



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103596979 B

(45)授权公告日 2018.01.26

(21)申请号 201280013552.5

(22)申请日 2012.03.16

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103596979 A

(43)申请公布日 2014.02.19

(30)优先权数据

61/453,390 2011.03.16 US

61/503,871 2011.07.01 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.09.16

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2012/054733 2012.03.16

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/123586 EN 2012.09.20

(73)专利权人 阿尔金-X有限公司

地址 荷兰布雷达

(72)发明人 卡伦·西伦斯 彼得·乌尔里希茨
约翰内斯·约斯特·威廉默斯·德
哈德

托尔斯滕·德赖尔

迈克尔·约翰·斯科特·桑德斯

哈拉尔德·瓦永特

索菲耶·马利亚·埃尔维雷·加布
里埃尔斯

马汉·莫希尔

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 彭鲲鹏 郑斌

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

审查员 段珊

权利要求书2页 说明书83页

序列表90页 附图17页

(54)发明名称

针对CD70的抗体

(57)摘要

本发明涉及以高亲和力与人CD70蛋白相结合并且展示出对肿瘤细胞生长之强效抑制的抗体及其抗原结合片段。

1. 抗体或其抗原结合片段,其与肿瘤细胞表面上表达的人CD70相结合,所述抗体或抗原结合片段包含至少一个重链可变结构域(VH)和至少一个轻链可变结构域(VL),其中可变重链CDR3由SEQ ID NO:50(DAGYSNHVPIFDS)组成;

可变重链CDR2由SEQ ID NO:27(DINNEGTTYYADSVKG)组成;

可变重链CDR1由SEQ ID NO:11(VYYMN)组成;

可变轻链CDR3由SEQ ID NO:160(ALFISNPSVE)组成;

可变轻链CDR2由SEQ ID NO:119(NTNTRHS)组成;以及

可变轻链CDR1由SEQ ID NO:250(GLKSGSVTSDNFPT)或SEQ ID NO:87(GLKSGSVTSTNFPT)组成。

2. 根据权利要求1所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述可变重链CDR3由SEQ ID NO:50(DAGYSNHVPIFDS)组成;

所述可变重链CDR2由SEQ ID NO:27(DINNEGTTYYADSVKG)组成;

所述可变重链CDR1由SEQ ID NO:11(VYYMN)组成;

所述可变轻链CDR3由SEQ ID NO:160(ALFISNPSVE)组成;

所述可变轻链CDR2由SEQ ID NO:119(NTNTRHS)组成;以及

所述可变轻链CDR1由SEQ ID NO:250(GLKSGSVTSDNFPT)组成。

3. 根据权利要求2所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL),所述重链可变结构域由以下组成:SEQ ID NO:223所示的氨基酸序列、或者与SEQ ID NO:223具有至少90%、95%、97%、98%或99%同一性的序列,其中HCDR3由SEQ ID NO:50组成、HCDR2由SEQ ID NO:27组成并且HCDR1由SEQ ID NO:11组成,所述轻链可变结构域由以下组成:SEQ ID NO:241所示的氨基酸序列、或者与SEQ ID NO:241具有至少90%、95%、97%、98%或99%同一性的序列,其中LCDR3由SEQ ID NO:160组成、LCDR2由SEQ ID NO:119组成并且LCDR1由SEQ ID NO:250组成。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的抗体,其为大羊驼-人嵌合抗体,其中所述VH和VL结构域或其一个或更多个CDR来源于大羊驼,并且一个或更多个恒定结构域来源于人免疫球蛋白。

5. 根据权利要求4所述的抗体,其包含人IgG的铰链区、CH2结构域和CH3结构域。

6. 根据权利要求5所述的抗体,其中所述人IgG为人IgG1。

7. 根据权利要求2所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段针对细胞表面上表达人CD70的细胞表现出选自以下的一种或更多种效应子功能:抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)。

8. 根据权利要求2所述的抗体或抗原结合片段,其针对表达CD70的癌细胞表现出抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)、补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体依赖性细胞的吞噬作用(ADCP)中的一种或更多种。

9. 根据权利要求1所述的抗体或抗原结合片段,其与包含天然人Fc结构域的等价抗体相比表现出增强的ADCC功能。

10. 根据权利要求1或2所述的抗体,其为非岩藻糖基化的IgG。

11. 根据权利要求10所述的抗体,其为非岩藻糖基化的人IgG1。

12. 分离的多核苷酸,其编码根据前述权利要求中任一项所述的抗体或抗原结合片段。
13. 包含根据权利要求12所述之多核苷酸的表达载体,所述多核苷酸与允许抗原结合多肽在宿主细胞或无细胞表达系统中表达的调控序列可操作性连接。
14. 宿主细胞或无细胞表达系统,其包含根据权利要求13所述的表达载体。
15. 产生重组抗体或其抗原结合片段的方法,其包括在允许所述抗体或抗原结合片段表达的条件下培养根据权利要求14所述的宿主细胞或无细胞表达系统,以及回收所表达的所述抗体或抗原结合片段。
16. 药物组合物,其包含根据权利要求1至11中任一项所述的抗体或抗原结合片段和至少一种可药用载体。
17. 药物组合物,其包含根据权利要求1至11中任一项所述的抗体或抗原结合片段和至少一种可药用赋形剂。
18. 治疗有效量的根据权利要求1至11中任一项所述的抗体或抗原结合片段在制备用于在人患者中抑制表达CD70之肿瘤细胞生长的药物中的用途。
19. 根据权利要求2或7所述的抗体或抗原结合片段,其用于在人患者中抑制表达CD70之肿瘤细胞的生长。
20. 根据权利要求2或8所述的抗体或抗原结合片段,其用于在人患者中治疗或预防癌症。
21. 根据权利要求20所述应用的抗体或抗原结合片段,其中所述癌症为表现出CD70的低拷贝数表达的癌症,所述癌症选自:大B细胞淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、皮肤T细胞淋巴瘤、胃癌、肺癌、黑素瘤、胶质母细胞瘤和卵巢癌。

针对CD70的抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及抗体及其抗原结合片段,其以高亲和力与人CD70蛋白相结合并且表现出对肿瘤细胞生长的强效抑制。

背景技术

[0002] 细胞因子受体CD27是肿瘤坏死因子受体(TFNR)超家族的成员,其在细胞生长和分化以及凋亡中起作用。CD27的配体是CD70,属于配体的肿瘤坏死因子家族。CD70为193个氨基酸的多肽,其具有20个氨基酸的亲水性N端结构域和包含2个潜在的N连接糖基化位点的C端结构域(Goodwin,R.G.等(1993)Cell 73:447-56;Bowman等(1994)Immunol 152:1756-61)。基于这些特性,确定CD70是具有细胞外C端部分的II型跨膜蛋白。

[0003] CD70在活化的T和B淋巴细胞以及树突状细胞上瞬时地存在(Hintzen等(1994)J.Immunol.152:1762-1773;Oshima等(1998)Int.Immunol.10:517-26;Tesselaar等(2003)J.Immunol.170:33-40)。除了在不同类型的癌症中报道了CD70的表达,所述癌症包括肾细胞癌、转移性乳腺癌、脑肿瘤、白血病、淋巴瘤和鼻咽癌(Junker等(2005)J Urol.173:2150-3;Sloan等(2004)Am J Pathol.164:315-23;Held-Feindt和Mentlein(2002)Int J Cancer 98:352-6;Hishima等(2000)Am J Surg Pathol.24:742-6;Lens等(1999)Br J Haematol.106:491-503)。还提出了CD70与CD27的相互作用在细胞介导的自身免疫疾病和TNF- α 产生的抑制中起作用(Nakajima等(2000)J.Neuroimmunol.109:188-96)。

[0004] 因此,CD70代表了用于治疗癌症、自身免疫疾病和由CD70表达而表征之多种其他疾病的靶标。

[0005] WO 2006/0044643描述了包含抗体效应子结构域(antibody effector domain)的CD70抗体,其可介导ADCC、ADCP、CDC或ADC中的一个或更多个并且在未与细胞抑制剂或细胞毒性剂缀合的情况下针对表达CD70的癌症发挥细胞抑制或细胞毒性作用或者针对表达CD70的免疫性病症发挥免疫抑制作用。本文中示例的抗体基于两种单克隆抗体(称为1F6和2F2)的抗原结合区域。

[0006] WO 2007/038637描述了与CD70结合的全人单克隆抗体。这些抗体表征为以 1×10^{-7} M或更少的 K_D 与人CD70结合。所述抗体还与表达CD70的肾细胞癌肿瘤细胞系(例如786-O)结合并且被其内化。

发明内容

[0007] 本文中提供的是抗体或其抗原结合片段(本文中称为CD70抗体),其与人CD70蛋白质相结合并且表现出与现有技术中描述的CD70抗体不同的且通常优越的特性。这些抗体的优越特性对于在人治疗(特别是治疗表达CD70的癌症以及免疫病症)中的使用是有利的。

[0008] 本文所述CD70抗体的特征为为对人CD70的极高的结合亲和力。与对人治疗提出的最强效现有技术CD70抗体(包括“全人”来源的现有技术CD70抗体)相比,本文中描述的所有

优选实施方案对重组人CD70表现出显著更高的结合亲和力(如通过本文中描述的Biacore™表面等离子体共振测量的)。另外,当与对人治疗提出的现有技术CD70抗体相比时,本文中描述的CD70抗体的所有优选实施方案表现出与人细胞系(尤其是人癌细胞系)表面上表达之CD70的优越(即更高亲和力)结合。与细胞表面CD70的该优越结合对于以“低拷贝数”表达CD70的人癌细胞系尤其相关并且与抗体在人治疗中的使用直接相关。更进一步地,当与对人治疗用途提出的现有技术CD70抗体相比时,本文中描述的CD70抗体的一些优选实施方案表现出与分离自人患者之癌细胞(特别是分离自慢性淋巴细胞性白血病(CLL)患者的癌细胞)实质上提高的结合。

[0009] 因此,在本发明的第一方面中,提供了与人CD70相结合的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段包含至少一个重链可变结构域(VH)和至少一个轻链可变结构域(VL),其中,当作为Fab片段使用本文中描述的标准Biacore™方案测试时,所述VH和VL结构域对人CD70表现出少于 $7 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 的解离速率(off-rate)(由Biacore™测量的 k_{off})。

[0010] 在一个优选的实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含至少一个重链可变结构域(VH)和至少一个轻链可变结构域(VL),其中所述VH和VL结构域对人CD70表现出 $5 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 或更少或者 $2 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 或更少或者 $1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 或更少的解离速率。最优选地,当作为Fab片段测试时,所述CD70抗体将对CD70表现出 $0.4 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 至 $4.8 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 的解离速率。

[0011] 还提供了与人CD70相结合的抗体,所述抗体包含两个Fab区,其中每个Fab区均与人CD70相结合,并且当作为Fab片段测试时,对人CD70表现出 $5 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 或更少或者 $2 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 或更少或者 $1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 或更少且优选 $0.4 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 至 $4.8 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 的解离速率。所述两个Fab区在结合特性方面(例如对人CD70的亲和力)可以不同或者可以是相同的。所述两个Fab区可以与人CD70上同一表位或重叠表位相结合或者它们可以与人CD70上不同的非重叠表位相结合。在氨基酸序列方面,所述两个Fab区可以在VH和VL结构域之一或两个中彼此不同。

[0012] 除了对CD70的极其高结合亲和力之外,本文中提供的CD70抗体的一些优选实施方案可表现出对CD70与其配体CD27之相互作用的强效阻断或抑制。表现出与CD70之高亲和力结合和CD70/CD27相互作用之强效阻断二者的优选CD70抗体作为用于治疗疾病适应症(indication)的治疗剂是特别有利的,所述疾病适应症中CD70/CD27信号转导的阻断增强治疗功效(例如除通过CD70抗体的效应子功能介导细胞杀伤外),例如共表达CD70和CD27的自身免疫疾病和癌症。

[0013] 不是所有本文中描述的CD70抗体除了与CD70的高亲和力结合之外还表现出CD70/CD27相互作用的强效阻断。本文中还描述了这样的许多CD70抗体,其表现出与CD70以非常高的亲和力结合但是没有显示出对CD70/CD27相互作用的显著阻断。这些抗体的特性在本文中的其他部分描述。高亲和力非阻断性CD70抗体的可获得性可以增加/延伸治疗可能性的范围。

[0014] 本文中描述的对人CD70表现出非常高结合亲和力的CD70抗体的一些优选实施方案还表征为对在人治疗中使用提出之现有技术CD70抗体未表现出的结合特性的组合。因此,本文中描述的一些优选CD70抗体的特征为:

[0015] (a) 与人CD70中的氨基酸序列HIQVTLAICSS(SEQ ID NO:342)结合;

[0016] (b) 与恒河猴(*Macaca mulatta*)和食蟹猴(*Macaca cynomolgus*)的CD70同源物有

交叉反应性;

[0017] (c) 与天然人CD70和热变性重组人CD70二者结合。

[0018] 对在人治疗中使用所提出之现有技术抗体未表现出的结合特性的该组合表明与CD70上的新表位的结合,所述新表位与现有技术CD70抗体结合的表位不同。

[0019] 在人药物开发的情况中,一些优选的CD70抗体表现的结合特性的组合是有利的。尤其是,与猴CD70同源物的交叉反应使得能够在灵长类动物模型中对在人治疗中使用提出的CD70抗体进行毒理学研究。

[0020] 本文中描述的一些优选CD70抗体还表现出与作为治疗性抗体产品进行商业制造相关的有利特性。如本文中别处讨论的,本文中提供的一些优选CD70抗体在用于商业制备临床级治疗性抗体产品的重组表达系统中表现出极高水平的表达。采用一些优选CD70抗体可实现的表达水平远远超过了甚至对于“全人”治疗性抗体产品通常实现的水平。另外,一些优选的CD70抗体产品(以适合用于在人治疗中使用的方式重组表达产生)表现出显著的热稳定性,其优于通常的治疗性抗体产品。

[0021] 本文中提供的对人CD70具有优越的结合亲和力以及上文所列的其他有利特性的CD70抗体为骆驼科动物(camelid)来源的(例如,大羊驼(llama)来源的)。骆驼科动物来源的CD70抗体可以是分离的或重组表达的单克隆抗体。一些优选的实施方案可以是人源化(或种系化)单克隆抗体(例如骆驼科动物来源之抗体的人源化变体)、嵌合抗体(例如骆驼科动物-人嵌合抗体)或人源化嵌合抗体(例如包含骆驼科动物VH和VL结构域之人源化变体以及人抗体之恒定结构域的嵌合抗体)。

[0022] 骆驼科动物来源的CD70抗体可包含从骆驼科(Camelidae)家族物种的VH结构域或VL结构域获得的至少一个高变环或互补决定区。在一个特定的实施方案中,CD70抗体或其抗原结合片段可包含重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL),其中所述VH和VL结构域或者其一个或更多个CDR是骆驼科动物来源的。在一些特定的实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段可包含大羊驼VH和VL结构域或大羊驼VH和VL结构域的人种系化变体。该抗体或抗原结合片段可表现出本文所定义的“高人同源性”。

[0023] 本文中描述的骆驼科动物来源的CD70抗体通常表现出与最接近的匹配人抗体种系序列具有至少90%(例如,91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)序列同一性的VH和/或VL区氨基酸序列。

[0024] 本发明的又一些优选实施方案包括骆驼科动物来源之CD70抗体的人源化(或人种系化)变体。尤其是,本发明提供了本文中所述大羊驼来源之CD70抗体的人源化或人种系化变体。

[0025] 在本发明的又一个方面中,提供了结合人CD70的嵌合骆驼科动物-人抗体,其中所述抗体的抗原结合部分(例如其VH和/或VL结构域或CDR)是骆驼科动物来源的并且所述抗体的恒定区来源于人抗体。尤其是,本发明提供了结合人CD70的嵌合大羊驼-人抗体。

[0026] 在本发明的又一个方面中,提供了结合人CD70的嵌合骆驼科动物-人抗体的人源化变体,其中所述抗体的抗原结合部分(例如其VH和/或VL结构域或CDR)是骆驼科动物来源之序列的人源化变体,并且抗体的恒定区来源于人抗体。尤其是,本发明提供了结合人CD70的嵌合大羊驼-人抗体的人源化变体。

[0027] 通过参照特定结构特征在以下限定CD70抗体或其抗原结合片段的一些优选(但非

限制性)实施方案,所述结构特征即CDR (SEQ ID NO:49~59、262或263 (重链CDR3) 或者SEQ ID NO:26~37、249、258或259 (重链CDR2) 或者SEQ ID NO:10~20、248、256或257 (重链CDR1) 中的一个或多个,或者SEQ ID NO:148~168、271或273 (轻链CDR3) 或者SEQ ID NO:109~128或270 (轻链CDR2) 或者SEQ ID NO:77~95或250~253、267或268 (轻链CDR1) 所示的CDR序列之一) 或整个可变结构域 (SEQ ID NO:177~188、212~223、274或275 (VH) 或SEQ ID NO:189~211、230~245、276或277 (VL) 中的一个或多个) 的具体氨基酸序列。当作为Fab片段测试时,所有这些抗体均以高亲和力与人CD70相结合,并且对人CD70表现出 $5 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 或更少、通常为 $0.4 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 至 $4.8 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 的解离速率。

[0028] 本发明还提供了本文所限定的这些抗体的人源化/种系化变体以及亲和变体和包含保守氨基酸替换的变体。特别提供的是与人抗体恒定结构域 (特别是人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4) 融合的、包含骆驼科动物来源之VH和VL结构域或其人种系化变体的嵌合抗体。上文定义的重链可变结构域可用作单结构域抗体或者可包含在常规四链抗体或其他抗原结合蛋白内,例如Fab、Fab'、F(ab')₂、双特异性Fab' 以及Fv片段、双抗体(diabodies)、线性抗体、单链抗体分子、单链可变片段(scFv) 和多特异性抗体。

[0029] CD70抗体的一些优选实施方案为包含这样的重链可变结构域的抗体或其抗原结合片段,所述重链可变结构域包含可变重链CDR3、可变重链CDR2和可变重链CDR1,其中所述可变重链CDR3包含选自以下的氨基酸序列:

[0030] SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:262和SEQ ID NO:263及所示序列中任一个的序列变体,其中所述序列变体在所示序列中包含一个、两个或三个氨基酸替换;

[0031] 所述可变重链CDR2任选地包含选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:306 [X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉YYADSVKX₁₀]的氨基酸序列,其中

[0032] X₁是任意氨基酸,优选为D、T、S或E,

[0033] X₂是任意氨基酸,优选为I,

[0034] X₃是任意氨基酸,优选为N、S、T或Y,

[0035] X₄是任意氨基酸,优选为N、M、S或T,

[0036] X₅是任意氨基酸,优选为E、D、Y或H,

[0037] X₆是任意氨基酸,优选为G、D、S或N,

[0038] X₇是任意氨基酸,优选为G、Y、S、D或M,

[0039] X₈是任意氨基酸,优选为T、E、S、N、Y或R,

[0040] X₉是任意氨基酸,优选为T、A或R,并且

[0041] X₁₀是任意氨基酸,优选为G或S,

[0042] 以及SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:249、SEQ ID NO:258和SEQ ID NO:259及所示序列中任一个之序列变体的氨基酸序列,其中所述序列变体在所示序列中包含一个、两个或三个氨基酸替换;以及

[0043] 所述可变重链CDR1任选地包含选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:307 [X₁YYMN]的氨基酸序列,其中

[0044] X₁是任意氨基酸,优选为V、G或A,

- [0045] SEQ ID NO:308[X₁X₂AMS]的氨基酸序列,其中
- [0046] X₁是任意氨基酸,优选为D、T、S、N或G并且
- [0047] X₂是任意氨基酸,优选为Y、S或P,
- [0048] 以及SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:248、SEQ ID NO:256和SEQ ID NO:257及所示序列中任一个之序列变体的氨基酸序列,其中所述序列变体在所示序列中包含一个、两个或三个氨基酸替换。
- [0049] 重链可变结构域可包含与可变重链CDR2序列(HCDR2)中任一个和可变重链CDR1序列(HCDR1)中任一个相组合的所列可变重链CDR3序列(HCDR3)中的任一个。然而,HCDR3和HCDR2和HCDR1的某些组合是尤其优选的,这些是来源于单一常见VH结构域的“天然”组合。这些优选的组合列于表6和表14A中。
- [0050] 所述抗体或其抗原结合片段可额外地包含轻链可变结构域(VL),其与VH结构域配对以形成抗原结合结构域。优选的轻链可变结构域是包含可变轻链CDR3、可变轻链CDR2和可变轻链CDR1的那些,其中所述可变轻链CDR3包含选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:148、SEQ ID NO:149、SEQ ID NO:150、SEQ ID NO:151、SEQ ID NO:152、SEQ ID NO:153、SEQ ID NO:154、SEQ ID NO:155、SEQ ID NO:156、SEQ ID NO:157、SEQ ID NO:158、SEQ ID NO:159、SEQ ID NO:160、SEQ ID NO:161、SEQ ID NO:162、SEQ ID NO:163、SEQ ID NO:164、SEQ ID NO:165、SEQ ID NO:166、SEQ ID NO:166、SEQ ID NO:168、SEQ ID NO:271和SEQ ID NO:273及所示序列中任一个之序列变体,其中所述序列变体在所示序列中包含一个、两个或三个氨基酸替换;
- [0051] 所述可变轻链CDR2任选地包含选自以下的氨基酸序列:
- [0052] (a) SEQ ID NO:310[X₁TX₂X₃RHS]的氨基酸序列,其中
- [0053] X₁是任意氨基酸,优选为N或S,
- [0054] X₂是任意氨基酸,优选为N、S或A,并且
- [0055] X₃是任意氨基酸,优选为S、N或T,
- [0056] (b) SEQ ID NO:311[YYSDSX₁X₂X₃QX₄S]的氨基酸序列,其中
- [0057] X₁是任意氨基酸,优选为Y、V或L,
- [0058] X₂是任意氨基酸,优选为K或S,
- [0059] X₃是任意氨基酸,优选为H或N,并且
- [0060] X₄是任意氨基酸,优选为G或S
- [0061] (c) SEQ ID NO:312[X₁NX₂NRPS]的氨基酸序列,其中
- [0062] X₁是任意氨基酸,优选为V、I或Y,并且
- [0063] X₂是任意氨基酸,优选为N或T,
- [0064] (d) SEQ ID NO:313[GDNX₁X₂PL]的氨基酸序列,其中
- [0065] X₁是任意氨基酸,优选为Y,并且
- [0066] X₂是任意氨基酸,优选为R或M,
- [0067] (e) SEQ ID NO:314[X₁DDX₂RPS]的氨基酸序列,其中
- [0068] X₁是任意氨基酸,优选为D或G,并且
- [0069] X₂是任意氨基酸,优选为S或I,
- [0070] 以及SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:120和SEQ ID NO:270及所示序

列中任一之序列变体的氨基酸序列,其中所述序列变体在所示序列中包含一个、两个或三个氨基酸替换;并且

[0071] 所述可变轻链CDR1任选地包含选自以下的氨基酸序列:

[0072] (a) SEQ ID NO:315 [GLX₁SGSX₂TX₃X₄X₅YPX₆]的氨基酸序列,其中

[0073] X₁是任意氨基酸,优选为S或T,

[0074] X₂是任意氨基酸,优选为V或A,

[0075] X₃是任意氨基酸,优选为S或T,

[0076] X₄是任意氨基酸,优选为S、T或G,

[0077] X₅是任意氨基酸,优选为N或H,

[0078] X₆是任意氨基酸,优选为G、D或E,

[0079] (b) SEQ ID NO:316 [TLX₁SX₂X₃X₄X₅GX₆YDIS]的氨基酸序列,其中

[0080] X₁是任意氨基酸,优选为S、N或I,

[0081] X₂是任意氨基酸,优选为G或A,

[0082] X₃是任意氨基酸,优选为N或D,

[0083] X₄是任意氨基酸,优选为N或S,

[0084] X₅是任意氨基酸,优选为V或I,

[0085] X₆是任意氨基酸,优选为N或S,

[0086] (c) SEQ ID NO:317 [QGGNLX₁LYGAN]的氨基酸序列,其中

[0087] X₁是任意氨基酸,优选为G或W,

[0088] (d) SEQ ID NO:318 [RGDX₁LX₂X₃YX₄X₅N]的氨基酸序列,其中

[0089] X₁是任意氨基酸,优选为S或T,

[0090] X₂是任意氨基酸,优选为E或R,

[0091] X₃是任意氨基酸,优选为R或N,

[0092] X₄是任意氨基酸,优选为G或H,

[0093] X₅是任意氨基酸,优选为T或A,

[0094] (e) SEQ ID NO:319 [GX₁X₂SGSVTSX₃NFPT]的氨基酸序列,其中

[0095] X₁是任意氨基酸,优选为V或L,

[0096] X₂是任意氨基酸,优选为K或T,

[0097] X₃是任意氨基酸,优选为T或D,

[0098] 以及SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:250、SEQ ID NO:251、SEQ ID NO:252、SEQ ID NO:253、SEQ ID NO:267和SEQ ID NO:268及所示序列中任一之序列变体的氨基酸序列,其中所述序列变体在所示序列中包含一个、两个或三个氨基酸替换。

