗体能够特异性抑制SCF248与c-Kit之间的相互作用,所述相互作用诱导并维持慢性炎症反应和纤维化。此外,本文提供的抗体能够特异性诱导SCF的内化,从而减少SCF248与c-Kit之间的相互作用。因此,在一些实施方案中,本公开提供了对SCF248具有特异性的抗体,并且在本文讨论的和本领域已知的各种炎性和纤维化疾病中是安全和有效的。

[0093] 对于单克隆抗体的制备,可以使用提供通过培养中的连续细胞系产生抗体分子的任何技术(参见例如Harlow和Lane,Antibodies:ALaboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.)。这些技术包括但不限于最初由Köhler和Milstein开发的杂交瘤技术和三瘤技术、人B细胞杂交瘤技术(参见例如Kozbor等人,Immunol.Today,4:72(1983))和EBV-杂交瘤技术,以产生人单克隆抗体(Cole等人,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,Inc.,第77-96页(1985))。或

者,可通过重组DNA方法来制备抗体。在一些实施方案中,根据本公开的抗体可以通过使用例如Clackson等人,Nature 352:624-28(1991)和Marks等人,J.Mol.Biol.222(3):581-97(1991)中所描述的技术从噬菌体展示文库中分离单克隆抗体来制备。在一些实施方案中,抗体是通过将选自人衍生的噬菌体展示或酵母展示文库的Fv克隆可变结构域序列与已知的人恒定结构域序列组合而构建的完全人抗体。

[0094] 在本文提供的一些实施方案中,由杂交瘤制备抗体。使用杂交瘤方法,通过注射免疫肽来免疫小鼠、仓鼠或其他合适的宿主动物,以引发淋巴细胞产生将特异性结合免疫抗原的抗体。或者,可在体外免疫淋巴细胞。免疫后,分离淋巴细胞并使用例如聚乙二醇与合适的骨髓瘤细胞系融合以形成杂交瘤细胞,然后从未融合的淋巴细胞和骨髓瘤细胞中选择所述杂交瘤细胞。然后可以使用标准方法(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986)在体外(例如,在培养中)繁殖或作为动物腹水肿瘤体内繁殖如通过免疫沉淀、免疫印迹或通过体外结合测定(例如放射免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA))所确定的产生特异性针对所选抗原的单克隆抗体的杂交瘤。然后可以如上述多克隆抗体所述从培养基或腹水中纯化单克隆抗体。

[0095] 在一些实施方案中,使用鼠杂交瘤系统产生本文提供的抗体。在鼠中进行杂交瘤产生是一个成熟的程序。分离用于融合的免疫脾细胞的免疫方案和技术是本领域已知的。融合配偶体(例如,鼠骨髓瘤细胞)和融合方法也是已知的。本文技术的实施方案提供了由杂交瘤产生的抗体(例如,单克隆抗体),所述杂交瘤通过用肽免疫小鼠而制备,所述肽是SCF蛋白的部分或片段。

[0096] 在一些实施方案中,本文提供的对SCF248具有特异性的抗体是通过用具有大部分或完全在外显子6内的氨基酸序列的肽免疫小鼠而产生的。例如,免疫肽包含SEQ ID NO:34中的5个或更多个氨基酸的任何延伸部。作为另一实例,免疫肽包含从SEQ ID NO:29的氨基酸位置20处开始的5个或更多个氨基酸的任何延伸部。作为另一实例,免疫肽包含从SEQ ID NO:29的氨基酸位置20处开始并终止于SEQ ID NO:29的位置25至38中的任一个处的5个或更多个氨基酸的延伸部。因此,在一些实施方案中,免疫肽在裂解位点之后包含外显子6的氨基酸序列,并且完全包含在外显子6内或仅包含外显子7的1个、2个、3个、4个或5个氨基酸。在一些实施方案中,免疫肽包含SEQ ID NO:30或由其组成。在一些实施方案中,免疫肽包含本文提供的任何肽或其保守变体。保守变体可包含1个、2个、3个、4个或5个氨基酸取代或缺失或其组合。如上所提供,在一些实施方案中,使用本文提供的免疫肽产生的抗体具有完全或大部分在外显子6内的表位。“大部分在…内”是指至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的肽在外显子6内。在一些实施方案中,表位开始于外显子6的裂解位点(即,在SEQ ID NO:29的氨基酸位置19和20处的丙氨酸之间)并延伸至外显子6的末端。在一些实施方案中,表位开始于外显子6的裂解位点并延伸至跨膜结构域的第1个、第2个、第3个、第4个或第5个n端氨基酸。在一些实施方案中,表位包含SEQ ID NO:33或由其组成。在一些实施方案中,本文称为5H10的抗体(包括鼠、嵌合和人源化5H10抗体)与包含SEQ ID NO:33或由其组成的SCF的表位结合。

[0097] 在一些实施方案中,本文提供的方法用于产生本文称为5H10的抗体。在一些实施方案中,抗体“5H10”在本文中也称为“OpSCF”。抗体5H10有利地以高特异性与SCF248结合并且不结合SCF220。本文提供了鼠亲本抗体5H10及其人源化变体的氨基酸序列(参见表1)。

[0098] 在一个实施方案中,本发明提供了对SCF和至少一种其他抗原或表位具有特异性的双特异性或多特异性抗体。可以使用本文提供的结合测定或本领域已知的任何其他结合测定来测试本文提供的抗SCF抗体及其片段与SCF的结合。

[0099] 除非另外说明,否则本发明的实践采用本领域公知的和例如以下中描述的常规分子生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学技术:Methods in Molecular Biology, Humana Press; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第二版 (Sambrook等人, 1989), Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan等编, 1991); Immunobiology (C.A. Janeway和P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practical approach (D. Catty编, IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd和C. Dean编, Oxford University Press, 2000); Phage display: a laboratory manual (C. Barbas III等人, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001); 和Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow和D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999)。

[0100] 治疗方法

[0101] 在一个方面,本公开提供了通过SCF248与免疫细胞上的c-Kit的相互作用治疗和/或预防与免疫细胞迁移、活化和/或增殖相关的任何疾病或病状的方法。因此,在一些实施方案中,本公开提供了用于抑制或预防免疫细胞活化,以及减少或预防免疫细胞在器官或组织内的积累,从而治疗或预防涉及炎症的各种疾病和病症的方法。在一些实施方案中,免疫细胞选自由以下组成的组:肥大细胞、先天淋巴样细胞(ILC,例如ILC2或ILC3细胞)和嗜酸性粒细胞。

[0102] 如本文所用,术语“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”是指治疗性治疗和防治性或预防性措施。需要治疗的受试者包括已经患有疾病或病状的那些受试者,以及可能罹患疾病或病状并且目的是预防、延迟或减轻疾病或病状的那些受试者。如本文所用,术语“受试者”表示哺乳动物,例如啮齿动物、猫科动物、犬科动物和灵长类动物。优选地,根据本发明的受试者是人。如本文所用,术语“治疗有效量”是指向受试者提供治疗性和/或预防性益处所必需的化合物或组合物的量。

[0103] 在一个方面,本发明提供了用于治疗受试者的炎性疾病、纤维化疾病和/或组织重塑疾病的方法。在一些实施方案中,炎性疾病是慢性炎性疾病。

[0104] 慢性炎性、纤维化和组织重塑疾病包括肺、肾、肝、心脏、皮肤、结缔组织及其他组织的疾病。示例性炎性、纤维化或组织重塑疾病包括但不限于肺纤维化(例如,特发性肺纤维化(IPF)、硬皮病肺纤维化、硬皮病相关间质性肺病(SSc-ILD)、与肺感染或肺炎相关的肺纤维化、与系统性红斑狼疮和/或类风湿性关节炎相关的肺纤维化、结节病)、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、囊性纤维化、支气管周围纤维化、博来霉素肺、高敏性肺炎、哮喘、纤维胸、纵隔纤维化、慢性鼻窦炎、荨麻疹(例如,慢性自发性荨麻疹)、特应性皮炎、皮炎、结节性表皮下纤维化、硬皮病、瘢痕瘤、肾纤维化、慢性肾病、肾小球肾炎、慢性肾移植排斥反应、肾病(例如,IgA肾病,局灶性节段性肾小球硬化症、急进性肾小球肾炎、新月体性肾小球肾炎、狼疮性肾炎、高血压肾病或糖尿病肾病)、非酒精性脂肪肝炎(NASH)、肝硬化、肝纤维化、原发性硬化性胆管炎、原发性胆汁性肝硬化、纤维肌痛、牙龈纤维化、放射诱导的纤维化、嗜酸性食管炎、关节纤维化和心房纤维化、心内膜纤维化、实质纤

维化、纤维组织细胞瘤和胶质瘢痕。

[0105] 在一些实施方案中,本文公开的抗体及其片段可以通过选自以下的至少一种途径施用于受试者:肠胃外、皮下、肌内、静脉内、关节内、支气管内、腹腔内、囊内、软骨内、腔内、细胞内、小脑内、脑室内、结肠内、宫颈内、胃内、肝内、心肌内、骨内、骨盆内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊柱内、滑膜内、胸内、鼓室内、子宫内、膀胱内、玻璃体内、弹丸注射、结膜下、口服、阴道、直肠、颊、舌下、鼻内、瘤内和经皮。

[0106] 在实施方案中,本文公开的抗体及其片段可以与一种或多种另外的疗法组合施用于有需要的受试者。一种或多种另外的疗法可以是例如外科手术程序的程序,或可以是例如设计用于减轻或减少与纤维化和/或炎症相关的疾病或病症的症状的药剂的治疗剂。

[0107] 通过参考以下实施例进一步说明本发明。然而,应注意,与上述实施方案一样,这些实施例是说明性的,并且不应被解释为以任何方式限制本发明的范围。

[0108] 实施例

[0109] 出于说明本公开的各种实施方案的目的给出以下实施例,并且不意在以任何方式限制本公开。本领域的技术人员将认识到在由权利要求书的范围所定义的本公开的精神内所涵盖的变化及其他用途。

[0110] 组织损伤/疾病过程的概述总结于图1中。疾病过程引发炎症。c-Kit+免疫细胞产生使成纤维细胞转化成在其表面上表达SCF248的活化的肌成纤维细胞的细胞因子。SCF248在肌成纤维细胞及其他细胞表面上的表达活化更多的免疫细胞,导致IL-4、IL-9、IL-13、IL-25、TGF β 及其他细胞因子的细胞因子释放,从而维持炎症。肌成纤维细胞分泌细胞外基质蛋白质、胶原和纤连蛋白,导致纤维化和重塑疾病,例如肺纤维化、皮肤纤维化、严重哮喘及其他疾病。

[0111] 靶向SCF248的本发明抗体(所述抗体在本文中称为OpSCF和/或称为5H10)的示例性机制总结于图2中。

[0112] 如上所提供,SCF具有由可变剪接产生的两种同工型:SCF248和SCF220。SCF248和SCF220的区别在于外显子6。SCF220与稳态功能相关,SCF248与炎症和纤维化相关。SCF248在炎症期间活化免疫细胞,并且有时称为“可溶性SCF”。SCF248在各种细胞类型上表达,包括肌成纤维细胞、活化的上皮细胞、内皮细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞和单核细胞(图3)。SCF248同种型引起单体裂解的细胞外结构域(称为SCF165)的裂解。外显子6的氨基酸序列在本文中提供为SEQ ID NO:34。

[0113] 实施例1:利用杂交瘤技术抗SCF mAb的产生

[0114] 包含ASSLRNDSSSSNRKAKNPPGD(SEQ ID NO:30)的肽用于产生结合SCF248的抗体。免疫肽包含外显子6的一部分,即干细胞因子的SCF248同种型。特别地,免疫肽包含在如本文所定义的裂解位点之后开始的外显子6的一部分。用根据SEQ ID NO:30的肽以标准方案免疫小鼠。高滴度血清抗体的测定指示制备了适当的免疫和融合杂交瘤。分析来自单个克隆的培养物上清液的SCF特异性抗体,并且基于特异性进行选择。繁殖产生针对肽的特异性单克隆抗体的杂交瘤,随后在生物学相关培养物中测试具有最高滴度的单克隆。抗体5H10对SCF248具有高特异性,并且与SCF220无交叉反应性。杂交瘤产生的其他单克隆抗体对SCF248没有高特异性,与SCF220没有交叉反应性。因此,选择5H10以进行进一步表征、开发和嵌合化以及随后的人源化。

[0115] 实施例2. 5H10与SCF248完整胞外结构域的结合

[0116] 将如实施例1中所述获得的鼠5H10抗体直接与荧光标记缀合,并将标记的抗体与表达SCF248的S1/S14 hSCF248细胞、表达SCF220的S1/S14 hSCF220细胞或不表达SCF的对照细胞一起温育。通过流式细胞术评估标记抗体与细胞的结合。5H10对SCF248的特异性和与SCF220缺乏交叉反应性如图4A中所示。

[0117] 通过ELISA方法评估鼠5H10抗体与仅含有SCF的氨基酸1-165的裂解的细胞外结构域(ECD)相比于含有SCF的氨基酸1-194的完整ECD的结合。抗体抗体与完整的SCF ECD结合,但不与裂解的SCF ECD结合(图4B),从而表明抗体对完整的细胞外结构域具有特异性,并且不与在血液中循环的单体裂解的ECD结合。

[0118] 为了评估2G8和5H10抗体内化肌成纤维细胞上的SCF248的能力,用pHrodo红标记抗体,pHrodo红在中性pH下是无色的,并且在内体内在低pH下发红色荧光。将标记的抗体与培养的人IPF肌成纤维细胞一起温育45分钟,并且通过显微镜观察红色荧光。如图5中所示,染料标记的抗体而不是对照IgG被快速内化。与2G8相比,5H10更快速内化并产生更高的荧光。

[0119] SCF通过两种截然不同的途径触发c-kit进行信号传导:MEK/ERK途径和P13K/AKT途径。进行研究以确定鼠5H10抗体是否抑制c-kit阳性细胞中这些途径中的一个或两个中的细胞内信号传导。在5H10或IgG对照的存在下,将嗜酸性粒细胞与表达SCF248的细胞系一起温育,并且用BioRad Bio-Plex测定系统测量磷酸蛋白表达。5H10显著降低磷酸-MEK和磷酸-AKT水平,从而指示抗体显著降低c-kit介导的细胞内信号传导(图6)。

[0120] 总之,这些研究的结果指示抗体5H10特异性结合并内化SCF248,并且不与SCF220同种型或裂解的ECD交叉反应。此外,5H10显著抑制维持炎症的c-kit阳性细胞中的细胞内信号传导途径。

[0121] 实施例3.鼠抗体5H10的人源化

[0122] 通过将重链和轻链的可变结构域亚克隆到具有人IgG4主链的载体中产生衍生自5H10的嵌合抗体。使用标准方案表达和纯化嵌合抗体。2G8是以前开发的结合SCF248和SCF220的抗体,并且含有λ轻链。2G8的嵌合重链和轻链分别命名为VH0和VL0。本文提供的SCF248特异性抗体5H10含有κ轻链。5H10的嵌合重链和轻链分别命名为VH0和VK0。

[0123] 嵌合抗体是人源化的。人源化重链保留了相同的互补决定区(CDR),但是产生了更多的“人样”框架区,并且产生了2G8和5H10可变重链各自的几种人源化变体,在本文中称为VH1、VH2、VH3、VH4和VH5。还产生了5H10的人源化κ轻链变体,本文称为VK1、VK2、VK3和VK4。2G8的人源化λ轻链命名为VL1、VL2、VL3和VL4。测试的嵌合和人源化轻链和重链的2G8和5H10组合分别示于表2和表3中。如表2所示,5H10抗体变体的某些重链和轻链组合引起与hSCF248的高结合。用于测定结合评分的结合数据提供于以下实施例5中。

[0124] 表2. 2G8嵌合和人源化克隆与S1/S14 hSCF248细胞的结合评分

[0125]

2G8 mAb	结合评分
VH0/VL0	高
VH1/VL1	中度高
VH1/VL3	中度
VH1/VL4	中度

VH2/VL1	中度
VH2/VL4	中度
VH3/VL1	中度
VH3/VL4	中度
VH4/VL1	中度
VH4/VL2	中度
VH5/VL1	中度高
VH5/VL4	中度

[0126] 表3.5H10嵌合和人源化克隆与S1/S14 hSCF248细胞的结合评分

5H10 mAb	结合评分
VH0/VK0	高
VH1/VK1	高
VH1/VK2	高
VH1/VK3	高
VH1/VK4	无结合
VH2/VK2	中度高
VH2/VK3	高
VH3/VK2	中度
VH3/VK3	中度
VH4/VK2	中度低
VH4/VK3	中度低
VH5/VK2	低
VH5/VK3	低

[0128] 还使用BiaCore分析来评估结合亲和力。BiaCore数据显示具有VK1、VK2或VK3轻链的所有人源化5H10抗体对固定化的SCF248肽抗原的亲和力与使用此测定的亲本鼠5H10的结合亲和力非常相似。具有VK4轻链的人源化5H10抗体不结合肽。

[0129] 表4.Biacore数据

	VK0	VK1	VK2	VK3	VK4
VH0	1.00	0.91			
VH1	0.92	0.99	0.97	0.94	-
VH2		0.98	0.99	0.94	-
VH3		1.15	1.16	1.10	-
VH3		1.27	1.32	0.85	-
VH5		1.07	0.93	1.09	-

[0131] 实施例4.通过流式细胞术进行抗SCF嵌合抗体结合的评估

[0132] S1/S14 hSCF248细胞(表达SCF248的转染细胞系)用于测试嵌合抗体2G8和5H10的结合。抗SCF抗体用作SCF结合的阳性对照。人IgG4抗体用作阴性同种型对照抗体。将早期传代(P3)的S1/S14hSCF248细胞与后期传代(P5)的细胞进行比较。如所预期,阴性对照(人IgG4抗体)不结合任何细胞群。5H10在早期传代时结合细胞(图7A),但在后期传代时未检测

到(图7B),这是由于多次传代后SCF248的表达丧失。类似地,与P3相比,用10 μ g/mL的2G8检测到的最大平均荧光强度(MFI)在P5降低约四倍。

[0133] 用潮霉素B处理的细胞观察到类似的观察结果。潮霉素选择用于富集表达相关人SCF序列的S1/S14细胞部分。通过流式细胞术评估两种嵌合抗SCF mAb 2G8和5H10与人源化抗SCF抗体的结合。分别为SCF248+和SCF220+的S1/S14 hSCF248细胞和S1/S14 hSCF220细胞用于测试嵌合抗体2G8和5H10的结合和特异性。抗SCF抗体用作SCF结合的阳性对照。人IgG4抗体用作阴性同种型对照抗体。将潮霉素B处理的细胞与早期传代(P3)细胞进行比较。最大平均荧光强度(MFI)和抗体剂量反应曲线与早期传代(P3)细胞相似(图8A、图8B)。

[0134] 实施例5.通过流式细胞术进行2G8和5H10人源化mAb的结合评估

[0135] 分别为SCF248+和SCF220+的S1/S14 hSCF248细胞和S1/S14hSCF220细胞用于测试嵌合抗体2G8和5H10及其人源化变体的结合和特异性。在两组实验中,人IgG4抗体用作阴性同种型对照抗体。同种型对照不结合S1/S14 hSCF248细胞或S1/S14 hSCF220细胞(图9A、9B、10A和10B)。发现市售的抗SCF抗体(Abcam,目录号EP665Y/ab52603)结合S1/S14 hSCF220细胞结合并微弱地结合S1/S14hSCF248细胞(仅1:25稀释)(图9A、9B、10A和10B)。2G8 VH0/VL0(嵌合2G8)表现出比其人源化克隆更强的结合。然而,2G8 VH0/VL0也显示以3.3 μ g/mL和10 μ g/mL的抗体浓度结合S1/S14 hSCF220细胞(图9A、图9B)。与人源化克隆5H10 VH3/VK2、5H10 VH3/VK3、5H10 VH4/VK2、5H10 VH4/VK3、5H10 VH5/VK2和5H10 VH5/VK3相比,5H10 VH0/VK0显示出更高的结合(图10A)。没有观察到5H10或其任何人源化变体与S1/S14 hSCF220细胞的结合(图10B)。表5显示了本研究中所示5H10人源化变体在50%最大结合(BC_{50})方面的差异。5H10克隆的结合在S1/S14 hSCF248细胞上达到3.3 μ g/mL的饱和度。(图10A)。

[0136] 表5.嵌合和人源化5H10变体、同种型对照和市售的抗SCF抗体与S1/S14 hSCF248细胞结合的 BC_{50} (μ g/mL)值

样品ID	BC_{50} (μ g/mL)
5H10 VH0/VK0	5.47
5H10 VH3/VK2	1.36
5H10 VH3/VK3	0.90
5H10 VH4/VK2	1.91
5H10 VH4/VK3	1.18
5H10 VH5/VK2	2.12
5H10 VH5/VK3	0.67
同种型对照	n/a
抗SCF Abcam	3.02

[0138] S1/S14 hSCF248细胞用于测试5H10和2G8的其他人源化变体的结合。2G8 VH0/VL0(嵌合)显示比人源化变体更强的细胞结合(图11A)。人源化5H10克隆5H10 VH1/VK1、5H10 VH1/VK2、5H10VH1/VK3、5H10 VH2/VK2、5H10 VH2/VK3的结合谱与5H10VH0/VK0相当(图11B)。与上面给出的Biacore数据一致,人源化变体5H10 VH1/VK4丧失了靶结合(图11B)。同种型对照不结合S1/S14hSCF248细胞。基于这些研究中提供的数据,将人源化2G8和5H10mAb赋予与S1/S14 hSCF248细胞的结合分数,其在上表2和3中给出。

[0139] 在单独的实验中,通过流式细胞术评估5H10克隆VH1/VK3、VH2/VK3、VH3/VK3、VH4/VK3和VH5/VK3与表达SCF248的细胞系的结合。如图11C和11D所示,VH1/VK3和VH2/VK3表现出高结合,在1 μ g/mL下最大化。阴性对照仅是二级抗体。对照表达SCF220的细胞系没有观察到结合(未显示)。

[0140] 实施例6.SCF与c-kit的相互作用的体外阻断

[0141] 在体外测试人源化5H10抗体抑制SCF-c-kit相互作用和炎症前馈环的能力。将表达表面SCF248的培养的人IPF肌成纤维细胞(Mfb)用LAD2肥大细胞(SCF应答细胞系)覆盖。在没有任何其他干预的情况下,Mfb刺激LAD2细胞,其产生细胞因子以刺激Mfb产生另外的细胞因子和细胞外基质蛋白。在此测定中,炎症和前馈环的读数是CCL11、胶原1和3和纤连蛋白的mRNA。

[0142] 将鼠5H10和人源化(VH1/VK3、VH2/VK3、VH3/VK3、VH4/VK3和VH5/VK3)5H10抗体与Mfb以1 μ g/mL和10 μ g/mL的浓度预温育以评估其抑制前馈环的能力。结果如图12A-12D中所示。即使在较低浓度下,人源化VH1/VK3抗体一致地显示对SCF-c-kit相互作用的抑制。

[0143] 为了评估人源化抗体(5H10 VH1/VK3和VH2/VK3)内化肌成纤维细胞上的SCF248的能力,用pHrodo红标记抗体,pHrodo红在中性pH下是无色的,并且在体内在低pH下发红色荧光。将标记的抗体与培养的人IPF肌成纤维细胞一起温育45分钟,并且通过显微镜观察红色荧光。如图13中所示,与鼠亲本5H10抗体和嵌合抗体(VH0/VK0)一样,人源化抗体被快速内化。

[0144] 实施例7.嵌合抗体5H10和人源化前导候选物的免疫原性

[0145] 将五种人源化抗体5H10 VH1/VK3、5H10 VH2/VK3、5H10VH3/VK3、5H10 VH4/VK3和5H10 VH5/VK3的免疫原性潜力与嵌合抗体5H10 VH0/VK0进行比较。

[0146] 对于EpiScreenTM时间过程测定中使用的五个供体,进行样品对PBMC生存力的任何细胞毒性作用的初始评估。将CD8⁺T细胞耗尽的PBMC与样品一起温育,并且在第7天使用Luna-FLTM自动细胞计数器测定细胞的存活力。结果显示用抗SCF mAb处理的来自五个供体的PBMC的平均存活率与用单独培养基处理的细胞相似,范围介于83%与90%(图14)。KLH(Pierce,Life Technologies,UK)用作新抗原。艾塞那肽(Bydureon,AstraZeneca,UK)用作临床基准对照。图15A-H和表6显示了由样品和对照诱导的CD4⁺T细胞反应的EpiScreenTM时间过程T细胞增殖测定获得的结果。临床基准艾塞那肽和新抗原KLH都引发阳性增殖反应。5H10 VH1/VK3、5H10VH2/VK3和5H10 VH3/VK3诱导了低频率的阳性反应($SI \geq 1.90$, $p < 0.05$),范围介于4%至8%。样品5H10 VH5/VK3在17%的供体队列中诱导更高的阳性反应。5H10 VH0/VK0和5H10 VH4/VK3不诱导任何阳性反应。所有样品的阳性T细胞增殖反应的平均量值在2.14与3.61之间(表7)。

[0147] 使用整个增殖数据集的方差分析(ANOVA)(使用第5-8天之间的增殖的最大量值)来确定与彼此和临床基准艾塞那肽相比对测试条件的CD4⁺T细胞反应的最大量值中是否存在任何统计学显著的差异(图16)。对艾塞那肽的T细胞增殖反应的最大量值在统计学上高于对所有样品的反应(表8)。

[0148] 表6.健康供体T细胞增殖反应的总结。在整个时间过程第5-8天(“P”)期间对增殖的阳性T细胞反应($SI \geq 1.90$, $p < 0.05$)。阳性反应的频率在列的底部显示为百分比。

[0149]

	5H10 VH0/VK0	5H10 VH1/VK3	5H10 VH2/VK3	5H10 VH3/VK3	5H10 VH4/VK3	5H10 VH5/VK3	艾塞那肽	KLH
供体 1							P	P
供体 2							P	P
供体 3							P	P
供体 4				P		P	P	P
供体 5								P
供体 6							P	P
供体 7								P
供体 8							P	P
供体 9							P	P
供体 10							P	P
供体 11								P
供体 12							P	P
供体 13		P					P	P
供体 14						P	P	P
供体 15						P	P	P
供体 16							P	P
供体 17			P				P	P
供体 18			P				P	P
供体 19							P	P
供体 20								P
供体 21								P
供体 22						P		P
供体 23								P
供体 24								P
增殖%	0	4	8	4	0	17	67	100

[0150] 表7. 阳性 ($SI \geq 1.90$, 显著 $p < 0.05$) T细胞增殖反应的量值 ($\pm SD$) 的总结。根据在整个时间过程 (第5-8天) 期间观察到的所有阳性供体反应的平均值计算平均SI。N/A指示不适用。

[0151]

样品	平均 SI	SD	响应%
VH0/VK0	N/A	N/A	0
VH1/VK3	2.88	± 0.13	4
VH2/VK3	3.61	± 1.36	8

[0152]

VH3/VK3	3.09	± 0.88	4
VH4/VK3	N/A	N/A	0
VH5/VK3	2.14	± 0.43	17
艾塞那肽	2.99	± 0.92	67
KLH	14.95	± 11.22	100

[0153] 表8.使用邓恩后测试对比较(Dunn's post-test pairs comparison)重复测量单向ANOVA(弗里德曼测试(Friedman test))。分析来自所有供体的所有时间点的增殖数据的最大SI。 $^{***}p<0.01$, $^{****}p<0.0001$,并且ns=不显著。

	<u>5H10</u> <u>VH0/VK</u> <u>0</u>	<u>5H10</u> <u>VH1/VK</u> <u>3</u>	<u>5H10</u> <u>VH2/VK</u> <u>3</u>	<u>5H10</u> <u>VH3/VK</u> <u>3</u>	<u>5H10</u> <u>VH4/VK</u> <u>3</u>	<u>5H10</u> <u>VH5/VK</u> <u>3</u>
[0154]	5H10 VH1/VK 3	ns				
	5H10 VH2/VK 3	ns	ns			
	5H10 VH3/VK 3	ns	ns	ns		
	5H10 VH4/VK 3	ns	ns	ns	ns	
	5H10 VH5/VK 3	ns	ns	ns	ns	
	艾塞那肽	****	****	****	****	**

[0155] 总之,通过使用从代表欧洲和北美人群(基于HLA同种异型)的24个健康供体分离的外周血单核细胞(PBMC)在EpiScreenTM时间过程T细胞测定中测量离体T细胞反应来确定临床免疫原性的风险。使用增殖测定($[^3\text{H}]$ -胸苷摄取)测量T细胞反应。结果显示四种先导人源化抗体具有低的临床免疫原性潜力。

[0156] 实施例8.鼠5H10在肺炎症和纤维化的博来霉素模型中的评估

[0157] 肺纤维化的博来霉素动物模型用于评估5H10的体内作用。博来霉素是引起人和动物的肺纤维化的化疗剂。在第1天对C57BL6小鼠气管内施用博来霉素,并且在第8天和第12天腹膜内接受20mg/kg的5H10或同种型匹配的对照抗体。在第17天收集样品。5H10处理的动物在肺组织学方面具有显著改善(图17),肺羟脯氨酸减少(纤维化的定量测量,图18),体重随时间保持(图19),炎性细胞因子和肌成纤维细胞活化标记的mRNA减少(图20),以及肺肥大细胞、嗜酸性粒细胞和ILC2淋巴细胞减少(图21)。肺功能测试也得到显著改善(图22)。因此,这个研究证明5H10在肺纤维化的体内模型中有效减少纤维化和炎症,并且改善肺功能。

[0158] 实施例9.人源化5H10抗体在慢性过敏性哮喘模型中的评估

[0159] 在慢性过敏性哮喘的体内模型中测试人源化5H10抗体。使小鼠腹膜内和皮下对蟑螂抗原(CRA)致敏,然后在第14天、第18天、第22天和第26天进行鼻内加强免疫。在第26天、第29天、第32天和第34天,以20mg/kg腹膜内施用指定的人源化5H10抗体或PBS对照或对照不相关抗体。在第30天和第34天,其还气管内接受CRA。在第35天收集试样。研究设计的示意图提供于图23中。

[0160] 与PBS对照以及其他人源化变体抗体相比,用抗体5H10VH1/VK3处理的动物的气道阻力显著较小(图24A)。此外,在用VH1/VK3或VH2/VK3处理的动物中,与慢性哮喘对照相比(即,与施用CRA而未进行任何抗体处理的动物(PBS对照)相比),肺IL-13mRNA显著减少(图

24B)。此外,在接受VH1/VK3抗体处理的动物中,基质基因表达显著降低(胶原1mRNA显示于图24C中;胶原3mRNA显示于图24D中。SCF248 mRNA表达在用VH1/VK3处理的动物中也显著降低(图24E)。图25A、25B和25C显示VH1/VK3施用以1mg/kg和5mg/kg的浓度降低了粘液蛋白Gob5和细胞因子IL-13和IL-5的mRNA水平。因此,数据显示VH1/VK3抗体在慢性哮喘模型中体内阻断细胞因子和基质基因表达。

[0161] 实施例12. 评价抗SCF248抗体的安全性、药代动力学和药效学的1a期临床试验

[0162] 1a期研究将招募110名健康志愿者。主要目的是获得人源化抗SCF248抗体5H10的安全性评估并获得准确的药代动力学和药效学数据。

[0163] 将静脉内或皮下施用单次和多次递增剂量的人源化5H10或安慰剂。6名至8名受试者将组成一组。起始剂量将基于根据药物非临床研究质量管理规范进行的毒理学研究。将获得所有开发和产品生命周期的基线药代动力学。为了评估药效学,将评估循环c-kit+细胞的数目,包括肥大细胞祖细胞和2型先天淋巴样(ILC2)细胞,以及血清炎性标记,例如SCF165。

[0164] 实施例13. 评估抗SCF248抗体在患者中的安全性和疗效的临床研究

[0165] 临床研究将招募患有炎症性疾病,例如特应性皮炎、慢性荨麻疹、肺纤维化和/或其他疾病的患者。本研究的一个目的是在患病患者中建立人源化5H10抗体与药效学标记之间的剂量-反应关系,例如循环c-kit+细胞的数目,例如肥大细胞祖细胞和2型先天淋巴样细胞(ILC2)细胞。还将测量炎性生物标记物,例如ADAM8、CCL17、EPX、RNASE3、CCL2、CCL5、类胰蛋白酶、组胺和SCF165。

[0166] 将向每个受试者组给予单次递增剂量的5H10抗体。起始剂量将基于1a期药效学生物标记物。患者将接受一个月、两个月、三个月或更长时间的治疗。研究结果将显示人源化5H10抗体在稳定和/或治疗和/或预防炎症病症和纤维化疾病的进展中是有效的。

[0167] 本文引用的出版物、专利和专利申请的全部内容通过引用整体并入。虽然已参考其具体实施方案描述了本发明,但本领域技术人员应该理解可做出各种变化并且在不背离本发明的真实精神和范围的情况下可取代等效物。此外,可以进行许多修改以使得特定情况、材料、物质组成、方法、方法步骤或步骤适应本发明的客观精神和范围。所有此类修改都旨在处于所附权利要求书的范围内。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 奥普西迪奥有限责任公司(Opsidio, LLC)
- [0003] <120> 抗干细胞因子抗体及其使用方法
- [0004] <130> OPSL-001/01W0 336059-2005
- [0005] <150> US 62/900,927
- [0006] <151> 2019-09-16
- [0007] <160> 50
- [0008] <170> PatentIn version 3.5
- [0009] <210> 1
- [0010] <211> 5
- [0011] <212> PRT
- [0012] <213> 小家鼠 (Mus musculus)
- [0013] <400> 1
- [0014] Ser Tyr Trp Met Asn
- [0015] 1 5
- [0016] <210> 2
- [0017] <211> 17
- [0018] <212> PRT
- [0019] <213> 小家鼠 (Mus musculus)
- [0020] <400> 2
- [0021] Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr His Tyr Asn Gly Lys Phe Lys
- [0022] 1 5 10 15
- [0023] Gly
- [0024] <210> 3
- [0025] <211> 7
- [0026] <212> PRT
- [0027] <213> 小家鼠 (Mus musculus)
- [0028] <400> 3
- [0029] Ser Asn Trp Val Gly Ser Tyr
- [0030] 1 5
- [0031] <210> 4
- [0032] <211> 16
- [0033] <212> PRT
- [0034] <213> 小家鼠 (Mus musculus)
- [0035] <400> 4
- [0036] Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Glu Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
- [0037] 1 5 10 15
- [0038] <210> 5

[0039]	<211>	7
[0040]	<212>	PRT
[0041]	<213>	小家鼠 (Mus musculus)
[0042]	<400>	5
[0043]	Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser	
[0044]	1	5
[0045]	<210>	6
[0046]	<211>	9
[0047]	<212>	PRT
[0048]	<213>	小家鼠 (Mus musculus)
[0049]	<400>	6
[0050]	Trp Gln Gly Thr His Leu Pro Gln Thr	
[0051]	1	5
[0052]	<210>	7
[0053]	<211>	116
[0054]	<212>	PRT
[0055]	<213>	小家鼠 (Mus musculus)
[0056]	<400>	7
[0057]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser	
[0058]	1	5 10 15
[0059]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr	
[0060]		20 25 30
[0061]	Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
[0062]		35 40 45
[0063]	Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr His Tyr Asn Gly Lys Phe	
[0064]		50 55 60
[0065]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
[0066]		65 70 75 80
[0067]	Met Gln Leu Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys	
[0068]		85 90 95
[0069]	Ser Ser Ser Asn Trp Val Gly Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val	
[0070]		100 105 110
[0071]	Thr Val Ser Ala	
[0072]		115
[0073]	<210>	8
[0074]	<211>	116
[0075]	<212>	PRT
[0076]	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)
[0077]	<220>	

[0078]	<223>	人源化5H10重链可变区VH1
[0079]	<400>	8
[0080]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ser	
[0081]	1	5 10 15
[0082]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr	
[0083]	20	25 30
[0084]	Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
[0085]	35	40 45
[0086]	Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr His Tyr Asn Gly Lys Phe	
[0087]	50	55 60
[0088]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	
[0089]	65	70 75 80
[0090]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys	
[0091]	85	90 95
[0092]	Ser Ser Ser Asn Trp Val Gly Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val	
[0093]	100	105 110
[0094]	Thr Val Ser Ser	
[0095]	115	
[0096]	<210>	9
[0097]	<211>	116
[0098]	<212>	PRT
[0099]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0100]	<220>	
[0101]	<223>	人源化5H10重链可变区VH2
[0102]	<400>	9
[0103]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser	
[0104]	1	5 10 15
[0105]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr	
[0106]	20	25 30
[0107]	Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
[0108]	35	40 45
[0109]	Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr His Tyr Asn Gly Lys Phe	
[0110]	50	55 60
[0111]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	
[0112]	65	70 75 80
[0113]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys	
[0114]	85	90 95
[0115]	Ser Ser Ser Asn Trp Val Gly Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val	
[0116]	100	105 110

[0117]	Thr Val Ser Ser
[0118]	115
[0119]	<210> 10
[0120]	<211> 116
[0121]	<212> PRT
[0122]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0123]	<220>
[0124]	<223> 人源化5H10重链可变区VH3
[0125]	<400> 10
[0126]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[0127]	1 5 10 15
[0128]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr
[0129]	20 25 30
[0130]	Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[0131]	35 40 45
[0132]	Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr His Tyr Asn Gly Lys Phe
[0133]	50 55 60
[0134]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0135]	65 70 75 80
[0136]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
[0137]	85 90 95
[0138]	Ser Ser Ser Asn Trp Val Gly Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
[0139]	100 105 110
[0140]	Thr Val Ser Ser
[0141]	115
[0142]	<210> 11
[0143]	<211> 116
[0144]	<212> PRT
[0145]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0146]	<220>
[0147]	<223> 人源化5H10重链可变区VH4
[0148]	<400> 11
[0149]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[0150]	1 5 10 15
[0151]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr
[0152]	20 25 30
[0153]	Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[0154]	35 40 45
[0155]	Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr His Tyr Asn Gly Lys Phe

[0156]	50	55	60
[0157]	Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
[0158]	65	70	75
[0159]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys		
[0160]	85	90	95
[0161]	Ser Ser Ser Asn Trp Val Gly Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val		
[0162]	100	105	110
[0163]	Thr Val Ser Ser		
[0164]	115		
[0165]	<210> 12		
[0166]	<211> 116		
[0167]	<212> PRT		
[0168]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0169]	<220>		
[0170]	<223> 人源化5H10重链可变区VH5		
[0171]	<400> 12		
[0172]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser		
[0173]	1	5	10
[0174]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr		
[0175]	20	25	30
[0176]	Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
[0177]	35	40	45
[0178]	Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr His Tyr Asn Gly Lys Phe		
[0179]	50	55	60
[0180]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
[0181]	65	70	75
[0182]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0183]	85	90	95
[0184]	Ser Ser Ser Asn Trp Val Gly Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val		
[0185]	100	105	110
[0186]	Thr Val Ser Ser		
[0187]	115		
[0188]	<210> 13		
[0189]	<211> 112		
[0190]	<212> PRT		
[0191]	<213> 小家鼠(Mus musculus)		
[0192]	<400> 13		
[0193]	Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly		
[0194]	1	5	10

[0195]	Gln Thr Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Glu Ser
[0196]	20 25 30
[0197]	Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Ser Gln Arg Pro Gly Gln Ser
[0198]	35 40 45
[0199]	Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser Gly Val Pro
[0200]	50 55 60
[0201]	Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[0202]	65 70 75 80
[0203]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
[0204]	85 90 95
[0205]	Thr His Leu Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0206]	100 105 110
[0207]	<210> 14
[0208]	<211> 112
[0209]	<212> PRT
[0210]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0211]	<220>
[0212]	<223> 人源化5H10轻链可变区VK1
[0213]	<400> 14
[0214]	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Leu Gly
[0215]	1 5 10 15
[0216]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Glu Ser
[0217]	20 25 30
[0218]	Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
[0219]	35 40 45
[0220]	Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser Gly Val Pro
[0221]	50 55 60
[0222]	Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[0223]	65 70 75 80
[0224]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
[0225]	85 90 95
[0226]	Thr His Leu Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0227]	100 105 110
[0228]	<210> 15
[0229]	<211> 112
[0230]	<212> PRT
[0231]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0232]	<220>
[0233]	<223> 人源化5H10轻链可变区VK2

[0234]	<400>	15
[0235]	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly	
[0236]	1 5 10 15	
[0237]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Glu Ser	
[0238]	20 25 30	
[0239]	Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser	
[0240]	35 40 45	
[0241]	Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser Gly Val Pro	
[0242]	50 55 60	
[0243]	Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile	
[0244]	65 70 75 80	
[0245]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly	
[0246]	85 90 95	
[0247]	Thr His Leu Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
[0248]	100 105 110	
[0249]	<210>	16
[0250]	<211>	112
[0251]	<212>	PRT
[0252]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0253]	<220>	
[0254]	<223>	人源化5H10轻链可变区VK3
[0255]	<400>	16
[0256]	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly	
[0257]	1 5 10 15	
[0258]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Glu Ser	
[0259]	20 25 30	
[0260]	Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser	
[0261]	35 40 45	
[0262]	Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser Gly Val Pro	
[0263]	50 55 60	
[0264]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile	
[0265]	65 70 75 80	
[0266]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly	
[0267]	85 90 95	
[0268]	Thr His Leu Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
[0269]	100 105 110	
[0270]	<210>	17
[0271]	<211>	112
[0272]	<212>	PRT

[0273]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
[0274]	<220>			
[0275]	<223>	人源化5H10轻链可变区VK4		
[0276]	<400>	17		
[0277]	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly			
[0278]	1	5	10	15
[0279]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Glu Ser			
[0280]	20	25	30	
[0281]	Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser			
[0282]	35	40	45	
[0283]	Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser Gly Val Pro			
[0284]	50	55	60	
[0285]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
[0286]	65	70	75	80
[0287]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly			
[0288]	85	90	95	
[0289]	Thr His Leu Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
[0290]	100	105	110	
[0291]	<210>	18		
[0292]	<211>	348		
[0293]	<212>	DNA		
[0294]	<213>	小家鼠(Mus musculus)		
[0295]	<400>	18		
[0296]	caggttcagc tgcagcagtc tggggctgag ctcgtgaggc ctgggtcctc agtgaagatt	60		
[0297]	tcctgcaagt cttctggcta tgcattcagt agctactgga tgaactgggt gaagcagagg	120		
[0298]	cctggacagg gtcttgagtg gattggacag atttatcctg gagatggtga tactcactac	180		
[0299]	aatggaaagt tcaagggcaa agccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac	240		
[0300]	atgcagctca gcaggctaac atctgaggac tctgcggtct atttctgttc aagttcaaac	300		
[0301]	tgggtcgga gttactgggg ccaagggact ctggtcaccg tctcctca	348		
[0302]	<210>	19		
[0303]	<211>	348		
[0304]	<212>	DNA		
[0305]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
[0306]	<220>			
[0307]	<223>	人源化重链可变区VH1		
[0308]	<400>	19		
[0309]	caggtccagc tgggtgcaatc tggggctgag ctgaagaagc ctgggtcctc ggtgaagatt	60		
[0310]	tcctgcaagt cttctggata tgcattcagc agctattgga tgaactgggt gaagcagagg	120		
[0311]	cctggacaag ggcttgagtg gattggacag atctatcctg gagatggtga tactcactac	180		

[0312]	aatggaaagt tcaagggcaa agccacgctg accgcggaca aatccacgag cacagcctac	240
[0313]	atggagctga gcagcctgac atctgaggac tctgccgtgt atttctgttc aagttcaaac	300
[0314]	tgggtcggga gttactgggg ccaaggaacc ctggtcaccg tctcctca	348
[0315]	<210>	20
[0316]	<211>	348
[0317]	<212>	DNA
[0318]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0319]	<220>	
[0320]	<223>	人源化重链可变区VH2
[0321]	<400>	20
[0322]	caggtccagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaagatt	60
[0323]	tcctgcaagt cttctggata tgcattcagc agctattgga tgaactgggt gaagcagagg	120
[0324]	cctggacaag ggcttgagtg gattggacag atctatcctg gagatgggtga tactcactac	180
[0325]	aatggaaagt tcaagggcaa agccacgctg accgcggaca aatccacgag cacagcctac	240
[0326]	atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt atttctgttc aagttcaaac	300
[0327]	tgggtcggga gttactgggg ccaaggaacc ctggtcaccg tctcctca	348
[0328]	<210>	21
[0329]	<211>	348
[0330]	<212>	DNA
[0331]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0332]	<220>	
[0333]	<223>	人源化重链可变区VH3
[0334]	<400>	21
[0335]	caggtccagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaagggt	60
[0336]	tcctgcaagt cttctggata tgcattcagc agctattgga tgaactgggt gcgacagagg	120
[0337]	cctggacaag ggcttgagtg gattggacag atctatcctg gagatgggtga tactcactac	180
[0338]	aatggaaagt tcaagggcaa agccacgctg accgcggaca aatccacgag cacagcctac	240
[0339]	atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt atttctgttc aagttcaaac	300
[0340]	tgggtcggga gttactgggg ccaaggaacc ctggtcaccg tctcctca	348
[0341]	<210>	22
[0342]	<211>	348
[0343]	<212>	DNA
[0344]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0345]	<220>	
[0346]	<223>	人源化重链可变区VH4
[0347]	<400>	22
[0348]	caggtccagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaagggt	60
[0349]	tcctgcaagt cttctggata tgcattcagc agctattgga tgaactgggt gcgacagagg	120
[0350]	cctggacaag ggcttgagtg gattggacag atctatcctg gagatgggtga tactcactac	180

[0351]	aatggaaagt tcaagggcag agtcacgatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac	240
[0352]	atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt atttctgttc aagttcaaac	300
[0353]	tgggtcggga gttactgggg ccaaggaacc ctggtcaccg tctcctca	348
[0354]	<210>	23
[0355]	<211>	348
[0356]	<212>	DNA
[0357]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0358]	<220>	
[0359]	<223>	人源化重链可变区VH5
[0360]	<400>	23
[0361]	caggtccagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtt	60
[0362]	tcttgcaagt cttctggata tgcattcagc agctattgga tgaactgggt gcgacagagg	120
[0363]	cctggacaag ggcttgagtg gattggacag atctatcctg gagatgggtga tactcactac	180
[0364]	aatggaaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac	240
[0365]	atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgttc aagttcaaac	300
[0366]	tgggtcggga gttactgggg ccaaggaacc ctggtcaccg tctcctca	348
[0367]	<210>	24
[0368]	<211>	336
[0369]	<212>	DNA
[0370]	<213>	小家鼠(Mus musculus)
[0371]	<400>	24
[0372]	gatgttgtga tgaccagac tccactcact ttgtcgggtta ccattggaca aacagcctcc	60
[0373]	atctcttgca agtcaagtca gaggctctta gaaagtgatg gaaagacata tttgaattgg	120
[0374]	ttgtcacaga ggccaggcca gtctccaaag cgcctaattc atctgggtgtc tagactggac	180
[0375]	tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc	240
[0376]	agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tattattggt ggcaaggcac acatcttcct	300
[0377]	cagacgttcg gtggaggcac caagctggag atcaaa	336
[0378]	<210>	25
[0379]	<211>	336
[0380]	<212>	DNA
[0381]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0382]	<220>	
[0383]	<223>	人源化轻链可变区VK1
[0384]	<400>	25
[0385]	gatgttgtga tgactcagtc tccactcact ctgtcgggtca cccttggaca gccggcctcc	60
[0386]	atctcctgca agtctagtca aagcctctta gaaagtgatg gaaagacctt cttgaattgg	120
[0387]	ttgcagcaga ggccaggcca atctccaagg cgcctaattt atctgggtttc tagactggac	180
[0388]	tctggggtcc cagacagatt cactggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc	240
[0389]	agcagggtgg aggctgagga tgttgggggtt tattactgct ggcaaggcac acatcttcct	300

[0390]	cagactttcg gcgaggaggac caaggtggag atcaaa	336
[0391]	<210> 26	
[0392]	<211> 336	
[0393]	<212> DNA	
[0394]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0395]	<220>	
[0396]	<223> 人源化轻链可变区VK2	
[0397]	<400> 26	
[0398]	gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc	60
[0399]	atctcctgca agtctagtca aagcctctta gaaagtgatg gaaagacctt cttgaattgg	120
[0400]	ttgcagcaga ggccaggcca atctccaagg cgcctaattt atctggtttc tagactggac	180
[0401]	tctggggtcc cagacagatt cactggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc	240
[0402]	agcagggtgg aggctgagga tgttgggggtt tattactgct ggcaaggcac acatcttcct	300
[0403]	cagactttcg gcgaggaggac caaggtggag atcaaa	336
[0404]	<210> 27	
[0405]	<211> 336	
[0406]	<212> DNA	
[0407]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0408]	<220>	
[0409]	<223> 人源化轻链可变区VK3	
[0410]	<400> 27	
[0411]	gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc	60
[0412]	atctcctgca agtctagtca aagcctctta gaaagtgatg gaaagacctt cttgaattgg	120
[0413]	ttgcagcaga ggccaggcca atctccaagg cgcctaattt atctggtttc tagactggac	180
[0414]	tctggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc	240
[0415]	agcagggtgg aggctgagga tgttgggggtt tattactgct ggcaaggcac acatcttcct	300
[0416]	cagactttcg gcgaggaggac caaggtggag atcaaa	336
[0417]	<210> 28	
[0418]	<211> 336	
[0419]	<212> DNA	
[0420]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0421]	<220>	
[0422]	<223> 人源化轻链可变区VK4	
[0423]	<400> 28	
[0424]	gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc	60
[0425]	atctcctgca agtctagtca aagcctctta gaaagtgatg gaaagacctt cttgaattgg	120
[0426]	tttcagcaga ggccaggcca atctccaagg cgcctaattt atctggtttc tagactggac	180
[0427]	tctggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc	240
[0428]	agcagggtgg aggctgagga tgttgggggtt tattactgct ggcaaggcac acatcttcct	300

[0429]	cagactttcg gcggagggac caaggtggag atcaaa	336
[0430]	<210> 29	
[0431]	<211> 40	
[0432]	<212> PRT	
[0433]	<213> 智人(Homo sapiens)	
[0434]	<400> 29	
[0435]	Pro Glu Lys Asp Ser Arg Val Ser Val Thr Lys Pro Phe Met Leu Pro	
[0436]	1 5 10 15	
[0437]	Pro Val Ala Ala Ser Ser Leu Arg Asn Asp Ser Ser Ser Ser Asn Arg	
[0438]	20 25 30	
[0439]	Lys Ala Lys Asn Pro Pro Gly Asp	
[0440]	35 40	
[0441]	<210> 30	
[0442]	<211> 21	
[0443]	<212> PRT	
[0444]	<213> 智人(Homo sapiens)	
[0445]	<400> 30	
[0446]	Ala Ser Ser Leu Arg Asn Asp Ser Ser Ser Ser Asn Arg Lys Ala Lys	
[0447]	1 5 10 15	
[0448]	Asn Pro Pro Gly Asp	
[0449]	20	
[0450]	<210> 31	
[0451]	<211> 8	
[0452]	<212> PRT	
[0453]	<213> 智人(Homo sapiens)	
[0454]	<400> 31	
[0455]	Ser Ser Asn Arg Lys Ala Lys Asn	
[0456]	1 5	
[0457]	<210> 32	
[0458]	<211> 14	
[0459]	<212> PRT	
[0460]	<213> 智人(Homo sapiens)	
[0461]	<400> 32	
[0462]	Ser Ser Ser Ser Asn Arg Lys Ala Lys Asn Pro Pro Gly Asp	
[0463]	1 5 10	
[0464]	<210> 33	
[0465]	<211> 14	
[0466]	<212> PRT	
[0467]	<213> 智人(Homo sapiens)	