[0099] 轻链可变结构域可包含与所列可变轻链CDR2序列(LCDR2)中任一和可变轻链CDR1序列(LCDR1)中任一相组合的所列可变轻链CDR3序列(LCDR3)中的任一。然而,LCDR3和LCDR2和LCDR1的某些组合是尤其优选的,这些是来源于单一常见VL结构域的“天然”组合。这些优选的组合列于表7和表15A中。

[0100] 包含与VL结构域配对以形成CD70抗原之结合位点的VH结构域的任意给定CD70抗体或其抗原结合片段将包括以下6个CDR的组合:可变重链CDR3(HCDR3)、可变重链CDR2

(HCDR2)、可变重链CDR1 (HCDR1)、可变轻链CDR3 (LCDR3)、可变轻链CDR2 (LCDR2) 和可变轻链CDR1 (LCDR1)。尽管选自上述所列CDR序列组的6个CDR的所有组合均为可允许的并且在本发明的范围内,但是6个CDR的某些组合是尤其优选的;这些是表现出与人CD70高亲和力结合的单一Fab中的“天然”组合。

[0101] 6个CDR的一些优选组合包括但不限于,选自以下的可变重链CDR3 (HCDR3)、可变重链CDR2 (HCDR2)、可变重链CDR1 (HCDR1)、可变轻链CDR3 (LCDR3)、可变轻链CDR2 (LCDR2) 和可变轻链CDR1 (LCDR1) 的组合:

[0102] (i) 包含SEQ ID NO:50的HCDR3、包含SEQ ID NO:27的HCDR2、包含SEQ ID NO:11的HCDR1、包含SEQ ID NO:160的LCDR3、包含SEQ ID NO:119的LCDR2和包含SEQ ID NO:250的LCDR1;

[0103] (ii) 包含SEQ ID NO:49的HCDR3、包含SEQ ID NO:26的HCDR2、包含SEQ ID NO:10的HCDR1、包含SEQ ID NO:148的LCDR3、包含SEQ ID NO:109的LCDR2和包含SEQ ID NO:77的LCDR1;

[0104] (iii) 包含SEQ ID NO:50的HCDR3、包含SEQ ID NO:27的HCDR2、包含SEQ ID NO:11的HCDR1、包含SEQ ID NO:149的LCDR3、包含SEQ ID NO:110的LCDR2和包含SEQ ID NO:78的LCDR1;

[0105] (iv) 包含SEQ ID NO:50的HCDR3、包含SEQ ID NO:28的HCDR2、包含SEQ ID NO:11的HCDR1、包含SEQ ID NO:150的LCDR3、包含SEQ ID NO:111的LCDR2和包含SEQ ID NO:79的LCDR1;

[0106] (v) 包含SEQ ID NO:50的HCDR3、包含SEQ ID NO:28的HCDR2、包含SEQ ID NO:11的HCDR1、包含SEQ ID NO:151的LCDR3、包含SEQ ID NO:110的LCDR2和包含SEQ ID NO:80的LCDR1;

[0107] (vi) 包含SEQ ID NO:51的HCDR3、包含SEQ ID NO:29的HCDR2、包含SEQ ID NO:12的HCDR1、包含SEQ ID NO:152的LCDR3、包含SEQ ID NO:110的LCDR2和包含SEQ ID NO:80的LCDR1;

[0108] (vii) 包含SEQ ID NO:52的HCDR3、包含SEQ ID NO:30的HCDR2、包含SEQ ID NO:13的HCDR1、包含SEQ ID NO:153的LCDR3、包含SEQ ID NO:112的LCDR2和包含SEQ ID NO:81的LCDR1;

[0109] (viii) 包含SEQ ID NO:53的HCDR3、包含SEQ ID NO:31的HCDR2、包含SEQ ID NO:14的HCDR1、包含SEQ ID NO:154的LCDR3、包含SEQ ID NO:113的LCDR2和包含SEQ ID NO:82的LCDR1;

[0110] (ix) 包含SEQ ID NO:54的HCDR3、包含SEQ ID NO:32的HCDR2、包含SEQ ID NO:15的HCDR1、包含SEQ ID NO:155的LCDR3、包含SEQ ID NO:114的LCDR2和包含SEQ ID NO:83的LCDR1;

[0111] (x) 包含SEQ ID NO:55的HCDR3、包含SEQ ID NO:33的HCDR2、包含SEQ ID NO:16的HCDR1、包含SEQ ID NO:156的LCDR3、包含SEQ ID NO:115的LCDR2和包含SEQ ID NO:84的LCDR1;

[0112] (xi) 包含SEQ ID NO:56的HCDR3、包含SEQ ID NO:34的HCDR2、包含SEQ ID NO:17的HCDR1、包含SEQ ID NO:157的LCDR3、包含SEQ ID NO:116的LCDR2和包含SEQ ID NO:85的

LCDR1;

[0113] (xii) 包含SEQ ID NO:57的HCDR3、包含SEQ ID NO:35的HCDR2、包含SEQ ID NO:18的HCDR1、包含SEQ ID NO:158的LCDR3、包含SEQ ID NO:117的LCDR2和包含SEQ ID NO:84的LCDR1;

[0114] (xiii) 包含SEQ ID NO:58的HCDR3、包含SEQ ID NO:36的HCDR2、包含SEQ ID NO:19的HCDR1、包含SEQ ID NO:159的LCDR3、包含SEQ ID NO:118的LCDR2和包含SEQ ID NO:86的LCDR1;

[0115] (xiv) 包含SEQ ID NO:50的HCDR3、包含SEQ ID NO:27的HCDR2、包含SEQ ID NO:11的HCDR1、包含SEQ ID NO:161的LCDR3、包含SEQ ID NO:120的LCDR2和包含SEQ ID NO:88的LCDR1;

[0116] (xv) 包含SEQ ID NO:50的HCDR3、包含SEQ ID NO:27的HCDR2、包含SEQ ID NO:11的HCDR1、包含SEQ ID NO:162的LCDR3、包含SEQ ID NO:121的LCDR2和包含SEQ ID NO:89的LCDR1;

[0117] (xvi) 包含SEQ ID NO:50的HCDR3、包含SEQ ID NO:27的HCDR2、包含SEQ ID NO:11的HCDR1、包含SEQ ID NO:163的LCDR3、包含SEQ ID NO:122的LCDR2和包含SEQ ID NO:90的LCDR1;

[0118] (xvii) 包含SEQ ID NO:51的HCDR3、包含SEQ ID NO:29的HCDR2、包含SEQ ID NO:12的HCDR1、包含SEQ ID NO:164的LCDR3、包含SEQ ID NO:123的LCDR2和包含SEQ ID NO:91的LCDR1;

[0119] (xviii) 包含SEQ ID NO:51的HCDR3、包含SEQ ID NO:29的HCDR2、包含SEQ ID NO:12的HCDR1、包含SEQ ID NO:164的LCDR3、包含SEQ ID NO:124的LCDR2和包含SEQ ID NO:91的LCDR1;

[0120] (xix) 包含SEQ ID NO:59的HCDR3、包含SEQ ID NO:37的HCDR2、包含SEQ ID NO:12的HCDR1、包含SEQ ID NO:165的LCDR3、包含SEQ ID NO:125的LCDR2和包含SEQ ID NO:92的LCDR1;

[0121] (xx) 包含SEQ ID NO:59的HCDR3、包含SEQ ID NO:37的HCDR2、包含SEQ ID NO:20的HCDR1、包含SEQ ID NO:165的LCDR3、包含SEQ ID NO:126的LCDR2和包含SEQ ID NO:93的LCDR1;

[0122] (xxi) 包含SEQ ID NO:59的HCDR3、包含SEQ ID NO:37的HCDR2、包含SEQ ID NO:20的HCDR1、包含SEQ ID NO:166的LCDR3、包含SEQ ID NO:127的LCDR2和包含SEQ ID NO:92的LCDR1;

[0123] (xxii) 包含SEQ ID NO:59的HCDR3、包含SEQ ID NO:37的HCDR2、包含SEQ ID NO:20的HCDR1、包含SEQ ID NO:167的LCDR3、包含SEQ ID NO:128的LCDR2和包含SEQ ID NO:94的LCDR1;

[0124] (xxiii) 包含SEQ ID NO:59的HCDR3、包含SEQ ID NO:37的HCDR2、包含SEQ ID NO:20的HCDR1、包含SEQ ID NO:168的LCDR3、包含SEQ ID NO:110的LCDR2和包含SEQ ID NO:95的LCDR1;

[0125] (xxiv) 包含SEQ ID NO:262的HCDR3、包含SEQ ID NO:258的HCDR2、包含SEQ ID NO:256的HCDR1、包含SEQ ID NO:271的LCDR3、包含SEQ ID NO:110的LCDR2和包含SEQ ID

NO:267的LCDR1;

[0126] (xxv) 包含SEQ ID NO:263的HCDR3、包含SEQ ID NO:259的HCDR2、包含SEQ ID NO:257的HCDR1、包含SEQ ID NO:273的LCDR3、包含SEQ ID NO:270的LCDR2和包含SEQ ID NO:268的LCDR1。

[0127] 表现出与人CD70高亲和力结合的其他优选CD70抗体包括分离的抗体或其抗原结合片段,其包含具有选自以下之氨基酸序列的重链可变结构域:SEQ ID NO:177、SEQ ID NO:178、SEQ ID NO:179、SEQ ID NO:180、SEQ ID NO:181、SEQ ID NO:182、SEQ ID NO:183、SEQ ID NO:184、SEQ ID NO:185、SEQ ID NO:186、SEQ ID NO:187、SEQ ID NO:188、SEQ ID NO:212、SEQ ID NO:213、SEQ ID NO:214、SEQ ID NO:215、SEQ ID NO:216、SEQ ID NO:217、SEQ ID NO:218、SEQ ID NO:219、SEQ ID NO:220、SEQ ID NO:221、SEQ ID NO:222、SEQ ID NO:223、SEQ ID NO:224、SEQ ID NO:225、SEQ ID NO:226、SEQ ID NO:227、SEQ ID NO:228、SEQ ID NO:229、SEQ ID NO:274和SEQ ID NO:275的氨基酸序列以及与所示序列之一表现出至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列;以及任选地包含具有选自以下之氨基酸序列的轻链可变结构域:SEQ ID NO:189、SEQ ID NO:190、SEQ ID NO:191、SEQ ID NO:192、SEQ ID NO:193、SEQ ID NO:194、SEQ ID NO:195、SEQ ID NO:196、SEQ ID NO:197、SEQ ID NO:198、SEQ ID NO:199、SEQ ID NO:200、SEQ ID NO:201、SEQ ID NO:202、SEQ ID NO:203、SEQ ID NO:204、SEQ ID NO:205、SEQ ID NO:206、SEQ ID NO:207、SEQ ID NO:208、SEQ ID NO:209、SEQ ID NO:210、SEQ ID NO:211、SEQ ID NO:223、SEQ ID NO:230、SEQ ID NO:231、SEQ ID NO:232、SEQ ID NO:233、SEQ ID NO:234、SEQ ID NO:234、SEQ ID NO:236、SEQ ID NO:237、SEQ ID NO:238、SEQ ID NO:239、SEQ ID NO:240、SEQ ID NO:241、SEQ ID NO:242、SEQ ID NO:243、SEQ ID NO:244、SEQ ID NO:245、SEQ ID NO:245、SEQ ID NO:247、SEQ ID NO:248、SEQ ID NO:276和SEQ ID NO:277的氨基酸序列以及与所示序列之一表现出至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0128] 尽管选自上文所列VH和VL结构域序列组之VH结构域和VL结构域的所有可能配对均是可允许的并且在本发明的范围内,但是某些VH和VL的组合是尤其优选的;这些是表现出与人CD70高亲和力结合的单一Fab内的“天然”组合。因此,表现出高亲和力CD70结合的一些优选CD70抗体或其抗原结合片段是包含重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)之组合的那些,其中所述组合选自:

[0129] (i) 包含SEQ ID NO:223之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:241之氨基酸序列的轻链可变结构域;

[0130] (ii) 包含SEQ ID NO:177之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:189之氨基酸序列的轻链可变结构域;

[0131] (iii) 包含SEQ ID NO:178之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:190之氨基酸序列的轻链可变结构域;

[0132] (iv) 包含SEQ ID NO:179之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:191之氨基酸序列的轻链可变结构域;

[0133] (v) 包含SEQ ID NO:179之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:192之氨基酸序列的轻链可变结构域;

[0134] (vi) 包含SEQ ID NO:180之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:193

之氨基酸序列的轻链可变结构域；

[0135] (vii) 包含SEQ ID NO:181之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:194之氨基酸序列的轻链可变结构域；

[0136] (viii) 包含SEQ ID NO:182之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:195之氨基酸序列的轻链可变结构域；

[0137] (ix) 包含SEQ ID NO:183之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:196之氨基酸序列的轻链可变结构域；

[0138] (x) 包含SEQ ID NO:184之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:197之氨基酸序列的轻链可变结构域；

[0139] (xi) 包含SEQ ID NO:185之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:198之氨基酸序列的轻链可变结构域；

[0140] (xii) 包含SEQ ID NO:186之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:199之氨基酸序列的轻链可变结构域；

[0141] (xiii) 包含SEQ ID NO:187之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:200之氨基酸序列的轻链可变结构域；

[0142] (xiv) 包含SEQ ID NO:178之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:201之氨基酸序列的轻链可变结构域；

[0143] (xv) 包含SEQ ID NO:178之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:202之氨基酸序列的轻链可变结构域；

[0144] (xvi) 包含SEQ ID NO:178之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:203之氨基酸序列的轻链可变结构域；

[0145] (xvii) 包含SEQ ID NO:178之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:204之氨基酸序列的轻链可变结构域；

[0146] (xviii) 包含SEQ ID NO:180之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:205之氨基酸序列的轻链可变结构域；

[0147] (xix) 包含SEQ ID NO:180之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:206之氨基酸序列的轻链可变结构域；

[0148] (xx) 包含SEQ ID NO:188之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:207之氨基酸序列的轻链可变结构域；

[0149] (xxi) 包含SEQ ID NO:188之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:208之氨基酸序列的轻链可变结构域；

[0150] (xxii) 包含SEQ ID NO:188之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:209之氨基酸序列的轻链可变结构域；

[0151] (xxiii) 包含SEQ ID NO:188之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:210之氨基酸序列的轻链可变结构域；

[0152] (xxiv) 包含SEQ ID NO:188之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:211之氨基酸序列的轻链可变结构域；

[0153] (xxv) 包含SEQ ID NO:274之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:276之氨基酸序列的轻链可变结构域；

[0154] (xxvi) 包含SEQ ID NO:275之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:277之氨基酸序列的轻链可变结构域。

[0155] 上文所列每种特定VH/VL组合,将具有与所示VH结构域序列有至少90%、92%、95%、97%或99%同一性之氨基酸序列的VH结构域与具有与所示VL结构域序列有至少90%、92%、95%、97%或99%同一性之氨基酸序列的VL结构域相组合也是可允许的并且在本发明的范围内。

[0156] 在前述段落中和本文中别处,基于与所示参照序列(具有给定SEQ ID NO)的序列同一性%限定了抗体/抗原结合片段的结构。在这种情况下,两条氨基酸序列之间的序列同一性%可通过比较以最佳方式比对的这两条序列来确定,其中待比较的氨基酸序列可包含相对于参照序列的添加或缺失以进行这两条序列之间的最佳比对。通过以下来计算同一性百分比:确定两条序列之间氨基酸残基相同的一致位置的数目,用该一致位置的数目除以比较窗口中的位置的总数目,并将所得结果乘以100以得到这两条序列之间的同一性百分比。通常,比较窗口对应于正被比较序列的全长。例如,可以使用可得自站点<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>的BLAST程序“BLAST-2序列”(Tatusova等,“Blast 2sequences-a new tool for comparing protein and nucleotide sequences”,FEMS Microbiol Lett.174:247-250),所使用的参数为默认给出的那些(特别是参数“开放缺口罚分”:5,和“延伸缺口罚分”:2;所选择的矩阵为例如由程序所提出的矩阵“BLOSUM 62”),通过该程序直接计算待比较的两条序列之间的同一性百分比。

[0157] 表现出特别有利的特性(包括与人CD70以极高亲和力结合)组合的本文中提供的最优选CD70抗体是基于以下的抗原结合部分的那些:在所附实施例中表示为27B3的大羊驼来源的Fab以及27B3的人种系化变体(包括在所附实施例中鉴定的种系化变体)。27B3及其种系化变体(特别是基于变体41D12之CDR或完整可变结构域的变体)表现出极其有利的特性组合,总结如下:与重组人CD70以高亲和力结合,与细胞表面CD70的强结合(尤其是与癌细胞系(特别是以“低拷贝数”表达CD70的细胞系)上所表达CD70结合)和与从患者样品(CLL)中分离的癌细胞强结合、对CD70/CD27相互作用的强效阻断,强效的效应子功能-特别是当与人IgG1恒定区作为嵌合体表达时和尤其是当作为非岩藻糖基化IgG1表达时,与恒河猴和食蟹猴的CD70同源物有交叉反应性(使得能够在灵长类物种中进行毒理学研究),结合天然(即细胞表面)和热变性两种CD70,在某些癌细胞系上的部分或低水平内化。所有这些特征相组合使得41D12(以及甚至其他27B3变体和表现出类似特性的本文中描述的其他CD70抗体)成为在治疗CD70相关疾病(尤其是表达CD70的癌症和免疫性病症)中用于治疗用途的优秀候选物。

[0158] 27B3及其变体的特征为存在如SEQ ID NO:50(DAGYSNHVPIFDS)所示的重链可变CDR3序列。

[0159] 因此,CD70抗体或其抗原结合片段的一些优选实施方案是包含重链可变结构域的那些,其中所述可变重链CDR3包含SEQ ID NO:50或其序列变体的氨基酸序列或者由所述序列组成,其中所述序列变体在所示序列中包含一个、两个或三个氨基酸替换。

[0160] 一些更优选的实施方案是这样的抗体或其抗原结合片段,其包含与27B3或27B3之人种系化变体相同的重链CDR组合。因此,所述抗体或其抗原结合片段可包含重链可变结构域,其中

[0161] 可变重链CDR3包含SEQ ID NO:50或其序列变体的氨基酸序列或者由所述序列组成;

[0162] 可变重链CDR2包含选自SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:249和其序列变体的氨基酸序列或由所述序列组成;以及

[0163] 可变重链CDR1包含选自SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:248和其序列变体的氨基酸序列或由所述序列组成,其中所述序列变体在所示序列中包含一个、两个或三个氨基酸替换(例如,保守替换、人源化替换或亲和变体)。

[0164] 来自CDR序列所示组内的HCDR3、HCDR2和HCDR1的任意组合是可允许的并且在本发明的范围内,然而某些组合是尤其优选的。因此,在一些优选的实施方案中,所述抗原或其抗原结合片段可包含重链可变结构域,其中HCDR3、HCDR2和HCDR1的组合选自以下:

[0165] (a) 可变重链CDR3包含SEQ ID NO:50 (DAGYSNHVPIFDS) 或其序列变体或者由所述序列组成;

[0166] 可变重链CDR2包含SEQ ID NO:27 (DINNEGTTYYADSVKG) 或其序列变体或者由所述序列组成;和

[0167] 可变重链CDR1包含SEQ ID NO:11 (VYYMN) 或其序列变体或者由所述序列组成,

[0168] 其中所述序列变体在所示序列中包含一个、两个或三个氨基酸替换(例如,保守替换、人源化替换或亲和变体)。

[0169] (b) 可变重链CDR3包含SEQ ID NO:50 (RDAGYSNHVPIFDS) 或其序列变体或者由所述序列组成;

[0170] 可变重链CDR2包含SEQ ID NO:249 (DINNEGATYYADSVKG) 或其序列变体或者由所述序列组成;和

[0171] 可变重链CDR1包含SEQ ID NO:11 (VYYMN) 或其序列变体或者由所述序列组成,

[0172] 其中所述序列变体在所示序列中包含一个、两个或三个氨基酸替换(例如,保守替换、人源化替换或亲和变体)。

[0173] (c) 可变重链CDR3包含SEQ ID NO:50 (DAGYSNHVPIFDS) 或其序列变体或者由所述序列组成;

[0174] 可变重链CDR2包含SEQ ID NO:27 (DINNEGTTYYADSVKG) 或其序列变体或者由所述序列组成;和

[0175] 可变重链CDR1包含SEQ ID NO:248 (GYVMN) 或其序列变体或者由所述序列组成,

[0176] 其中所述序列变体在所示序列中包含一个、两个或三个氨基酸替换(例如,保守替换、人源化替换或亲和变体)。

[0177] 在一些优选的实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段还包含与重链可变结构域配对的轻链可变结构域(VL)。在一些优选的轻链可变结构域中,可变轻链CDR3包含SEQ ID NO:160或其序列变体或者由所述序列组成;

[0178] 可变轻链CDR2包含选自SEQ ID NO:119、SEQ ID NO:110和所示序列之序列变体的氨基酸序列或由所述序列组成;以及

[0179] 可变轻链CDR1包含选自SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:250、SEQ ID NO:251、SEQ ID NO:252、SEQ ID NO:253和所示序列之序列变体的氨基酸序列或由所述序列组成,以及

[0180] 其中所述序列变体在所示序列中包含一个、两个或三个氨基酸替换(例如,保守替

换、人源化替换或亲和变体)。

[0181] 来自轻链CDR序列所示组内的LCDR3、LCDR2和LCDR1的任意组合是可允许的并且在本发明的范围内,然而某些组合是尤其优选的。因此,在一些优选的实施方案中,所述抗原或其抗原结合片段可包含轻链可变结构域,其中LCDR3、LCDR2和LCDR1的组合选自以下:

[0182] (a) 可变轻链CDR3包含SEQ ID NO:160 (ALFISNPSVE) 或其序列变体或者由所述序列组成;

[0183] 可变轻链CDR2包含SEQ ID NO:119 (NTNTRHS) 或其序列变体或者由所述序列组成;和

[0184] 可变轻链CDR1包含SEQ ID NO:250 (GLKSGSVTSDNFPT) 或其序列变体或者由所述序列组成,

[0185] 其中所述序列变体在所示序列中包含一个、两个或三个氨基酸替换(例如,保守替换、人源化替换或亲和变体)。

[0186] (b) 可变轻链CDR3包含SEQ ID NO:160 (ALFISNPSVE) 或其序列变体或者由所述序列组成;

[0187] 可变轻链CDR2包含SEQ ID NO:119 (NTNTRHS) 或其序列变体或者由所述序列组成;和

[0188] 可变轻链CDR1包含SEQ ID NO:87 (GLKSGSVTSTNFPT) 或其序列变体或者由所述序列组成,

[0189] 其中所述序列变体在所示序列中包含一个、两个或三个氨基酸替换(例如,保守替换、人源化替换或亲和变体)。

[0190] 对于27B3的人“种系化”变体的另一些优选轻链CDR组合示于表15A中。

[0191] CD70抗体或其抗原结合片段的一个最优选实施方案包含重链可变结构域(VH) 和轻链可变结构域(VL), 其中形成人CD70之结合位点的6个CDR的组合如下:

[0192] 可变重链CDR3包含SEQ ID NO:50 (DAGYSNHVPIFDS) 或其序列变体或者由所述序列组成;

[0193] 所述可变重链CDR2包含SEQ ID NO:27 (DINNEGTTYYADSVKG) 或其序列变体或者由所述序列组成;

[0194] 可变重链CDR1包含SEQ ID NO:11 (VYYMN) 或其序列变体或者由所述序列组成;

[0195] 可变轻链CDR3包含SEQ ID NO:160 (ALFISNPSVE) 或其序列变体或者由所述序列组成;