[0468]	<400>	33
[0469]	Ala Ser Ser Leu Arg Asn Asp Ser Ser Ser Ser Asn Arg Lys	
[0470]	1	5 10
[0471]	<210>	34
[0472]	<211>	29
[0473]	<212>	PRT
[0474]	<213>	智人(Homo sapiens)
[0475]	<400>	34
[0476]	Asp Ser Arg Val Ser Val Thr Lys Pro Phe Met Leu Pro Pro Val Ala	
[0477]	1	5 10 15
[0478]	Ala Ser Ser Leu Arg Asn Asp Ser Ser Ser Ser Asn Arg	
[0479]		20 25
[0480]	<210>	35
[0481]	<211>	7
[0482]	<212>	PRT
[0483]	<213>	智人(Homo sapiens)
[0484]	<400>	35
[0485]	Ser Asn Arg Lys Ala Lys Asn	
[0486]	1	5
[0487]	<210>	36
[0488]	<211>	13
[0489]	<212>	PRT
[0490]	<213>	智人(Homo sapiens)
[0491]	<400>	36
[0492]	Ala Ser Ser Leu Arg Asn Asp Ser Ser Ser Ser Asn Arg	
[0493]	1	5 10
[0494]	<210>	37
[0495]	<211>	17
[0496]	<212>	PRT
[0497]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0498]	<220>	
[0499]	<223>	VH5 CDR2
[0500]	<400>	37
[0501]	Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr His Tyr Asn Gly Lys Phe Gln	
[0502]	1	5 10 15
[0503]	Gly	
[0504]	<210>	38
[0505]	<211>	443
[0506]	<212>	PRT

[0507]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)																		
[0508]	<220>																		
[0509]	<223> VH0 IgG4重链																		
[0510]	<400> 38																		
[0511]	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Arg	Pro	Gly	Ser			
[0512]	1				5					10					15				
[0513]	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe	Ser	Ser	Tyr			
[0514]				20					25					30					
[0515]	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile			
[0516]			35					40					45						
[0517]	Gly	Gln	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	His	Tyr	Asn	Gly	Lys	Phe			
[0518]		50					55					60							
[0519]	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr			
[0520]	65					70					75					80			
[0521]	Met	Gln	Leu	Ser	Arg	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys			
[0522]					85					90					95				
[0523]	Ser	Ser	Ser	Asn	Trp	Val	Gly	Ser	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val			
[0524]				100					105					110					
[0525]	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala			
[0526]			115					120					125						
[0527]	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu			
[0528]		130						135					140						
[0529]	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly			
[0530]	145					150					155					160			
[0531]	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser			
[0532]					165					170					175				
[0533]	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu			
[0534]				180					185					190					
[0535]	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr			
[0536]			195					200					205						
[0537]	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro			
[0538]		210						215					220						
[0539]	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro			
[0540]	225					230					235					240			
[0541]	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr			
[0542]					245					250					255				
[0543]	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn			
[0544]					260					265					270				
[0545]	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg			

[0546]	275	280	285
[0547]	Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val		
[0548]	290	295	300
[0549]	Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser		
[0550]	305	310	315
[0551]	Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys		
[0552]	325	330	335
[0553]	Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu		
[0554]	340	345	350
[0555]	Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe		
[0556]	355	360	365
[0557]	Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu		
[0558]	370	375	380
[0559]	Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe		
[0560]	385	390	395
[0561]	Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly		
[0562]	405	410	415
[0563]	Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr		
[0564]	420	425	430
[0565]	Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
[0566]	435	440	
[0567]	<210> 39		
[0568]	<211> 219		
[0569]	<212> PRT		
[0570]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0571]	<220>		
[0572]	<223> VK0 κ轻链		
[0573]	<400> 39		
[0574]	Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly		
[0575]	1	5	10
[0576]	Gln Thr Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Glu Ser		
[0577]	20	25	30
[0578]	Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Ser Gln Arg Pro Gly Gln Ser		
[0579]	35	40	45
[0580]	Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser Gly Val Pro		
[0581]	50	55	60
[0582]	Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile		
[0583]	65	70	75
[0584]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly		

[0585]	85																90				95			
[0586]	Thr	His	Leu	Pro	Gln	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys								
[0587]	100								105				110											
[0588]	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu								
[0589]	115				120				125															
[0590]	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe								
[0591]	130				135				140															
[0592]	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln								
[0593]	145	150				155				160														
[0594]	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser								
[0595]	165				170				175															
[0596]	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu								
[0597]	180				185				190															
[0598]	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser								
[0599]	195				200				205															
[0600]	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys													
[0601]	210				215																			
[0602]	<210>	40																						
[0603]	<211>	327																						
[0604]	<212>	PRT																						
[0605]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)																						
[0606]	<220>																							
[0607]	<223>	重链恒定区																						
[0608]	<400>	40																						
[0609]	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg								
[0610]	1	5				10				15														
[0611]	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr								
[0612]	20				25				30															
[0613]	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser								
[0614]	35				40				45															
[0615]	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser								
[0616]	50				55				60															
[0617]	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr								
[0618]	65	70				75				80														
[0619]	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys								
[0620]	85				90				95															
[0621]	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro								
[0622]	100				105				110															
[0623]	Glu	Phe	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys								

[0624]	115	120	125
[0625]	Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val		
[0626]	130	135	140
[0627]	Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp		
[0628]	145	150	155
[0629]	Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe		
[0630]	165	170	175
[0631]	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp		
[0632]	180	185	190
[0633]	Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu		
[0634]	195	200	205
[0635]	Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg		
[0636]	210	215	220
[0637]	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys		
[0638]	225	230	235
[0639]	Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		
[0640]	245	250	255
[0641]	Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
[0642]	260	265	270
[0643]	Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		
[0644]	275	280	285
[0645]	Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser		
[0646]	290	295	300
[0647]	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
[0648]	305	310	315
[0649]	Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		320
[0650]	325		
[0651]	<210> 41		
[0652]	<211> 107		
[0653]	<212> PRT		
[0654]	<213> 智人 (Homo sapiens)		
[0655]	<400> 41		
[0656]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu		
[0657]	1	5	10
[0658]	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe		15
[0659]	20	25	30
[0660]	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln		
[0661]	35	40	45
[0662]	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser		

[0663]	50	55	60
[0664]	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu		
[0665]	65	70	75
[0666]	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser		80
[0667]	85	90	95
[0668]	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[0669]	100	105	
[0670]	<210> 42		
[0671]	<211> 443		
[0672]	<212> PRT		
[0673]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0674]	<220>		
[0675]	<223> 5H10 VH1 重链		
[0676]	<400> 42		
[0677]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ser		
[0678]	1	5	10
[0679]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr		15
[0680]	20	25	30
[0681]	Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
[0682]	35	40	45
[0683]	Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr His Tyr Asn Gly Lys Phe		
[0684]	50	55	60
[0685]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
[0686]	65	70	75
[0687]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys		80
[0688]	85	90	95
[0689]	Ser Ser Ser Asn Trp Val Gly Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val		
[0690]	100	105	110
[0691]	Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala		
[0692]	115	120	125
[0693]	Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu		
[0694]	130	135	140
[0695]	Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly		
[0696]	145	150	155
[0697]	Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser		160
[0698]	165	170	175
[0699]	Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu		
[0700]	180	185	190
[0701]	Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr		

[0702]	195	200	205
[0703]	Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro		
[0704]	210	215	220
[0705]	Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro		
[0706]	225	230	235
[0707]	Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr		
[0708]	245	250	255
[0709]	Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn		
[0710]	260	265	270
[0711]	Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg		
[0712]	275	280	285
[0713]	Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val		
[0714]	290	295	300
[0715]	Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser		
[0716]	305	310	315
[0717]	Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys		
[0718]	325	330	335
[0719]	Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu		
[0720]	340	345	350
[0721]	Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe		
[0722]	355	360	365
[0723]	Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu		
[0724]	370	375	380
[0725]	Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe		
[0726]	385	390	395
[0727]	Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly		
[0728]	405	410	415
[0729]	Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr		
[0730]	420	425	430
[0731]	Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
[0732]	435	440	
[0733]	<210> 43		
[0734]	<211> 443		
[0735]	<212> PRT		
[0736]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0737]	<220>		
[0738]	<223> 5H10 VH2重链		
[0739]	<400> 43		
[0740]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser		

[0741]	1	5	10	15
[0742]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr			
[0743]	20	25	30	
[0744]	Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
[0745]	35	40	45	
[0746]	Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr His Tyr Asn Gly Lys Phe			
[0747]	50	55	60	
[0748]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr			
[0749]	65	70	75	80
[0750]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys			
[0751]	85	90	95	
[0752]	Ser Ser Ser Asn Trp Val Gly Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val			
[0753]	100	105	110	
[0754]	Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala			
[0755]	115	120	125	
[0756]	Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu			
[0757]	130	135	140	
[0758]	Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly			
[0759]	145	150	155	160
[0760]	Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser			
[0761]	165	170	175	
[0762]	Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu			
[0763]	180	185	190	
[0764]	Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr			
[0765]	195	200	205	
[0766]	Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro			
[0767]	210	215	220	
[0768]	Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro			
[0769]	225	230	235	240
[0770]	Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr			
[0771]	245	250	255	
[0772]	Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn			
[0773]	260	265	270	
[0774]	Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg			
[0775]	275	280	285	
[0776]	Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val			
[0777]	290	295	300	
[0778]	Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser			
[0779]	305	310	315	320

[0780]	Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
[0781]	325 330 335
[0782]	Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
[0783]	340 345 350
[0784]	Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
[0785]	355 360 365
[0786]	Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
[0787]	370 375 380
[0788]	Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
[0789]	385 390 395 400
[0790]	Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
[0791]	405 410 415
[0792]	Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
[0793]	420 425 430
[0794]	Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
[0795]	435 440
[0796]	<210> 44
[0797]	<211> 443
[0798]	<212> PRT
[0799]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0800]	<220>
[0801]	<223> 5H10 VH3重链
[0802]	<400> 44
[0803]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[0804]	1 5 10 15
[0805]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr
[0806]	20 25 30
[0807]	Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[0808]	35 40 45
[0809]	Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr His Tyr Asn Gly Lys Phe
[0810]	50 55 60
[0811]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0812]	65 70 75 80
[0813]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
[0814]	85 90 95
[0815]	Ser Ser Ser Asn Trp Val Gly Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
[0816]	100 105 110
[0817]	Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
[0818]	115 120 125

[0819]	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu
[0820]	130						135				140					
[0821]	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly
[0822]	145					150				155					160	
[0823]	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser
[0824]					165					170					175	
[0825]	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu
[0826]				180						185				190		
[0827]	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr
[0828]			195					200					205			
[0829]	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro
[0830]	210						215					220				
[0831]	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro
[0832]	225					230					235				240	
[0833]	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr
[0834]					245					250					255	
[0835]	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn
[0836]				260					265					270		
[0837]	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg
[0838]			275						280					285		
[0839]	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val
[0840]	290						295					300				
[0841]	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser
[0842]	305					310					315				320	
[0843]	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys
[0844]				325						330					335	
[0845]	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu
[0846]				340					345					350		
[0847]	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe
[0848]			355						360				365			
[0849]	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu
[0850]	370						375					380				
[0851]	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe
[0852]	385					390					395				400	
[0853]	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly
[0854]				405						410					415	
[0855]	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr
[0856]				420						425				430		
[0857]	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys					

[0858]	435	440
[0859]	<210> 45	
[0860]	<211> 443	
[0861]	<212> PRT	
[0862]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0863]	<220>	
[0864]	<223> 5H10 VH4重链	
[0865]	<400> 45	
[0866]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser	
[0867]	1 5 10 15	
[0868]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr	
[0869]	20 25 30	
[0870]	Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
[0871]	35 40 45	
[0872]	Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr His Tyr Asn Gly Lys Phe	
[0873]	50 55 60	
[0874]	Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	
[0875]	65 70 75 80	
[0876]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys	
[0877]	85 90 95	
[0878]	Ser Ser Ser Asn Trp Val Gly Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val	
[0879]	100 105 110	
[0880]	Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala	
[0881]	115 120 125	
[0882]	Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu	
[0883]	130 135 140	
[0884]	Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly	
[0885]	145 150 155 160	
[0886]	Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser	
[0887]	165 170 175	
[0888]	Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu	
[0889]	180 185 190	
[0890]	Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr	
[0891]	195 200 205	
[0892]	Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro	
[0893]	210 215 220	
[0894]	Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro	
[0895]	225 230 235 240	
[0896]	Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr	

[0897]		245		250		255
[0898]	Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn					
[0899]		260		265		270
[0900]	Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg					
[0901]		275		280		285
[0902]	Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val					
[0903]		290		295		300
[0904]	Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser					
[0905]	305		310		315	320
[0906]	Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys					
[0907]		325		330		335
[0908]	Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu					
[0909]		340		345		350
[0910]	Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe					
[0911]		355		360		365
[0912]	Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu					
[0913]		370		375		380
[0914]	Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe					
[0915]	385		390		395	400
[0916]	Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly					
[0917]		405		410		415
[0918]	Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr					
[0919]		420		425		430
[0920]	Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys					
[0921]		435		440		
[0922]	<210> 46					
[0923]	<211> 443					
[0924]	<212> PRT					
[0925]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)					
[0926]	<220>					
[0927]	<223> 5H10 VH5重链					
[0928]	<400> 46					
[0929]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser					
[0930]	1	5		10		15
[0931]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr					
[0932]		20		25		30
[0933]	Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile					
[0934]		35		40		45
[0935]	Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr His Tyr Asn Gly Lys Phe					

[0936]	50	55	60
[0937]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
[0938]	65	70	75
[0939]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		80
[0940]		85	90
[0941]	Ser Ser Ser Asn Trp Val Gly Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val		95
[0942]		100	105
[0943]	Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala		110
[0944]		115	120
[0945]	Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu		125
[0946]		130	135
[0947]	Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly		140
[0948]		145	150
[0949]	Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser		155
[0950]		165	170
[0951]	Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu		175
[0952]		180	185
[0953]	Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr		190
[0954]		195	200
[0955]	Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro		205
[0956]		210	215
[0957]	Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro		220
[0958]		225	230
[0959]	Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr		235
[0960]		245	250
[0961]	Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn		255
[0962]		260	265
[0963]	Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg		270
[0964]		275	280
[0965]	Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val		285
[0966]		290	295
[0967]	Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser		300
[0968]		305	310
[0969]	Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys		315
[0970]		325	330
[0971]	Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu		335
[0972]		340	345
[0973]	Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe		350
[0974]		355	360
			365

[0975]	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu
[0976]		370					375				380					
[0977]	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe
[0978]	385					390				395						400
[0979]	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly
[0980]					405					410					415	
[0981]	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr
[0982]				420					425					430		
[0983]	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys					
[0984]			435						440							
[0985]	<210>	47														
[0986]	<211>	219														
[0987]	<212>	PRT														
[0988]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)														
[0989]	<220>															
[0990]	<223>	5H10 VK1轻链														
[0991]	<400>	47														
[0992]	Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Thr	Leu	Ser	Val	Thr	Leu	Gly
[0993]	1			5					10					15		
[0994]	Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Glu	Ser
[0995]				20					25					30		
[0996]	Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	Trp	Leu	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser
[0997]			35					40					45			
[0998]	Pro	Arg	Arg	Leu	Ile	Tyr	Leu	Val	Ser	Arg	Leu	Asp	Ser	Gly	Val	Pro
[0999]		50					55					60				
[1000]	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
[1001]	65					70					75					80
[1002]	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Trp	Gln	Gly
[1003]					85					90					95	
[1004]	Thr	His	Leu	Pro	Gln	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
[1005]				100					105					110		
[1006]	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu
[1007]			115						120					125		
[1008]	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe
[1009]		130						135						140		
[1010]	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln
[1011]	145					150					155					160
[1012]	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser
[1013]					165					170						175

[1014]	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
[1015]	180 185 190
[1016]	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
[1017]	195 200 205
[1018]	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[1019]	210 215
[1020]	<210> 48
[1021]	<211> 219
[1022]	<212> PRT
[1023]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1024]	<220>
[1025]	<223> 5H10 VK2轻链
[1026]	<400> 48
[1027]	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
[1028]	1 5 10 15
[1029]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Glu Ser
[1030]	20 25 30
[1031]	Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
[1032]	35 40 45
[1033]	Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser Gly Val Pro
[1034]	50 55 60
[1035]	Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[1036]	65 70 75 80
[1037]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
[1038]	85 90 95
[1039]	Thr His Leu Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[1040]	100 105 110
[1041]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
[1042]	115 120 125
[1043]	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
[1044]	130 135 140
[1045]	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
[1046]	145 150 155 160
[1047]	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
[1048]	165 170 175
[1049]	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
[1050]	180 185 190
[1051]	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
[1052]	195 200 205

[1053]	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[1054]	210 215
[1055]	<210> 49
[1056]	<211> 219
[1057]	<212> PRT
[1058]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1059]	<220>
[1060]	<223> 5H10 VK3轻链
[1061]	<400> 49
[1062]	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
[1063]	1 5 10 15
[1064]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Glu Ser
[1065]	20 25 30
[1066]	Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
[1067]	35 40 45
[1068]	Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser Gly Val Pro
[1069]	50 55 60
[1070]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[1071]	65 70 75 80
[1072]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
[1073]	85 90 95
[1074]	Thr His Leu Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[1075]	100 105 110
[1076]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
[1077]	115 120 125
[1078]	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
[1079]	130 135 140
[1080]	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
[1081]	145 150 155 160
[1082]	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
[1083]	165 170 175
[1084]	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
[1085]	180 185 190
[1086]	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
[1087]	195 200 205
[1088]	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[1089]	210 215
[1090]	<210> 50
[1091]	<211> 219

[1092]	<212>	PRT
[1093]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[1094]	<220>	
[1095]	<223>	5H10 VK4轻链
[1096]	<400>	50
[1097]	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly	
[1098]	1	5 10 15
[1099]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Glu Ser	
[1100]		20 25 30
[1101]	Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser	
[1102]		35 40 45
[1103]	Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser Gly Val Pro	
[1104]		50 55 60
[1105]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile	
[1106]	65	70 75 80
[1107]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly	
[1108]		85 90 95
[1109]	Thr His Leu Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
[1110]		100 105 110
[1111]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu	
[1112]		115 120 125
[1113]	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe	
[1114]		130 135 140
[1115]	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln	
[1116]	145	150 155 160
[1117]	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser	
[1118]		165 170 175
[1119]	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu	
[1120]		180 185 190
[1121]	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser	
[1122]		195 200 205
[1123]	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
[1124]		210 215