[0196] 可变轻链CDR2包含SEQ ID NO:119 (NTNTRHS) 或其序列变体或者由所述序列组成;和

[0197] 可变轻链CDR1包含SEQ ID NO:250 (GLKSGSVTSDNFPT) 或其序列变体或者由所述序列组成,

[0198] 其中所述序列变体在所示序列中包含一个、两个或三个氨基酸替换(例如,保守替换、人源化替换或亲和变体)。

[0199] 6个CDR的另一些优选组合是在表14A(重链)和15A(轻链)中所列27B3的人种系化变体中出现的那些“天然”组合。

[0200] 在基于27B3及其种系化变体的一些前述优选实施方案中,所述抗体优选地包含人

抗体(尤其是人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)的CH1结构域、铰链区、CH2结构域和CH3结构域。一个最优选的实施方案是人IgG1。还优选的是对人IgG1进行改造以最大化在抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、补体依赖性细胞毒性(CDC)或抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)的一个或更多个中的效应子功能。特别优选地是非岩藻糖基化的人IgG1,例如使用BioWa Inc的Potelligent™技术生产的非岩藻糖基化IgG1。

[0201] 基于表示为27B3的Fab和27B3的人种系化变体,表现出与人CD70的高亲和力结合的另一一些优选CD70抗体包括分离的抗体或其抗原结合片段,其包含具有选自以下之氨基酸序列的重链可变结构域:SEQ ID NO:178、SEQ ID NO:212、SEQ ID NO:213、SEQ ID NO:214、SEQ ID NO:215、SEQ ID NO:216、SEQ ID NO:217、SEQ ID NO:218、SEQ ID NO:219、SEQ ID NO:220、SEQ ID NO:221、SEQ ID NO:222、SEQ ID NO:223、SEQ ID NO:224、SEQ ID NO:225、SEQ ID NO:226、SEQ ID NO:227、SEQ ID NO:228、SEQ ID NO:229、SEQ ID NO:274和SEQ ID NO:275的氨基酸序列以及与所示序列之一表现出至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列;以及任选地包含具有选自以下的氨基酸序列的轻链可变结构域:SEQ ID NO:201、SEQ ID NO:230、SEQ ID NO:231、SEQ ID NO:232、SEQ ID NO:233、SEQ ID NO:234、SEQ ID NO:234、SEQ ID NO:236、SEQ ID NO:237、SEQ ID NO:238、SEQ ID NO:239、SEQ ID NO:240、SEQ ID NO:241、SEQ ID NO:242、SEQ ID NO:243、SEQ ID NO:244、SEQ ID NO:245、SEQ ID NO:245、SEQ ID NO:247、SEQ ID NO:248、SEQ ID NO:276和SEQ ID NO:277的氨基酸序列以及与所示序列之一表现出至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0202] 尽管选自上文所列VH和VL结构域序列组之VH结构域和VL结构域的所有可能配对是可允许的并且在本发明的范围内,但是某些VH和VL的组合是特别优选的;这些是在表现出与人CD70之高亲和力结合的单一Fab中的“天然”组合。在表14B和15B中所示的27B3种系化变体的情况中,可优选保留原始的VH/VL配对。因此,表现出高亲和力CD70结合的一些优选CD70抗体或其抗原结合片段是包含重链可变结构域和轻链可变结构域之组合的那些,其中所述组合选自:

[0203] (i) 包含SEQ ID NO:223之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:241之氨基酸序列的轻链可变结构域;

[0204] (ii) 包含SEQ ID NO:178之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:190之氨基酸序列的轻链可变结构域;

[0205] (iii) 包含SEQ ID NO:212之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:230之氨基酸序列的轻链可变结构域;

[0206] (iv) 包含SEQ ID NO:213之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:231之氨基酸序列的轻链可变结构域;

[0207] (v) 包含SEQ ID NO:214之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:232之氨基酸序列的轻链可变结构域;

[0208] (vi) 包含SEQ ID NO:215之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:235之氨基酸序列的轻链可变结构域;

[0209] (vii) 包含SEQ ID NO:216之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:234之氨基酸序列的轻链可变结构域;

[0210] (viii) 包含SEQ ID NO:217之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:235之氨基酸序列的轻链可变结构域;

[0211] (ix) 包含SEQ ID NO:218之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:236之氨基酸序列的轻链可变结构域;

[0212] (x) 包含SEQ ID NO:219之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:237之氨基酸序列的轻链可变结构域;

[0213] (xi) 包含SEQ ID NO:220之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:238之氨基酸序列的轻链可变结构域;

[0214] (xii) 包含SEQ ID NO:221之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:239之氨基酸序列的轻链可变结构域;

[0215] (xiii) 包含SEQ ID NO:222之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:240之氨基酸序列的轻链可变结构域;

[0216] (xiv) 包含SEQ ID NO:224之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:242之氨基酸序列的轻链可变结构域;

[0217] (xv) 包含SEQ ID NO:225之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:243之氨基酸序列的轻链可变结构域;

[0218] (xvi) 包含SEQ ID NO:226之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:244之氨基酸序列的轻链可变结构域;

[0219] (xvii) 包含SEQ ID NO:227之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:245之氨基酸序列的轻链可变结构域;

[0220] (xviii) 包含SEQ ID NO:228之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:246之氨基酸序列的轻链可变结构域;

[0221] (xix) 包含SEQ ID NO:229之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:247之氨基酸序列的轻链可变结构域;

[0222] (xx) 包含SEQ ID NO:223之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:244之氨基酸序列的轻链可变结构域;

[0223] (xxi) 包含SEQ ID NO:223之氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:245之氨基酸序列的轻链可变结构域。

[0224] 对于上文所列每个特定VH/VL组合,将具有与所示VH结构域序列有至少90%、92%、95%、97%或99%同一性之氨基酸序列的VH结构域与具有与所示VL结构域序列有至少90%、92%、95%、97%或99%同一性之氨基酸序列的VL结构域相组合也是可允许的并且在本发明的范围内。

[0225] 一个最优选的实施方案为基于表示为41D12之人种系化变体的天然VH/VL组合的CD70抗体或其抗原结合片段。因此,本文中还提供了包含重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)的抗体或其抗原结合片段,所述重链可变结构域(VH)包含选自以下的氨基酸序列或由其组成:SEQ ID NO:223所示的氨基酸序列、其种系化变体和亲和变体以及与所述序列有至少90%、95%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列;所述轻链可变结构域(VL)包含选自以下的氨基酸序列或由其组成:SEQ ID NO:241所示的氨基酸序列、其种系化变体和亲和变体以及与所述序列有至少90%、95%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0226] 其中VH结构域的氨基酸序列与SEQ ID NO:223所示序列表现出低于100%序列同一性的实施方案仍可包含这样的重链CDR,其与SEQ ID NO:223的HCDR1、HCDR2和HCDR3(分别为SEQ ID NO:11、27和50)相同同时在框架区内表现出氨基酸序列变化。同样地,其中VL结构域的氨基酸序列与SEQ ID NO:241所示序列表现出低于100%序列同一性的实施方案仍可包含这样的重链CDR,其与SEQ ID NO:241的LCDR1、LCDR2和LCDR3(分别为SEQ ID NO:250、116和160)相同同时在框架区内表现出氨基酸序列变化。

[0227] 在基于41D12的VH和VL结构域或其变体的一些前述优选实施方案中,所述抗体优选地包含人抗体(尤其是人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)的CH1结构域、铰链区、CH2结构域和CH3结构域。一个最优选的实施方案是人IgG1。还优选的是对人IgG1进行改造以最大化在ADCC、CDC或ADCP之一或多个中的效应子功能。特别优选地是去岩藻糖基化的人IgG1,优选地使用Potelligent™表达系统制备。

[0228] 另一个有利的实施方案为包含以下重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)的抗体或其抗原结合片段,所述重链可变结构域(VH)包含选自以下的氨基酸序列或由其组成:SEQ ID NO:225所示的氨基酸序列、其种系化变体和亲和变体以及与所述序列有至少90%、95%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列;所述轻链可变结构域(VL)包含选自以下的氨基酸序列或由其组成:SEQ ID NO:243所示的氨基酸序列、其种系化变体和亲和变体以及与所述序列有至少90%、95%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0229] 另一个有利的实施方案为包含以下重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)的抗体或其抗原结合片段,所述重链可变结构域(VH)包含选自以下的氨基酸序列或由其组成:SEQ ID NO:226所示的氨基酸序列、其种系化变体和亲和变体以及与所述序列有至少90%、95%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列;所述轻链可变结构域(VL)包含选自以下的氨基酸序列或由其组成:SEQ ID NO:244所示的氨基酸序列、其种系化变体和亲和变体以及与所述序列有至少90%、95%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0230] CD70抗体的特点/特性

[0231] 在前述方面和实施方案中,所述CD70抗体或其抗原结合片段各自可表现出下述特性或特点中的一个或多个或者任意组合:

[0232] 所述抗体或抗原结合片段可以以高亲和力与人CD70相结合,当作为Fab片段测试时,对人CD70表现出 $7 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 或更少、优选 $5 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 或更少、以及通常 $0.4 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 至 $4.8 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 的解离速率。

[0233] 所述抗体或抗原结合片段可以以高亲和力与人CD70相结合并且抑制CD70与CD27之间的相互作用。或者,所述抗体或抗原结合片段可与人CD70相结合但不抑制CD70与CD27之间的相互作用。

[0234] 所述抗体或抗原结合片段可以以高亲和力与表达CD70之细胞表面上的人CD70相结合。

[0235] 所述抗体或抗原结合片段可以与表达CD70之细胞表面上的人CD70相结合并且缓慢地或仅部分地被内化。本发明的一个关键方面是这样的观察,CD70抗体事实上在大量表达CD70的细胞系(包括许多表达CD70的癌细胞系)上内化很少。该观察与之前发表的报道(CD70抗体在与肾细胞癌细胞系相结合后快速内化(参见Adam等,British Journal of Cancer (2006) 95:298-306;和WO 2007/038637))直接相反并且对抗体的治疗用途具有直接

启示。CD70抗体在与癌细胞相结合后内化很少这一观察结果强烈支持这样的结论：用于治疗许多表达CD70之癌症和与CD70有关的免疫性疾病的治疗方案应基于与CD70的极高亲和力结合，以及抗体效应子功能（尤其是ADCC、CDC或ADCP中的任意一个或更多个）偶联，而不是基于使用免疫缀合物，其中CD70抗体与治疗剂（例如细胞毒性或细胞抑制药物部分）相连接。

[0236] 所述抗体或抗原结合片段可与人CD70中的氨基酸序列HIQVTLAICSS (SEQ ID NO: 342) 结合；

[0237] 所述抗体或抗原结合片段可与猴来源的CD70（尤其是恒河猴 (*Macaca mulatta*) 和食蟹猴 (*Macaca cynomolgus*) 的CD70同源物) 表现出交叉反应性。

[0238] 所述抗体或抗原结合片段可与天然人CD70（例如在细胞（例如细胞系或从人患者中分离的表达CD70的细胞）的表面上表达的CD70）和热变性重组人CD70二者相结合。

[0239] 与治疗性抗体产物的1~2g/L历史平均数相比，所述抗体或抗原结合片段可在重组抗体表达系统（例如CHK1SV细胞系（由BioWa/Lonza所有））中提供非常高的产量（>4g/L），使得显著降低了生产成本。

[0240] 所述抗体或抗原结合片段在37℃贮存条件和冻融循环中可以是高度稳定的，这也是降低成本的主要因素。

[0241] 所述抗体可表现出选自以下的一个或更多个效应子功能：针对细胞表面上表达人CD70之细胞的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性（ADCC）、补体依赖性细胞毒性（CDC）和抗体依赖性细胞介导的吞噬作用（ADCP）。

[0242] 所述抗体可表现出针对表达CD70的细胞（例如癌细胞或其他恶性细胞或者免疫细胞）的ADCC。

[0243] 与参照抗体相比，所述抗体可表现出增强的ADCC功能，所述参照抗体是包含天然人Fc结构域的等价抗体。在一个非限制性实施方案中，与包含天然人Fc结构域的参照抗体相比，ADCC功能可至少增强10倍。此处的“等价”可意为具有增强的ADCC功能的抗体显示出与参照抗体基本一致的抗原结合特异性和/或共有一致的氨基酸序列，为了增强ADCC而进行（相对于天然人Fc）的任何修饰除外。

[0244] 在没有与细胞毒剂或细胞抑制剂缀合的情况下，所述抗体或抗原结合片段可在体内肿瘤异种移植模型中抑制肿瘤生长。在一个非限制性实施方案中，与参照抗体SGN70相比，肿瘤生长功能的抑制可增强至少10倍。

[0245] 所述抗体或抗原结合片段可诱导表达CD70之细胞的细胞凋亡。

[0246] 所述抗体可包含人IgG（最优选人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4）的铰链区、CH2结构域和CH3结构域。

[0247] 所述抗体可包含Fc区中的修饰（例如在本文中别处所解释的增强抗体效应子功能的修饰）。尤其是，抗体可以是非岩藻糖基化的IgG。

[0248] 在又一些方面中，本发明还提供了编码上文所列CD70抗体及其抗原结合片段的多核苷酸分子，以及包含所述多核苷酸的表达载体、包含所述载体的宿主细胞和重组表达/产生所述CD70抗体的方法。

[0249] 在还一个方面中，本发明提供了包含任一上述CD70抗体和可药用载体或赋形剂的药物组合物。

[0250] 本发明的还一个方面涉及使用上文所列CD70抗体进行医学治疗的方法,尤其是治疗癌症。

附图说明

[0251] 参照下述实验实施例和附图将进一步理解本发明,附图中:

[0252] 图1:示出了对于经786-0细胞(顶图)和经Raji细胞(底图)免疫的大羊驼在ELISA中针对重组CD70测试的免疫应答。

[0253] 图2:说明了通过ELISA测量的大羊驼来源之CD70Fab和参照CD70Fab的CD27与CD70结合的抑制。

[0254] 图3:是在结合Elisa(黑色)中或在抑制Elisa(白色)中所测试大羊驼来源之Fab的信号图示。

[0255] 图4:说明了通过ELISA测量的嵌合大羊驼-人CD70mAb和参照CD70mAb对CD27与人CD70(A&B)或恒河猴CD70(C)结合的抑制。

[0256] 图5:示出了通过FACS分析表明的嵌合大羊驼-人CD70mAb与786-0细胞(A)或MHH-PREB-1细胞(B)的结合。

[0257] 图6:示出了在基于Raji细胞的共培养效力测定(Raji cell based co-culture potency assay)中通过CD70特异性嵌合大羊驼-人mAb的抑制。

[0258] 图7:示出了在786-0细胞中标准Cr⁵¹释放ADCC测定的结果。

[0259] 图8:示出了在9%人血清的存在下在U266细胞中的CDC测定的结果。

[0260] 图9:表明了786-0细胞中在ADCP测定中嵌合大羊驼-人CD70mAb的效力。

[0261] 图10:说明了在两个独立实验中,在786-0细胞中对于不同嵌合大羊驼-人CD70mAb而言的以MFI外(MFI OUT)评估的作为时间之函数的抗体内化。

[0262] 图11:表明了在用嵌合大羊驼-人CD70mAb 41D12、同种型对照和Fc-dead对照处理后在Raji异种移植模型中的小鼠存活率。

[0263] 图12:描述了克隆27B3之VH和VL氨基酸序列分别与人种系基因区段VH3-38和VL8-61之氨基酸序列的比对。

[0264] 图13:示出了种系化27B3mAb变体在37℃下孵育5周后获得的样品的凝胶过滤分析。

[0265] 图14:示出了使用Biacore测量的在多个温度下孵育后在多个时间点获得的种系化CD70mAb样品的CD70结合效力。

[0266] 图15:示出了CD70mAb对表达CD70之癌细胞系的结合亲和力。

[0267] 图16:示出了CD70mAb对表达CD70之CLL患者细胞的亲和力。

[0268] 图17:示出了CD70mAb结合之SU-DHL-6细胞的裂解。

[0269] 图18:示出了通过ELISA测量的CD70mAb对CD27与CD70结合的抑制。

[0270] 图19:示出了来自不同物种之CD70序列的比对。

[0271] 图20:示出了CD70mAb对人U266细胞、恒河猴LCL8864细胞和食蟹猴HSC-F细胞的结合亲和力。

[0272] 图21:示出了通过ELISA测量的CD70mAb对CD27与人、恒河猴和食蟹猴之CD70结合的抑制。

[0273] 图22:示出了通过ELISA评估的CD70mAb与变性重组CD70的结合。

[0274] 图23:示出了用于表位作图的CD70嵌合序列。

[0275] 图24:说明了在786-O细胞中作为时间之函数的CD70mAb的抗体内化。

[0276] 定义

[0277] “抗体”或“免疫球蛋白”---本文中使用的术语“免疫球蛋白”包括具有两条重链与两条轻链之组合的多肽,无论其是否具有任何相关特异性免疫反应性。“抗体”指对目的抗原(例如,人CD70)具有显著已知特异性免疫反应活性的这种组装体(assembly)。本文所使用的术语“CD70抗体”指对人CD70蛋白表现出免疫特异性的抗体。如在本文中其它地方所解释的,对人CD70的“特异性”不排除与CD70的物种同源物的交叉反应。抗体和免疫球蛋白包含轻链和重链,它们之间有或没有链间共价连接。对脊椎动物系统中的基本免疫球蛋白结构已有相对深入地认识。

[0278] 通用术语“免疫球蛋白”包括可在生物化学上区分的5类不同抗体。所有5类抗体均在本发明的范围内,下述讨论将一般地涉及IgG类的免疫球蛋白分子。就IgG而言,免疫球蛋白包含分子量为约23,000道尔顿的两条相同的轻多肽链和分子量为53,000~70,000的两条相同的重链。四条链通过二硫键以“Y”构型连接,其中轻链在“Y”的口处开始支托(bracket)重链,并且延续通过可变区。

[0279] 抗体的轻链分为 κ 或 λ (κ 、 λ)。各重链类别可与 κ 或 λ 轻链相连。一般而言,轻链和重链彼此共价连接,并且当通过杂交瘤、B细胞或遗传改造的宿主细胞产生免疫球蛋白时,两条重链的“尾”部分彼此通过共价二硫键连接或非共价连接结合。在重链中,氨基酸序列从Y构型叉状端的N末端到各链底部的C末端。本领域技术人员将理解重链分为 γ 、 μ 、 α 、 δ 、 ϵ ,其中有一些亚类型(例如, $\gamma 1 \sim \gamma 4$)。该链的特性决定抗体的“类型”分别为IgG、IgM、IgA、IgD或IgE。免疫球蛋白亚类(同种型(isotype))例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1等是良好表征的,并且已知其赋予功能特化。根据本公开内容,这些类型和同种型中每一种的经修饰形式对于本领域技术人员而言易于辨别,并且因此在本发明的范围内。

[0280] 如上所述,抗体的可变区允许抗体选择性地识别并特异性地结合抗原上的表位。即,抗体的VL结构域与VH结构域组合以形成限定三维抗原结合位点的可变区。该四级抗体结构形成存在于Y各臂末端的抗原结合位点。更特别地,抗原结合位点由各VH和VL链上的三个互补决定区(CDR)来限定。

[0281] “CD70蛋白”或“CD70抗原”---本文中使用的术语“CD70蛋白”或“CD70抗原”或“CD70”可互换使用,并且指为TNFRSF27/CD27之配体的TNF配体家族的成员。术语“人CD70蛋白”或“人CD70抗原”或“人CD70”可互换使用以尤其指人的同源物,包括天然地表达于人体中和/或培养的人细胞系表面上的天然人CD70蛋白及其重组形式和片段。人CD70的具体实例包括具有NCBI参照序列登录号NP_001243所示氨基酸序列的多肽或其胞外结构域。

[0282] “结合位点”---本文中使用的术语“结合位点”包含负责选择性地结合目的靶抗原(例如,人CD70)的多肽区。结合结构域包含至少一个结合位点。示例性结合结构域包括抗体可变结构域。本发明的抗体分子可包含单一结合位点或多(例如,二、三或四)结合位点。

[0283] “来源于(derived from)”---本文中使用的术语“来源于”指定蛋白质(例如,CD70抗体或其抗原结合片段)表示多肽的来源。在一个实施方案中,来源于特定起始多肽的多肽或氨基酸序列是CDR序列或与其相关的序列。在一个实施方案中,来源于特定起始多肽的氨

氨基酸序列是不连续的。例如,在一个实施方案中,一个、两个、三个、四个、五个或六个CDR来自起始抗体。在一个实施方案中,来源于特定起始多肽或氨基酸序列的多肽或氨基酸序列具有与起始序列基本一致的氨基酸序列或者其部分,其中所述部分由至少3至5个氨基酸、5至10个氨基酸、至少10至20个氨基酸、至少20至30个氨基酸或至少30至50个氨基酸组成,或者其对于本领域普通技术人员而言可以另外的方式鉴定为在起始序列中具有其来源。在一个实施方案中,改变来自起始抗体的一个或更多个CDR序列以产生变体CDR序列,例如亲和变体,其中所述变体CDR序列保持CD70结合活性。

[0284] “骆驼科动物来源(Camelid-derived)”——在某些优选实施方案中,本发明的CD70抗体分子包含通过用CD70抗原主动免疫骆驼科动物而产生的来自骆驼科动物常规抗体的框架氨基酸序列和/或CDR氨基酸序列。但是,可以将包含骆驼科动物来源之氨基酸序列的CD70抗体改造为包含来源于人氨基酸序列(即人抗体)或其它非骆驼科哺乳动物物种的框架和/或恒定区序列。例如,可以将人或非人灵长动物框架区、重链部分和/或铰链部分包含于本发明的CD70抗体中。在一个实施方案中,一个或更多个非骆驼科动物氨基酸可存在于“骆驼科动物来源”CD70抗体的框架区,例如,骆驼科动物框架氨基酸序列可包含一个或更多个氨基酸突变,其中存在相应的人或非人灵长动物氨基酸残基。此外,骆驼科动物来源的VH和VL结构域或其人源化变体可与人抗体的恒定结构域连接以产生嵌合分子,如在本文中其它地方详细描述。

[0285] “保守氨基酸替换”——“保守氨基酸替换”是其中氨基酸残基被具有类似侧链的氨基酸残基所替代的替换。已在本领域中限定了具有类似侧链的氨基酸残基家族,包括碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、 β -支链化(beta-branched)侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,免疫球蛋白多肽中的非必需氨基酸残基可以被来自相同侧链家族的另一氨基酸残基替代。在另一实施方案中,一串氨基酸可以被结构上类似但是顺序和/或侧链家族成员组成不同的一串所替代。

[0286] “重链部分”——本文中使用的术语“重链部分”包含来源于免疫球蛋白重链之恒定结构域的氨基酸序列。含有重链部分的多肽包含以下中的至少一种:CH1结构域、铰链(例如,上、中和/或下铰链区)结构域、CH2结构域、CH3结构域或其变体或片段。在一个实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段可包含免疫球蛋白重链的Fc部分(例如,铰链部分、CH2结构域和CH3结构域)。在另一个实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段可缺乏恒定结构域的至少一部分(例如,CH2结构域的全部或一部分)。在某些实施方案中,恒定结构域的至少之一并且优选全部来源于人免疫球蛋白重链。例如,在一个优选实施方案中,重链部分包含完全人铰链结构域。在另一些优选的实施方案中,重链部分包含完全人Fc部分(例如,来自人免疫球蛋白的铰链、CH2和CH3结构域序列)。

[0287] 在某些实施方案中,构成重链部分的恒定结构域来自不同免疫球蛋白分子。例如,多肽的重链部分可包含来自IgG1分子的CH2结构域和来自IgG3或IgG4分子的铰链区。在另一些实施方案中,恒定结构域是包含不同免疫球蛋白分子的部分的嵌合结构域。例如,铰链可包含来自IgG1分子的第一部分和来自IgG3或IgG4分子的第二部分。如在上文中所给出

的,本领域普通技术人员将理解可以修饰重链部分的恒定结构域从而使得他们的氨基酸序列与天然(野生型)免疫球蛋白分子不同。即,本文所公开的本发明多肽可包含一个或更多个重链恒定结构域(CH1、铰链、CH2或CH3)和/或轻链恒定区结构域(CL)的改变或修饰。示例性修饰包括一个或更多个结构域中一个或更多个氨基酸的添加、缺失或替换。

[0288] “嵌合”——“嵌合”蛋白质包含与第二氨基酸序列连接的第一氨基酸序列,第一氨基酸序列与第二氨基酸序列在自然中并非天然地连接。所述氨基酸序列通常可存在于分开的蛋白质中,将它们合并成融合多肽,或者,他们通常可存在于同一蛋白质中但在融合多肽中以新的排布放置。嵌合蛋白质可例如通过化学合成或者通过产生和翻译多核苷酸来产生,所述多核苷酸中肽区以期望的关系编码。示例性嵌合CD70抗体包括融合蛋白,所述融合蛋白包含与人抗体(例如人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)恒定结构域融合的骆驼科动物来源的VH和VL结构域或其人源化变体。