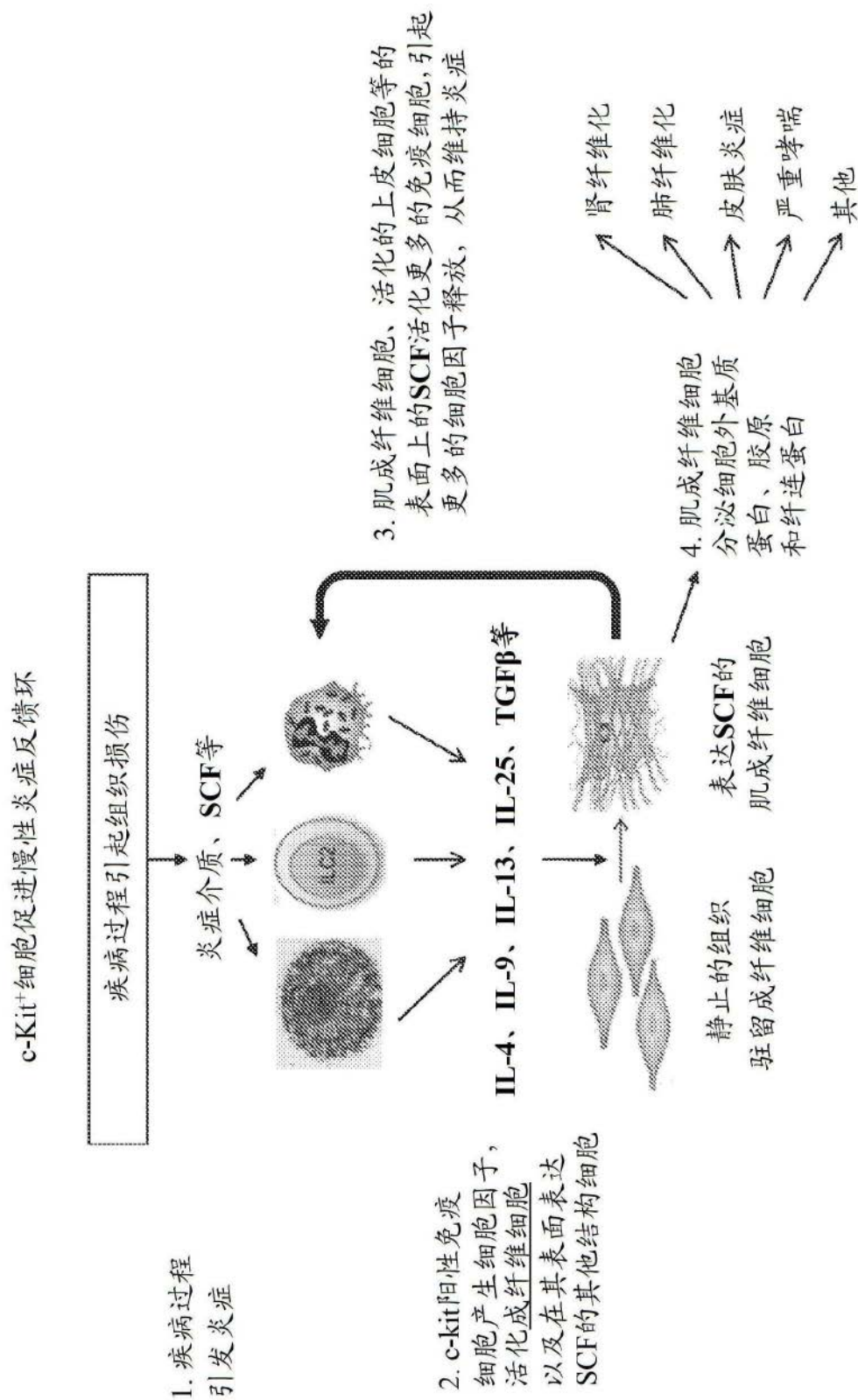


图1

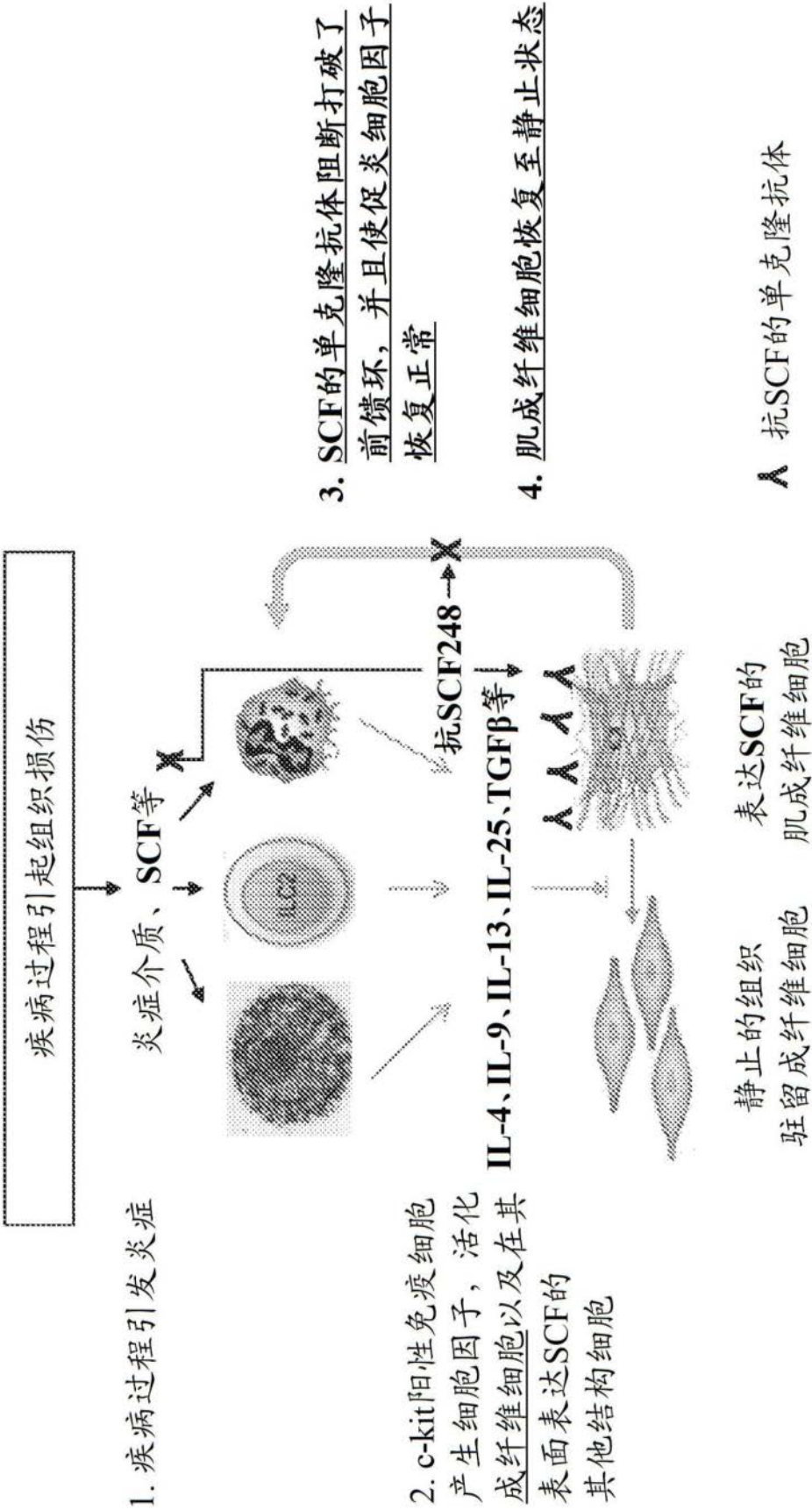


图2

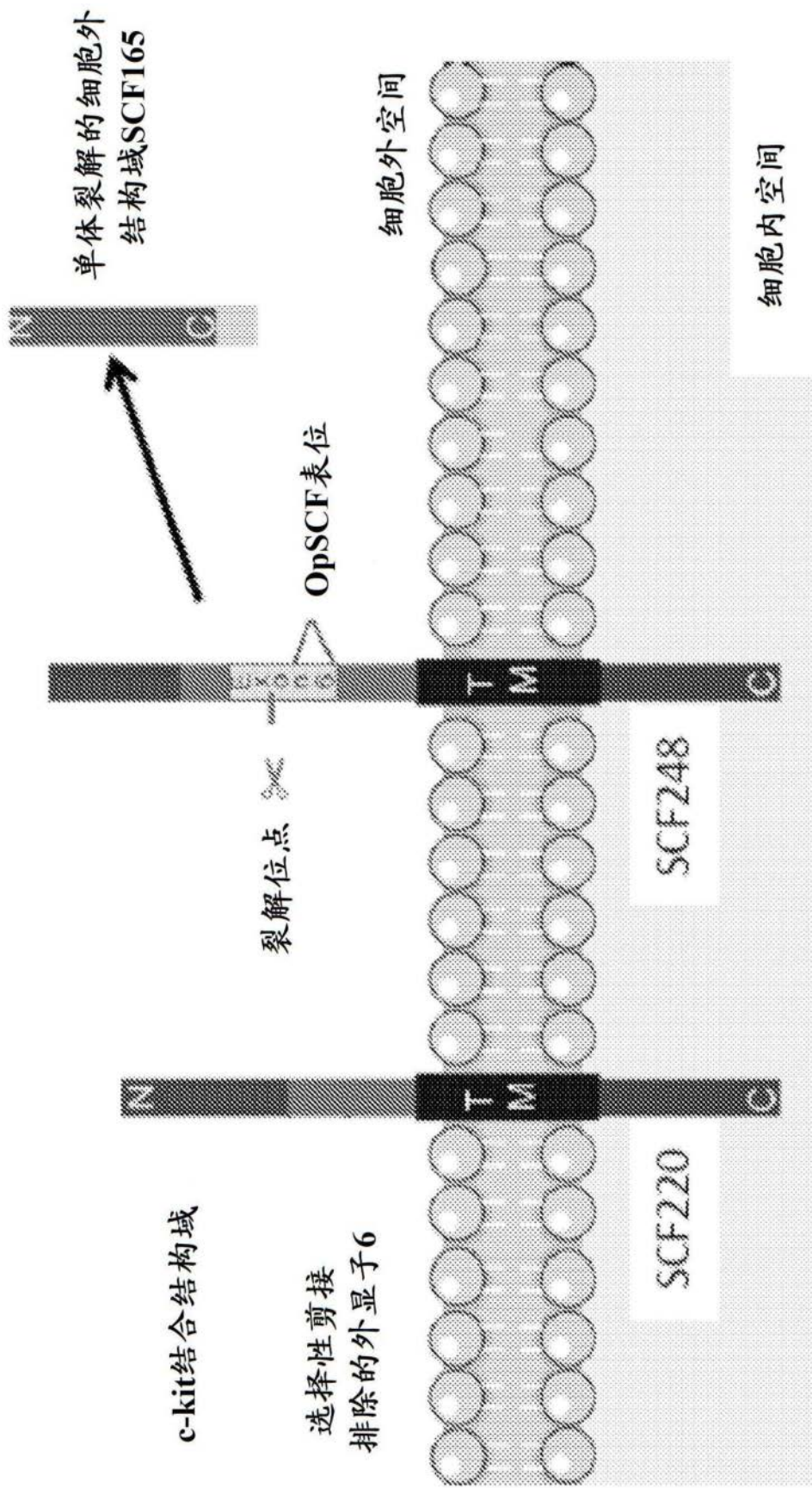


图3

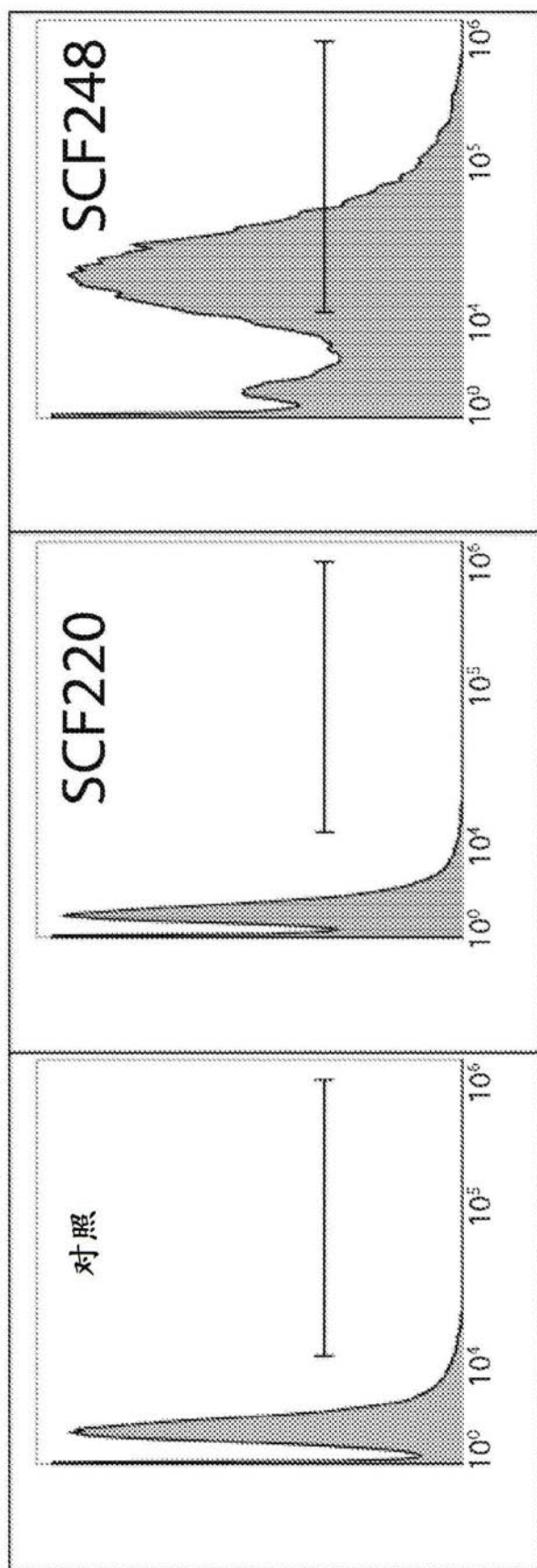


图4A

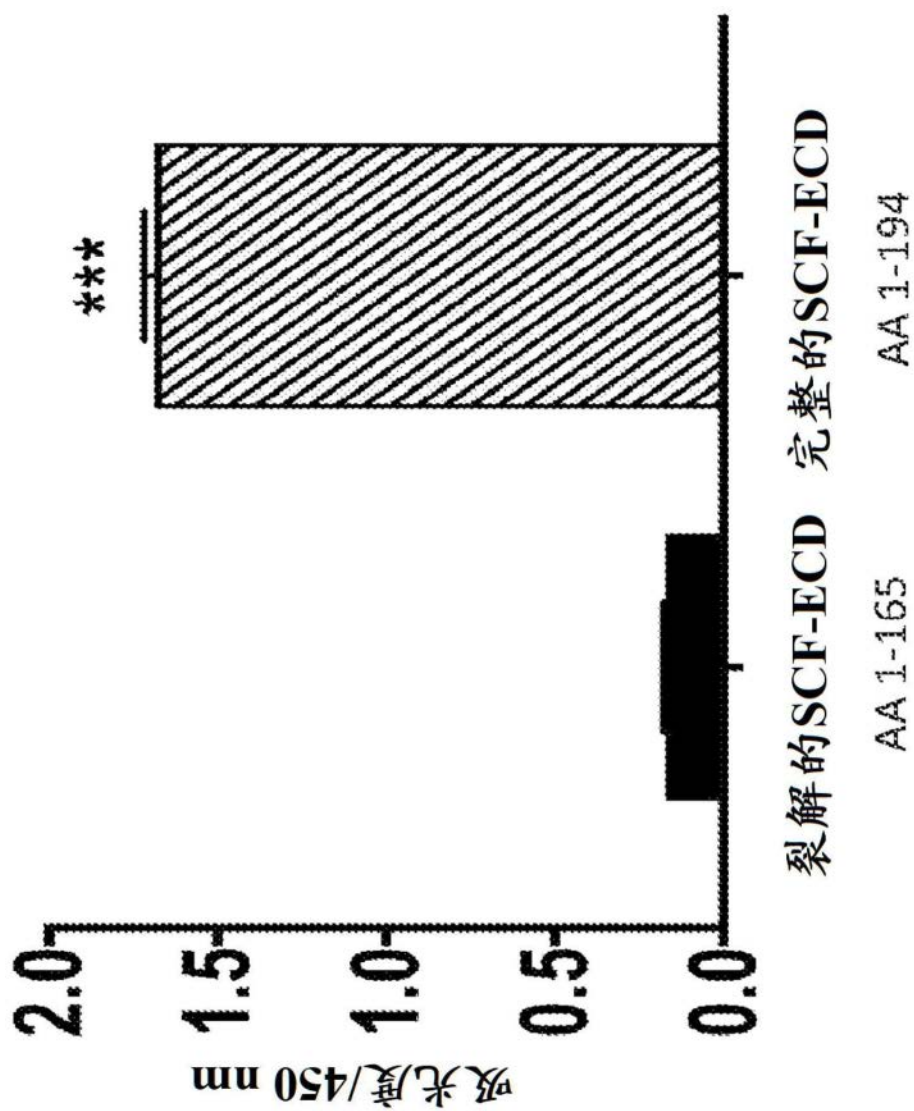


图4B

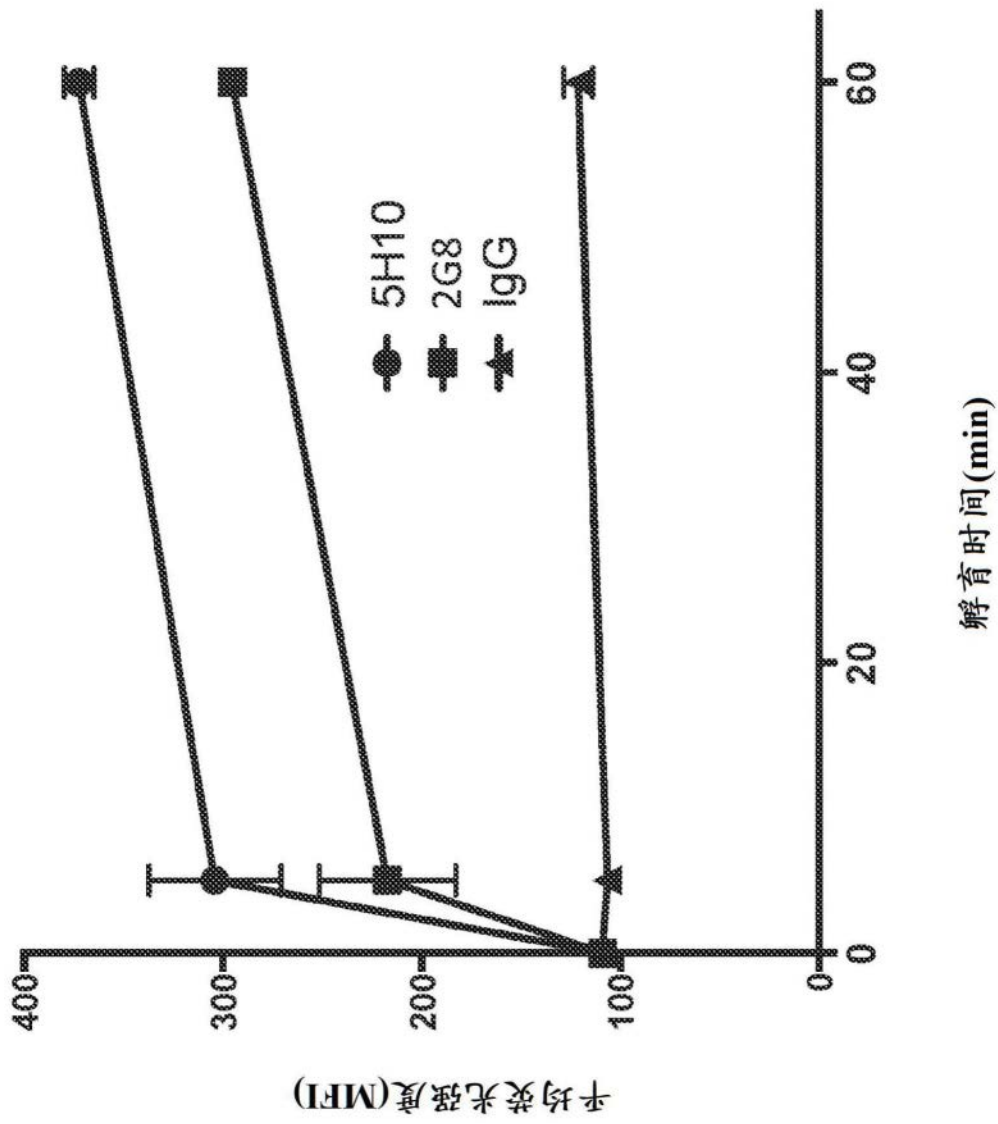


图5

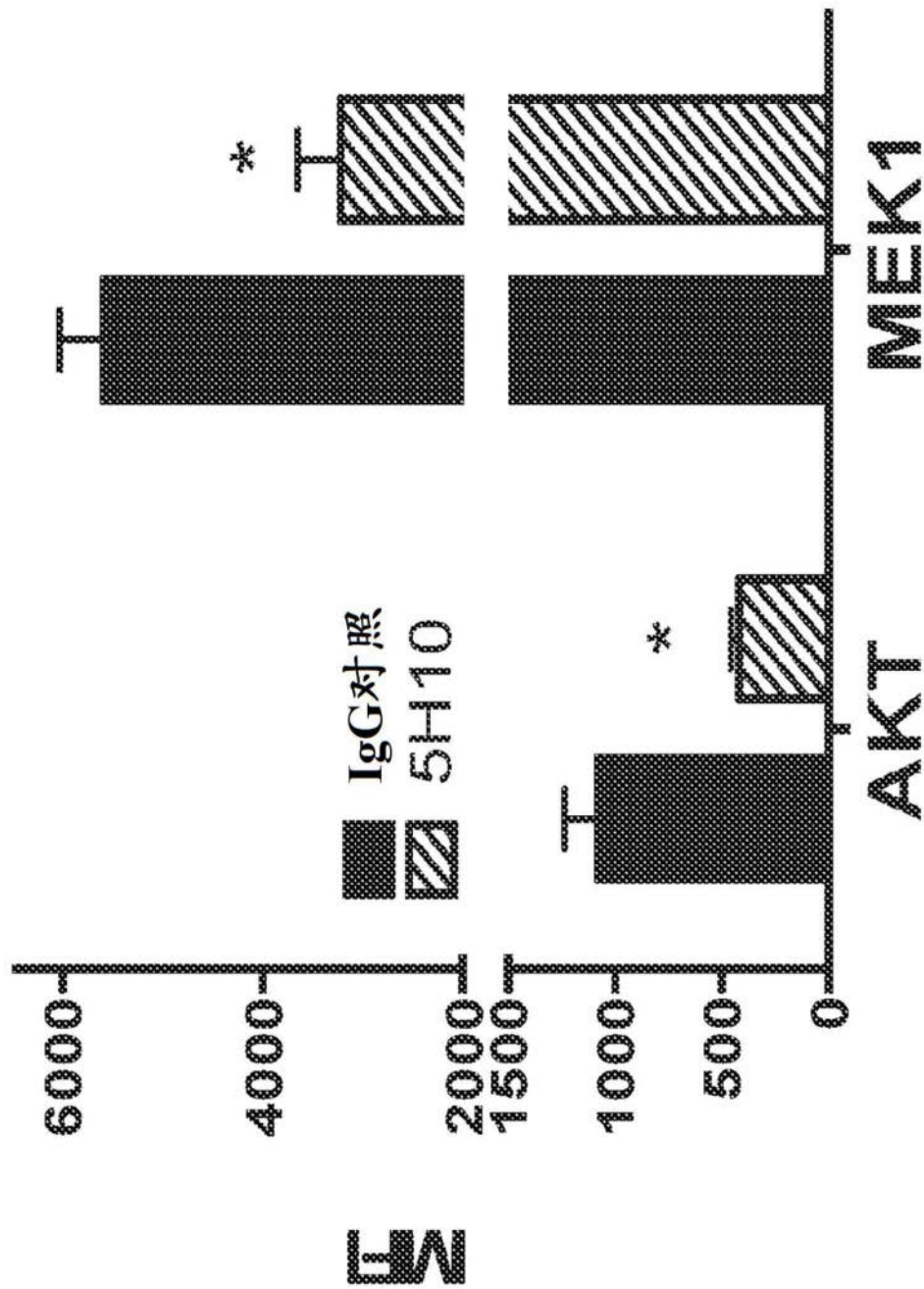


图6

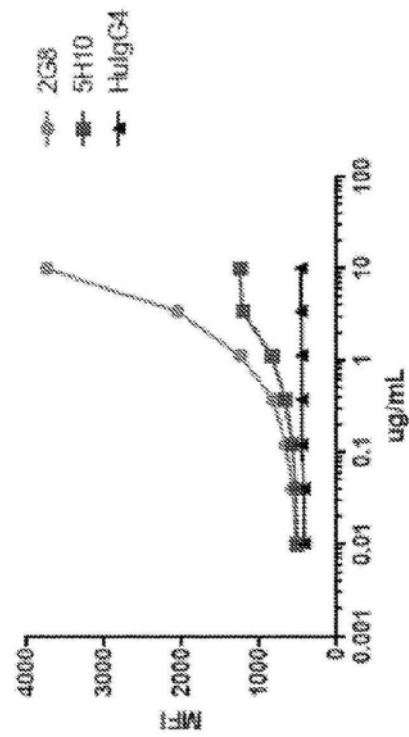


图7A

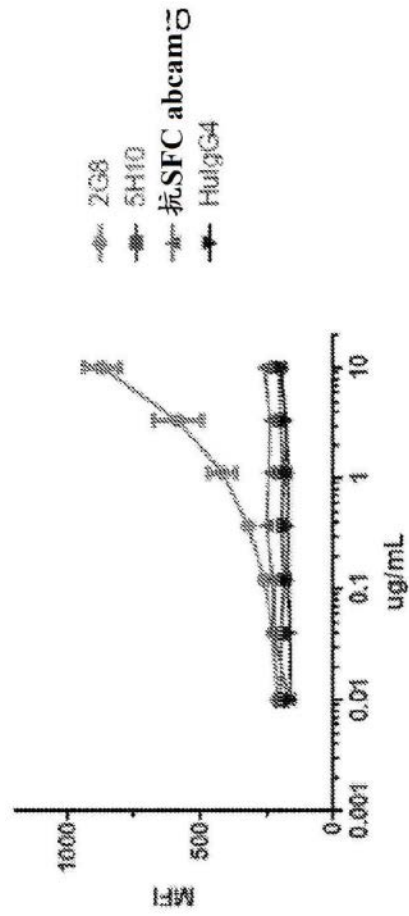


图7B

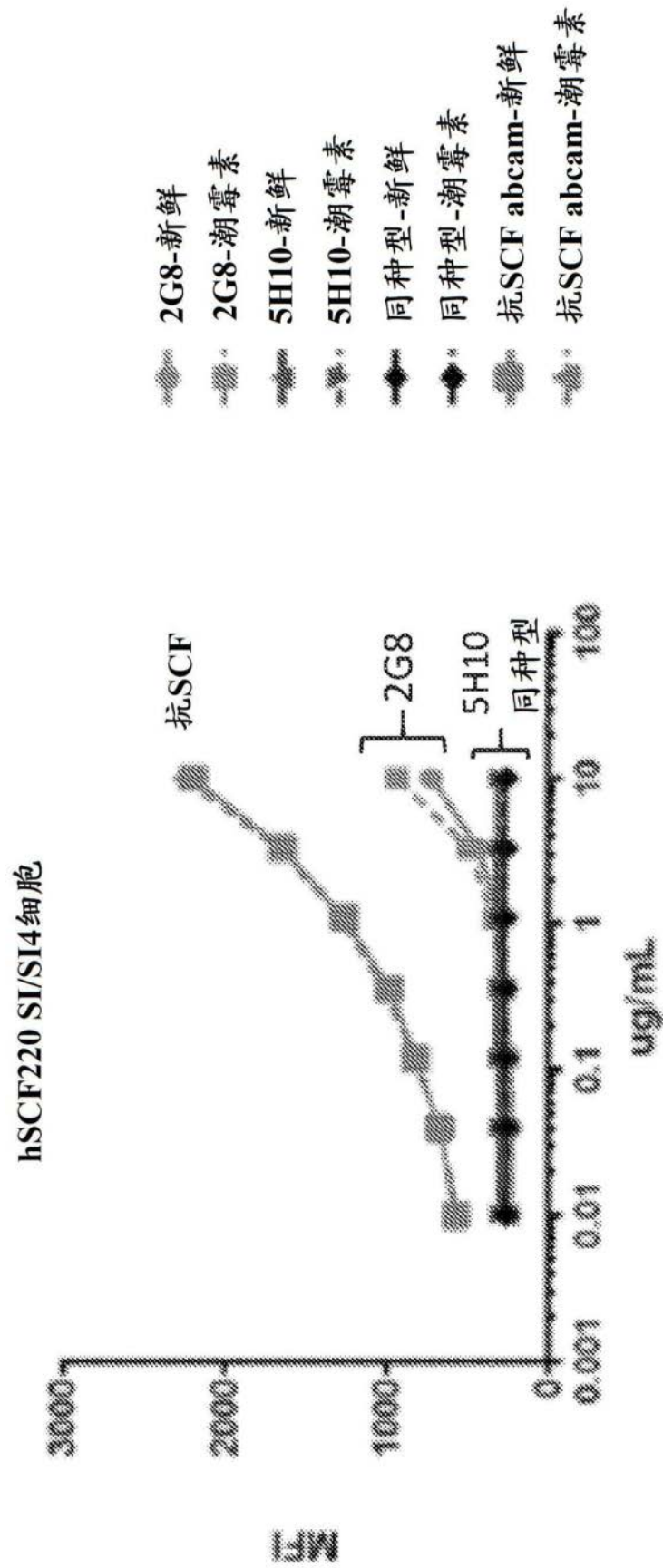


图8A

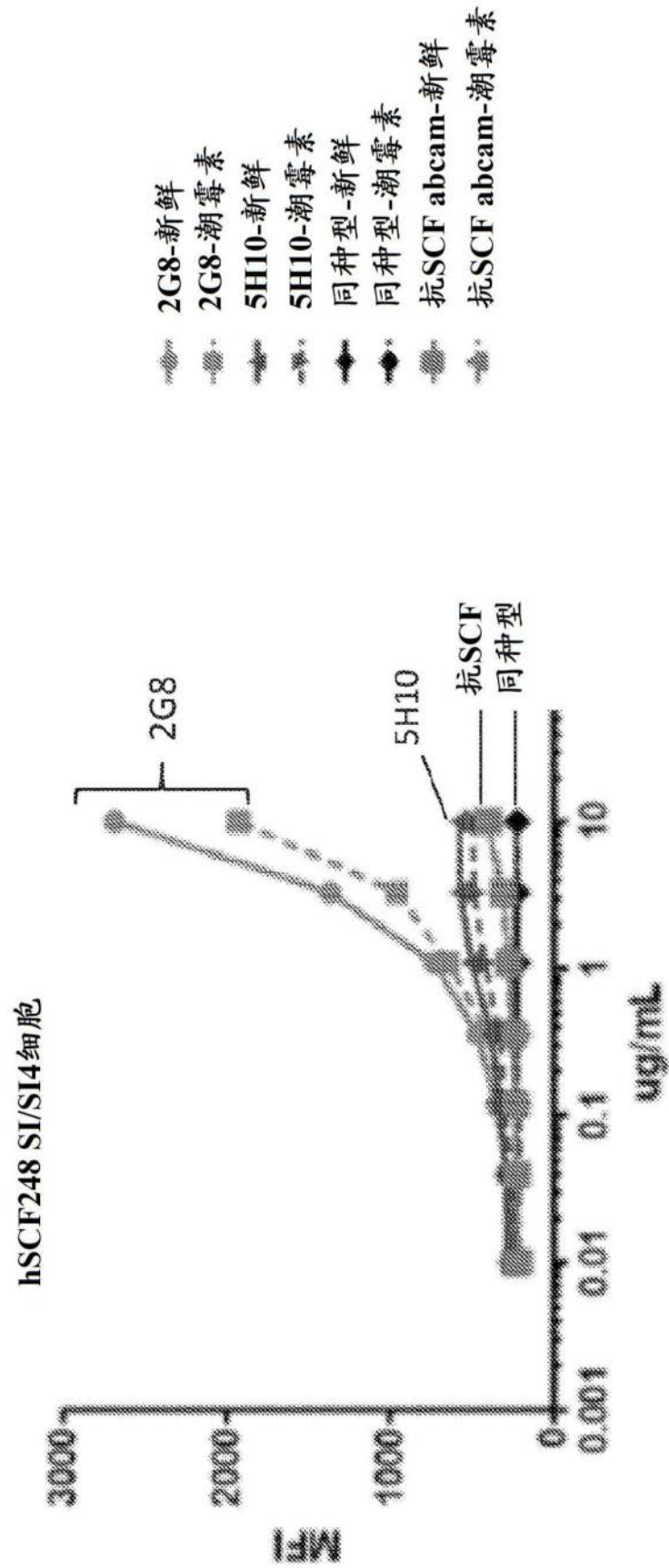


图8B

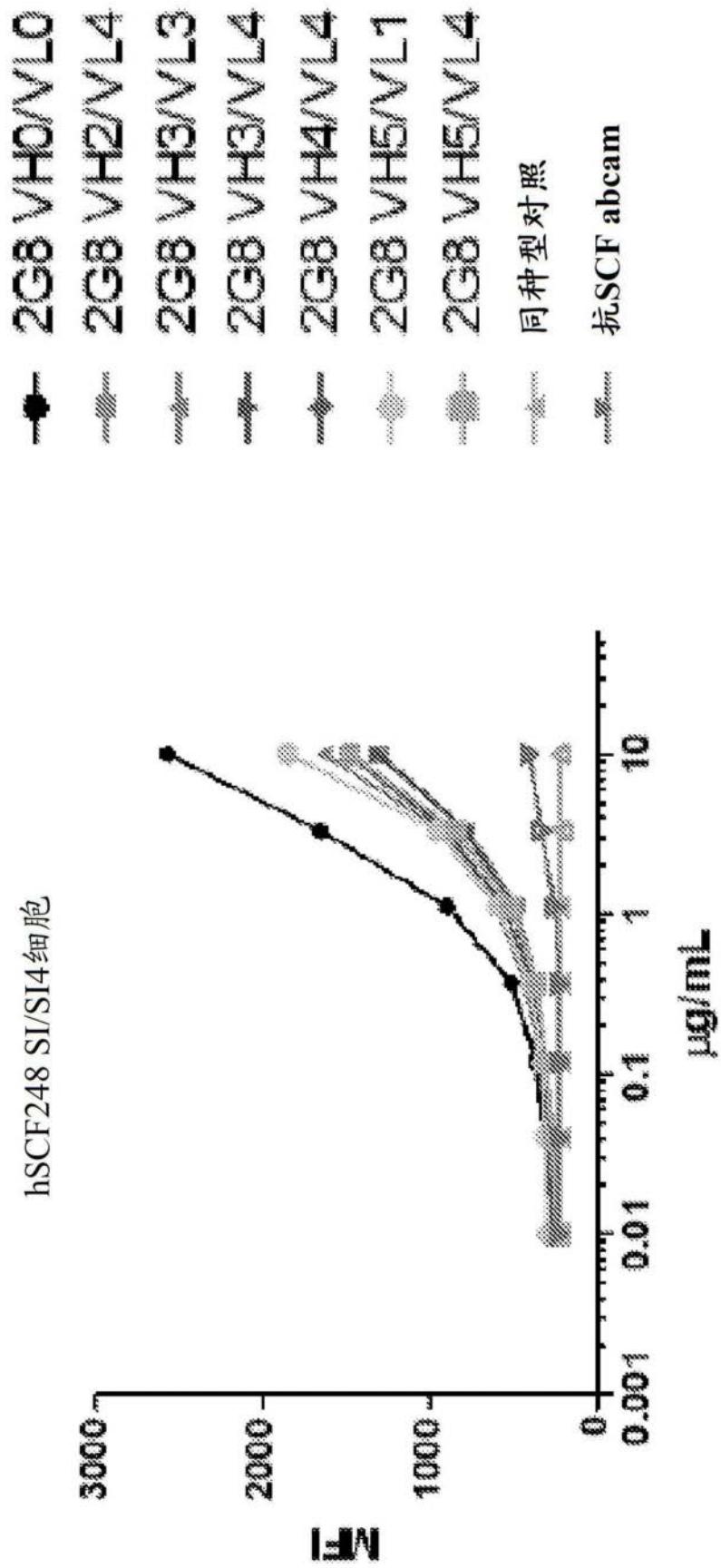


图9A

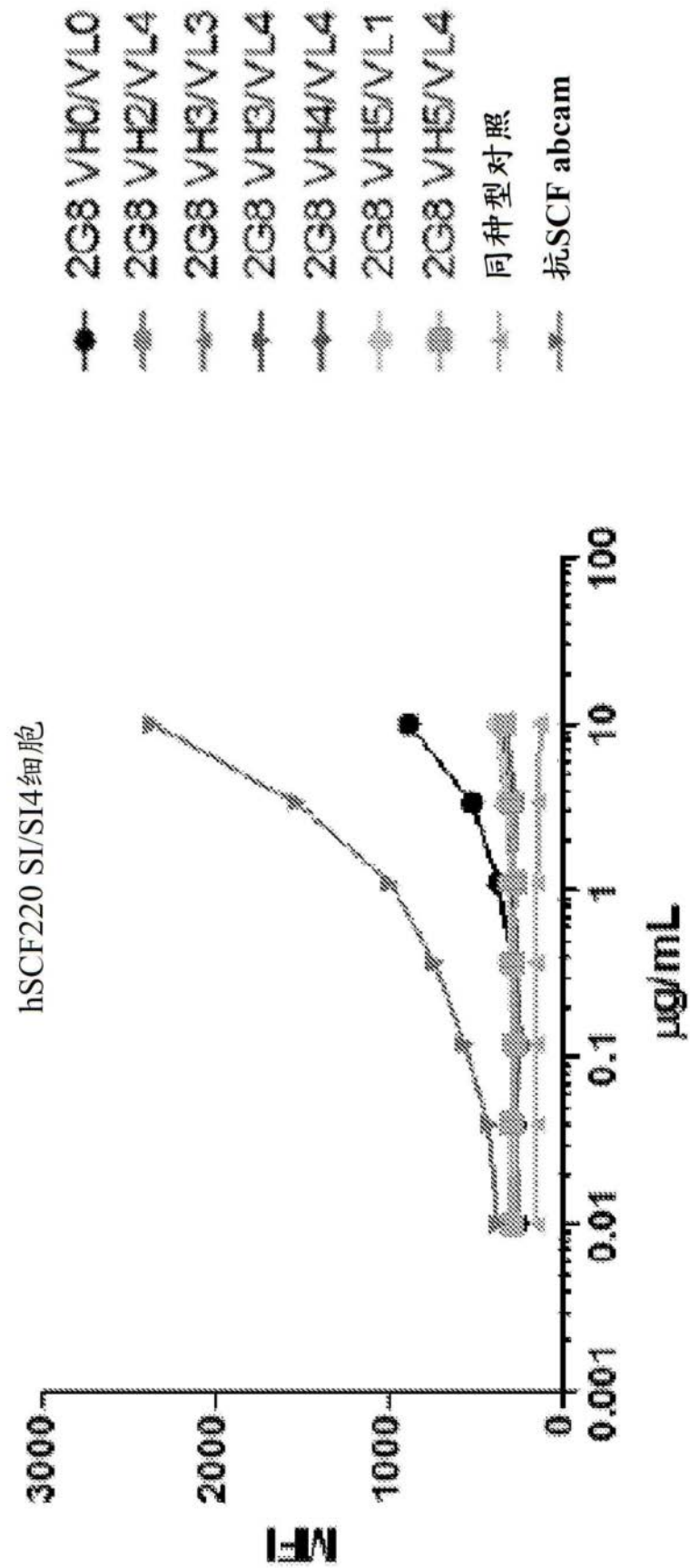


图9B

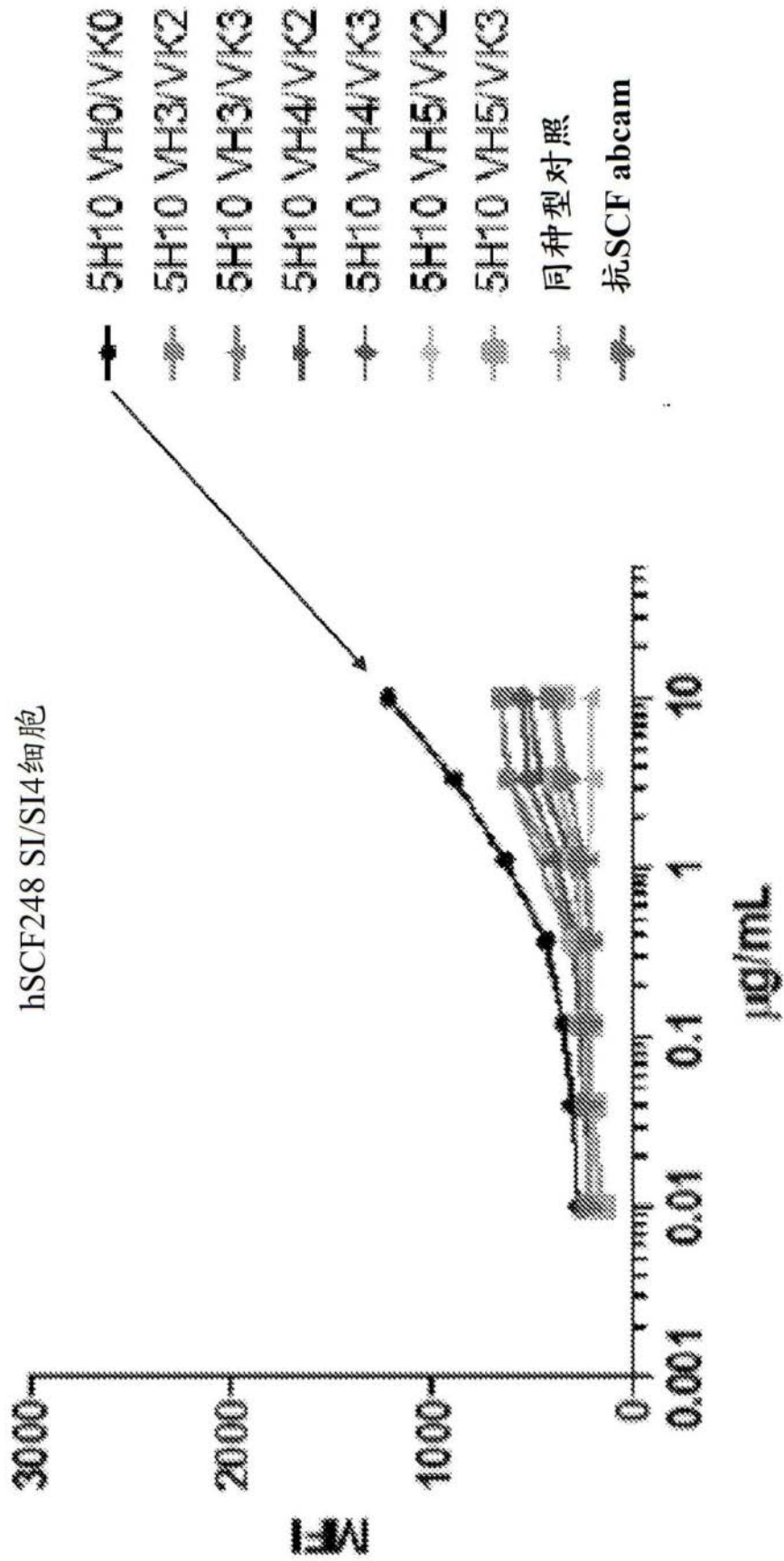


图10A

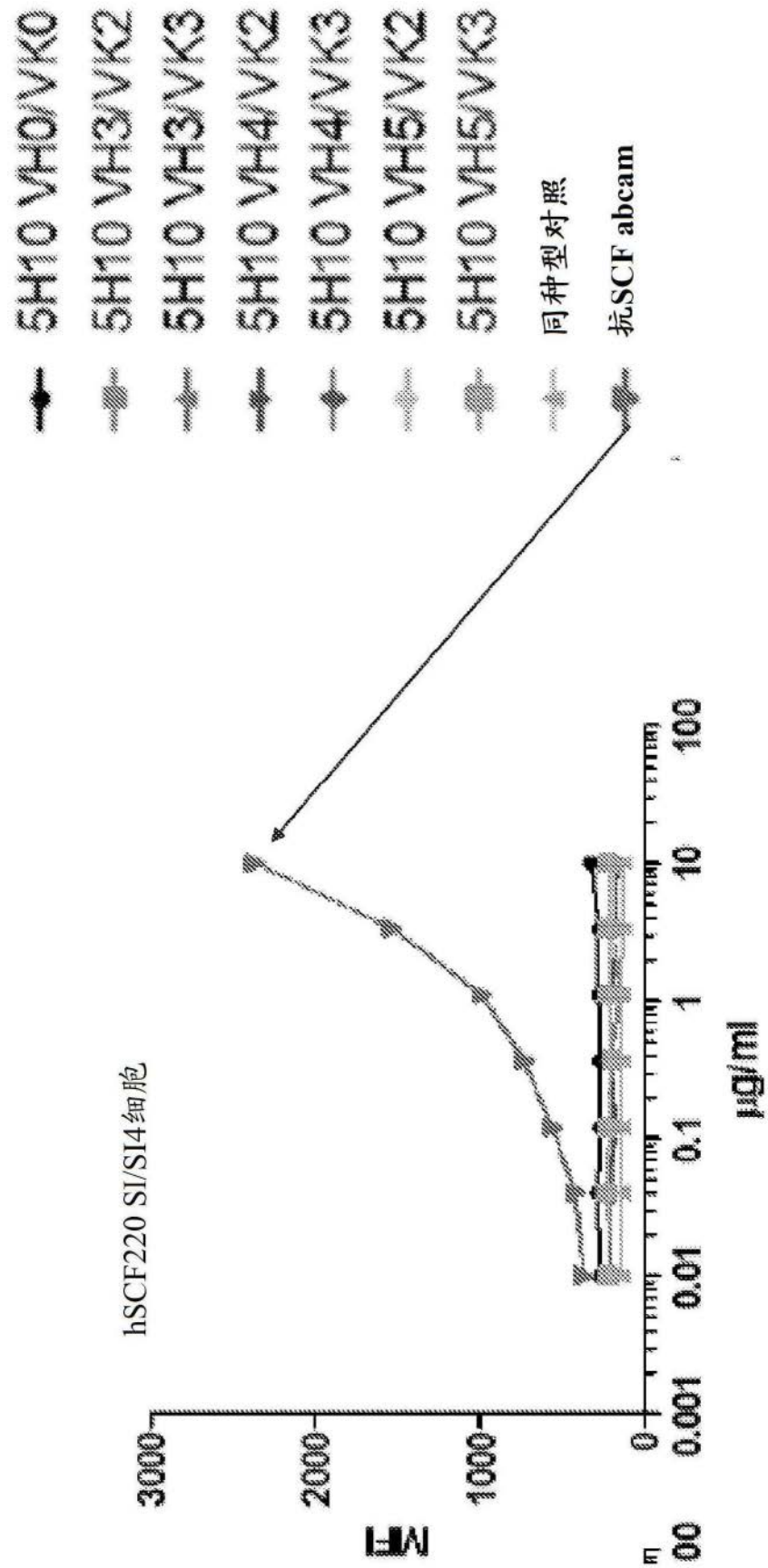


图10B

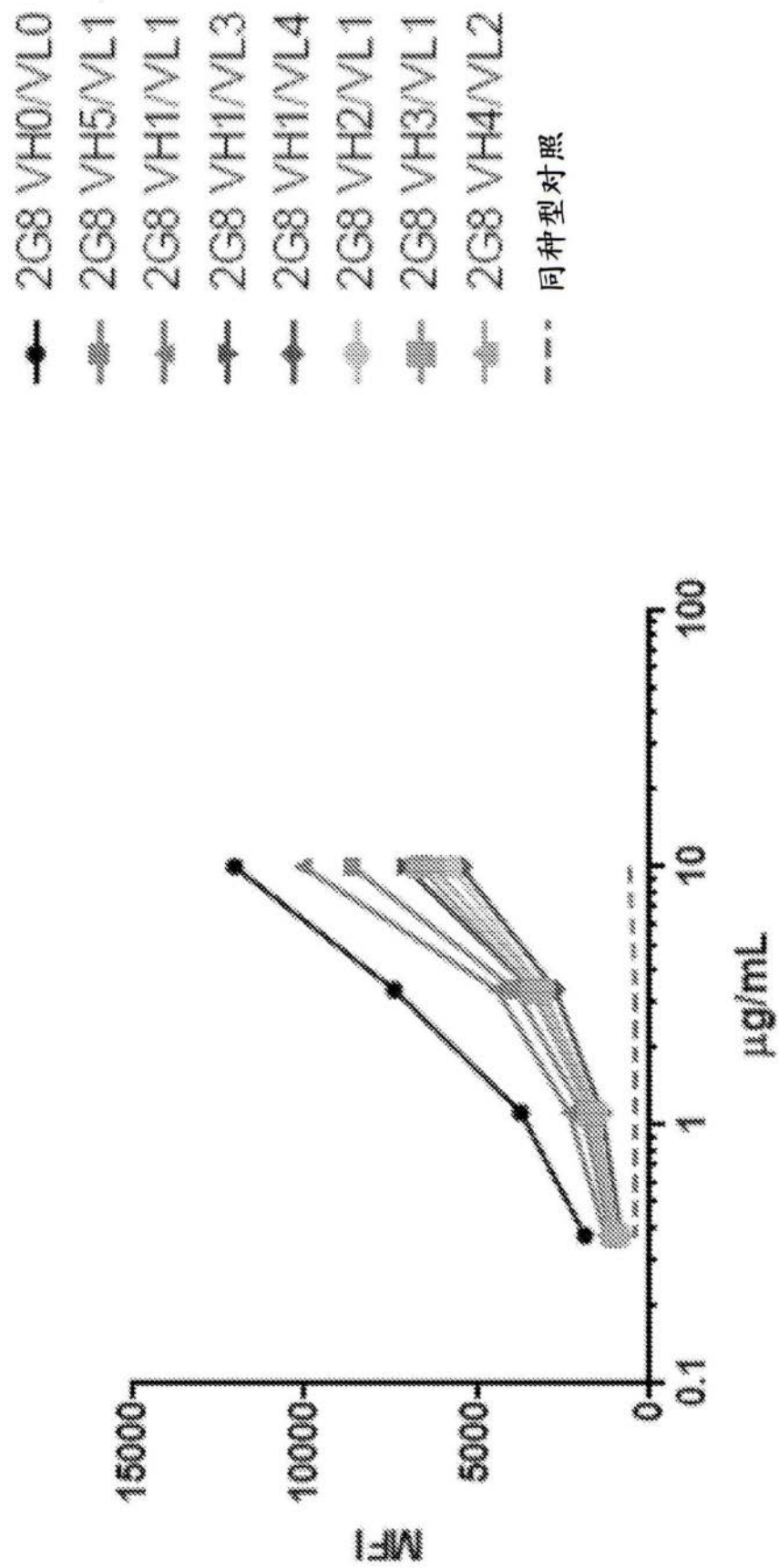


图11A

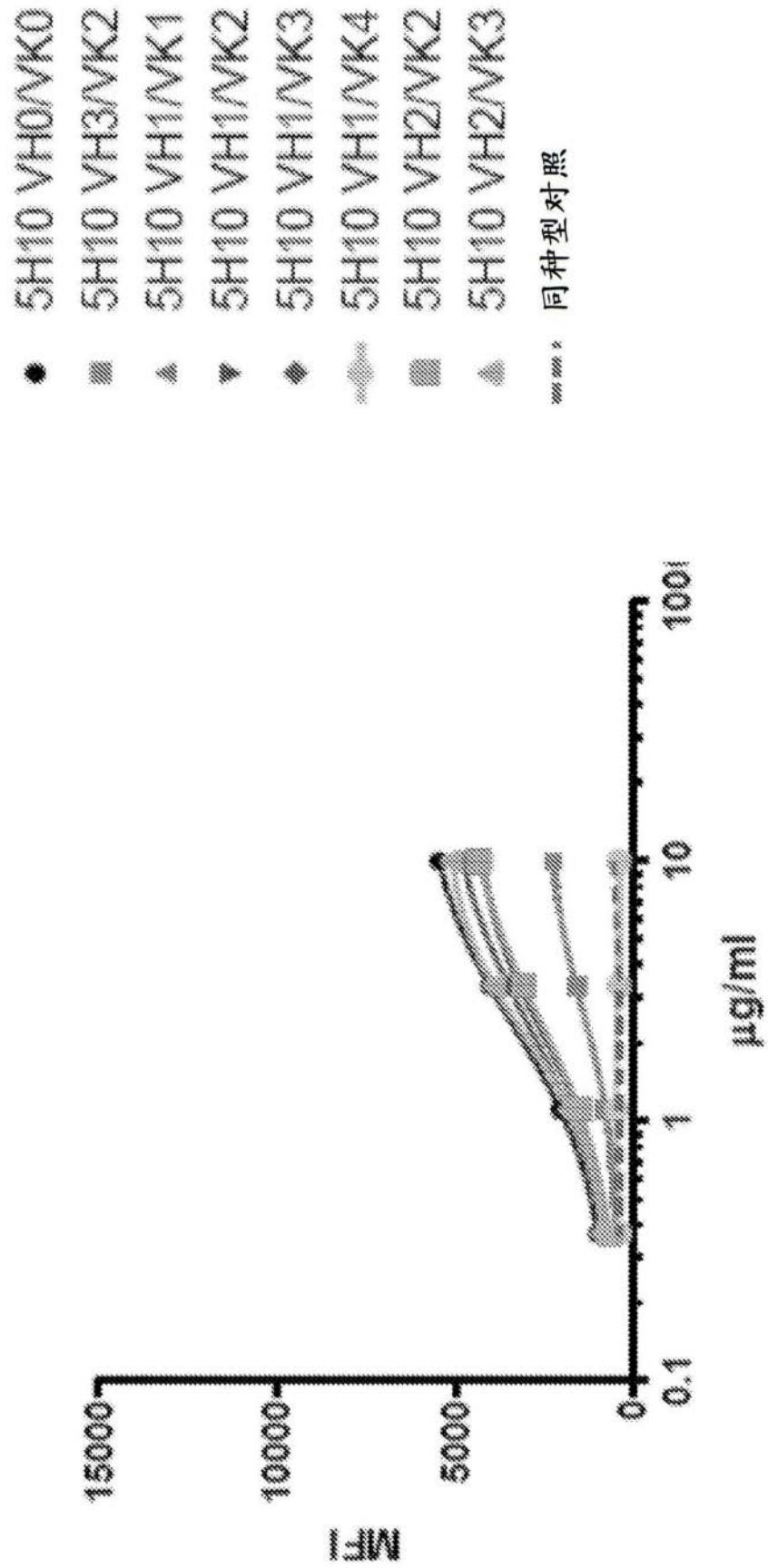


图11B

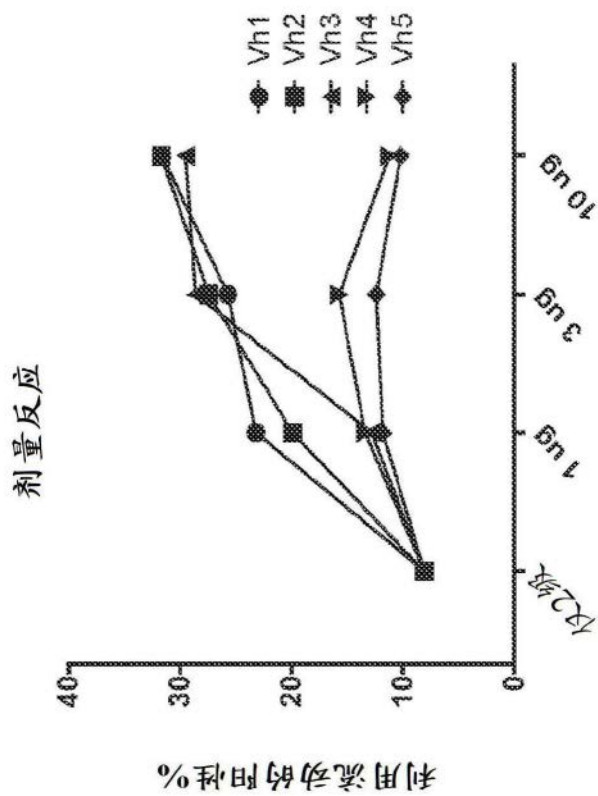