[0289] “可变区”或“可变结构域”——术语“可变区”和“可变结构域”在本文中可互换使用并且旨在具有等同含义。术语“可变”指这样的事实:可变结构域VH和VL的某些部分的序列在抗体之间差异很大,并用于每个特定抗体针对其靶抗原的结合和特异性。然而,可变性在抗体的可变结构域中并非均匀分布。它集中在每个VL结构域和VH结构域中被称为“高变环”的三个区段,其形成抗原结合位点的一部分。V λ 轻链结构域中的第一、第二和第三高变环在本文中被称为L1(λ)、L2(λ)和L3(λ),并且可限定为包含VL结构域中的24~33位(L1(λ),由9、10或11个氨基酸残基组成)、49~53位(L2(λ),由3个残基组成)和90~96位(L3(λ),由5个残基组成)残基(Morea等,Methods 20:267-279(2000))。V κ 轻链结构域中的第一、第二和第三高变环在本文中被称为L1(κ)、L2(κ)和L3(κ),并且可限定为包含VL结构域中的25~33位(L1(κ),由6、7、8、11、12或13个残基组成)、49~53位(L2(κ),由3个残基组成)和90~97位(L3(κ),由6个残基组成)残基(Morea等,Methods 20:267-279(2000))。VH结构域中的第一、第二和第三高变环在本文中被称为H1、H2和H3,并且可限定为包含VH结构域中的25~33位(H1,由7、8或9个残基组成)、52至56位(H2,由3或4个残基组成)和91至105位(H3,长度高度可变)残基(Morea等,Methods 20:267-279(2000))。

[0290] 除非另有说明,否则术语L1、L2和L3分别指VL结构域的第一、第二和第三高变环,并且涵盖得自V κ 和V λ 两种同种型的高变环。术语H1、H2和H3分别指VH结构域的第一、第二和第三高变环,并且涵盖得自任意已知重链同种型(包括 γ 、 ϵ 、 δ 、 α 或 μ)的高变环。

[0291] 高变环L1、L2、L3、H1、H2和H3均可包含如下文中所限定的“互补决定区”或“CDR”的一部分。术语“高变环”和“互补决定区”不是严格意义的同义词,因为高变环(HV)是基于结构限定的,而互补决定区(CDR)是基于序列可变性限定的(Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD.,1983),并且HV和CDR的范围在一些VH和VL结构域中可以不同。

[0292] VL和VH结构域的CDR通常可限定为包含下列氨基酸:轻链可变结构域中的24~34位(CDRL1)、50~56位(CDRL2)和89~97位(CDRL3)残基,以及重链可变结构域中的31~35位或31~35b位(CDRH1)、50~65位(CDRH2)和95~102位(CDRH3)残基;(Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD.(1991))。因此,除非另有说明,HV可包含在相应的

CDR中,并且本文中涉及VH和VL结构域的“高变环”时应解释为也涵盖相应的CDR,反之亦然。

[0293] 可变结构域中保守性较高的部分称为框架区 (FR),其如下文中所限定。天然重链和轻链的可变结构域各包含四个FR (分别为FR1、FR2、FR3和FR4),主要是采用β-片层构型,它们通过三个高变环相连接。每条链中的高变环通过FR紧密相邻,并与其它链中的高变环一起促成抗体的抗原结合位点的形成。对抗体的结构分析披露了序列与通过互补决定区形成之结合位点的形状之间的关系 (Chothia等, J. Mol. Biol. 227:799-817 (1992); Tramontano等, J. Mol. Biol. 215:175-182 (1990))。尽管它们具有高度序列可变性,但六个环有五个只采用主链构型的小库 (small repertoire),称为“典型结构 (canonical structure)”。这些构型首先取决于环的长度,其次取决于环和框架区中某些位点上关键残基的存在 (其通过包装、氢键键合或决定不寻常主链构型的能力来确定构型)。

[0294] “CDR”——本文中使用的术语“CDR”或“互补决定区”表示见于重链多肽和轻链多肽二者的可变区中的非连续抗原组合位点。Kabat等, J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977) 和 Kabat等, Sequences of protein of immunological interest. (1991), 及 Chothia等, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) 以及 MacCallum等, J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996) 描述了这些特定区,其中当与彼此比较时,定义包括氨基酸残基的重叠和子集。给出涵盖以上所引用各参考文献所限定之CDR的氨基酸残基用于比对。优选地,术语“CDR”是根据序列比对由Kabat所限定的CDR。

[0295] 表1:CDR定义

	CDR 定义		
	Kabat ¹	Chothia ²	MacCallum ³
V _H CDR1	31-35	26-32	30-35
V _H CDR2	50-65	53-55	47-58
V _H CDR3	95-102	96-101	93-101
V _L CDR1	24-34	26-32	30-36
V _L CDR2	50-56	50-52	46-55
V _L CDR3	89-97	91-96	89-96

[0297] ¹按照上文中的Kabat等的命名的残基编号

[0298] ²按照上文中的Chothia等的命名的残基编号

[0299] ³按照上文中的MacCallum等的命名的残基编号

[0300] “框架区”——本文中使用的术语“框架区”或“FR区”包括作为可变区的一部分但并非CDR (例如,使用Kabat的CDR定义) 的一部分的氨基酸残基。因此,可变区框架的长度为约100~120个氨基酸,但只包括CDR外的那些氨基酸。对于重链可变结构域和由Kabat等所限定的CDR的特定实例而言,框架区1对应于包含1~30位氨基酸的可变区的结构域;框架区2对应于包含第36~49位氨基酸的可变区的结构域;框架区3对应于包含第66~94位氨基酸的可变区的结构域,以及框架区4对应于从第103位氨基酸到可变区末端的可变区的结构域。轻链的框架区类似地通过各轻链可变区CDR分开。类似地,使用Chothia等或McCallum等的CDR定义,通过如上所述的各CDR末端来分离框架区界限。在一些优选实施方案中,CDR由

Kabat所限定。

[0301] 在天然抗体中,存在于各单体抗体上的6个CDR是短的、非连续氨基酸序列,其特异性地定位以形成抗体在水性环境中呈现其三维构型时的抗原结合位点。重可变结构域和轻可变结构域的剩余部分的氨基酸序列示出较小的分子间可变性,并且称为框架区。框架区主要采用 β -片层构型,并且CDR形成连接 β -片层结构(以及在一些情况下形成 β -片层结构的一部分)的环。因此,这些框架区起到形成支架的作用,所述支架用以以正确方位通过链间非共价相互作用安置6个CDR。由所安置的CDR形成的抗原结合位点限定与免疫反应性病原上表位互补的表面。该互补表面促进抗体与免疫反应性抗原表位的非共价结合。本领域普通技术人员可容易地鉴定CDR的位置。

[0302] “铰链区”——本文中使用的术语“铰链区”包括将CH1结构域与CH2结构域相连接的重链分子的一部分。该铰链区包含约25个残基并且是柔性的,因此允许两个N末端抗原结合区独立地移动。铰链区可再分为三个不同结构域:上部、中部和下部铰链结构域(Roux等, J. Immunol. 1998 161:4083)。包含“完全人”铰链区的CD70抗体可含有下表2所示的铰链区序列之一。

[0303] 表2:人铰链序列

[0304]

IgG	上部铰链	中部铰链	下部铰链
IgG1	EPKSCDKTHT (SEQ ID NO:320)	CPPCP (SEQ ID NO:321)	APELLGGP (SEQ ID NO:322)
IgG3	ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO:323)	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) ₃ (SEQ ID NO:324)	APELLGGP (SEQ ID NO:325)
IgG4	ESKYGPP (SEQ ID NO:326)	CPSCP (SEQ ID NO:327)	APEFLGGP (SEQ ID NO:328)
IgG42	ERK (SEQ ID NO:329)	CCVECPCPPCP (SEQ ID NO:330)	APPVAGP (SEQ ID NO:331)

[0305] “CH2结构域”——本文中使用的术语“CH2结构域”包括例如使用常规编号方案从抗体的约244位残基至360位残基延伸的重链分子的一部分(244至360位残基, Kabat编号系统;和231~340位残基, EU编号系统, Kabat EA等. Sequences of Proteins of Immunological Interest. Bethesda, US Department of Health and Human Services, NIH. 1991)。CH2结构域是独特的,因为它不与另一结构域紧密配对。而是,两个N连接的支链化羟链插入完整天然IgG分子的两个CH2结构域之间。对于CH3结构域从CH2结构域延伸至IgG分子的C末端并且包含约108个残基也有详尽记载。

[0306] “片段”——术语“片段”指与完整或完全抗体或抗体链相比包含较少氨基酸残基的抗体或抗体链的一部分。术语“抗原结合片段”指结合抗原或者与完整抗体(即,与它们所来源的完整抗体)竞争抗原结合(即,与人CD70的特异性结合)的免疫球蛋白或抗体的多肽片段。本文中使用的术语抗体分子的“片段”包括抗体的抗原结合片段,例如抗体轻链可变结构域(VL)、抗体重链可变结构域(VH)、单链抗体(scFv)、F(ab')₂片段、Fab片段、Fd片段、Fv

片段和单结构域抗体片段(DAb)。片段可通过例如完整或完全抗体或抗体链的化学或酶处理或通过重组方法来获得。

[0307] “价(valency)”——本文中使用的术语“价”指多肽中潜在靶结合位点的数目。每个靶结合位点特异性地结合一个靶分子或靶分子上的特定位点。当多肽包含多于一个靶结合位点时,每个靶结合位点可特异性地结合相同或不同分子(例如,可与不同配体或不同抗原或相同抗原上的不同表位结合)。本发明的结合分子具有至少一个对人CD70分子特异的结合位点。

[0308] “特异性”——术语“特异性”指结合(例如与其发生免疫反应)给定靶标(例如,CD70)的能力。多肽可以是单特异性的并且包含一个或更多个特异性地结合靶标的结合位点,或者多肽可以是多特异性的并且包含两个或更多个特异性地结合相同或不同靶标的结合位点。在一个实施方案中,本发明的抗体对多于一个靶标有特异性。例如,在一个实施方案中,本发明的多特异性结合分子与CD70和在肿瘤细胞上表达的第二分子相结合。包含与在肿瘤细胞上表达之抗原相结合的抗原结合位点的示例性抗体在本领域中是已知的,并且本发明的抗体中可包含来自这些抗体的一个或更多个CDR。

[0309] “合成的”——本文中使用的关于多肽的术语“合成的”包括包含非天然氨基酸序列的多肽。例如,作为天然多肽的经修饰形式(例如,包含突变例如添加、替换或缺失)的非天然多肽,或者,包含在氨基酸线性序列中与第二氨基酸序列(其可以是或不是天然的)连接的第一氨基酸序列(其可以是或不是天然的)的非天然多肽,所述第一氨基酸序列与第二氨基酸序列并非在自然中天然连接的。

[0310] “改造的”——本文中使用的术语“改造的”包括通过合成方法(例如,通过重组技术、体外肽合成、通过肽的酶促或化学偶联或者这些技术的一些组合)进行的核酸或多肽分子操作。优选地,本发明的抗体是经改造的抗体,包括例如人源化抗体和/或嵌合抗体,及经改造以改进一个或更多个特性(例如抗原结合、稳定性/半衰期或效应子功能)的抗体。

[0311] “经修饰抗体”——本文中使用的术语“经修饰抗体”包括经改变使得成为非天然的合成形式抗体,例如包含至少两个重链部分但并非两个完全重链的抗体(例如,结构域缺失抗体或微小抗体(minibody));经改变以与两种或更多种不同抗原或单一抗原上的不同表位结合的多特异性形式的抗体(例如,双特异性、三特异性等);与scFv分子连接的重链分子等。ScFv分子在本领域中是已知的并且描述于例如美国专利5,892,019中。另外,术语“经修饰抗体”包括多价形式的抗体(例如,三价、四价等,与相同抗原的三个或更多个拷贝结合的抗体)。在另一实施方案中,本发明的经修饰抗体是融合蛋白,所述融合蛋白包含至少一个缺少CH2结构域的重链部分,并且包含多肽的结合结构域,其包含受体配体对的一个成员的结合部分。

[0312] 术语“经修饰抗体”在本文中也可用于指CD70抗体的氨基酸序列变体。本领域普通技术人员将理解,可以修饰CD70抗体以产生变体CD70抗体,所述变体CD70抗体的氨基酸序列与其所来源的CD70抗体的氨基酸序列不同。例如,可以产生引起保守替换或“非必需”氨基酸残基的变化的核苷酸或氨基酸替换(例如,在CDR和/或框架残基中)。氨基酸替换可包括用天然氨基酸或非天然氨基酸替代一个或更多个氨基酸。

[0313] “人源化替换”——本文中使用的术语“人源化替换”指这样的氨基酸替换,其中存在于CD70抗体(例如骆驼科动物来源的CD70抗体)之VH或VL结构域的特定位置处的氨基酸

残基被存在于参照人VH或VL结构域等价位置处的氨基酸残基所替代。参照人VH或VL结构域可以是由人种系编码的VH或VL结构域。人源化替换可以在本文所限定的CD70抗体的框架区和/或CDR中进行。

[0314] “人源化变体”---本文中使用的术语“人源化变体”指与参照CD70抗体相比包含一个或更多个“人源化替换”的变体抗体,其中参照抗体的一部分(例如包含至少一个CDR的VH结构域和/或VL结构域或者其部分)具有来源于非人物种的氨基,并且“人源化替换”发生在来源于非人物种的氨基酸序列内。

[0315] “种系化变体”---本文中使用的术语“种系化变体”尤其指这样的“人源化变体”,其中“人源化替换”导致存在于CD70抗体(例如骆驼科动物来源的CD70抗体)之VH或VL结构域的一个或更多个特定位置处的一个或更多个氨基酸残基被存在于由人种系编码之参照人VH或VL结构域等价位置处的氨基酸残基所替代。通常对于任何给定的“种系化变体”,唯一地或主要地从单一人种系编码的VH或VL结构域取得替换进入种系化变体中的替代氨基酸残基。术语“人源化变体”和“种系化变体”在本文中常常可互换使用。使一个或更多个“人源化替换”引入骆驼科动物来源的(例如大羊驼来源的)VH或VL结构域导致骆驼科动物(大羊驼)来源之VH或VL结构域的“人源化变体”的产生。如果替换进的氨基酸残基主要地或唯一地来源于单一人种系编码的VH或VL结构域序列,那么结果可以是骆驼科动物(大羊驼)来源之VH或VL结构域的“人种系化变体”。

[0316] “亲和变体”-本文中使用的术语“亲和变体”指与参照CD70抗体相比,表现出氨基酸序列中一个或更多个变化的变体抗体,其中与参照抗体相比,亲和变体对人CD70蛋白表现出改变的亲和力。通常,与参照CD70抗体相比,亲和变体将对人CD70表现出改变的亲和力。优选地,与参照CD70抗体相比,亲和变体将对人CD70表现出提高的亲和力。该提高可以表现为对于人CD70而言较低的 K_D ,对于人CD70而言较慢的解离速率或与非人CD70同源物交叉反应模式的改变。与参照CD70抗体相比,亲和变体通常在CDR的氨基酸序列中表现出一个或更多个变化。这样的替换可导致存在于CDR中给定位置的原始氨基酸被不同氨基酸残基替代,所述不同氨基酸残基可以是天然氨基酸残基或非天然氨基酸残基。氨基酸替换可以是保守的或非保守的。

[0317] “高人同源性”-如果VH结构域和VL结构域一起与最匹配的人种系VH和VL序列表现出至少90%的氨基酸序列同一性,则认为包含所述重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)的抗体具有高人同源性。具有高人同源性的抗体可包括这样的抗体,其包含与人种系序列显示充分高的序列同一性%的天然非人抗体之VH和VL结构域,包括例如包含骆驼科动物常规抗体之VH和VL结构域的抗体,以及这样的抗体的经改造(尤其是人源化的或种系化的)变体,以及“完全人抗体”。

[0318] 在一个实施方案中,具有高人同源性的抗体的VH结构域可与一个或更多个人VH结构域在框架区FR1、FR2、FR3和FR4显示80%或更高的氨基酸序列同一性或序列同源性。在另一些实施方案中,本发明多肽的VH结构域与最匹配的人种系VH结构域序列之间的氨基酸序列同一性或序列同源性可以为85%或更高、90%或更高、95%或更高、97%或更高、或者高至99%或甚至100%。

[0319] 在一个实施方案中,具有高人同源性的抗体的VH结构域可以相对于最匹配的人VH序列而言在框架区FR1、FR2、FR3和FR4中包含一个或更多个(例如,1至10个)氨基酸序列错

配。

[0320] 在另一实施方案中,具有高人同源性的抗体的VL结构域可与一个或更多个人VL结构域在框架区FR1、FR2、FR3和FR4显示80%或更高的序列同一性或序列同源性。在另一些实施方案中,本发明多肽的VL结构域与最匹配的人种系VL结构域序列之间的氨基酸序列同一性或序列同源性可以为85%或更高、90%或更高、95%或更高、97%或更高、或者高至99%或甚至100%。

[0321] 在一个实施方案中,具有高人同源性的抗体的VL结构域可以相对于最匹配的人VL序列而言在框架区FR1、FR2、FR3和FR4中包含一个或更多个(例如,1至10个)氨基酸序列错配。

[0322] 在分析具有高人同源性的抗体和人种系VH和VL之间的序列同一性百分比之前,可确定典型折叠(canonical fold),其允许鉴定具有H1和H2或L1和L2(及L3)典型折叠之相同组合的人种系区段家族。随后,选择与目的抗体的可变区具有最高程度序列同源性的人种系家族成员来对序列同源性进行评分。高变环L1、L2、L3、H1和H2之Chothia典型类型(Chothia canonical classes)的确定可通过使用在网页www.bioinf.org.uk/abs/chothia.html上公开可用的生物信息学工具进行。该程序的输出结果显示了在数据文件中的关键残基需求。在这些数据文件中,显示出关键残基的位置以及每个位置处允许的氨基酸。目的抗体可变区的序列被作为输入,并且首先与共有抗体序列进行比对以按Kabat方案编号。典型折叠的分析采用了一系列来自于Martin和Thornton开发的自动化方法的关键残基模板(Martin等,J.Mol.Biol.263:800-815(1996))。

[0323] 使用已知的特定人种系V区段(其使用与H1和H2或者L1和L2(及L3)典型折叠的相同组合),可以确定就序列同源性而言最佳匹配的家族成员。使用生物信息学工具可以确定目的抗体的VH和VL结构域框架氨基酸序列与由人种系编码的相应序列之间的序列百分比同一性,但实际上也可以手动比对序列。人免疫球蛋白序列可以从若干蛋白质数据库中鉴定,例如VBase(<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>)或Pluckthun/Honegger 数据库(<http://www.bioc.unizh.ch/antibody/Sequences/Germlines>)。为了将人序列与目的抗体中VH或VL结构域的V区进行比较,可以使用例如可通过网站例如www.expasy.ch/tools/#align得到的序列比对算法,而对于有限的序列组同样可进行手动比对。与每条链的框架区1、2和3具有最高程度同源性且具有相同典型折叠组合的人种系轻链和重链序列家族被选出来,并与目的可变区进行比较;FR4也进行相对于人种系JH和JK或JL区的检查。

[0324] 注意,在计算总序列同源性百分比时,使用来自具有相同典型折叠组合的人种系家族的最匹配序列来评估FR1、FR2和FR3的残基。只对与最匹配的或具有相同典型折叠组合的相同家族中的其他成员不同的残基进行评分(注:排除任何引物编码的差异)。然而,为了人源化的目的,框架区中与其它人种系家族成员相同的残基(其不具备相同的典型折叠组合)可以被认为是“人的”,尽管事实上,根据上述的严格条件,这些都被评分为“负的(negative)”。这种假设是基于用于人源化的“混合与匹配(mix and match)”法,其中FR1、FR2、FR3和FR4均被分别与其最匹配的人种系序列进行比较,并且人源化的分子因此包含了不同FR的组合,正如Qu及其同事(Qu等,Clin.Cancer Res.5:3095-3100(1999))和Ono及其同事(Ono等,Mol.Immunol.36:387-395(1999))所做的一样。各框架区的边界可以使用IMGT编号方案来确定,其是Chothia编号方案(numbering scheme of Chothia)的改编版本

(Lefranc等, NAR 27:209-212 (1999); imgt.cines.fr)。

[0325] 如在下文中详细讨论的, 具有高人同源性的抗体可包含具有人典型折叠或人样典型折叠的高变环或CDR。在一个实施方案中, 具有高人同源性的抗体的VH结构域或VL结构域中的至少一个高变环或CDR可得自或来源于非人抗体(例如骆驼科物种的常规抗体)的VH或VL结构域, 但表现出的预测或实际典型折叠结构与发生在人抗体中的典型折叠结构基本一致。

[0326] 本领域已熟知, 虽然存在于由人种系编码的VH结构域和VL结构域二者中的高变环的氨基酸一级序列根据定义来看是高度可变的, 但是所有高变环(VH结构域的CDR H3除外)均仅采取几种独特的结构构型, 称为典型折叠(canonical fold)(Chothia等, J.Mol.Biol.196:901-917 (1987); Tramontano等, Proteins 6:382-94 (1989)), 其取决于高变环的长度和所谓典型氨基酸残基的存在二者(Chothia等, J.Mol.Biol.196:901-917 (1987))。完整VH或VL结构域中高变环的实际典型结构可以通过结构分析(例如, X-射线晶体学)来确定, 但也可以根据作为特定结构的特征的关键氨基酸残基来预测典型结构(详见下文)。事实上, 确定每种典型结构的特定残基模式形式形成“签名(signature)”, 这使得能够识别未知结构的VH或VL结构域的高变环中的典型结构; 因此典型结构可仅根据氨基酸一级序列来预测。

[0327] 可以使用从如下网站可公开获得的算法分析具有高人同源性的抗体中任何给定VH或VL序列的高变环的经预测典型折叠结构: www.bioinf.org.uk/abs/chothia.html、www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/antibodies.html和www.bioc.unizh.ch/antibody/Sequences/Germlines/Vbase_hVk.html。这些工具允许查询待与典型结构已知之人VH或VL结构域序列进行比对的VH或VL序列, 并对查询序列高变环的典型结构进行预测。

[0328] 在VH结构域的情况下, 如果至少符合下列第一个标准(优选地符合两个标准), 则H1和H2环可以被评分为具有与已知在人抗体中存在的典型折叠结构“基本相同”的典型折叠结构:

[0329] 1. 与最匹配的人源典型结构类别具有由残基数确定的相同长度。

[0330] 2. 与相应人H1和H2典型结构类别中描述的关键氨基酸残基有至少33%的同一性, 优选至少50%的同一性。

[0331] (注意为了进行上述分析, H1环和H2环被分别处理并且各自与其最匹配的人典型结构类别进行比较)。

[0332] 上述分析依赖于对目的抗体H1环和H2环的典型结构的预测。在已知目的抗体中H1环和H2环的实际结构(例如基于X-射线晶体学)的情况下, 如果环的长度与最匹配的人典型结构类别的长度不同(通常相差 ± 1 或 ± 2 个氨基酸), 但目的抗体中H1环和H2环的实际结构与入典型折叠的结构相匹配, 则目的抗体中的H1环和H2环可以被评分为具有与已知发生在人抗体中的典型折叠结构“基本一致”的典型折叠结构。

[0333] Chothia等, J.Mol.Biol.227:799-817 (1992) (其通过引用整体并入本文)描述了在人典型结构类别中发现的针对人VH结构域第一和第二高变环(H1和H2)的关键氨基酸残基。特别地, 在Chothia等第802页的表3(其通过引用具体并入本文)列出了在人种系中发现的针对H1典型结构的关键位点上的优选氨基酸残基, 而同样通过引用具体并入本文的第803页的表4列出了在人种系中发现的针对CDR H2典型结构的关键位点上的优选氨基酸残

基。

[0334] 在一个实施方案中,具有高人同源性的抗体的VH结构域中的H1和H2二者均表现出与发生在人抗体中的典型折叠结构基本一致的预测或实际典型折叠结构。

[0335] 具有高人同源性的抗体可包含这样的VH结构域,其中高变环H1和H2形成典型折叠结构的组合,该组合与已知发生在至少一个人种系VH结构域中的典型结构的组合相同。现已发现在由人种系编码的VH结构域中实际上只存在H1和H2的典型折叠结构的某些组合。在一个实施方案中,具有高人同源性的抗体的VH结构域中的H1和H2可得自非人物种(例如骆驼科物种)的VH结构域,然而也形成与已知发生在人种系或体细胞突变之VH结构域中的典型折叠结构组合相同的预测或实际典型折叠结构的组合。在一些非限制性实施方案中,具有高人同源性的抗体的VH结构域中的H1和H2可得自非人物种(例如,骆驼科物种)的VH结构域,并形成下列典型折叠组合之一:1-1、1-2、1-3、1-6、1-4、2-1、3-1和3-5。