图11C

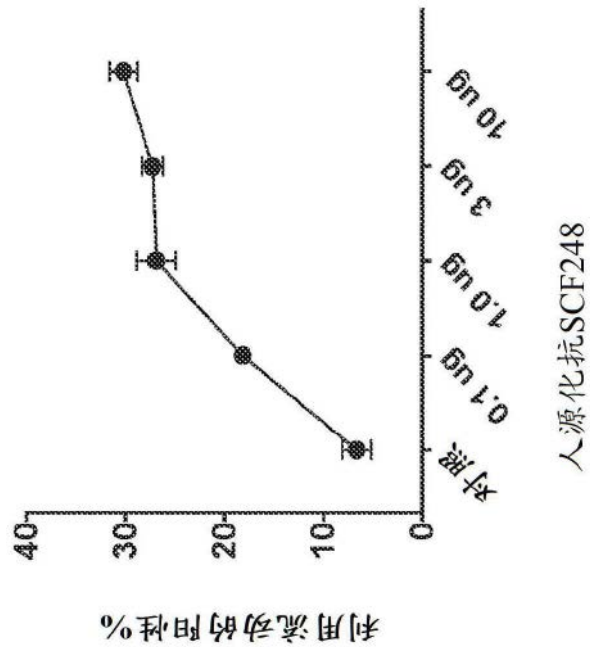


图11D

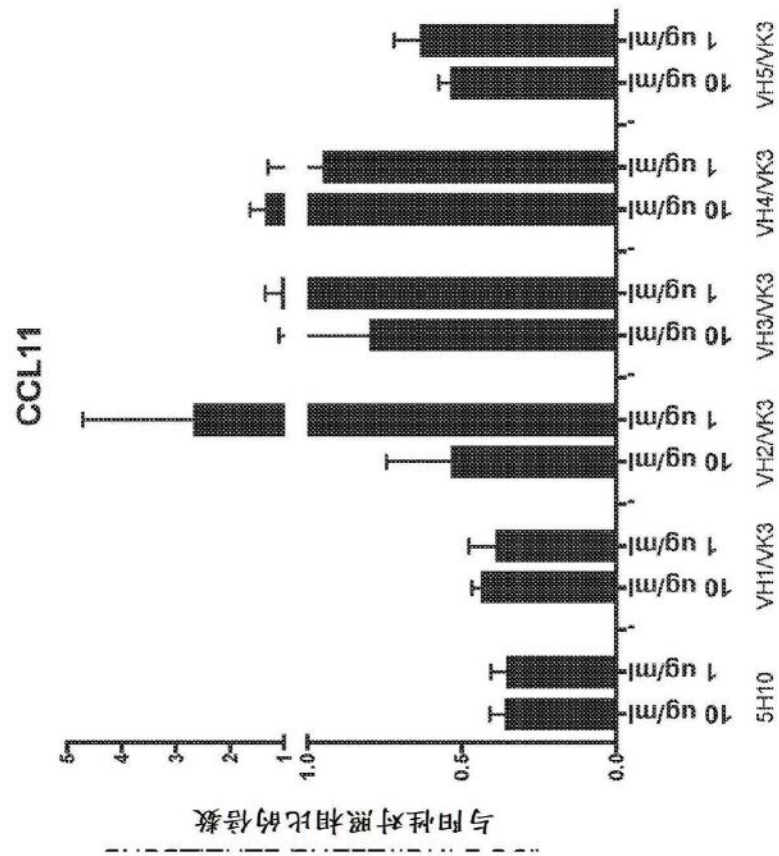


图12A

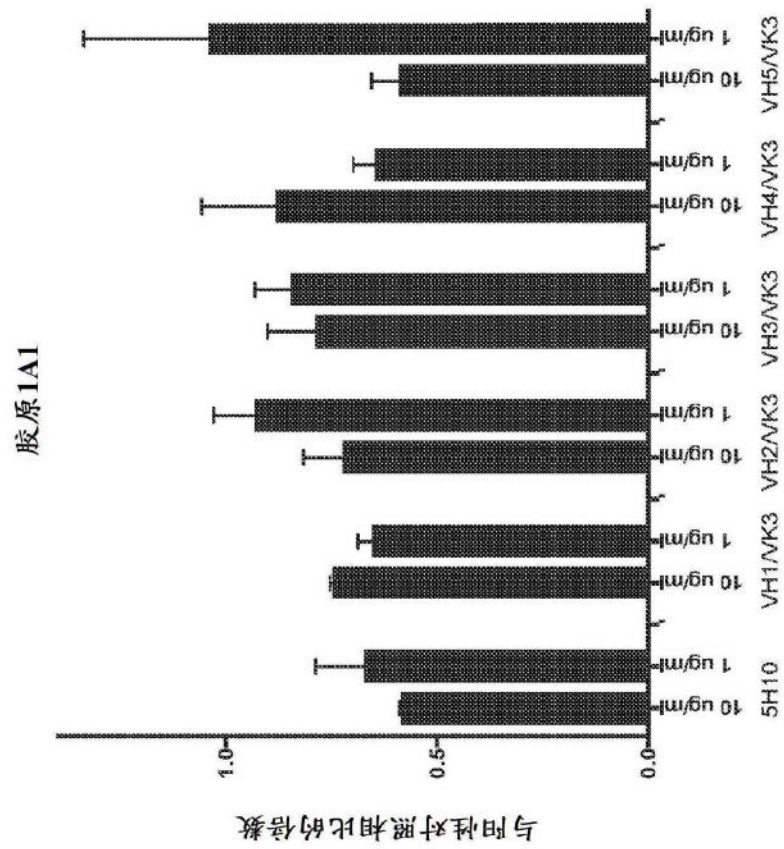


图12B

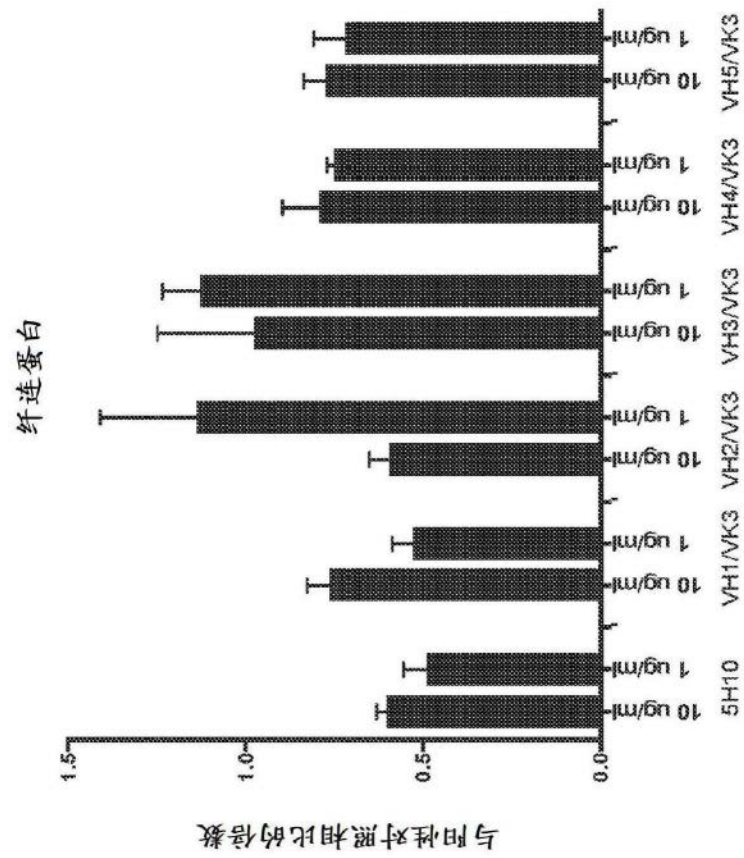


图12C

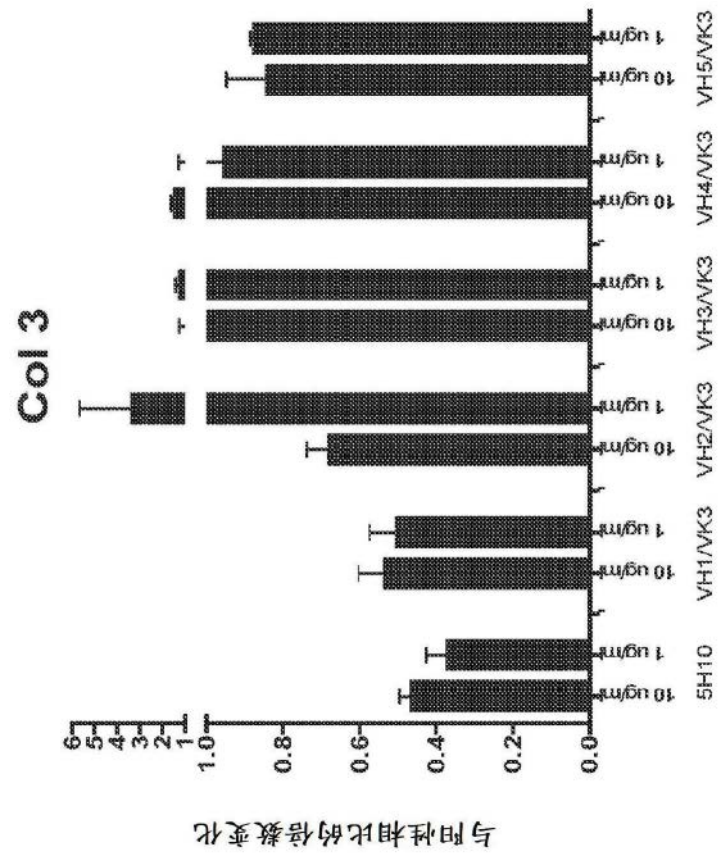


图12D

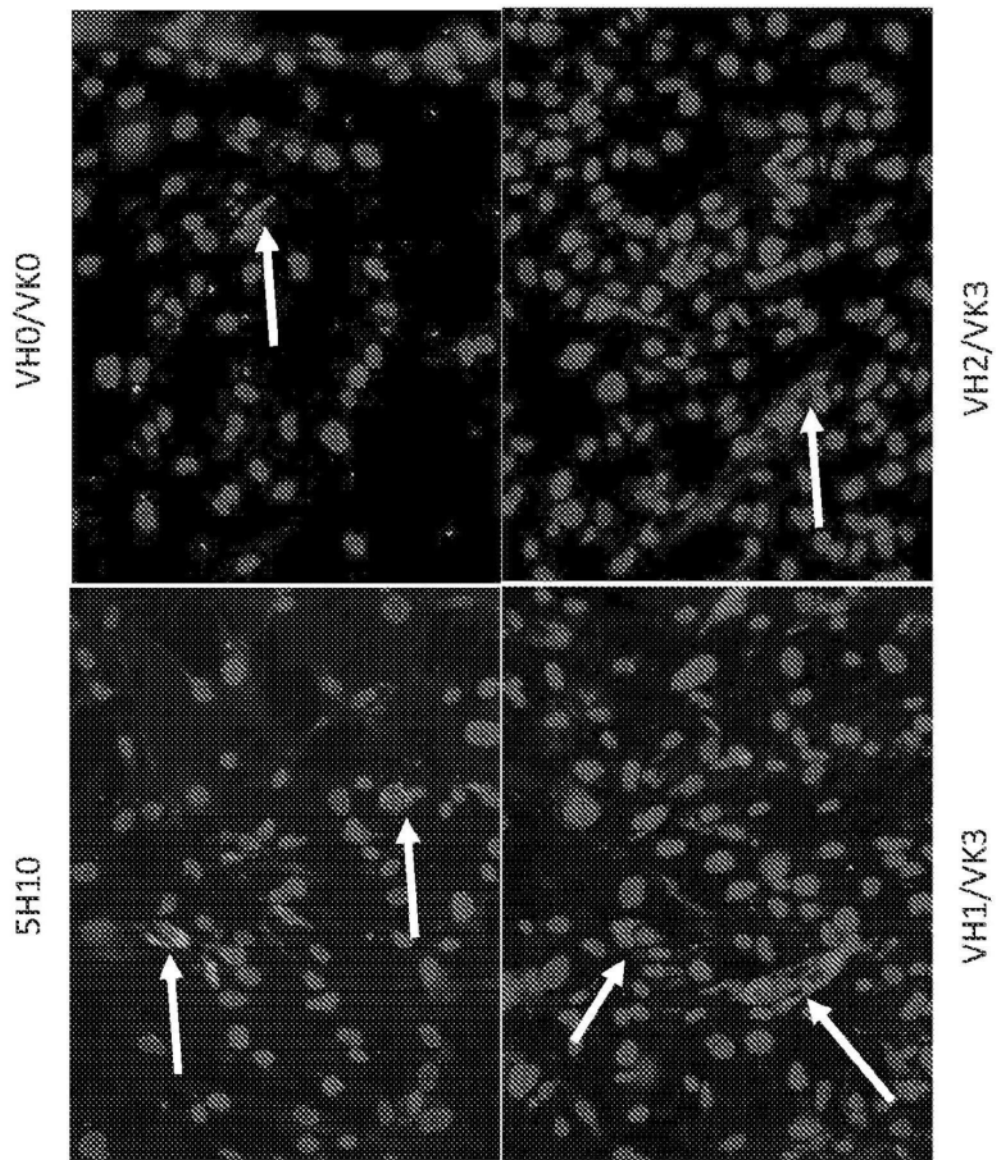


图13

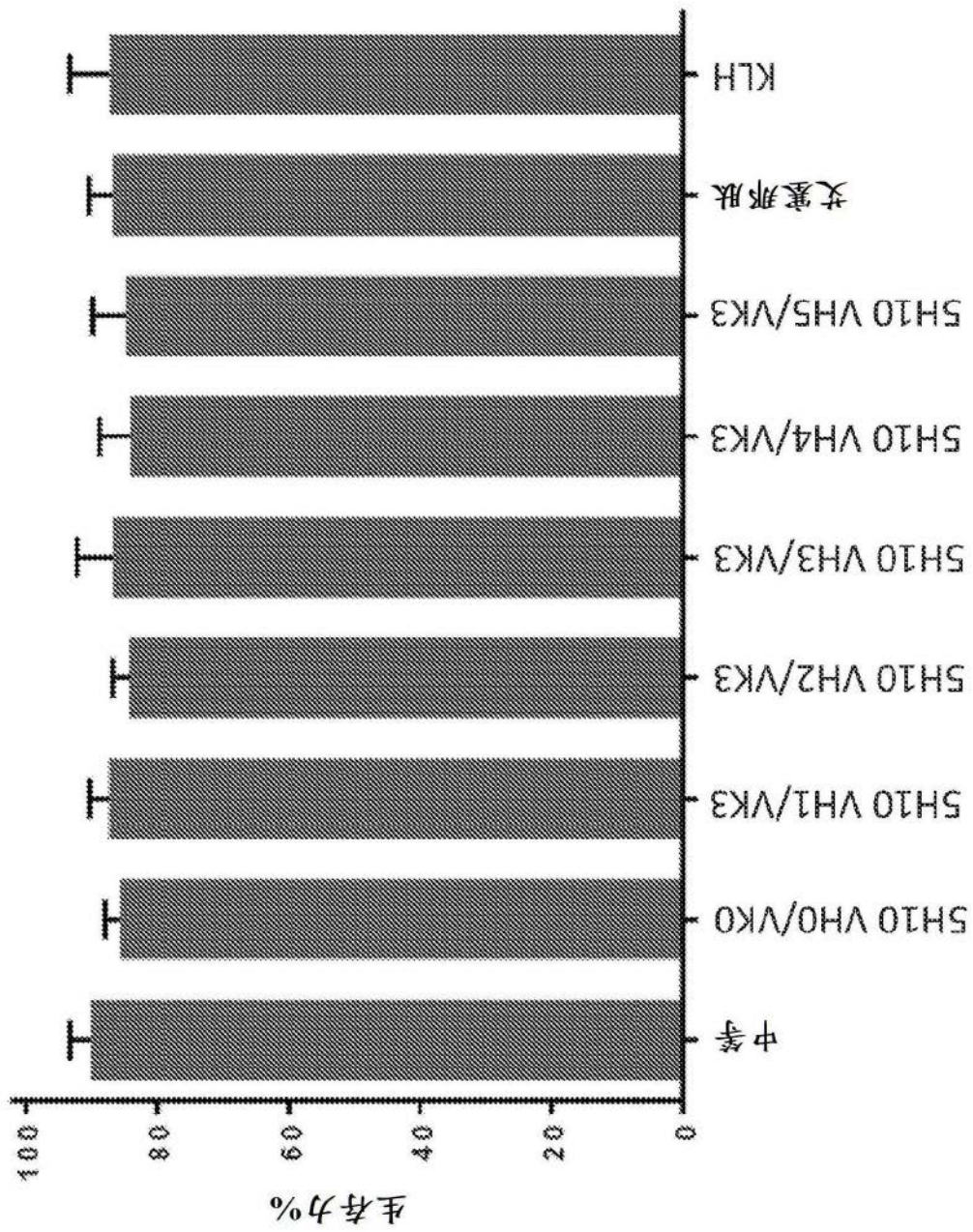


图14

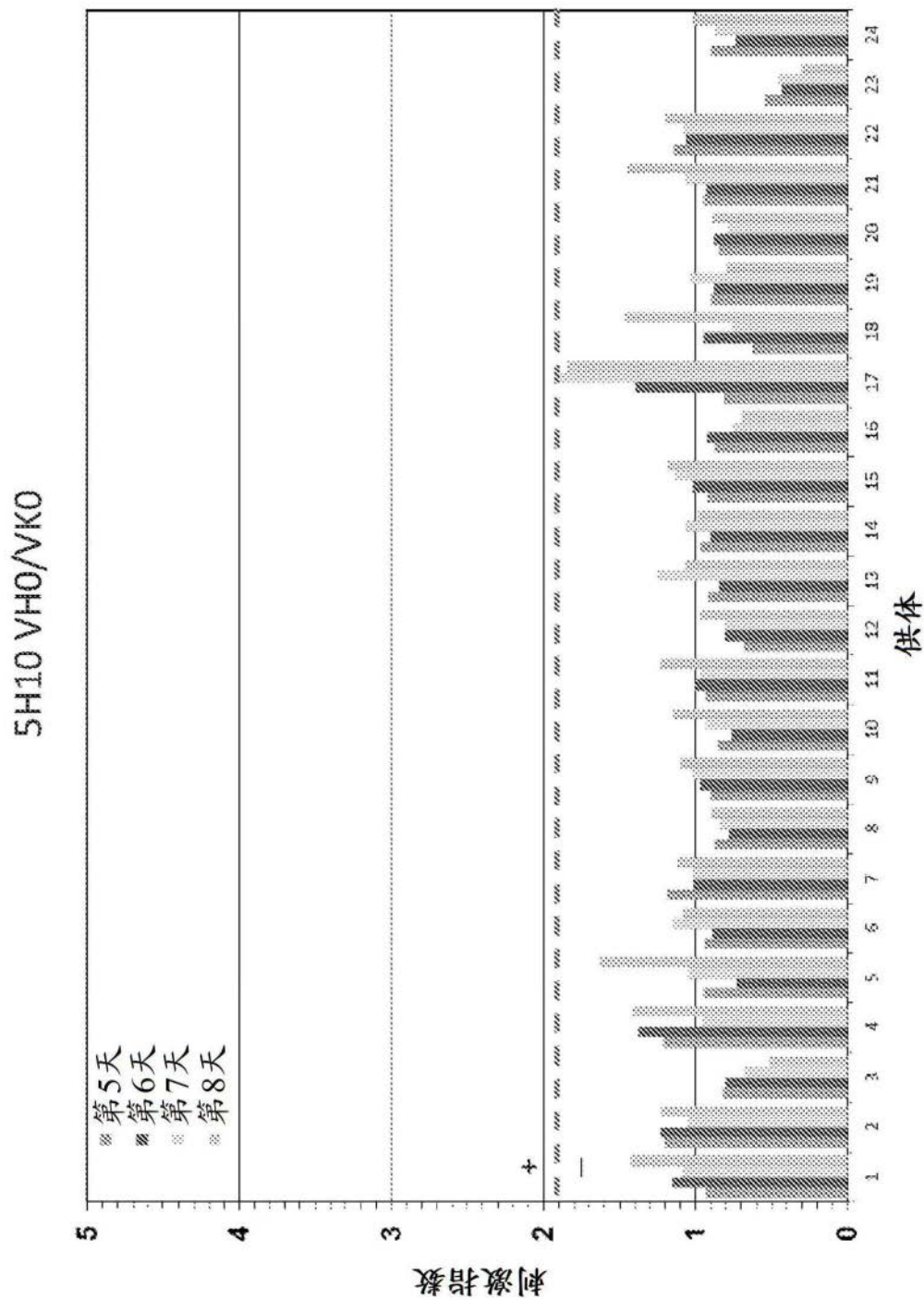


图15A