[0336] 具有高人同源性的抗体可包含这样的VH结构域,其与人VH表现出高序列同一性/序列同源性二者,并且包含与人VH表现出结构同源性的高变环。

[0337] 将具有高人同源性的抗体的VH结构域中H1和H2上存在的典型折叠及其组合“更正(correct)”为人VH种系序列(就整体一级氨基酸序列同一性而言,其与具有高人同源性的抗体的VH结构域最匹配)可以是有利的。例如,如果与人种系VH3结构域的序列匹配是最接近的,则H1和H2形成人VH3结构域中天然的典型折叠之组合可以是有利的。在来自非人物种的具有高人同源性的抗体(例如,包含来自骆驼科动物常规抗体的VH和VL结构域的抗体,尤其是包含人源化骆驼科动物VH和VL结构域的抗体)的情况下,这可以是特别重要的。

[0338] 因此,在一个实施方案中,具有高人同源性的CD70抗体的VH结构域可与人VH结构域在框架区FR1、FR2、FR3和FR4显示出80%或更高、85%或更高、90%或更高、95%或更高、97%或更高或者高至99%或甚至100%的序列同一性或序列同源性,另外,同一抗体中的H1和H2得自非人VH结构域(例如,来自骆驼科物种),但形成与已知天然存在在相同人VH结构域中的典型折叠组合相同的预测或实际典型折叠结构的组合。

[0339] 在另一些实施方案中,具有高人同源性的抗体的VL结构域中的L1和L2均得自非人物种的VL结构域(例如,骆驼科动物来源的VL结构域),并且都表现出与发生在人抗体中的典型折叠结构基本相同的预测或实际典型折叠结构。

[0340] 与VH结构域一样,V λ 型和V κ 型二者的VL结构域的高变环可采取有限数目的构型或典型结构,这部分取决于长度,还取决于某些典型位置上关键氨基酸残基的存在。

[0341] 在具有高人同源性的目的抗体中,如果符合下列至少第一个标准(优选地符合两个标准),则获自非人物种(例如,骆驼科物种)的VL结构域的L1、L2和L3环可被评分为具有与已知发生在人抗体中的典型折叠结构“基本相同”的典型折叠结构:

[0342] 1. 与最匹配的人结构类别具有由残基数确定的相同长度。

[0343] 2. 与对来自V λ 库或V κ 库(repertoire)的相应人L1或L2典型结构类别所描述的关键氨基酸残基具有至少33%的同一性,优选至少50%的同一性。

[0344] (注意为了进行上述分析,L1环和L2环被分别处理并且各自与其最匹配的人典型结构类别进行比较)。

[0345] 上述分析依赖于对目的抗体的VL结构域中L1、L2和L3环的典型结构的预测。在L1、L2和L3环的实际结构是已知的(例如基于X-射线晶体学)的情况下,如果环的长度与最匹配

的人典型结构类别的长度不同(通常相差 ± 1 或 ± 2 个氨基酸),但骆驼科环的实际结构与人典型折叠的相匹配,则得自目的抗体的L1、L2或L3环也可被评分为具有与已知发生于人抗体中的典型折叠结构“基本相同”的典型折叠结构。

[0346] Morea等.Methods,20:267-279(2000)和Martin等,J.Mol.Biol.,263:800-815(1996)描述了在人典型结构类别中发现的人V λ 或V κ 结构域CDR的关键氨基酸残基。Tomlinson等,EMBO J.14:4628-4638(1995)也描述了人V κ 结构域的结构库,Williams等.J.Mol.Biol.,264:220-232(1996)描述了V λ 结构域的结构库。所有这些文献的内容通过引用并入本文。

[0347] 具有高人同源性的抗体的VL结构域中的L1和L2可形成与已知发生在人种系VL结构域中的典型折叠结构的组合相同的预测或实际典型折叠结构的组合。在一些非限制性实施方案中,具有高人同源性的抗体(例如,包含骆驼科动物来源的VL结构域或其人源化变体的抗体)的V λ 结构域中的L1和L2可形成下列典型折叠组合中的一种:11-7、13-7(A、B、C)、14-7(A、B)、12-11、14-11和12-12(如Williams等.J.Mol.Biol.264:220-32(1996)中所限定的,以及如http://www.bioc.uzh.ch/antibody/Sequences/Germlines/VBase_hVL.html所示)。在一些非限制性实施方案中,V κ 结构域中的L1和L2可形成下列典型折叠组合中的一种:2-1、3-1、4-1和6-1(如Tomlinson等.EMBO J.14:4628-38(1995)所限定的,以及如http://www.bioc.uzh.ch/antibody/Sequences/Germlines/VBase_hVK.html所示)。

[0348] 在另一个实施方案中,具有高人同源性的抗体的VL结构域中的L1、L2和L3三者都可以表现出基本上的人结构。优选地,具有高人同源性的抗体的VL结构域与人VL表现出高的序列同一性/序列同源性,并且VL结构域的高变环与人VL表现出结构同源性。

[0349] 在一个实施方案中,具有高人同源性的CD70抗体的VL结构域可与人VL结构域在框架区FR1、FR2、FR3和FR4表现出80%或更高、85%或更高、90%或更高、95%或更高、97%或更高或者高至99%或甚至100%的序列同一性,另外,高变环L1和高变环L2可以形成与已知天然地发生在相同人VL结构域中的典型折叠组合相同的预测或实际典型折叠结构的组合。

[0350] 当然,可以设想,将与人VH表现出高度序列同一性/序列同源性并与人VH的高变环具有结构同源性的VH结构域以及与人VL表现出高度序列同一性/序列同源性并与人VL的高变环具有结构同源性的VL结构域相组合以提供具有高人同源性的抗体,所述抗体包含与人编码的VH/VL对具有最高序列和结构同源性的VH/VL对(例如,骆驼科动物来源的VH/VL对)。

[0351] 如上文所总结的,本发明涉及(至少部分涉及)以高亲和力与人CD70相结合的抗体及其抗原结合片段。现在将更详细地描述根据本发明的CD70抗体和抗体片段的特性和特征。

[0352] CD70的结合和亲和力

[0353] 在某些方面中,本文中提供的抗体及其抗原结合片段以高亲和力与人CD70相结合。以高亲和力与人CD70相结合的抗体或其抗原结合片段对人CD70和更特别地对人CD70的胞外结构域可表现出约10nM或更少、或者1nM或更少、或者0.1nM或更少、或者10pM或更少的结合亲和力(K_D)。

[0354] CD70抗体(或抗原结合片段)可包含这样的VH和VL结构域,当VH和VL结构域以Fab的形式表达时,它们对人CD70结合表现出 $7 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 、优选小于 $5 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 或小于 $2 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 、小于 $1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 的解离速率。通常,解离速率将落在 $0.4 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 至 $4.8 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 的范围中。可

以使用本领域技术人员公知的标准技术来测量结合亲和力(K_D)和解离速率(k_{off}),例如,如所附实施例中所述的表面等离子体共振(BIAcore)。简要地,将50 μ l待测样品添加至200 μ l PBS+0.02%吐温中,然后如下1/400稀释:5 μ l样品(1mg/ml)+195 μ l HBS-EP+ (Biacore缓冲液),再稀释的10 μ l+90 μ l HBS-EP+=2.5 μ g/ml。使用制造商提供的方案,在室温下使用高度CD70包被的CM5芯片(4000RU)进行Biacore分析。

[0355] 在这一点上,应注意,尽管以Fab的形式测量了VH和VL组合的解离速率,但是这并不意味着VH和VL结构域对CD70结合有相等的贡献。对于许多VH/VL组合,主要有助于CD70结合的是VH结构域,而VL结构域有助于VH/VL配对的溶解性和/或稳定性。

[0356] 也可通过ELISA评估本文中描述的CD70抗体或其Fab片段与重组人CD70的结合。

[0357] 本文中描述的CD70抗体还可表现出与完整细胞(例如786-0肾癌细胞或其他癌细胞系)表面上表达的CD70相结合。可通过流式细胞术评估CD70抗体与表达CD70之细胞的结合。所附实施例中的结果表明包括变体41D12(当作为非岩藻糖基化的IgG1ARGX-110表达时)在内的一些优选CD70抗体表现出与细胞表面CD70的非常强结合。事实上,对于许多细胞系,ARGX-110比参照现有技术抗体SGN70表现出更强的结合。

[0358] 特别值得注意的是,ARGX-110表现出与以低拷贝数表达CD70之细胞系(尤其包括细胞系Raji、SU-DHL-6、MHHPREB1、Mino、Mec1、JVM-2、HH和EBC-1)的强结合,以及还与从患者(例如CLL患者)分离之癌细胞的强结合,在这两种情况下,ARGX-110的结合显著地强于SGN70。与低拷贝数细胞系和CLL患者材料的“增强的”结合在很大程度上可反映ARGX-110对重组CD70的极高亲和力。这些结合特征支持ARGX-110(基于41D12)和具有类似特性的本文中描述的其他CD70抗体在癌症治疗中的特别使用,特别是当作为IgG而非作为与细胞毒性或细胞抑制部分连接之免疫缀合物使用时,其表现强效效应子功能(例如非岩藻糖基化的IgG1)。在所附实施例中通过实验(其中PBMC样品被“掺入”癌细胞系,之后采用CD70抗体处理)表明了与重组CD70和细胞表面CD70之高亲和力结合(即比采用现有技术CD70抗体可实现的更高的亲和力)对于抗体之临床使用的显著性。在该系统中,采用ARGX-110治疗比参照CD70抗体MDX1411和SGN70产生显著更多的靶癌细胞裂解。

[0359] 本文中描述的CD70抗体与人CD70并且更具体地是人CD70之胞外结构域显示高亲和力结合,而不排除与CD70之非人同源物的交叉反应性。事实上,本文中描述的许多CD70抗体(包括27B3及其种系化变体,特别是41D12)的一个有利特性是,除了与人CD70的高亲和力结合之外,它们还与猴CD70同源物(尤其是恒河猴和食蟹猴之CD70同源物)交叉反应。

[0360] 在这一点上,如果在CD70-CD27抑制ELISA中(例如所附实施例20.2中描述的)人相对于猴(恒河猴或食蟹猴)CD70的IC₅₀的差异为小于5倍、优选小于3倍或小于2倍,那么可认为CD70抗体表现出与猴CD70同源物(例如恒河猴和食蟹猴的CD70同源物)的交叉反应性。对人和猴CD70的结合亲和力以及由此的阻断效力应是大致相当的。

[0361] CD70与CD27之间的相互作用

[0362] 在某些方面中,本文中提供的CD70抗体或其抗原结合片段可以以高亲和力与人CD70相结合并且阻断CD70与CD27之间的相互作用。

[0363] 可通过Elisa(使用捕获的重组CD70(Flag-TNC-CD70)或经直接包被的CD70和重组CD27-Fc)来评估CD70抗体或其抗原结合片段阻断CD70与CD27之结合的能力。本文中描述的CD70抗体可抑制CD70与CD27之间的相互作用,其IC₅₀为300ng/ml或更少、或者200ng/ml或

更少、或者110ng/ml或更少、或者70ng/ml或更少、或者50ng/ml或更少。

[0364] 如在所附实施例中描述的,还可在基于Raji细胞(人B细胞淋巴瘤)和HT1080-CD27细胞(转染CD27的人上皮细胞系)之共培养的测定中评估CD70抗体或其抗原结合片段阻断CD70与CD27之结合的能力。抑制CD70与CD27之间相互作用的CD70抗体可在该共培养测定中表现出500ng/ml或更少、或者300ng/ml或更少、或者100ng/ml或更少、或者50ng/ml或更少、或者30ng/ml或更少的IC₅₀。

[0365] 基于27B3及其种系化变体的一些优选CD70抗体(包括41D12 (ARGX-110))在Elisa系统中表现出CD70/CD27相互作用的强效阻断。事实上,在阻断CD70/CD27相互作用方面,ARGX-110比参照抗体SGN70和MDX1411显著地更强效。CD70与CD27之间的相互作用可有助于肿瘤微环境内的肿瘤细胞存活、增殖和/或免疫抑制。因此,除了与CD70的高亲和力结合之外,CD70/CD27相互作用的强效抑制可有助于在治疗某些表达CD70之癌症或免疫性疾病(例如共表达CD70和CD27的自身免疫疾病和癌症)中的改进的临床结果。

[0366] 在另一些实施方案中,CD70抗体或其抗原结合片段可与人CD70相结合,但不抑制CD70与CD27之间的相互作用。可基于Elisa(使用捕获的重组CD70 (Flag-TNC-CD70)或直接包被的CD70和重组CD27-Fc)来评估结合CD70但不抑制CD70与CD27之间相互作用的CD70抗体。如所附实施例中证实的,已经鉴别了许多结合CD70但不以显著程度抑制CD70/CD27相互作用的Fab。尤其是,本文中鉴别为59D10的Fab克隆表现出通过Biacore测量的与重组CD70的强结合,但是当通过ELISA评估时不以显著程度阻断CD70/CD27的相互作用。本文中描述的结合CD70但不抑制CD70与CD27之间相互作用的CD70抗体仍可具有完整的抗体效应子功能(即ADCC、CDC、ADCP或ADC中的一种或更多种)并且在体内抑制肿瘤细胞生长。以高亲和力结合CD70但为非阻断性的CD70抗体可有利地用作“单臂”抗体或PEG基化的Fab产物或者提供与表达CD70之靶细胞的严格单价相互作用的任意其他抗体形式。

[0367] CD70表位

[0368] 在某些方面中,本文中描述的CD70抗体与人CD70胞外结构域内的表位相结合。

[0369] 术语“表位”指接触抗体的抗原(例如人CD70)的一个或更多个部分。表位可以是线性的,即涉及与单个氨基酸序列的结合;或者是构象的,即,涉及与抗原之不同区中两个或更多个氨基酸序列(其未必为连续的)结合。

[0370] 本文中提供的CD70抗体可与人CD70蛋白之胞外结构域内的不同(重叠或非重叠)表位相结合。例如,在所附实施例中表示为1C2和9E1的Fab显然与人CD70上的不同、非重叠表位相结合。

[0371] 如本文中别处所指出的,一个优选的CD70抗体41D12 (ARGX-110)表现出未被任意已知现有技术CD70抗体表现出的特别有用的结合特征组合,即:

[0372] (a) 在人CD70的氨基酸序列HIQVTLAICSS (SEQ ID NO:342)内进行结合;

[0373] (b) 与恒河猴 (*Macaca mulatta*) 和食蟹猴 (*Macaca cynomolgus*) 的CD70同源物有交叉反应性;

[0374] (c) 与天然人CD70和热变性重组人CD70结合。

[0375] 对于任意给定的CD70抗体,本领域技术人员可使用例如所附实施例20.4中描述的小鼠-人嵌合CD70结合分析来容易地确定在氨基酸序列HIQVTLAICSS (SEQ ID NO:342)内结合人CD70的能力。

[0376] 本领域技术人员还可通过例如通过FAC分析、表面等离子体共振(Biacore™)或使用CD70-CD27抑制ELISA来容易地确定与猴CD70同源物的交叉反应性。在这一点上,如果在CD70-CD27抑制ELISA(例如所附实施例20.2中描述的)中人相对于猴(恒河猴或食蟹猴)CD70的IC₅₀差异小于5倍、优选小于3倍或小于2倍,那么可认为CD70抗体表现出与猴CD70同源物(例如恒河猴和食蟹猴的CD70同源物)的交叉反应性。

[0377] 本文中描述的CD70抗体还可被证明具有结合天然人CD70和热变性重组人CD70二者的能力。在这一点上,通过与表达CD70之细胞(例如在所附实施例中描述的任意CD70+细胞系)或甚至从患者材料中分离的表达CD70之天然细胞(例如,如所附实施例中从CLL患者中分离的细胞)的表面上表达的CD70的结合指示与“天然”人CD70的结合。

[0378] 可如所附实施例20.3中描述的测试与热变性重组人CD70的结合。优选的是,CD70抗体应在该测定中在620nm处表现出0.6的OD,以表明与热变性重组人CD70的显著结合。

[0379] 部分或缓慢内化

[0380] 本文中描述的CD70抗体(包括优选CD70抗体41D12(ARX-110))在肾癌细胞系中表现出部分内化,意指当在786-O肾癌细胞中测试抗体内化时,相当比例的结合抗体(即至少30~40%)在37℃下孵育6小时和甚至24小时后保持在外。另外,CD70抗体还可表现出低速率内化。在这一点上,如果CD70抗体以比参照CD70抗体9D1(VH SEQ ID NO:178;VL SEQ ID NO:190)更慢的速率内化,那么认为其表现出缓慢内化。

[0381] 如所附实施例中表明的,不同癌细胞系在CD70抗体的内化程度中表现出显著的差异。特别显著的是,大多数癌细胞系甚至在与ARX-110一起孵育6小时后表现出CD70结合抗体的小于30%和甚至小于10%的内化。这些结果清楚地支持具有强效应子功能的CD70抗体(包括为增强效应子功能而改造的变体)在治疗表达CD70的癌症中的用途。之前已经在科学文献中报道了CD70是“内化”靶标;因此已经提出开发用于治疗表达CD70之癌症和免疫性疾病二者的CD70抗体-药物免疫缀合物。因此,本文中提出的结果是极其令人惊讶的,该结果结论性地表明细胞表面结合之CD70抗体的内化是稀有事件并且大多数表达CD70的细胞系不以显著程度内化结合的CD70抗体。

[0382] 骆驼科动物来源的CD70抗体

[0383] 在又一个方面中,本文中描述的抗体或其抗原结合片段可包含从骆驼科家族物种的VH结构域或VL结构域获得的至少一个高变环或互补决定区。尤其是,所述抗体或抗原结合片段可包含用人CD70抗原主动免疫远交(outbred)骆驼科动物(例如大羊驼)获得的VH和/或VL结构域或者其CDR。

[0384] “从骆驼科家族物种的VH结构域或VL结构域获得的高变环或互补决定区”意指高变环(HV)或CDR具有的氨基酸序列与由骆驼科免疫球蛋白基因编码的高变环或CDR的氨基酸序列相同或基本相同的。此处的“免疫球蛋白基因”包括种系基因、已经历重排的免疫球蛋白基因、以及体细胞突变的基因。因此,从骆驼科物种VH或VL结构域获得的HV或CDR的氨基酸序列可以与存在于成熟骆驼科常规抗体中的HV或CDR的氨基酸序列相同。此处的术语“从...获得”表明了结构关系,意思是CD70抗体的HV或CDR包括(embody)最初由骆驼科免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列(或其略微发生改变的变体(minor variant))。但是,该术语并不必然意味着在用于制备CD70抗体的生产方法方面有特定关系。

[0385] 骆驼科动物来源CD70抗体可来自任何骆驼科动物物种,尤其包括大羊驼(llama)、

单峰驼 (dromedary)、阿尔帕卡羊驼 (alpaca)、小羊驼 (vicunia)、原驼 (guanaco) 或骆驼 (camel) 等。

[0386] 包含骆驼科动物来源的VH和VL结构域或其CDR的CD70抗体通常是重组表达的多肽,并且可以是嵌合多肽。术语“嵌合多肽”指通过将两个或更多个肽片段相邻放置(否则的话所述肽片段不连续存在)而产生的人工(非天然)多肽。该定义包括“物种”嵌合多肽,其通过将两个或更多个物种(例如骆驼科动物和人)编码的肽片段相邻放置而产生。

[0387] 骆驼科动物来源的CDR可包含SEQ ID NO:49~59、262或263(重链CDR3)或者SEQ ID NO:26~37、249、258或259(重链CDR2)或者SEQ ID NO:10~20、248、256或257(重链CDR1)所示的CDR序列之一,或者SEQ ID NO:148~168、271或273(轻链CDR3)、或者SEQ ID NO:109~128或270(轻链CDR2)或者SEQ ID NO:77~95或250~253、267和268(轻链CDR1)所示的CDR序列之一。

[0388] 在一个实施方案中,整个VH结构域和/或整个VL结构域可得自骆驼科家族中的物种。在一些特定实施方案中,骆驼科动物来源的VH结构域可包含SEQ ID NO:177~188、212~223、274或275所示的氨基酸序列,而骆驼科动物来源的VL结构域可包含SEQ ID NO:189~211、230~245、276或277(VL)所示的氨基酸序列。然后,可对骆驼科动物来源的VH结构域和/或骆驼科动物来源的VL结构域进行蛋白质改造,其中向骆驼科动物氨基酸序列中引入一个或更多个氨基酸替换、插入或缺失。这些经改造的变化优选地包括相对于骆驼科动物序列而言的氨基酸替换。这些变化包括“人源化”或“种系化”,其中骆驼科动物编码的VH或VL结构域中的一个或更多个氨基酸残基被来自同源的人编码的VH或VL结构域中的等价残基所替代。

[0389] 通过用人CD70抗原主动免疫骆驼科动物(例如,大羊驼)获得的分离的骆驼科动物VH和VL结构域可用作改造本发明的抗原结合多肽的基础。从完整的骆驼科动物VH和VL结构域开始,可以进行一个或更多个氨基酸替换、插入或缺失,从而与初始骆驼科动物序列不同。在某些实施方案中,这样的替换、插入或缺失可存在于VH结构域和/或VL结构域的框架区。在一级氨基酸序列中进行这样的改变的目的可能是为了减少推测的不利特性(例如在人宿主中的免疫原性(所谓的人源化)、潜在产物异源性(heterogeneity)和或不稳定性的位点(糖基化、去酰胺、异构化等))或是为了提高分子的其它一些有利特性(例如,溶解性、稳定性、生物利用度等)。在另一些实施方案中,在一级氨基酸序列上的改变可以在通过主动免疫获得的骆驼科VH和/或VL结构域的一个或更多个高变环(或CDR)上进行。可以引入这样的变化从而增强抗原结合亲和力和/或特异性,或者减少推测的不利特性(例如在人宿主中的免疫原性(所谓的人源化)、使潜在的产物异源性和或不稳定性的位点(糖基化、去酰胺、异构化等)),或是提高分子的其它一些有利特性,(例如,溶解性、稳定性、生物利用度等)。

[0390] 因此,在一个实施方案中,本发明提供了变体CD70抗体,与骆驼科动物来源的VH或VL结构域相比,所述变体CD70抗体在VH结构域或VL结构域的至少一个框架区或CDR区中包含至少一个氨基酸替换,其实例包括但不限于包含如SEQ ID NO:177~188、212~223、274或275所示的氨基酸序列的骆驼科动物VH结构域和包含如SEQ ID NO:189~211、230~245、276或277所示的氨基酸序列的骆驼科动物VL结构域。

[0391] 在另一些实施方案中,提供了“嵌合”抗体分子,其包含骆驼科动物来源的VH和VL

结构域(或其经改造的变体)和来自非骆驼科动物抗体的一个或更多个恒定结构域,例如由人编码的恒定结构域(或其经改造的变体)。在这样的实施方案中,优选VH结构域和VL结构域二者均得自相同的骆驼科动物物种,例如VH和VL二者均可来自大羊驼(*Lama glama*)或者VH和VL二者均可来自阿尔帕卡羊驼(*Lama pacos*)(在引入经改造的氨基酸序列变化之前)。在这样的实施方案中,VH和VL结构域二者均可来自单个动物、特别是已被人CD70抗原主动免疫的单个动物。

[0392] 作为改造骆驼科VH和/或VL结构域的一级氨基酸序列以使其变化的一个替代方案,可将单个的骆驼科动物来源的高变环或CDR或者它们的组合从骆驼科动物VH/VL结构域中分离出来,并通过CDR移植将其转移到替代的(即,非骆驼科的)框架(例如人VH/VL框架)。特别地,骆驼科动物来源的CDR的一些非限制性实施方案可选自具有如SEQ ID NO:49~59(重链CDR3)、或SEQ ID NO:26~37(重链CDR2)或SEQ ID NO:10~20(重链CDR1)所示的氨基酸序列的CDR或者如SEQ ID NO:148~168(轻链CDR3)、或SEQ ID NO:109~128(轻链CDR2)或SEQ ID NO:77~95(轻链CDR1)所示的CDR序列之一。

[0393] 包含骆驼科动物来源的VH和VL结构域或其CDR的CD70抗体可采取其中存在VH结构域和VL结构域二者的多种不同实施方案。本文所使用的术语“抗体”以其最广泛的含义使用,涵盖但不限于单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体),只要它们对人CD70蛋白表现出适当的免疫学特异性即可。本文所使用的术语“单克隆抗体”指从基本同源(homogeneous)的抗体群体获得的抗体,即,构成群体的单个抗体是相同的(除了可以少量存在的可能的天然突变以外)。单克隆抗体具有高特异性,其针对单一抗原位点。此外,与常规的(多克隆)抗体制备物(其通常包括针对抗原上不同决定簇(表位)的不同抗体)不同的是,每个单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇或表位。

[0394] “抗体片段”包含全长抗体的一部分,一般为其抗原结合或可变结构域。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂、双特异性Fab's和Fv片段、双抗体(diabody)、线性抗体、单链抗体分子、单链可变片段(scFv)和由抗体片段形成的多特异性抗体(参见Holliger和Hudson,Nature Biotechnol.23:1126-36(2005),其内容通过引用并入本文)。

[0395] 在一些非限制性实施方案中,包含骆驼科动物来源的VH和VL结构域或其CDR的CD70抗体可包含CH1结构域和/或CL结构域(其氨基酸序列完全或基本上是人的)。当本发明的抗原结合多肽是用于人治疗的抗体时,抗体的整个恒定区或者至少其一部分通常完全具有或基本上具有人的氨基酸序列。因此,CH1结构域、铰链区、CH2结构域、CH3结构域和CL结构域(以及CH4结构域,如果存在的话)的一个或更多个或任意组合的氨基酸序列可完全或基本上是人的。

[0396] 有利地,CH1结构域、铰链区、CH2结构域、CH3结构域和CL结构域(以及CH4结构域,如果存在的话)可以都完全具有或基本上具有人的氨基酸序列。在人源化或嵌合抗体或抗体片段的恒定区的上下文中,术语“基本上人的”指与人恒定区具有至少90%、或至少92%、或至少95%、或至少97%、或至少99%的氨基酸序列同一性。此处的术语“人的氨基酸序列”指人免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列,其包括种系的、重排的和体细胞突变的基因。本发明还涵盖这样的多肽,其包含已被改变的“人”恒定结构域序列(相对于人序列,进行一个或更多个氨基酸添加、缺失或替换),其中明示地需要“完全人”铰链区存在的那些实施方案除外。

[0397] 本发明的CD70抗体中“完全人”铰链区的存在可有利于使免疫原性最小化并优化抗体的稳定性二者。

[0398] 正如本文其它地方所讨论的,考虑可以在重链和/或轻链的恒定区中(特别是在Fc区中)进行一个或更多个氨基酸的替换、插入或缺失。氨基酸替换可导致被替换的氨基酸被不同的天然氨基酸或者被非天然的或经修饰的氨基酸所取代。其它结构修饰也是允许的,例如改变糖基化模式(例如,通过添加或删除N-或O-连接的糖基化位点)。基于所述抗体的预期用途,可期望改变本发明抗体对Fc受体的结合特性,例如用以调节效应子功能。例如,可以将一个或更多个半胱氨酸残基引入Fc区中,从而使该区中形成链间二硫键。由此产生的同二聚体抗体可具有提高的内化能力和/或增加的补体介导的细胞杀伤和抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。参见Caron等,J. Exp. Med. 176:1191-1195 (1992) 和Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992)。或者,CD70抗体可以被改造成具有双Fc区,从而可具有增强的补体裂解(complement lysis)和ADCC的能力。参见Stevenson等,Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989)。本发明还涵盖包含本文所述的抗体的免疫缀合物,其中所述抗体与细胞毒剂(例如化疗剂)、毒素(例如细菌、真菌、植物或动物来源的酶促活性毒素,或其片段)或放射性同位素(即,放射性缀合物))相缀合。如Chan和Carter, Nature Reviews: Immunology, 第10卷,第301-316页,2010(其通过引用并入本文)所述,还可以改造Fc区以延长半衰期。

[0399] 在另一个实施方案中,通过修饰一个或更多个氨基酸来修饰Fc区以增加抗体介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的能力和/或增加抗体对Fc γ 受体的亲和力。

[0400] 在又一个实施方案中,修饰抗体的糖基化。例如,可以产生无糖基化的(aglycosylated)抗体(即,抗体缺乏糖基化)。可以改变糖基化以例如增加抗体对CD70靶抗原的亲和力。这样的碳水化合物修饰可以通过例如改变抗体序列中的一个或更多个糖基化位点来完成。例如,可以进行导致去除一个或更多个可变区框架糖基化位点从而去除该位点处的糖基化的一个或更多个氨基酸替换。这样的去糖基化可增加抗体对抗原的亲和力。

[0401] 还设想具有改变类型的糖基化的变体CD70抗体,例如具有减少量的岩藻糖基残基的低岩藻糖基化(hypofucosylated)抗体或非岩藻糖基化抗体(如Natsume等, Drug Design Development and Therapy, 第3卷,第7-16页,2009所述)或具有增加的两分(bisecting)GlcNAc结构的抗体。这样的改变的糖基化方式已证实增加抗体的ADCC活性,通常相对于包含“天然”人Fc结构域的等价抗体产生10倍的ADCC增强。这样的碳水化合物修饰可以通过例如以改变的糖基化酶促机制(如Yamane-Ohnuki和Sato, mAbs 1:3, 230-236, 2009所述)在宿主细胞中表达所述抗体来实现。具有增强ADCC功能的非岩藻糖基化之抗体的实例是使用BioWa Inc的Potelligent™技术生产的那些。

[0402] 在某些实施方案中,本发明可涵盖嵌合的骆驼科/人抗体,特别是其中VH和VL结构域完全是骆驼科动物序列(例如,大羊驼或阿尔帕卡羊驼)并且所述抗体的其余部分是完全人序列的嵌合抗体。CD70抗体可包括含有骆驼科动物来源的VH和VL结构域或其CDR的“人源化”或“种系化”变体的抗体,和骆驼科动物/人嵌合抗体,其中VH和VL结构域与通过用人CD70抗原主动免疫骆驼科动物获得的骆驼科动物VH和VL结构域相比在框架区中包含一个或更多个氨基酸替换。通过使用在人种系编码的VH或VL结构域中发现的等价残基替代起始骆驼科VH或VL结构域中的错配氨基酸残基,该“人源化”提高了与人种系VH或VL结构域的序

列同一性%。

[0403] CD70抗体也可以是CDR移植抗体,其中来自骆驼科动物抗体(例如使用人CD70蛋白主动免疫而产生的骆驼科动物CD70抗体或者由骆驼科动物的基因编码的抗体)的CDR(或高变环)被移植到人VH和VL框架,而抗体的其它部分也是完全人源的。这样的CDR移植的CD70抗体可包含具有如SEQ ID NO:49~59、262或263(重链CDR3)或者SEQ ID NO:26~37、249、258或259(重链CDR2)或者SEQ ID NO:10~20、248、256或257(重链CDR1)所示的氨基酸序列的CDR,或者如SEQ ID NO:148~168、271或273(轻链CDR3)或者SEQ ID NO:109~128或270(轻链CDR2)或者SEQ ID NO:77~95或250~253、267和268(轻链CDR1)所示的CDR序列之一。

[0404] 如上所述的人源化的、嵌合的和CDR移植的CD70抗体(特别是包含来源于人CD70抗原主动免疫的骆驼科动物的高变环或CDR的抗体)可以使用常规的重组DNA操作和表达技术容易地产生,其利用经改造以产生目的多肽的原核和真核宿主细胞(包括但不限于细菌细胞、酵母细胞、哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞,它们中的一些如本文所述并在所附实施例中说明)。

[0405] 骆驼科动物来源的CD70抗体包括这样的变体,其中VH结构域和/或VL结构域的一个或更多个高变环或一个或更多个CDR得自针对人CD70抗体而产生的常规骆驼科动物抗体的,但其中至少一个所述(骆驼科动物来源的)高变环或CDR被改造为相对于骆驼科动物编码的序列包含一个或更多个氨基酸替换、添加或缺失。这样的变化包括高变环/CDR的“人源化”。以这种方式改造的骆驼科动物来源的HV/CDR仍可表现出与由骆驼科动物编码的HV/CDR的氨基酸序列“基本相同”的氨基酸序列。此处的“基本相同”可允许与骆驼科动物编码的HV/CDR有不多于一个或不多于两个氨基酸序列错配。CD70抗体的一些特定实施方案可包含如SEQ ID NO:49~59、262或263(重链CDR3)或者SEQ ID NO:26~37、249、258或259(重链CDR2)或者SEQ ID NO:10~20、248、256或257(重链CDR1)所示的CDR序列,或者如SEQ ID NO:148~168、271或273(轻链CDR3)或者SEQ ID NO:109~128或270(轻链CDR2)或者SEQ ID NO:77~95或250~253、267和268(轻链CDR1)所示的CDR序列之一的人源化变体。

[0406] 本文所提供的骆驼科动物来源的CD70抗体可以是任何同种型。旨在用于人治疗用途的抗体通常为IgA、IgD、IgE、IgG、IgM型,通常是IgG型,在这种情况下,它们可以属于IgG1、IgG2a和b、IgG3或IgG4四个亚类中的任意一者。在这些亚类中的每一者中,允许在Fc部分进行一个或更多个氨基酸替换、插入或缺失,或者进行其它结构修饰,从而例如提高或降低Fc依赖性功能。

[0407] 骆驼科动物来源的VH和VL结构域的人源化

[0408] 由于下列因素,骆驼科动物常规抗体为制备用作人治疗剂的抗体提供了有利的起点(在US 12/497239中讨论,其通过引用并入本文):

[0409] 1) 骆驼科动物VH和VL结构域与其人对应物之间的高序列同源性%;

[0410] 2) 骆驼科动物VH和VL结构域的CDR与其人对应物之间的高度结构同源性(即,人样典型折叠结构(human-like canonical fold structure)和人样典型折叠组合)。

[0411] 骆驼科动物(例如,大羊驼)平台还在可获得的CD70抗体的功能多样性方面提供了显著的优点。

[0412] 包含骆驼科动物VH和/或骆驼科动物VL结构域的CD70抗体在人治疗中的用途可通过天然骆驼科动物VH和VL结构域的“人源化”来进一步改善,例如使得它们在人宿主中具有

更小的免疫原性。人源化的总体目的是产生这样的分子：当引入人对象时，其VH和VL结构域表现出尽可能小的免疫原性，同时保留由亲本VH和VL结构域所形成之抗原结合位点的特异性和亲和力。

[0413] 一种人源化的方法（所谓的“种系化”）涉及改造骆驼科动物VH或VL结构域的氨基酸序列以使其改变，从而使其更接近于人VH或VL结构域的种系序列。

[0414] 对于选择待改变的骆驼科动物氨基酸残基（在给定VH或VL结构域中）和选择一个或更多个替换氨基酸残基二者而言，对骆驼科动物VH（或VL）结构域与人VH（或VL）结构域之间同源性的确定是人源化过程的关键步骤。

[0415] 根据大量新的骆驼科动物VH（和VL）结构域序列（通常是已知结合靶抗原的体细胞突变VH（或VL）结构域）与人种系VH（或VL）序列、人VH（和VL）共有序列的比对，以及对阿尔帕卡羊驼可获得的种系序列信息，开发出骆驼科动物常规抗体人源化的方法。在对任何给定的骆驼科动物VH（或VL）结构域进行人源化时，下文概括出了可用于以下的原则：(i) 选择用于在骆驼科动物来源的VH或VL结构域或其CDR中进行替换的“骆驼科动物”氨基酸残基，以及(ii) 选择用于进行替换的替代“人”氨基酸。该方法可用于制备具有如SEQ ID NO: 49～59、262或263（重链CDR3）或者SEQ ID NO: 26～37、249、258或259（重链CDR2）或者SEQ ID NO: 10～20、248、256或257（重链CDR1）所示的氨基酸序列的骆驼科动物来源的CDR，或者如SEQ ID NO: 148～168、271或273（轻链CDR3）或者SEQ ID NO: 109～128或270（轻链CDR2）或者SEQ ID NO: 77～95或250～253、267或268（轻链CDR1）所示的CDR序列之一的人源化变体；以及用于具有如SEQ ID NO: 177～188、212～223、274或275所示的序列的骆驼科动物来源的VH结构域和具有如SEQ ID NO: 189～211、230～245、276或277所示的序列的骆驼科动物来源的VL结构域的人源化。

[0416] 步骤1：选择与待人源化的成熟骆驼科动物序列示出最高同源性/同一性的人（种系）家族和该家族的成员。对于任何给定骆驼科动物VH（或VL）结构域而言确定最匹配人种系的一般方法如下所述。

[0417] 步骤2：选择特定的人种系家族成员用于参照其进行种系化。优选为具有最高同源性的种系或来自同一家族的另一个种系家族成员。

[0418] 步骤3：根据与所选择的人种系最接近的骆驼科动物种系的氨基酸使用列表来确定种系化所考虑的优选位置。

[0419] 步骤4：尝试改变骆驼科动物种系中偏离（deviate from）最接近的人种系的氨基酸，FR残基的种系化相比于CDR残基是优选的。

[0420] a. 优选的是偏离选择用于参照其进行种系化之人种系的位置，对于它们来说骆驼科动物序列中存在的氨基酸与所选择的种系不匹配，并且在同一亚类型的其他种系中未发现（由V以及J编码的FR氨基酸）。

[0421] b. 在种系化过程中还可以处理以下位置，这些位置偏离所选择的人种系家族成员，但其被用于同一家族的其他种系中。

[0422] c. 还可处理与所选择的人种系的其他错配（例如，因为额外的体细胞突变）。

[0423] 可以使用以下方法来确定与给定的骆驼科动物VH（或VL）结构域最匹配的人种系：

[0424] 在分析骆驼科和人种系VH和VL之间序列一致性的百分比前，可先确定典型折叠，其允许识别具有H1和H2或者L1和L2（及L3）典型折叠之相同组合的人种系区段家族。随后，

可选择那些与目的骆驼科动物可变结构域具有最高程度序列同源性的人种系家族成员用于计算序列同源性。高变环L1、L2、L3、H1和H2之Chothia典型类型(Chothia canonical classes)的确定可通过使用在网站www.bioinf.org.uk/abs/chothia.html.page上公开可用的生物信息学工具进行。该程序的输出结果显示了在数据文件中的关键残基需求。在这些数据文件中,显示出关键残基的位置以及每个位置上允许的氨基酸。抗体可变区序列被作为输入,并首先与共有抗体序列进行比对以按Kabat系统编号。典型折叠的分析采用了一系列来自于Martin和Thornton开发的自动化方法的关键残基模板(Martin等, J.Mol.Biol.263:800-815 (1996))。各个框架区的边界可使用IMGT编号方案分配,该编号系统是Chothia编号方案的改编(Lefranc et al, NAR 27:209-212 (1999); <http://imgt.cines.fr>)。

[0425] 使用已知特定的人种系V区段(其使用与H1和H2或者L1和L2(及L3)相同的典型折叠组合),可以确定就序列同源性而言最佳匹配的家族成员。使用生物信息学工具可以确定骆驼科VH和VL结构域的框架氨基酸序列与由人种系编码的相应序列之间的序列同一性百分比,但也可以手动比对这些序列。人免疫球蛋白序列可以从若干蛋白质数据库中确定,如VBase(<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>)或Pluckthun/Honegger数据库(<http://www.bioc.unizh.ch/antibody/Sequences/Germline>)。为了比较人序列与骆驼科VH或VL结构域的V区,可以使用序列比对算法(如通过像www.expasy.ch/tools/#align的网站可获得的),而对于有限的序列组也可进行手动比对。可以选出与每条链的框架区1、2和3具有最高程度同源性的具有相同典型折叠组合的人种系的轻链和重链序列家族,并与目的骆驼科可变区进行比较;FR4也针对人种系的JH和JK或JL区进行检查。

[0426] 注意,在计算序列总同源性百分比时,使用来自具有相同典型折叠组合的人种系家族的最匹配序列来评估FR1、FR2和FR3的残基。只计算了与具有相同典型折叠组合的最匹配的或同一家族中的其他成员不同的残基(注:排除任何引物编码的差异)。然而,为了人源化的目的,框架区中与其他人种系家族成员一致的残基(其不具备相同的典型折叠的组合)可以考虑用于人源化,尽管事实上,根据上述严格的条件,这些都被评分为“负的”。这种假设是基于用于人源化的“混合与匹配(mix and match)”法,其中FR1、FR2、FR3和FR4均被分别与其最匹配的人种系序列进行比较,并且人源化的分子因此包含了不同FR的组合,正如Qu及其同事(Qu等, Clin.Cancer Res.5:3095-3100 (1999))和Ono及其同事(Ono等, Mol.Immunol.36:387-395 (1999))所做的一样。

[0427] 交叉竞争抗体

[0428] 与本文所公开的分子“交叉竞争”的单克隆抗体或其抗原结合片段是在与本发明CD70抗体结合的一个或更多个位点相同或重叠的一个或更多个位点处结合人CD70的那些。例如,可以通过抗体竞争测定来鉴定竞争单克隆抗体或其抗原结合片段。例如,可以使纯化的或部分纯化的人CD70样品与固体支持物结合。然后,添加本发明的抗体化合物或其抗原结合片段和怀疑能够与该本发明抗体化合物竞争的单克隆抗体或其抗原结合片段。两种分子之一被标记。如果标记化合物和未标记化合物与CD70上的区别且离散的位点结合,则无论所怀疑的竞争化合物是否存在,标记化合物都将以相同水平结合。但是,如果相互作用位点一致或重叠,则未标记化合物将竞争,与抗原结合的标记化合物的量将下降。如果未标记化合物过量存在,则标记化合物将以非常少的量(如果有的话)结合。出于本发明的目的,竞

争单克隆抗体或其抗原结合片段是将本发明抗体化合物与CD70的结合减少约50%、约60%、约70%、约80%、约85%、约90%、约95%或约99%的那些。用于实施这样的竞争测定的方法的细节在本领域中是公知的,并且可见于例如Harlow和Lane(1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 第567-569页, ISBN 0-87969-314-2中。通过使用纯化抗体,可以使这样的测定为定量测定。通过针对其本身(即,对于标记和竞争物二者使用相同抗体)滴定一种抗体来建立标准曲线。滴定未标记竞争单克隆抗体或其抗原结合片段抑制标记分子与板结合的能力。对结果作图,并且比较达到期望程度的结合抑制所需的浓度。

[0429] 一些优选的实施方案是这样的抗体,对于与人CD70的结合其与包含大羊驼来源之Fab 27B3的抗体及其种系化变体(尤其包括41D12 (ARGX-110))交叉竞争并且表现出结合特性的相同组合,即

[0430] (a) 在人CD70的氨基酸序列HIQVTLAICSS (SEQ ID NO:342) 内进行结合;

[0431] (b) 与恒河猴 (*Macaca mulatta*) 和食蟹猴 (*Macaca cynomolgus*) 的CD70同源物有交叉反应性;

[0432] (c) 与天然和热变性重组人CD70结合。

[0433] 编码CD70抗体的多核苷酸

[0434] 本发明还提供了编码本发明的CD70抗体的多核苷酸分子,和包含与调节序列有效连接的编码本发明的CD70抗体的多核苷酸序列的表达载体(其中所述调节序列允许抗原结合多核苷酸在宿主细胞或无细胞表达系统中表达),以及包含该表达载体的宿主细胞或无细胞表达系统。

[0435] 编码本发明的CD70抗体的多核苷酸分子包括例如重组DNA分子。本文中使用的术语“核酸”、“多核苷酸”或“多核苷酸分子”可互换使用,其指任何DNA或RNA分子,无论是单链或双链的,并且如果是单链的话,还包括具有其互补序列的分子。在讨论核酸分子时,本文中可根据以5'至3'方向提供序列的标准惯例描述特定核酸分子的序列或结构。在本发明的一些实施方案中,核酸或多核苷酸是“分离”的。当涉及核酸分子时,该术语指从所述分子来源之生物体的天然基因组中与所述分子直接相连的序列中分离出来的核酸分子。例如,“分离的核酸”可以包括插入到载体(例如质粒或病毒载体)中的DNA分子,或是整合到原核或真核细胞或非人宿主生物体的基因组DNA中的DNA分子。当涉及RNA时,术语“分离的多核苷酸”主要指由如上所限定的分离的DNA分子编码的RNA分子。或者,该术语可指从在自然状态下(即在细胞或组织内)与其相关联的其他核酸中纯化/分离出来的RNA分子。分离的多核苷酸(DNA或RNA)还可表示通过生物或合成方法直接产生,并与其产生过程中存在的其它组分分开的分子。

[0436] 在一个实施方案中,本发明提供了编码本文中表示为41D12的种系化大羊驼来源的Fab的VH结构域和VL结构域的核苷酸序列,其中所述VH结构域具有如SEQ ID NO:223所示的氨基酸序列并且所述VH结构域具有如SEQ ID NO:241所示的氨基酸序列。在一个优选的实施方案中,编码具有如SEQ ID NO:223所示氨基酸序列之VH结构域的核苷酸序列包含如SEQ ID NO:344所示的核苷酸序列,并且编码具有如SEQ ID NO:241所示氨基酸序列之VL结构域的核苷酸序列包含如SEQ ID NO:345所示的核苷酸序列。

[0437] 在一个实施方案中,本发明提供了编码本文中表示为57B6的种系化大羊驼来源的

Fab的VH结构域和VL结构域的核苷酸序列,其中所述VH结构域具有如SEQ ID NO:274所示的氨基酸序列并且所述VH结构域具有如SEQ ID NO:276所示的氨基酸序列。在一个优选的实施方案中,编码具有如SEQ ID NO:274所示氨基酸序列之VH结构域的核苷酸序列包含如SEQ ID NO:346所示的核苷酸序列,并且编码具有如SEQ ID NO:276所示氨基酸序列之VL结构域的核苷酸序列包含如SEQ ID NO:347所示的核苷酸序列。

[0438] 在一个实施方案中,本发明提供了编码本文中表示为59D10的种系化大羊驼来源的Fab的VH结构域和VL结构域的核苷酸序列,其中所述VH结构域具有如SEQ ID NO:275所示的氨基酸序列并且所述VH结构域具有如SEQ ID NO:277所示的氨基酸序列。在一个优选的实施方案中,编码具有如SEQ ID NO:275所示氨基酸序列之VH结构域的核苷酸序列包含如SEQ ID NO:348所示的核苷酸序列,并且编码具有如SEQ ID NO:277所示氨基酸序列之VL结构域的核苷酸序列包含如SEQ ID NO:349所示的核苷酸序列。

[0439] 就本发明的CD70抗体的重组产生而言,可以制备(使用标准的分子生物学技术)编码所述CD70抗体的重组多核苷酸,并插入到可复制载体中以在所选的宿主细胞或无细胞表达系统中表达。合适的宿主细胞可以是原核生物、酵母或高等真核生物的细胞(特别是哺乳动物细胞)。可用的哺乳动物宿主细胞系的实例是:通过SV40转化的猴肾CV1系(COS-7,ATCC CRL 1651)、人胚胎肾细胞系(293细胞或亚克隆以悬浮培养生长的293细胞,Graham等,J.Gen.Virol.36:59(1977))、幼仓鼠肾细胞(BHK,ATCC CCL 10)、中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR(CH0,Urlaub等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216(1980))、小鼠支持细胞(sertoli cell)(TM4,Mather,Biol.Reprod.23:243-251(1980))、小鼠骨髓瘤细胞SP2/0-AG14(ATCC CRL1581ATCC CRL8287)或NS0(HPA培养物保藏号85110503)、猴肾细胞(CV1ATCC CCL70)、非洲绿猴肾细胞(VERO-76,ATCC CRL-1587)、人宫颈癌细胞(HELA,ATCC CCL2)、犬肾细胞(MDCK,ATCC CCL34)、布法罗大鼠肝细胞(BRL3A,ATCC CRL1442)、人肺细胞(W138,ATCC CCL75)、人的肝细胞(Hep G2,HB8065)、小鼠乳腺癌(MMT060562,ATCC CCL51)、TRI细胞(Mather等,Annals N.Y.Acad.Sci.383:44-68(1982))、MRC5细胞、FS4细胞和人肝癌细胞系(Hep G2),以及DSM的PERC-6的细胞系。适合用于这些宿主细胞中的一种的表达载体在本领域中也是公知的。

[0440] 应注意,术语“宿主细胞”一般指培养的细胞系。其中引入编码本发明的抗原结合多肽之表达载体的完整人个体被明确地从“宿主细胞”的定义中排除。

[0441] 抗体产生

[0442] 在一个重要的方面,本发明还提供了用于产生本发明的CD70抗体的方法,其包括在允许CD70抗体表达的条件下,培养包含编码CD70抗体的多核苷酸(例如,表达载体)的宿主细胞(或无细胞表达系统),并回收所表达的CD70抗体。该重组表达方法可用于本发明的CD70抗体(包括旨在用于人治疗用途的单克隆抗体)的大规模生产。用于大规模生产适用于体内治疗用途的重组抗体的合适的载体、细胞系和生产方法一般是都在本领域中可得的,并且对于本领域技术人员而言是公知的。