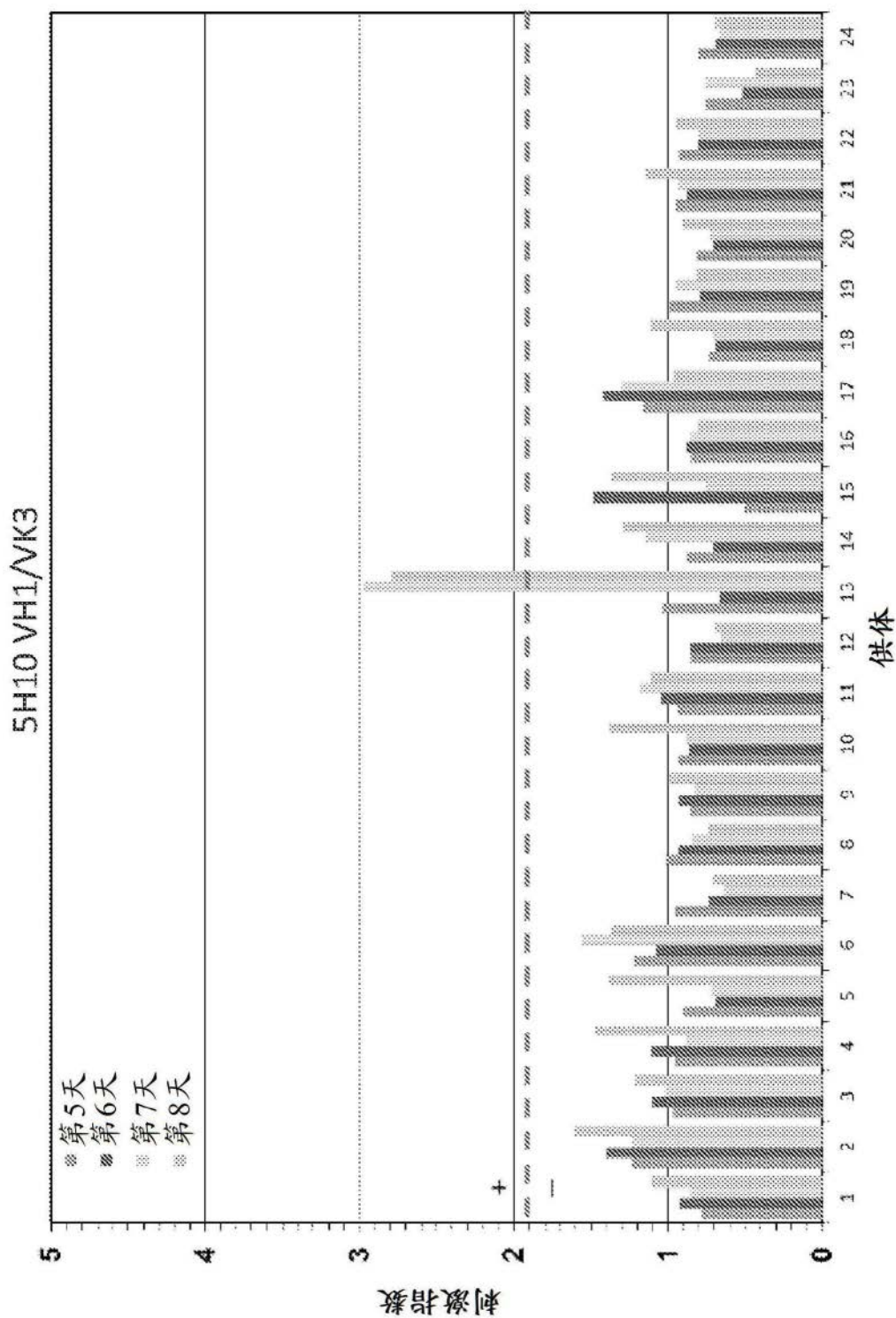


图15B

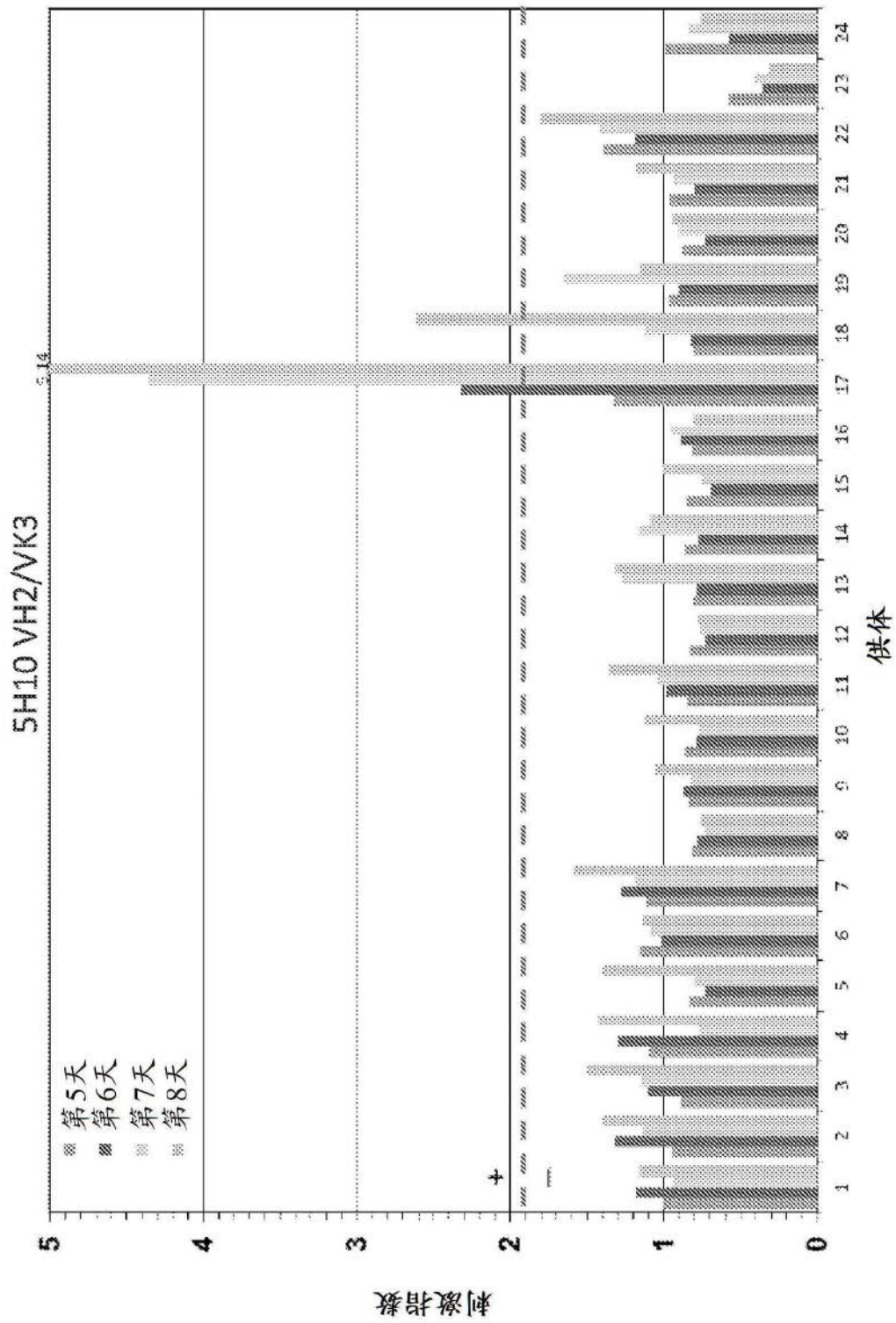


图15C

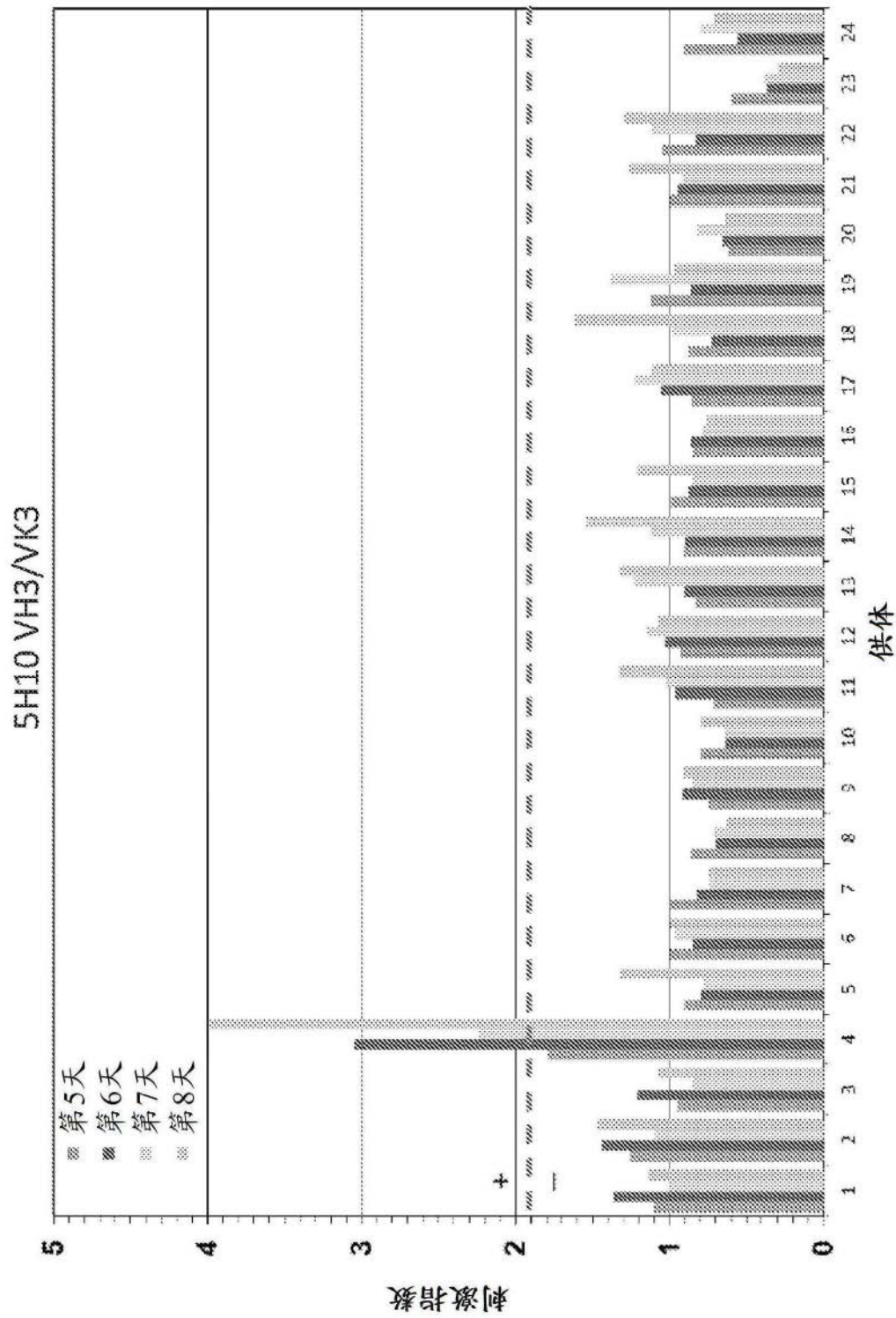


图15D

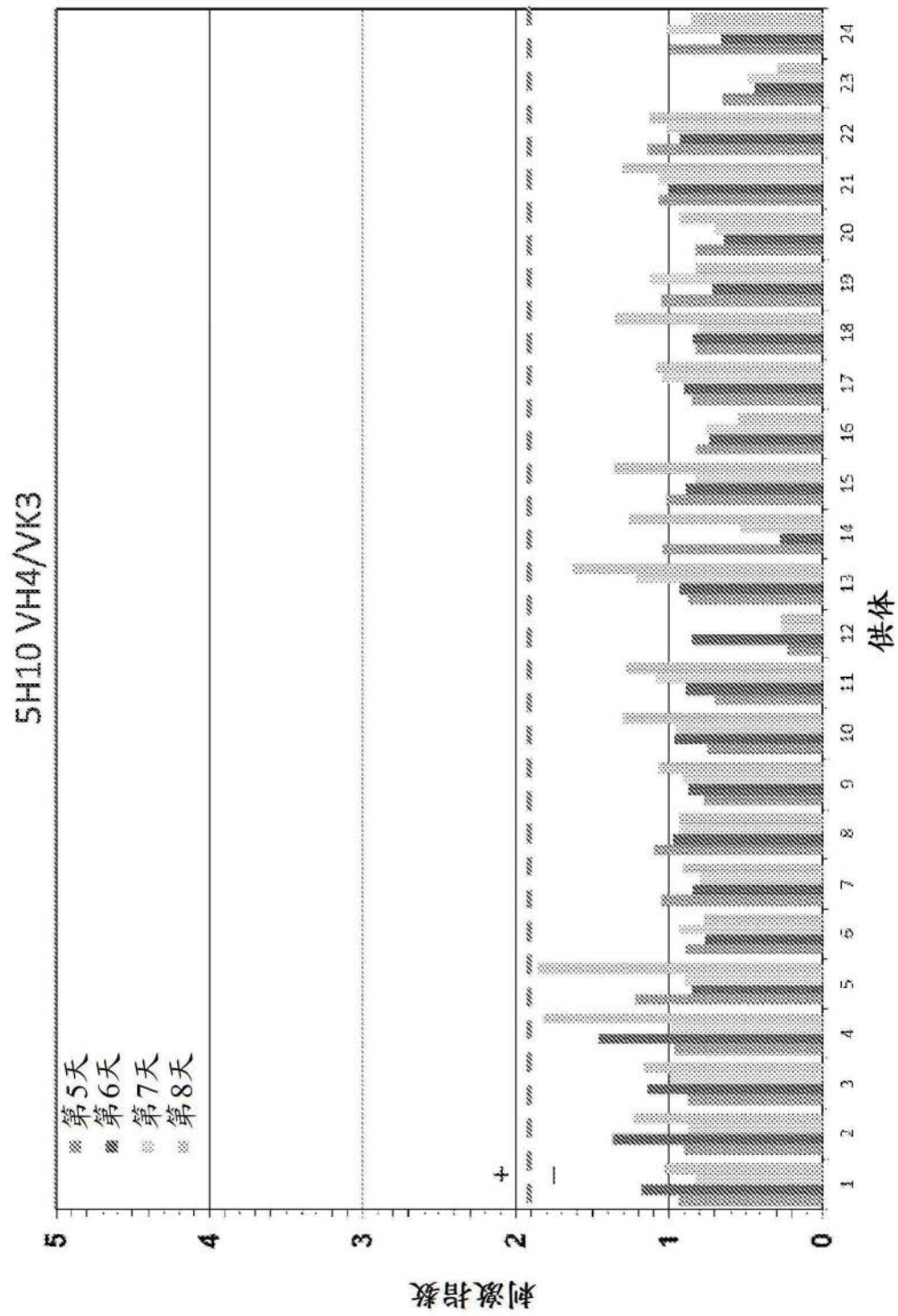


图15E

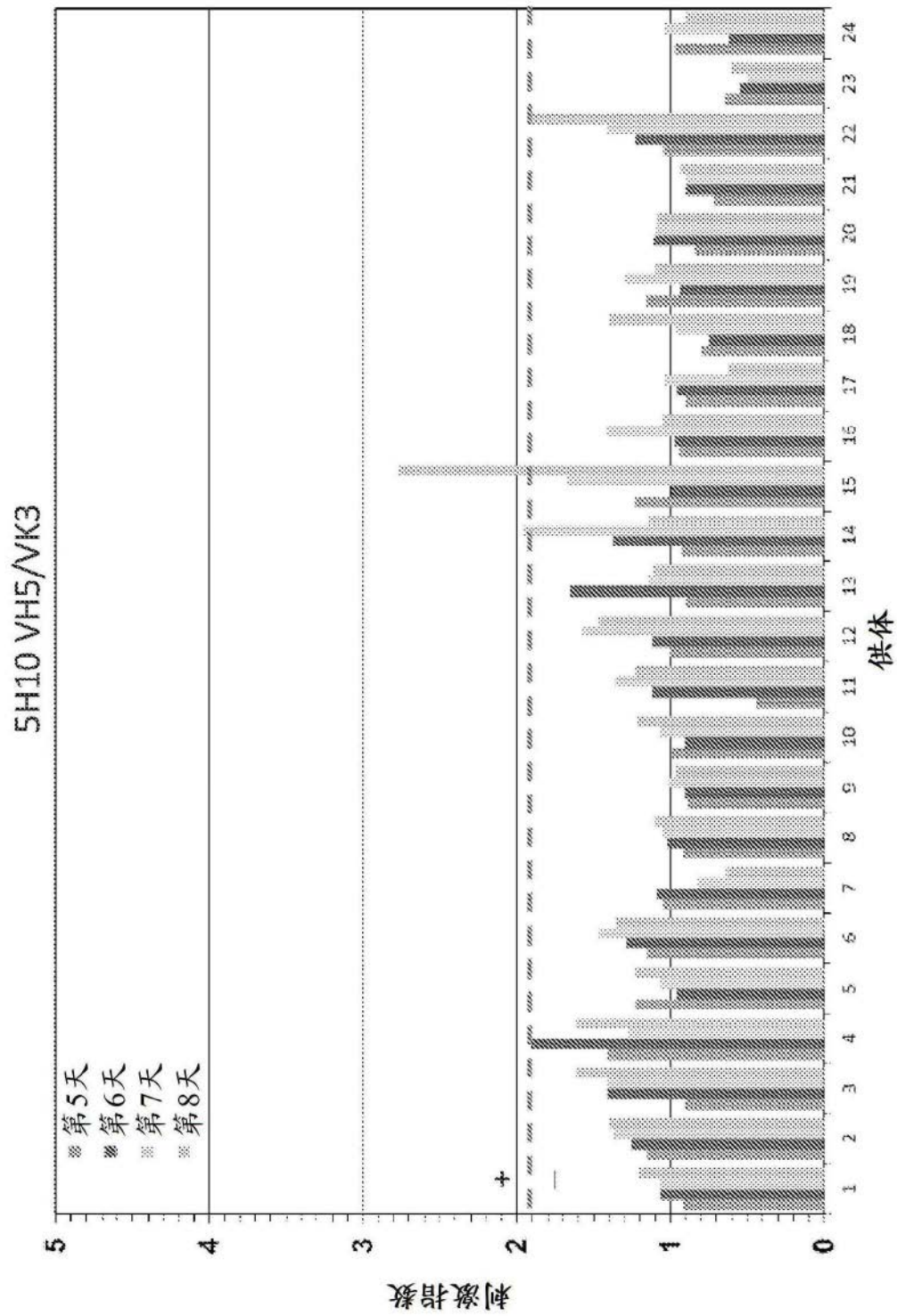


图15F

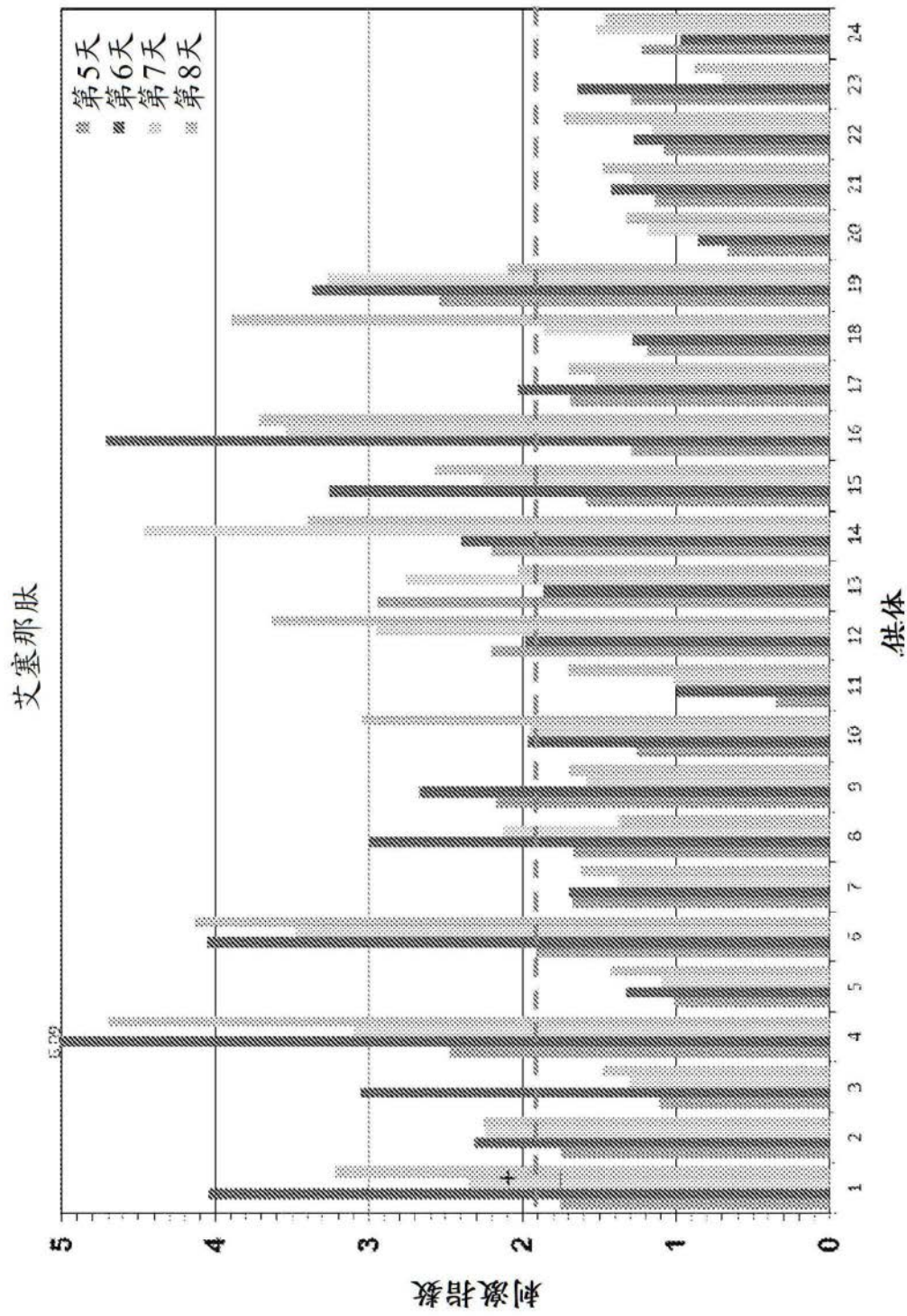


图15G

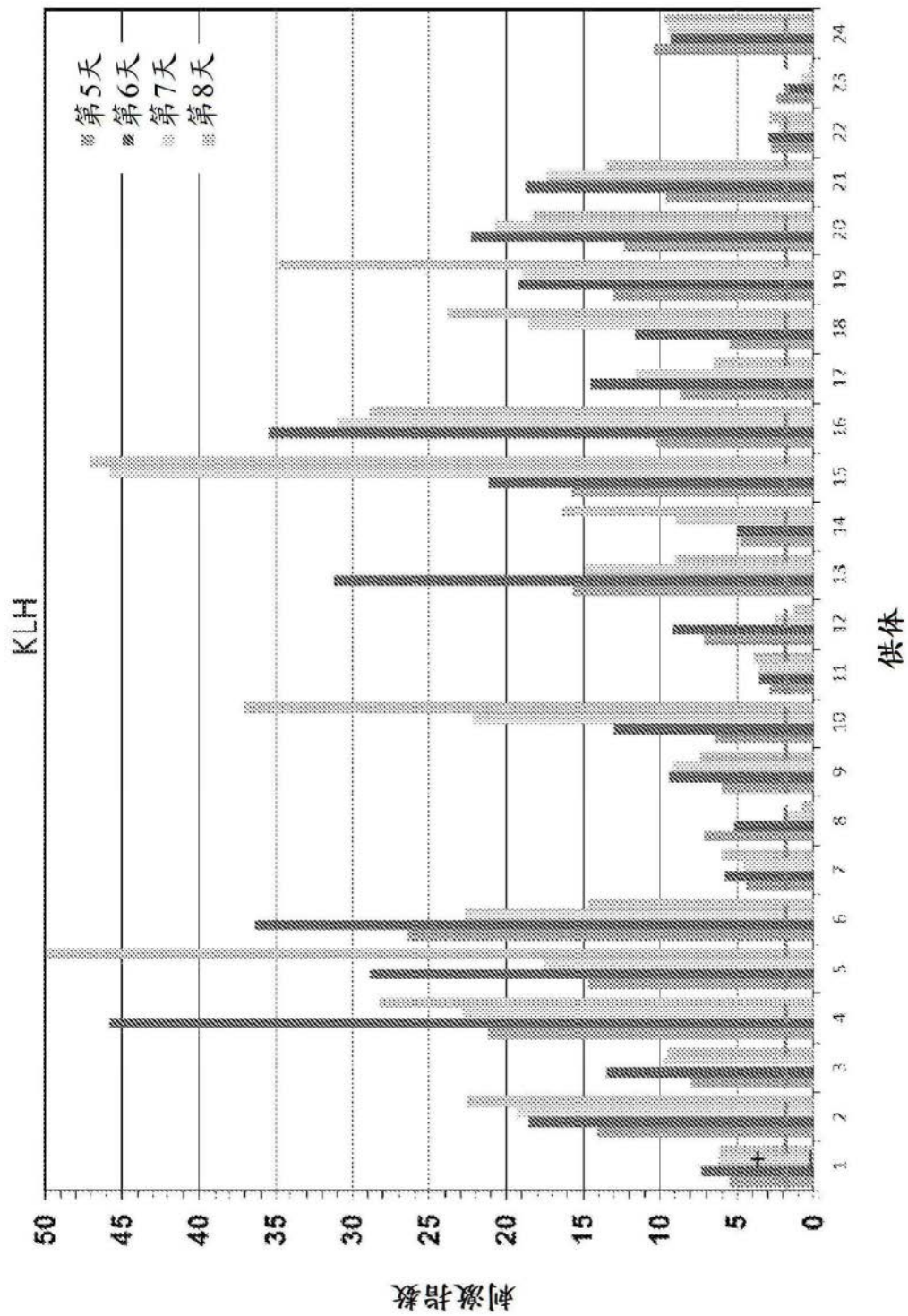


图15H

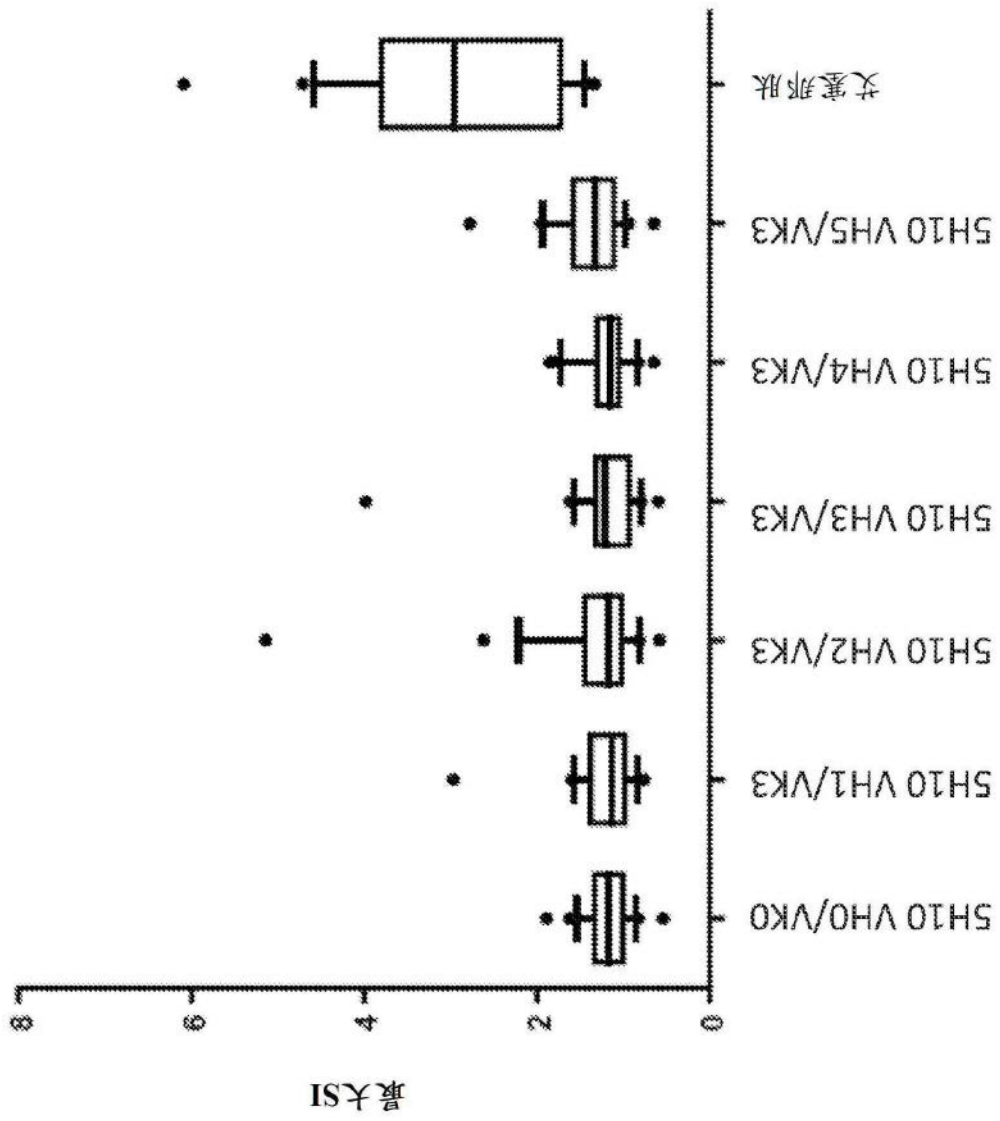
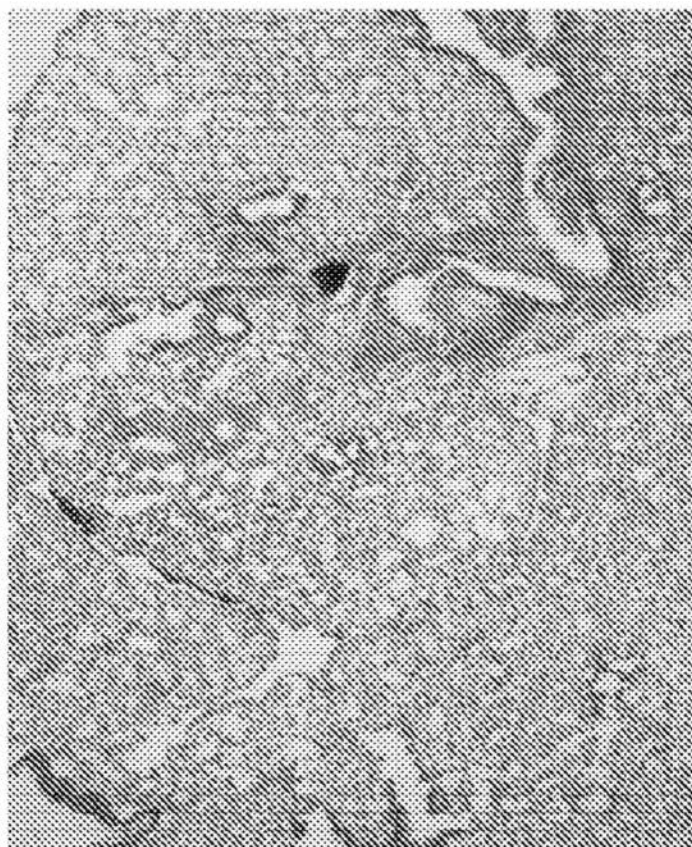