[0443] 如别处所述的,本文中提供的CD70抗体(尤其包括基于Fab 27B3及其种系化变体的抗体,例如41D12(ARGX-110))显示出对于大规模商业制备特别有益的特征。尤其是,商业规模重组表达系统中可用的极高产量(>4g/L)将显著地降低生产成本。

[0444] 当在37℃下测试并且还经数个冻融循环时,一些优选的实施方案还表现出热稳定

性,这对于临床产品的商业制备和储存也是极其有益的。令人惊讶地是,Fab 27B3的数个人种系化变体(包括41D12和40F1)与27B3自身相比表现出改进的热稳定性。

[0445] 因此,在又一个方面中,本发明提供了与人CD70相结合的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含对应于SEQ ID NO:178所示氨基酸序列的重链可变结构域,前提条件是选自H6、H18、H24、H31、H56、H74、H74、H77、H79、H83、H84、H89、H93、H94、H108、H110和H112之Kabat位置处的至少一个氨基酸被另一个氨基酸替换。

[0446] 该抗体或其抗原结合片段比包含具有SEQ ID NO:178所示氨基酸序列之重链可变结构域的抗体或其抗原结合片段可表现出更强的热稳定性。

[0447] 在又一个方面中,提供了包含对应于SEQ ID NO:201所示氨基酸序列之轻链可变结构域的CD70抗体或抗原结合片段,前提条件是选自L2、L11、L12、L25、L26、L30、L46、L53、L60、L61、L67、L68、L76、L80、L81、L85和L87之Kabat位置处的至少一个氨基酸被另一个氨基酸替换。

[0448] 该抗体或其抗原结合片段比包含具有SEQ ID NO:201所示氨基酸序列之重链可变结构域的抗体或其抗原结合片段可表现出更强的热稳定性。

[0449] 在一个特定的实施方案中,所述CD70抗体或其抗原结合片段可包含:

[0450] a) 具有SEQ ID NO:178所示氨基酸序列的重链可变结构域,所述序列包含在选自H6、H18、H24、H31、H56、H74、H74、H77、H79、H83、H84、H89、H93、H94、H108、H110和H112之Kabat位置处的一个或更多个氨基酸替换;以及

[0451] b) 具有SEQ ID NO:201所示氨基酸序列的轻链可变结构域,所述序列包含在选自L2、L11、L12、L25、L26、L30、L46、L53、L60、L61、L67、L68、L76、L80、L81、L85和L87之Kabat位置处的一个或更多个氨基酸替换。

[0452] 权利要求24的该抗体或其抗原结合片段比包含具有SEQ ID NO:178所示氨基酸序列之重链可变结构域和具有SEQ ID NO:201所示氨基酸序列之轻链可变结构域的抗体或其抗原结合片段可表现出更强的热稳定性。

[0453] CD70抗体的治疗用途

[0454] 本文中提供的CD70抗体或其抗原结合片段可用于体内抑制癌性肿瘤的生长并且从而用于治疗表达CD70的癌症。

[0455] 因此,本发明的又一些方面涉及在人患者中抑制肿瘤细胞生长的方法以及还涉及治疗或预防癌症的方法,所述方法包括向有此需要的患者施用治疗有效量的本文中描述的CD70抗体或抗原结合片段。

[0456] 本发明的另一个方面提供了本文中描述的用于在人患者中抑制表达CD70之肿瘤细胞生长的CD70抗体或抗原结合片段。

[0457] 本发明的又一个方面提供了本文中描述的用于在人患者中治疗或预防癌症的CD70抗体或抗原结合片段。

[0458] 一些优选的癌症(可使用本文中描述之CD70抗体抑制其生长)包括肾癌(例如、肾细胞癌)、乳腺癌、脑肿瘤,慢性或急性白血病(包括急性髓性白血病、慢性髓性白血病,急性淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病)、淋巴瘤(例如、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、原发性CNS淋巴瘤、T细胞淋巴瘤)、鼻咽癌、黑素瘤(例如、转移性恶性黑素瘤)、前列腺癌、结肠癌、肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头部或颈部的癌、皮肤或眼内恶

性黑素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛门区的癌症、胃癌、睾丸癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、食管癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、儿童实体肿瘤、膀胱癌、肾脏或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统 (CNS) 肿瘤、肿瘤血管发生、脊髓轴肿瘤、脑干胶质瘤、垂体腺瘤、卡波济氏肉瘤、类上皮癌、鳞状细胞癌、间皮瘤。

[0459] 本文中描述的CD70抗体还可用于治疗患有致瘤性病症的对象,所述病症表征为存在表达CD70的肿瘤细胞,包括,例如肾细胞癌(RCC)如透明细胞(clear cell) RCC、胶质母细胞瘤、乳腺癌、脑肿瘤、鼻咽(nasopharyngeal)癌、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、Burkitt淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)、多发性骨髓瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、结节性小裂细胞淋巴瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、外周T细胞淋巴瘤、Lennert淋巴瘤、免疫母细胞淋巴瘤、T细胞白血病/淋巴瘤(ATLL)、成人T细胞白血病(T-ALL)、中心母细胞/中心细胞性(cb/cc)滤泡性淋巴瘤癌(entoblastic/centrocytic (cb/cc) follicular lymphomas cancers)、B系弥漫性大细胞淋巴瘤,血管免疫母细胞性淋巴瘤(AILD)样T细胞淋巴瘤、HIV相关的基于体腔的淋巴瘤、胚胎癌、鼻咽的未分化癌(例如, Schmincke瘤)、Castleman病、Kaposi肉瘤、多发性骨髓瘤、Waldenstrom巨球蛋白血症、套细胞淋巴瘤和其他的B细胞淋巴瘤。

[0460] 一些特定的实施方案涉及采用包含大羊驼来源的Fab 27B3或其种系化变体之一的抗体(尤其包括41D12(ARGX-110))治疗任一上文所列癌症。尤其是,可使用包含与人IgG1恒定区融合之41D12(27B3的种系化变体)的Fab区的抗体治疗任一上文所列癌症。在后者实施方案中,人IgG1恒定区可被进一步改造以将抗体效应子功能最大化(例如通过添加点突变)或者41D12-IgG1抗体可以是非岩藻糖基化的以同样进一步增强抗体效应子功能。

[0461] 如别处所述的,本文中描述的CD70抗体(特别是27B3及其种系化变体)表现出与以低拷贝数表达细胞表面CD70之人癌细胞系的尤其强的结合,所述细胞系例如大B细胞淋巴瘤细胞系SU-DHL-6、慢性淋巴细胞性白血病细胞系JVM-2、皮肤T细胞淋巴瘤细胞系HH、胃癌细胞系MKN-45、肺癌细胞系A549和EBC-1、黑素瘤细胞系WM852和WM793、胶质母细胞瘤细胞系GaMG以及卵巢癌细胞系OAW-42、SKOv3和OVCAR3。事实上,41D12(ARGX-110)对那些低拷贝数癌细胞系的亲和力比参照现有技术抗体(例如SGN70和MDX1411)显著更高。

[0462] 如通过在所附实施例中细胞掺入实验(cell spiking experiment)表明的,对低拷贝数癌细胞系的“改进”亲和力与临床治疗相应癌症直接相关。当将低拷贝数细胞系(例如弥漫性大B细胞淋巴瘤细胞系SU-DHL-6)的细胞掺入至来自健康供体的新鲜分离的PBMC中时,通过示例CD70抗体ARGX-110优先地消除癌细胞系的细胞。

[0463] 因此,本发明的又一个方面涉及治疗或预防癌症的方法,其包括向由此需要的患者施用治疗有效量的本文中描述的CD70抗体或抗原结合片段,其中所述癌症是表现出CD70之低拷贝数表达的癌症。

[0464] 本发明还提供了用于在人患者中治疗或预防癌症的本文中描述的CD70抗体或抗原结合片段,其中所述癌症是表现出CD70之低拷贝数表达的癌症。

[0465] 在这些方面的每个中,低拷贝数癌症优选地选自:大B细胞淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、皮肤T细胞淋巴瘤、胃癌、肺癌、黑素瘤、胶质母细胞瘤和卵巢癌。

[0466] 一些特定的实施方案涉及采用包含大羊驼来源的Fab 27B3或其种系化变体之一

的抗体(尤其包括41D12(ARGX-110))治疗低拷贝数癌症。尤其是,可使用包含与人IgG1恒定区融合之41D12(27B3的种系化变体)的Fab区的抗体治疗任一上文所列低拷贝数癌症。

[0467] 本文中描述的CD70抗体还可用于治疗表征为CD70之表达的免疫性病症。这种免疫性病症的特定实例包括:类风湿性关节炎、自身免疫性脱髓鞘疾病(例如,多发性硬化、变应性脑脊髓炎)、内分泌性眼病、葡萄膜视网膜炎、系统性红斑狼疮、重症肌无力、Grave病、肾小球性肾炎、自身免疫性肝(hepatological)病、炎性肠病(例如,Crohn病、溃疡性结肠炎、乳糜泻病)、过敏反应、变应性反应、Sjogren综合征、I型糖尿病、原发性胆汁性肝硬化、韦格纳肉芽肿病、纤维肌痛、多肌炎、皮炎、多内分泌不足、Schmidt综合征、自身免疫性葡萄膜炎、Addison病、肾上腺炎、甲状腺炎、Hashimoto甲状腺炎、自身免疫性甲状腺疾病、恶性贫血、胃萎缩、慢性肝炎、狼疮样肝炎、动脉粥样硬化、亚急性皮肤性红斑狼疮、甲状旁腺功能减退、Dressier综合征、自身免疫性血小板减少症、特发性血小板减少性紫癜、溶血性贫血、寻常性天疱疮、天疱疮、疱疹样皮炎、斑秃、类天疱疮、硬皮病、进行性系统性硬化症、CREST综合征(钙质沉着、Raynaud现象、食管蠕动障碍、硬指症和毛细血管扩张)、男性和女性自身免疫性不育症、强直性脊柱炎、溃疡性结肠炎、混合性结缔组织病、结节性多动脉炎(polyarteritis nodosa)、系统性坏死性血管炎、特应性皮炎、特应性鼻炎、Goodpasture综合征、Chagas病、结节病、风湿热、哮喘、复发性流产、抗磷脂综合征、农民肺、多形性红斑、心切开后综合征、Gushing综合征、自身免疫性慢性活动性肝炎、养鸟人肺、中毒性表皮坏死性溶解症、Alport综合征、肺泡炎、变应性肺泡炎、纤维化肺泡炎、间质性肺病、结节性红斑、坏疽性脓皮病、输血反应、Takayasu 动脉炎、风湿性多肌痛、颞动脉炎、血吸虫病、巨细胞动脉炎(giant cell arthritis)、蛔虫病、曲霉病、Sampter综合征、湿疹、淋巴瘤样肉芽肿病、白塞氏病、Caplan综合征、川崎病、登革热、脑脊髓炎、心内膜炎、心内膜心肌纤维化、眼内炎、持久性隆起性红斑(erythema elevatum et diutinum)、银屑病、胎儿成红细胞增多症、嗜酸性筋膜炎、Shulman综合征、Felty综合征、丝虫病、睫状体炎、慢性睫状体炎、异色性睫状体炎、Fuch睫状体炎、IgA肾病、Henoch-Schonlein紫癜、移植物抗宿主病、移植排斥反应、心肌病、Eaton-Lambert综合征、复发性多软骨炎、冷球蛋白血症、Evan综合征和自身免疫性腺衰竭,B淋巴细胞的病症(例如,系统性红斑狼疮、Goodpasture综合征、类风湿性关节炎和I型糖尿病)、Th1淋巴细胞的病症(例如,类风湿性关节炎、多发性硬化症、银屑病、Sjorgren综合征、Hashimoto甲状腺炎、Grave病、原发性胆汁性肝硬化、韦格纳肉芽肿病、肺结核或移植物抗宿主病)、或者Th2淋巴细胞的病症(例如,特应性皮炎、系统性红斑狼疮、特应性哮喘、鼻结膜炎、变应性鼻炎、Omenn综合征、系统性硬化症或慢性移植物抗宿主病),Churg Strauss综合征、显微多血管炎、以及Takayasu动脉炎。

[0468] 一些特定的实施方案涉及采用包含大羊驼来源的Fab 27B3或其种系化变体之一的抗体(尤其包括41D12(ARGX-110))治疗任一上文所列免疫性病症。尤其是,可使用包括与人IgG1恒定区融合之41D12(27B3的种系化变体)的Fab区的抗体治疗任一上文所列癌症。在后者实施方案中,人IgG1恒定区可被进一步改造以使抗体效应子功能最大化(例如通过添加点突变)或者41D12-IgG1抗体可以是非岩藻糖基化的以同样进一步增强抗体效应子功能。

[0469] 本文中使用的术语“治疗”意指减慢、干扰、阻止、控制、改善、停止、减轻症状、病症、状况或疾病的严重程度,但未必涉及所有疾病相关症状、状况或病症的完全消除。

[0470] 就人治疗用途而言,可以将本文所述的CD70抗体以“有效量”施用于有此治疗需要的人对象。术语“有效量”指对人对象的单剂量或多剂量施用后,在疾病的治疗中提供治疗效力的CD70抗体的量或剂量。CD70抗体的治疗有效量可以包括范围为每单剂量约0.1mg/kg至约20mg/kg的量。医疗工作者可以通过监测CD70抗体对生物标志物(例如肿瘤组织中的细胞表面CD70)或者症状(例如肿瘤退化等)的作用来确定任何个体患者的治疗有效量。在任意给定时间点施用的抗体量可以不同,使得在治疗过程中施用最佳量的CD70抗体,无论是单独施用还是与任何其它治疗剂组合施用。

[0471] 还考虑与任意其它癌症治疗相组合地施用本文所述的CD70抗体或包含所述抗体的药物组合物以作为组合。

[0472] 内化少的抗体消除表达CD70之细胞的用途

[0473] 本文中描述的一个令人惊讶的发现是,与在癌细胞系表面上表达的CD70结合的CD70抗体内化少。这是令人惊讶的结果,因为现有技术之前已经描述CD70为“内化靶标”。尽管在结合CD70抗体内化的精确程度上不同癌细胞类型之间不同,但是没有观察到癌细胞类型“完全内化”结合的CD70抗体。例如,之前描述为快速内化的肾癌细胞系实际上示出内化最多约70%的结合抗体ARGX-110。许多其他癌细胞系内化小于30%、小于20%或甚至小于10%的结合ARGX-110。

[0474] 在内化程度上不同癌细胞系之间的变化主要是疾病指征依赖性的,使用不同的CD70抗体观察到了类似的结果。然而,当使用抗体ARGX-110时,在某些细胞系中的内化少是特别明显的。在许多癌细胞上观察到的低程度内化提供了使用具有强效应子功能的CD70抗体在体内消除(例如杀死或抑制其生长)癌细胞的原理。因为结合的CD70抗体在许多癌细胞上被相对内化少,所以抗体将保持与细胞表面的结合,从而可通过与人患者的免疫系统的相互作用触发效应子功能(ADCC、CDC、ADCP)。

[0475] 因此,本发明的又一个重要方面涉及在人患者中消除表达CD70之细胞的方法,包括向所述患者施用有效量的与人CD70相结合的抗体,其中所述表达CD70的细胞在6小时后表现出所述抗体的30%或更少、25%或更少、20%或更少、15%或更少、10%或更少或者5%或更少的内化,并且其中所述抗体表现出选自ADCC、CDC和ADCP的至少一种效应子功能。

[0476] 在该方法中,所述CD70抗体(具有活性效应子功能)用于消除表达CD70的细胞。表达CD70之细胞的消除可形成治疗性或预防性治疗的基础,例如用于治疗或预防表达CD70的癌症或者用于治疗预防CD70相关的免疫性病症。借此消除表达CD70之抗体的精确机制可取决于由CD70抗体所表现的效应子功能的类型,但是将依赖于CD70抗体与细胞表面CD70的强(高亲和力)结合,以及结合抗体的低程度内化。

[0477] 在某些实施方案中,表达CD70的细胞为表达CD70的癌细胞。尤其是,表达CD70的癌细胞可为选自以下的癌症类型:Burkitt淋巴瘤、大B细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、胰腺癌、胃癌、胶质母细胞瘤和肺癌。已证明来源于这些癌症中每一种的细胞系经6小时内化30%或更少的结合的CD70抗体。在又一个实施方案中,表达CD70的癌细胞可具有选自以下的癌症类型:Burkitt淋巴瘤、大B细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、胃癌、胶质母细胞瘤和肺癌。已证明来源于这些癌症中每一种的细胞系经6小时内化20%或更少的结合的CD70抗体。在又一个实施方案中,表达CD70的癌细胞可具有选自以下的癌症类型:

Burkitt淋巴瘤、大B细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、胃癌和肺癌。已证明来源于这些癌症中每一种的细胞系经6小时内化10%或更少的结合的CD70抗体。

[0478] 在另一些实施方案中,表达CD70的细胞可以是表达CD70的活化T细胞,其经6小时没有表现出任何可检测的结合CD70抗体的内化(尤其是没有观察到ARGX-110的内化)。结合的CD70抗体没有被CD70+活化T细胞内化这一观察结果强有力地支持具有强效应子功能(ADCC、CDC或ADCP)的CD70抗体(包括但不限于ARGX-110)在治疗由CD70+活化T细胞介导的免疫性疾病(包括自身免疫性疾病,例如类风湿性关节炎、银屑病、SLE等)中的用途。

[0479] 上文所列实施方案可基本上使用任意CD70抗体。在一些特定的实施方案中,抗体可以是这样的任意CD70抗体,实验上显示其在选自Raji、SU-DHL-6、MHHPREB1、Mino、Mec1、JVM-2、MKN-45、A549、U87MG、PANC-1、PANC-89、L428、Granta 519、Rec-1和EBC-1的表达CD70之癌细胞系中在6小时后表现出30%或更少、25%或更少、20%或更少、15%或更少、10%或更少或者5%或更少的内化。实际上,在所附实施例中描述的细胞系内化测定可作为筛选用于以下二者:确定是否应采用具有强效应子功能的CD70抗体或采用CD抗体-药物缀合物(下述讨论)来靶定特定的疾病适应症,并且还鉴别用于治疗特定疾病适应症的合适CD70抗体。

[0480] 因此,本发明还提供了在人患者中消除表达CD70之癌细胞的方法,包括向所述患者施用有效量的与人CD70相结合的抗体,其中所述抗体在选自Raji、SU-DHL-6、MHHPREB1、Mino、Mec1、JVM-2、MKN-45、A549、U87MG、PANC-1、PANC-89、L428、Granta 519、Rec-1和EBC-1的表达CD70之癌细胞系中在6小时后表现出30%或更少的内化,并且其中所述抗体表现出选自ADCC、CDC和ADCP的至少一种效应子功能。在一个实施方案中,待用于在人患者中消除表达CD70之癌细胞的抗体可以是这样的抗体,其在选自Raji、SU-DHL-6、Granta 519、Rec-1、Mec1、JVM-2、MKN-45、A549和EBC-1的表达CD70之癌细胞系中经6小时表现出10%或更少的内化,并且还表现出选自ADCC、CDC和ADCP的至少一种效应子功能。

[0481] 本发明的该方面的一些特定实施方案可使用本文中描述的任意CD70抗体,其以极高亲和力结合人CD70。一些优选的实施方案可使用包含大羊驼来源之Fab 27B3或其种系化变体之一的抗体(尤其包括41D12 (ARGX-110))。一些特别优选的实施方案使用包含与人IgG1恒定区融合之41D12 (27B3的种系化变体)的Fab区的抗体。在后者实施方案中,人IgG1恒定区可被进一步改造以使抗体效应子功能最大化(例如通过添加点突变)或者41D12-IgG1抗体可以是非岩藻糖基化的以同样进一步增强抗体效应子功能。

[0482] 因为使用内化少的CD70抗体消除表达CD70之细胞的原理依赖于抗体效应子功能,所以优选的是在本发明的该方面中使用的抗体不是免疫缀合物,其中所述CD70抗体与药剂、细胞毒剂、细胞抑制剂、药物部分等相连接。事实上,本发明的该方面的一个特定优点是避免需要使用抗体-药物缀合物,这对患者安全性(避免施用可能有毒的药剂)和经济(避免高成本地合成抗体-药物缀合物)两方面而言是期望的。

[0483] 采用抗体-药物缀合物以显著内化的CD70抗体杀死细胞

[0484] 在本实例中表明了CD70抗体的内化程度方面有显著的细胞间差异,并且这些差异主要依赖于细胞类型,而不是CD70抗体的性质(尽管当使用抗体ARGX-110时差异尤其显著)。对于表现出结合CD70抗体之显著内化程度(即6小时后30%或更多、优选40%或更多、更优选50%或更多、或者甚至60%或更多的内化)的这些细胞类型,替换性治疗方案可以基于使用CD70抗体-药物缀合物。

[0485] 因此,本发明的又一个重要方面涉及在人患者中消除表达CD70之细胞的方法,包括向所述患者施用有效量的抗体-药物缀合物,其包含与人CD70相结合之抗体和细胞毒性或细胞抑制性药物部分,其中所述表达CD70的细胞在6小时后表现出与人CD70相结合之所述抗体的30%或更多、40%或更多、50%或更多、或者60%或更多的内化。

[0486] 在一些特定的实施方案中,表达CD70的细胞可在6小时内内化40%至70%、优选50%至70%的CD70抗体(为形成抗体-药物缀合物的基础)。

[0487] 在该方法中,CD70抗体-药物缀合物用于消除表达CD70的细胞。表达CD70之细胞的该消除可形成治疗性或预防性治疗的基础,例如用于治疗或预防表达CD70的癌症或者用于治疗或预防CD70相关的免疫性病症。借此消除表达CD70之抗体的精确机制可取决于抗体-药物缀合物的性质,即不论“药物”部分是否为细胞毒性的或细胞抑制性的,而将依赖于CD70抗体与细胞表面CD70的强(高亲和力)结合,以及结合抗体的显著内化。

[0488] 在某些实施方案中,表达CD70的细胞为表达CD70的癌细胞。尤其是,表达CD70的癌细胞可具有选自以下的癌症类型:皮肤T细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、肾细胞癌、星形细胞瘤、黑素瘤和卵巢癌。证明来源于这些癌症中每一种的细胞系经6小时内化超过30%的结合CD70抗体。在又一个实施方案中,表达CD70的癌细胞可具有选自以下的癌症类型:肾细胞癌、星形细胞瘤、黑素瘤和卵巢癌。已证明来源于这些癌症中每一种的细胞系经6小时内化超过50%的结合CD70抗体。

[0489] 在本发明的该方面的一些特定实施方案中,抗体-药物缀合物可以是基于本文中描述的任意CD70抗体,其以极其高亲和力结合人CD70。在一些优选的实施方案中,抗体-药物缀合物可以基于包含大羊驼来源之Fab 27B3或其种系化变体之一的抗体(尤其包括41D12)。旨在用于人治疗用途之抗体-药物缀合物的性质通常为本领域熟知,特别是关于“药物”部分的性质(例如细胞毒剂或细胞抑制剂)和药物部分与CD70抗体部分的缀合方式。例如WO 2004/073656中给出了CD70抗体-药物缀合物的实例。

[0490] 药物组合物

[0491] 本发明的范围包括药物组合物,其包含本发明的CD70抗体或其抗原结合片段中的一种或组合,其与一种或更多种可药用载体或赋形剂一起配制。这样的组合物可包括CD70抗体中的一种或组合(例如,两种或更多种不同的CD70抗体)。

[0492] 配制用于人治疗用途之抗体的技术在本领域中是公知的,并且综述于例如Wang等,Journal of Pharmaceutical Sciences,第96卷,第1-26页,2007中。

[0493] 通过引用并入

[0494] 在上文的描述和下述实施例中引用了许多出版物,其各自通过引用整体并入本文。

实施例

[0495] 将参照下述非限制性实验实施例进一步理解本发明。

[0496] 实施例1:大羊驼的免疫

[0497] 大羊驼的免疫和外周血淋巴细胞(PBL)的获取以及随后RNA的提取和抗体片段的扩增都依照De Haard及其同事所述进行(De Haard H等,J.Bact.187:4531-4541,2005)。采用表达CD70的786-0细胞(ATCC-CRL-1932)免疫两只大羊驼和采用表达CD70的Raji细胞