图16

5H10



博来霉素对照

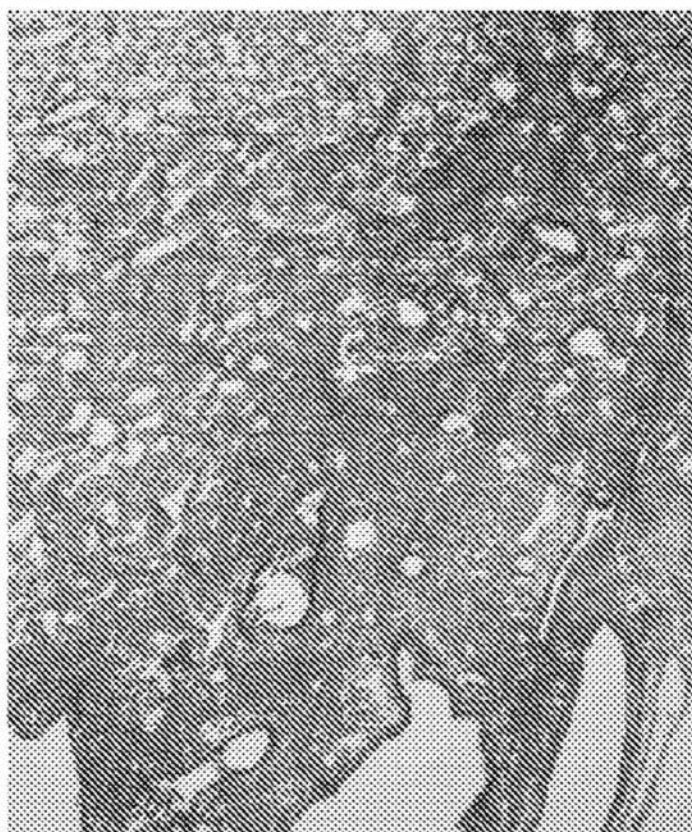


图17

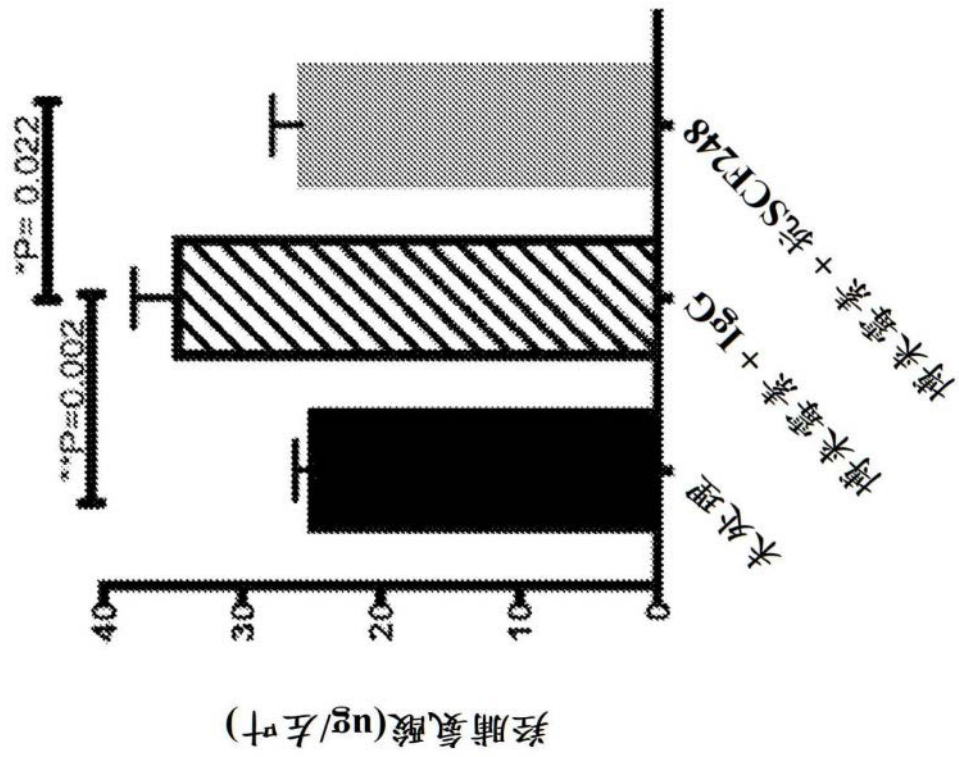


图18

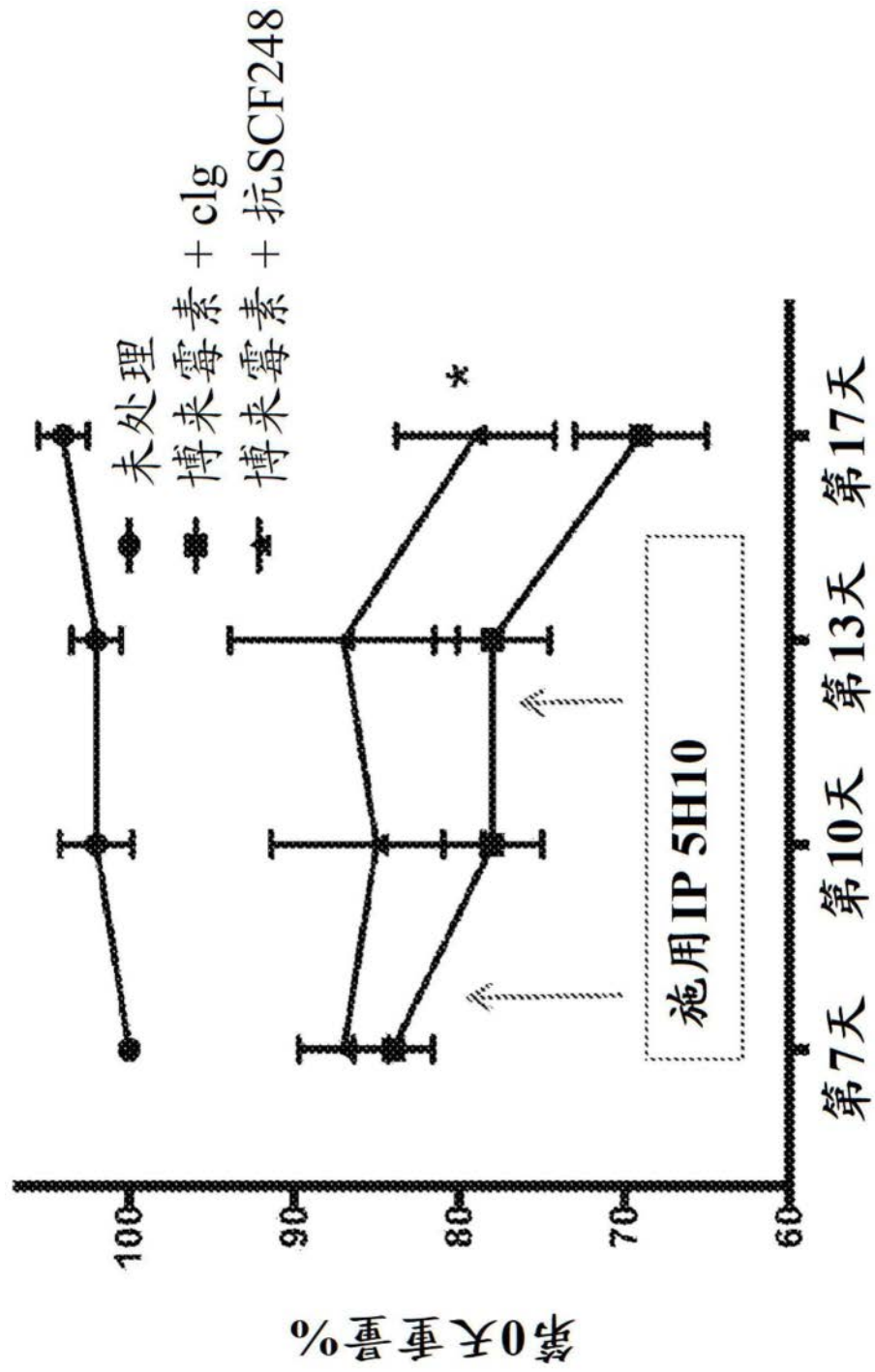


图19

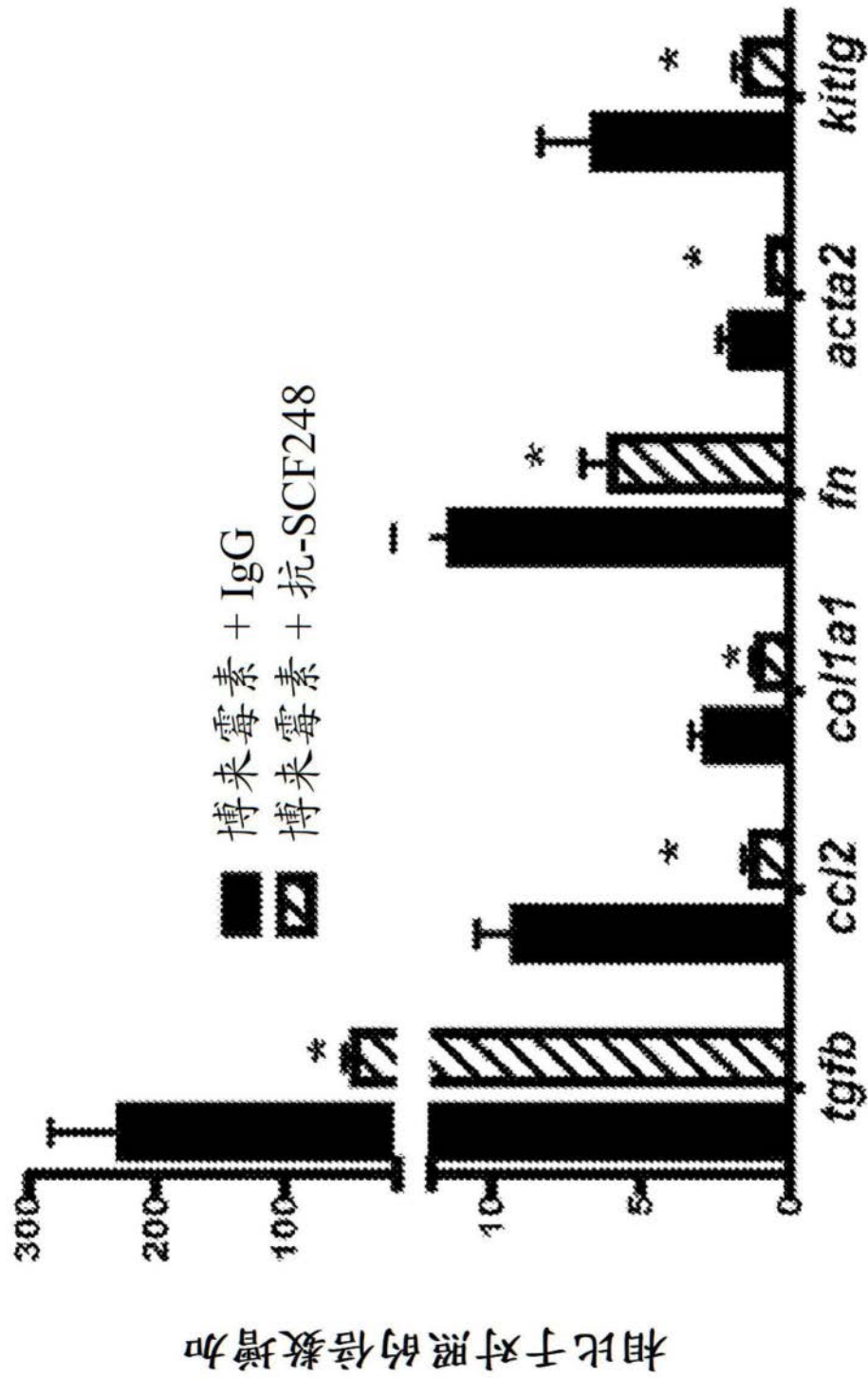


图20

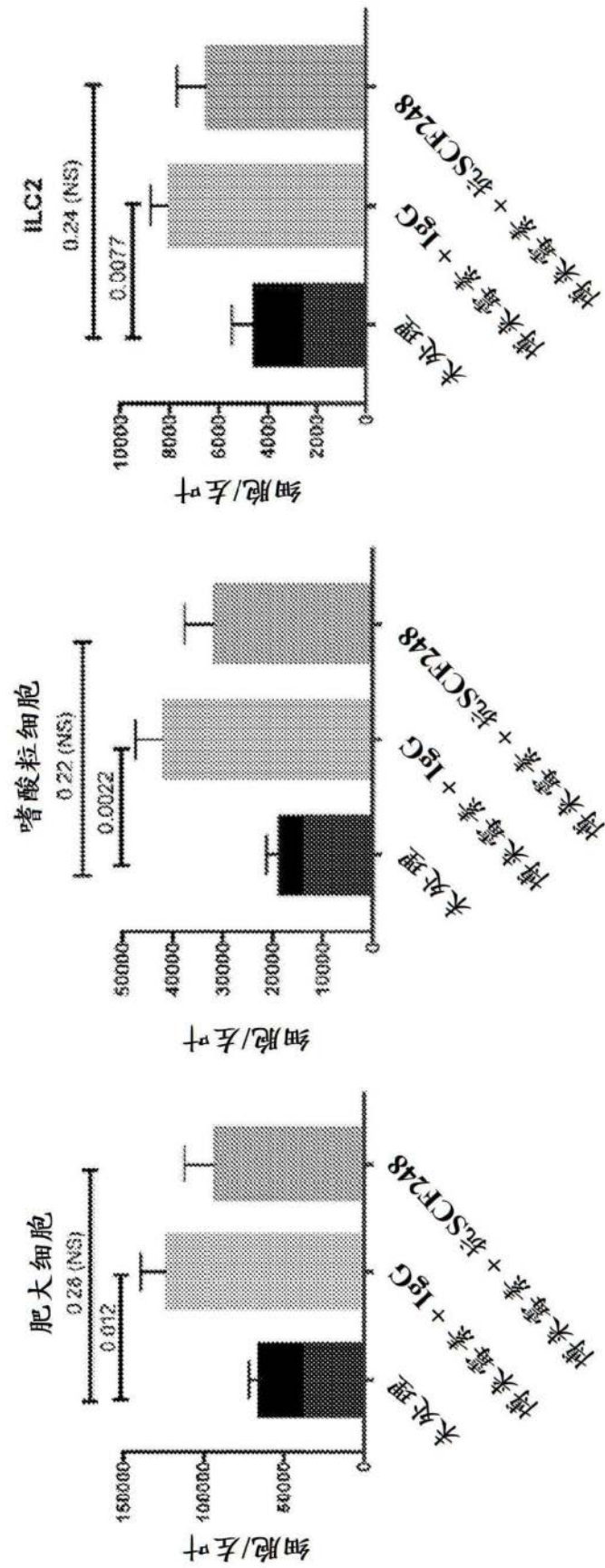


图21

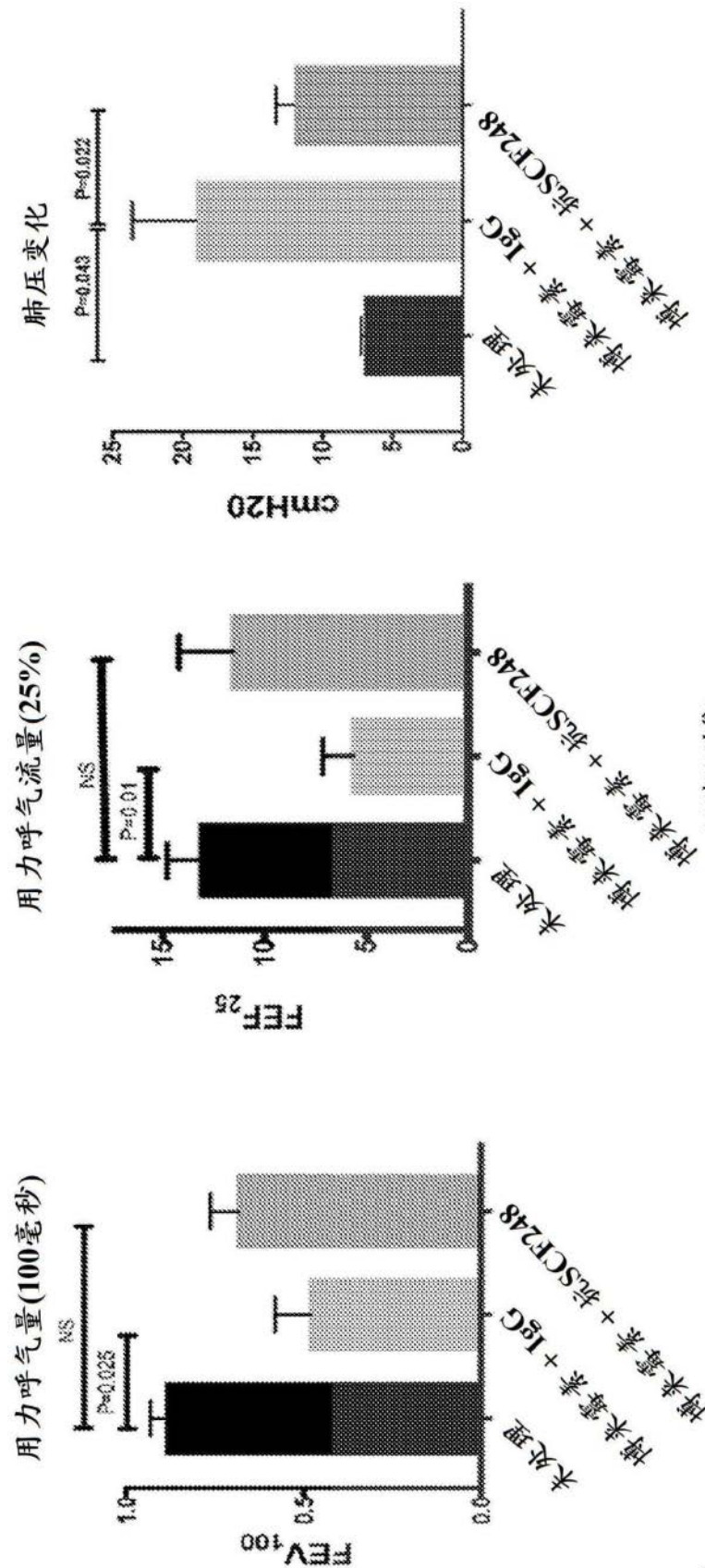


图22

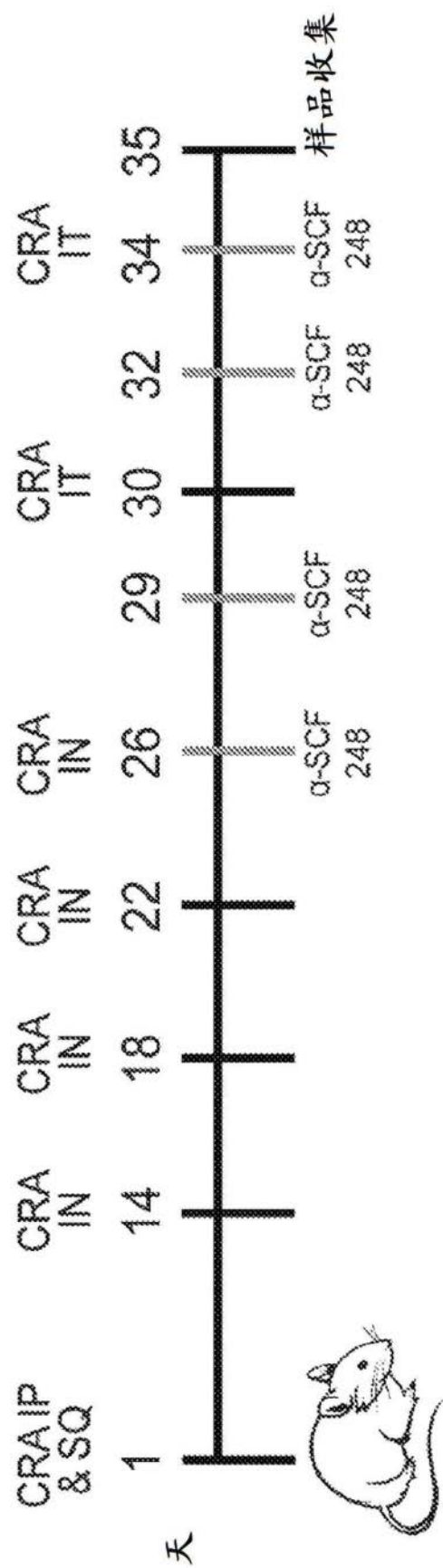


图23

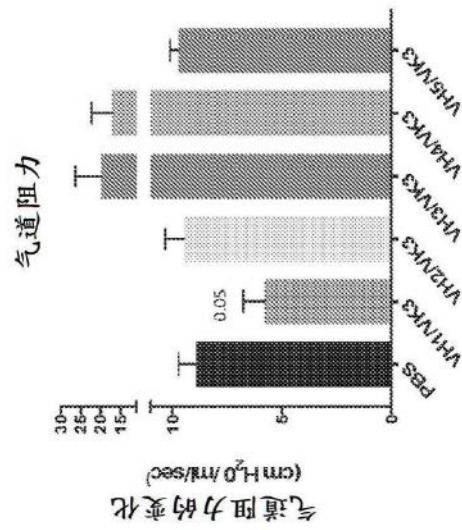


图24A

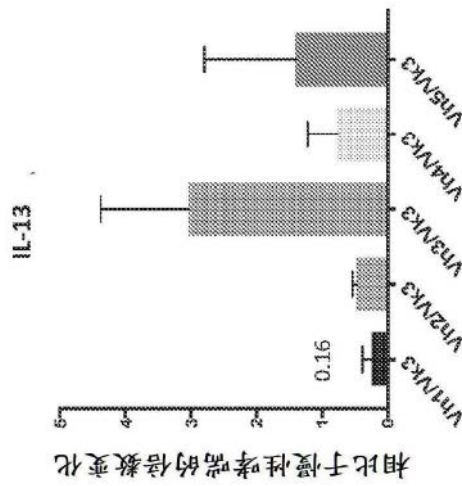


图24B

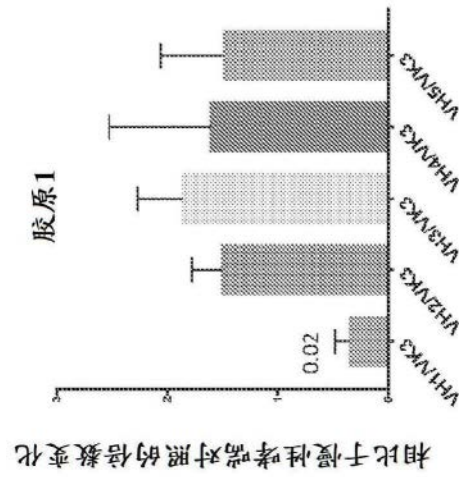


图24C

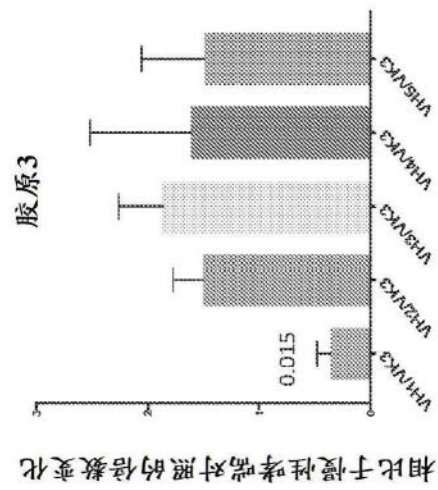


图24D

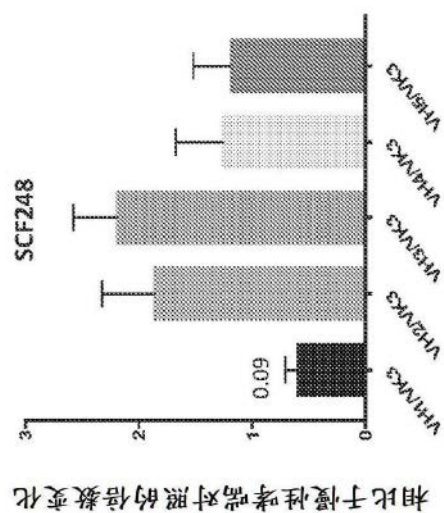


图24E

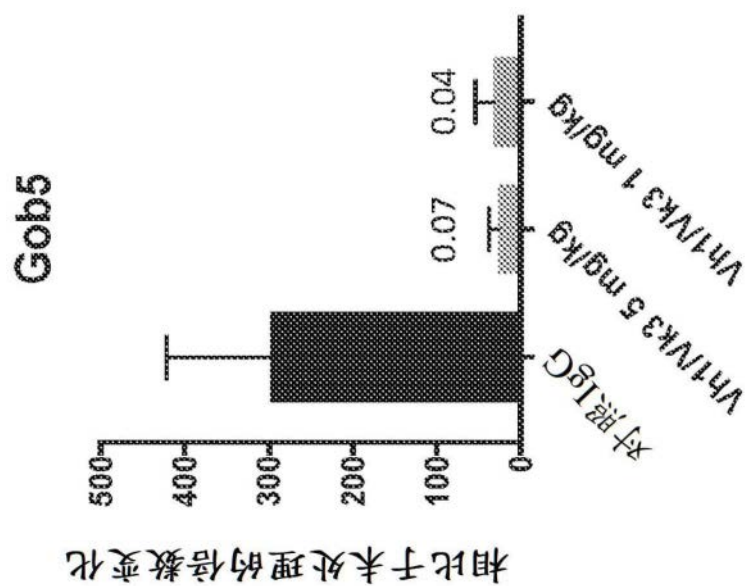


图25A

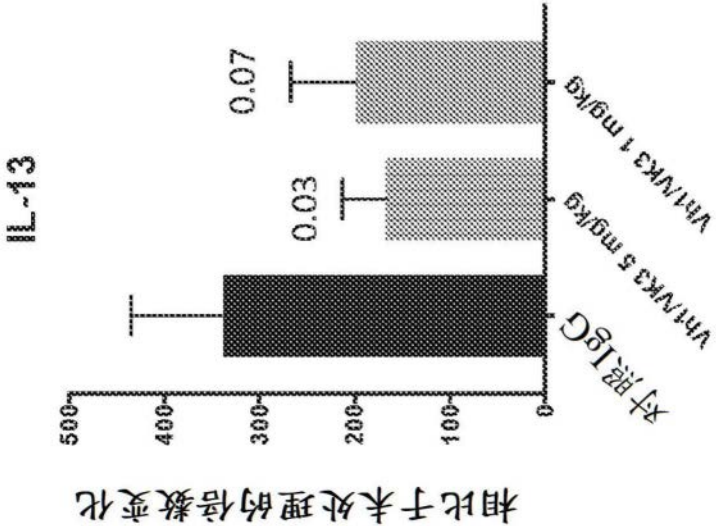


图25B

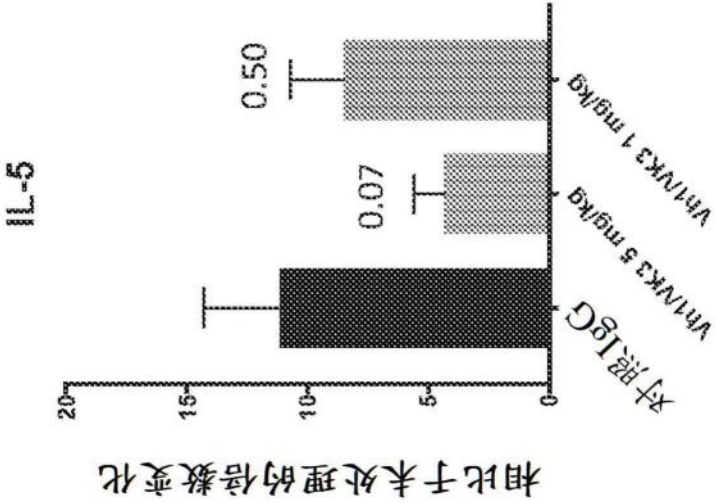


图25C