(ATCC-CCL-86) 免疫两只大羊驼。对于每次免疫新鲜制备细胞并且对于CD70表达通过FACS分析验证细胞。采用在颈部每周一次经六周肌肉注射的约 10^7 个活细胞来免疫大羊驼。将弗氏不完全佐剂注射到与细胞免疫位点相距几厘米的颈部肌肉中。

[0498] 在免疫前后收集10ml血液样品以研究免疫应答。通过免疫前(第0天)和免疫后(第55或69天)的ELISA对于针对重组CD70 (Flag-TNC-CD70) 之抗体的存在测试来自大羊驼的血清。应注意,当检测抗体时,使用对常规与重链抗体不区分的山羊抗大羊驼IgG1/2 (Bethyl, A160-100P),意味着经测量CD70应答来自总IgG。结果示于图1中。

[0499] 最后一次免疫后三至四天,收集400ml血液用于从PBL中提取总RNA,使用Ficoll-Paque梯度以分离PBL和由Chomczynski P等,Anal. Biochem. 162:156-159, 1987描述的方法以制备RNA。平均地,实现了450 μ g的RNA产量,其中80 μ g用于随机cDNA合成和随后VHCH1、V λ C λ 和V κ C κ 基因片段的扩增。

[0500] 实施例2:文库构建

[0501] 使用两步PCR构建独立的V λ C λ 和V κ C κ 文库,其中进行采用非标签化引物的25个循环,然后使用这些引物的标签化形式进行10个循环(De Haard H,等,Biol. Chem. 274, 1999)。使用同一方法平行地建立VHCH1文库。各个文库的大小在 10^7 之 10^{10} cfu之间。接下来,将来自V λ C λ 和V κ C κ 文库的轻链再分别地克隆至表达VHCH1的载体中以分别建立“ λ ”和“ κ ”大羊驼Fab文库。或者,将经消化VHCH1扩增子直接克隆至V λ C λ 和V κ C κ 文库中,从而避免构建单独的VHCH1文库。由于轻链替换(shuffling)通常比重链替换提供更好的亲和力变体,所以我们选择产生预克隆的轻链文库和将重链扩增子直接克隆至这些初级库(primary repertoires)中。

[0502] 最终的噬菌体展示文库为 5×10^8 至 2×10^9 cfu。可使用PCR例行地通过分析包含克隆之全长Fab的百分数来对文库进行定量控制。

[0503] 实施例3:选择和筛选

[0504] 使用标准方案针对捕获的重组CD70 (Flag-TNC-CD70) 或针对经直接包被的CD70进行两至三轮的噬菌体选择。采用胰蛋白酶进行经结合噬菌体的洗脱。

[0505] 从转染至TG1中的选定噬菌体,随机挑选单个克隆用于在96孔板中培养。根据标准方案的IPTG诱导后,制备包含Fab的周质级分(peris)。在所有选择中和对于所有四只大羊驼而言,均发现了能够表达Fab的数个克隆,所述Fab能够抑制通过抑制ELISA测定的CD27与CD70之间的相互作用(图2和3)。在该测定中,通过抗Flag mAb捕获Flag-TNC-CD70并且在CD70Fab(图2和3)或CD70mAb(图4)的缺乏和存在下通过生物素化的抗CD27mAb和strep-HRP检测CD27-Fc的结合。在图2B中,可以看出,与9D1具有相同VH但是包含有些不同的轻链的27B3似乎更有效地阻断CD27与CD70的结合,这与采用Biacore测量的该Fab的较高解离速率一致(数据未给出)。表3表明了对于在CD70抑制ELISA中测试的多个大羊驼-人嵌合mAb的阻断效力(表示为IC₅₀)。Fab 27B3具有约0.4nM的IC₅₀,这甚至似乎在形成嵌合大羊驼-人IgG1后有改进,产生IC₅₀为0.25nM,而具有其他轻链的mAb 9D1的效力低3倍(0.73nM)。图3为对于阻断活性(在抑制ELISA中,参见白色柱)和对于CD70结合(结合ELISA,黑色柱)测试大羊驼CD70Fab之实验的综合图。对于结合ELISA,通过抗Flag mAb捕获Flag-TNC-CD70并且使用抗myc-HRP mAb检测Fab的结合,这识别了与Fd片段的C端相融合的MYC标签。出于比较目的,平行地测试了针对CD70的已知单克隆抗体(在US 2010/0129362A1中描述的SGN70,克

隆1F6;和在W02008/074004图5A和5B中描述的MDX69A7)。鉴别了表明ELISA中纯结合和非阻断的许多大羊驼来源的Fab克隆(参见图3-例如Fab克隆45H8、45C4、46A2、46G7、46E4、46F12和46G12)。感兴趣的是克隆59D10,其作为Fab不具有阻断活性,但是当转化成嵌合IgG时为拮抗性的(参见表3)。本文中别处示出了结合和阻断大羊驼来源之Fab克隆的VH和VL结构域的氨基酸序列(表6~9)。

[0506] 表3:使用重组人CD70在CD70抑制ELISA中测量的对于各个SIMPLE抗体(mAb)以及基准(benchmark)SGN70和MDX69A7的表示为IC₅₀(ng/ml)的阻断效力。

mAb	IC ₅₀ (ng/ml)
SGN70	330
MDX69A7	4038
9D1	109
5F4	296
9E1	1400
9G2	40
5B2	92
9B2	126
4D2	254
24D4	84

[0507]

24B6	420
27B3	38
19G10	75
57B6	154
59D10	107

[0508] 还针对mAb 27B3和57B6抑制恒河猴重组CD70(FLAG-TNC-恒河猴CD70)与CD27之间相互作用的能力进行了测试。由上述抑制ELISA测定的IC₅₀值分别为150和135ng/ml。

[0509] 实施例4:对人和恒河猴CD70的亲合力

[0510] 使用Biacore测定了纯化的大羊驼来源的抗CD70阻断Fab的解离速率。在CM5Biacore芯片上固定重组人CD70。根据由Biacore提供的方法和通过使用NHS/EDC试剂盒(Biacore AB)进行固定:活化芯片后,制备50μg/ml重组CD70在pH 5的10mM醋酸盐缓冲液中的溶液并且注入1μl该溶液(50ng),从而导致约1000RU的表面密度。

[0511] 通过胰蛋白酶消化制备CD70mAb ARGX-110、MDX2H5和SGN70的Fab(本文中别处描述了SGN70和MDX69A7,W02008/074004图1A和1B中描述了MDX2H5(也称为MDX1411))。将约100~400μg/ml浓度的Fab在hepes缓冲盐水(0.1M Hepes、1.5M NaCl、30mM EDTA、0.5% v/v表面活性剂P20)中稀释6倍。将它们注入(30μl)并使其以30μl/分钟的流速通过流动细胞。

Fab与CD70结合后,经10分钟监测解离速率。解离后,通过注入5 μ l 10mM NaOH再生流动细胞表面。有时需要多次注入NaOH以再生表面,这取决于Fab的亲合力。通过使用BIAevaluation软件进行解离速率分析。首先,从采用经包被流动细胞获得的sensogram减去空转中获得的那些。之后使用拟合动力学应用经10分钟测定解离速率并计算 K_d 值。另外,还测定了CD27对CD70的解离速率。解离速率总结于表4中。

[0512] 基于 $0.4\sim 4.8\times 10^{-4}\text{s}^{-1}$ 的Biacore解离速率,所测试的所有大羊驼来源的Fab均以明显非常低的解离速率(即高亲合力)与人重组CD70和与恒河猴重组CD70相结合。对人CD70,大羊驼来源之Fab的解离速率远高于参照mAb来源之Fab($7\sim 30\times 10^{-4}\text{s}^{-1}$)。具有最佳解离速率的大羊驼来源的Fab显示具有与CD27对其与CD70相互作用的解离速率($0.8\times 10^{-4}\text{s}^{-1}$)相当的解离速率。应注意,使用Biacore测量解离速率的下限为约 $0.4\times 10^{-4}\text{s}^{-1}$ 。因此,具有通过Biacore评估的下降接近该极限之解离速率的大羊驼来源的Fab可事实上对CD70表现出甚至更高的亲合力。

[0513] 表4:大羊驼来源的Fab和参照Fab对人或恒河猴CD70的解离速率

[0514]

测试的Fab	$k_{\text{off}} (\text{s}^{-1}) \times \text{E}^{-4}$ 人 CD70	$k_{\text{off}} (\text{s}^{-1}) \times \text{E}^{-4}$ 恒河猴 CD70
SGN70-Fab	7.0	
MDX2H5-Fab	17	无结合
MDX69A7-Fab	30	
CD27	0.8	
1C2	0.4	3.2
9D1	4.8	2.0
9G2	1.8	1.8
5F4	0.8	5.0
9E1	1.9	2.0
9B2	2.8	6.1
4D2	3.3	2.9
27B3	0.8	
24E3	0.8	
33D8	4.5	
24F2	1.6	
24B6	1.0	
19G10	0.8	

8B12	3.6	
45B12	2.1	
45D9	2.1	
45F8	2.0	
57B6	1.0	0.4
59D10	13.9	无结合

[0515] 实施例5: 嵌合大羊驼-人CD70mAb与CD70阳性细胞的结合

[0516] 目标大羊驼来源的Fab克隆的VH和VL与人IgG1的恒定区和与人C λ (所有可变轻链区为 λ 来源) 相融合, 从而产生为专利申请W0 2009/145606中所描述系统中的二价嵌合单克隆抗体。根据凝胶过滤采用蛋白质A纯化嵌合大羊驼-人mAb。

[0517] 786-0细胞用1/5稀释系列的嵌合大羊驼-人CD70抑制mAb (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~0.25ng/ml) 孵育, 然后使用抗人Fc-FITC抗体 (来自供应商Binding Site的1/500稀释的缀合物AF006) 检测mAb与细胞的结合。使用流式细胞仪测量10,000个细胞/条件的荧光, 然后绘制中值荧

光。结果示于图5中。大部分mAb以高亲和力与786-0细胞相结合。证明作为Fab SIMPLE抗体1C2具有最佳解离速率和阻断效力,不能够识别细胞表面表达的CD70(数据未给出),从而没有更进一步研究。SIMPLE抗体27B3对细胞结合受体具有EC50为0.24nM的最佳亲和力。

[0518] 在又一个实验中,NHL来源的MHH-PREB-1细胞(10^5 个细胞)用浓度梯度的嵌合大羊驼-人CD70抑制mAb(20 μ g/ml~0.25ng/ml)孵育,然后使用抗人IgG-FITC抗体检测mAb与细胞的结合。结果示于图5B中。57B6和59D10的EC50值分别为83和74ng/ml。

[0519] 实施例6:嵌合大羊驼-人CD70mAb在共培养实验中的抑制

[0520] 为了在基于细胞的测定中确定阻断效力,使用由Wyzgol及其同事描述的系统(J Immunol (2009) 183:1851-1861)。在与三聚体重组CD70连接后经人CD27转染的纤维肉瘤细胞系HT1080分泌IL-8,然后可通过降低的细胞因子水平测量与中和mAb相互作用的阻断。使用其中B细胞淋巴瘤Raji细胞系充当CD70源的测定的经修饰形式,尽管分子在细胞表面上表达,从而比可溶性CD70更相关。

[0521] 培养Raji细胞并通过FACS分析检查CD70表达。之后将细胞在96孔组织培养板(50,000个细胞/孔)中与抗CD70mAb混合并在室温下孵育1小时。添加HT1080-CD27细胞(10,000个细胞/孔)并充分混合。将共培养物转移至培养箱中并在37℃下培养过夜。收集上清液并通过ELISA分析其IL-8含量。SIMPLE抗体的结果示于图6中并且与参照CD70mAb相比较。与SGN70的42ng/ml和MDX69A7的143ng/ml相比,嵌合大羊驼-人CD70mAb的IC50值为3至517ng/ml(参见表5)。SIMPLE抗体27B3(IC50为33pM)和9G2(IC50为20pM)比基准SGN70(IC50为370pM)的效力高出10至20倍,而基准SGN70还比基准MDX69A7(1nM)的效力高出3倍。因此可以推测,嵌合大羊驼-人mAb在阻断CD27与CD70之间相互作用中极其强效并且在该高度相关生物测定中优于基准抗体。

[0522] 表5:在基于Raji的共培养测定中所测试嵌合大羊驼-人CD70mAb和参照mAb的表示为IC50值(ng/ml)的中和效力

mAb	IC50 (ng/ml)
9D1	29
5F4	32
9B2	213
4D2	54
9E1	517
5B2	19
SGN70	55
MDX69A7	143
27B3	5
19G10	16
9G2	3
57B6	5
59D10	10

[0523]

[0524] 实施例7:抗体依赖性细胞的细胞毒性活性

[0525] 使用McEarchern等 (Blood (2007) 109:1185-1192) 描述的标准 Cr^{51} 释放测定来测量抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC)。通过标准ficoll分离从肝素化全血中纯化人外周血单核细胞 (PBMC) 并用作NK细胞 (效应细胞) 源。使用来自数位独立供者的血。将细胞以 2×10^6 个/ml悬于含200U/ml的人IL-2 (用于刺激NK细胞) 的培养基中并在37℃下孵育过夜。次日, 收集贴附和未贴附细胞并在培养基中洗涤一次。靶细胞为786-0细胞 (RCC) 并且用 Cr^{51} 标记。靶与效应细胞比率为1:20并且在培养基中与不同浓度存在的抗体一起孵育2小时。针对在不同浓度下786-0细胞上的ADCC活性, 测试嵌合大羊驼-人mAb以及基准抗体。

[0526] 通过以下方程式来确定裂解百分比:

[0527] $\text{裂解}\% = (\text{样品CPM} - \text{自发释放CPM}) / (\text{最大释放CPM} - \text{自发释放CPM}) \times 100$ 。

[0528] 结果表明, 所有嵌合大羊驼-人mAb均通过ADCC活性诱导靶细胞裂解 (图7)。SIMPLE mAb 27B3具有约 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 的效力, 从而比亲和变体9D1的效力高出10倍, 而亲和变体9D1具有与基准SGN70相当的 IC_{50} , 基准SGN70在ADCC中比基准MDX69A7的效力高出2.5倍。SIMPLE抗体27B3组合了一流的受体-配体阻断效力和优秀的ADCC效力, 从而具有有利的治疗谱。

[0529] 实施例8:CD70特异性mAb的补体依赖性细胞毒性效力

[0530] 在由McEarchern等 (Blood (2007) 109:1185-1192) 描述的标准测定中确定了抗体的补体依赖性细胞毒性 (CDC)。在第一对照实验中, 通过FACS分析, 对于CD70抗原的存在测试U266 (MM) 和MH-1 (NHL) 细胞。在下一个实验中, 以3种不同的浓度和在3、6或9%人血清 (作为人补体源) 的存在下, 对于两种细胞系上CDC活性, 测试嵌合大羊驼-人CD70mAb。推测在9%血清的存在下U266细胞给出最佳信号/噪声比率。

[0531] 在下一个实验中, 在9%人血清的缺乏或存在下使U266细胞与 $0.001 \sim 20\mu\text{g}/\text{ml}$ 的嵌合大羊驼-人mAb (图8, 上图) 或参照CD70mAb (图8, 下图) 相混合并在37℃下孵育2小时。使细胞旋转沉降并且添加碘化丙啶以确定死亡细胞的数目。在FACS中测量细胞裂解。在9%人血清的存在下, 在U266细胞上所有嵌合大羊驼-人mAb表明CDC活性。SIMPLE抗体27B3与基准SGN70具有类似的 IC_{50} , 同时又比MDX69A7的效力高了10倍。

[0532] 实施例9:抗体依赖性细胞吞噬作用效力

[0533] 为了分析SIMPLE mAb的抗体依赖性细胞吞噬作用 (ADCP) 特性, 实施由McEarchern等 (Blood (2007) 109:1185-1192) 描述的测定。在该测定中, 通过标准ficoll分离从肝素化全血中纯化人外周血单核细胞 (PBMC)。使用来自数位独立供者的血。将细胞在组织培养瓶中的含有10%FCS的RPMI中于37℃孵育过夜。移除未贴附细胞并将贴附细胞在含有500U/ml rhGM-CSF的75ml X-VIVO 15培养基 ($7.5\mu\text{g}/75\text{ml}$) 中培养15天。15天后, 收获贴附细胞 (单核细胞来源的巨噬细胞 (MDM))。

[0534] 在V底96孔板中将采用加载了红色染料PKH26的 8.0×10^4 个靶细胞 (786-0细胞) 与mAb在冰上孵育30分钟。然后, 添加 2.0×10^4 个MDM细胞 (靶与效应子 (786-0与MDM) 比率为4:1), 在37℃下孵育1小时后, 将细胞离心, 重悬于 $100\mu\text{l}$ PBS 1%BSA中, 然后转移至V底96孔板中。对于巨噬细胞染色, 经30分钟添加抗CD11b单克隆抗体 (FITC缀合的) 同时将板保持在冰上, 之后用PBS洗涤细胞两次并采用1%低聚甲醛 (PBS中) 固定。通过FACS分析样品, 其中在双重染色细胞上计数吞噬作用。结果示于图9中并且这些表明测试的所有嵌合大羊驼-人mAb在诱导ADCP中均是强效的。SIMPLE抗体27B3在 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度通过为约 $100\text{ng}/\text{ml}$ 的 IC_{50}

(0.4nM) 诱导通过巨噬细胞的多至50%的经标记肿瘤细胞的吞噬作用。

[0535] 实施例10:肿瘤细胞系786-0上抗CD70mAb的内化

[0536] 已经表明,CD70抗体与肾癌来源之细胞系786-0的结合导致抗体-受体复合物的快速(1小时内)内化(Adam等,Br J Cancer (2006) 95:298-306)。为了测试SIMPLE抗体和基准mAb针对CD70的内化,将786-0细胞培养在96孔微滴定板中并在37℃下孵育过夜。添加2.5μg/ml mAb并与细胞在37℃下孵育0~24小时。用stripping缓冲液(150mM NaCl,100mM甘氨酸,pH=2.5;代码“内(IN)”表示通过CD70内化的mAb的量)或PBS(代码“外(OUT)”并且表示与细胞外面的受体结合的mAb的量)经5分钟洗涤板3次。最后,采用4%低聚甲醛在RT下将细胞固定30分钟,采用PBS洗涤,然后与0.2%Triton-X-100(“IN”)或PBS(“OUT”)孵育5分钟。之后,洗涤细胞两次并在RT下与100mM甘氨酸孵育10分钟,然后与PBS+1%BSA孵育30分钟。最后,在采用Li-Cor Odyssey红外扫描仪分析之前,采用山羊抗人Fc(Jackson immunoresearch 109-005-098)和抗山羊IRDYE800(Li-cor 926-32214)对细胞进行染色。在图10中将保留在细胞外面的抗体(即非内化的)计数为平均MFI外。结果表明,数个mAb在细胞表面比其他mAb保留时间更长(较高信号)。然而,没有mAb完全内化:最初(0至2小时),mAb内化进行地非常快速,但是之后似乎达到了稳定状态,其中30~40%的mAb保留在细胞外面,甚至在37℃下孵育24小时后也是如此。SIMPLE抗体27B3与基准抗体SGN70和MDX69A7一样快速地内化。有趣的是,观察到,SIMPLE抗体9E1和19G10(但也有其他的)以高水平保留在细胞外面,甚至在孵育24小时后也是如此(图10的下图)。为了有效地诱导ADCC、CDC和ADCP作用,重要的是高水平的CD70特异性抗体保留在所靶定癌细胞外面以募集负责细胞杀伤的效应子免疫细胞。另一方面,快速内化抗体具有作为抗体药物缀合物(ADC)的潜力。

[0537] 实施例11:嵌合大羊驼-人mAb在肿瘤异种移植模型中的体内效力

[0538] 为了建立弥散性(disseminated)疾病,将0.2mL PBS中的 10^6 个Raji细胞注入C.B.-17严重联合免疫缺陷(SCID)小鼠(Harlan,Indianapolis,IN)的侧尾静脉中。注射后,汇集所有的小鼠,之后随机置于多个处理组中,每组9只小鼠。在通过腹膜内注射的细胞移植后第1、4、8、11、15天在0.5ml中施用抗体。每周至少两次监测小鼠并且当它们表现出疾病信号时处死小鼠,这些信号包括体重损失15%至20%、缩成一团的姿势、嗜睡、颅肿胀或脱水。在剂量应答中小鼠接受采用41D12的治疗。另外,以10mg/kg测试41D12的Fc-dead形式。之前已经在文献中描述了该Fc-dead形式并且其不具有ADCC和CDC活性和具有低得多的ADCP活性(McEarchern等,Clin Cancer Res (2008) 14 (23):7763-72)。结果作为存活曲线示于图11中。这些数据显示,对照小鼠的中值存活时间为27天。当施用等于或高于0.1mg/kg的41D12的剂量时,中值存活时间延长至至少67天。0.01mg/kg的剂量仍是有效的。41D12的Fc-dead形式不具有体内效力,表明了ADCC、CDC和ADCP在该模型中的重要性。

[0539] 实施例12:非岩藻糖基化mAb的表达

[0540] 已经表明具有降低量岩藻糖基残基的抗体使ADCC提高了10~1000倍(Iida等,Clin Cancer Res. (2006) 12 (9):2879-2887)。采用编码嵌合大羊驼-人CD70mAb之重链和轻链的真核表达载体对缺乏岩藻糖基转移酶基因(FUT8,BioWa,Inc.)的CHO细胞系Ms704-PF和MS705进行电穿孔。通过在Excell 325-PF CHO培养基中生长来选择耐药性克隆。通过标准CD70结合ELISA对IgG产生筛选克隆。

[0541] 表6:CD70特异性大羊驼来源的VH的序列

[0542]

Fab	框架1	SEQ ID	CDR1	SEQ ID
1C2	ELQVVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLS	1	NYWMH	10
9D1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	2	VYYMN	11
8B12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	2	VYYMN	11
8C12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	2	VYYMN	11
9E1	EVQLQESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFD	3	DYAMS	12
5F4	EVQVQESGGGLVHPGGSLRLSCAASGFTFD	4	TYAMS	13
5B2	QVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTVS	5	NPAMS	14
6D5	EVQLVQPGAELRKPGASVKVSCKASGYTFT	6	SYIID	15
4D2	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLACTVSGGSIT	7	TSYYYWS	16
9A1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	2	SYAMS	17
9G2	QVQLVESGGGLMQPGGSLRLSCAASGFTFS	8	SSAMS	18
9B2	QLQVVESGGGLMQPGGSLRLSCAASGFTFS	9	GSAMS	19
27B3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	2	VYYMN	11
24E3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	2	VYYMN	11
33D8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	2	VYYMN	11
24F2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	2	VYYMN	11
24B6	EVQLQESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFD	3	DYAMS	12
19G10	EVQLQESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFD	3	DYAMS	12
45B12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	2	AYYMN	20
45D9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	2	AYYMN	20
45F8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	2	AYYMN	20
45A12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	2	AYYMN	20
45B6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	2	AYYMN	20
57B6	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFS	254	HYAMS	256
59D10	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASELSFS	255	ISEMT	257

[0543]

Fab	框架2	SEQ ID	CDR2	SEQ ID
1C2	WVRQAPRKGLEWVS	21	TISTDNSRTYYADSVKG	26
9D1	WVRQAPGKGLEWVS	22	DINNEGDTTYADSVKG	27
8B12	WVRQAPGKGLEWVS	22	DINNEGDTTYADSVKG	28
8C12	WVRQAPGKGLEWVS	22	DINNEGDTTYADSVKG	28
9E1	WVRQAPGKGLEWVS	22	SIYMYDSSTYYADSVKG	29
5F4	WVRQAPGKGLEWVS	22	AISWSGGGETFYAESMKG	30
5B2	WVRQAPGKGLEWVS	22	EITNYGYNRYADSVKG	31
6D5	WVRQAPGQGLEWMG	23	RIDPEDGGTKYAQKFQG	32
4D2	WIRQPPGKGLEWMG	24	AIGSRGSTYYSPSLKT	33
9A1	WVRQAPGKGLEWVS	22	DINSGGGSTKYNDSVKG	34

[0544]

9G2	WVRQAPGKGLEWVS	22	SIYSDSSYTTYADSVKS	35
9B2	WVRQAPGKGLEWVS	22	SIYSHSMYTTYADSVKS	36
27B3	WVRQAPGKGLEWVS	22	DINNEGTTTYADSVKG	27
24E3	WVRQAPGKGLEWVS	22	DINNEGTTTYADSVKG	27
33D8	WVRQAPGKGLEWVS	22	DINNEGTTTYADSVKG	27
24F2	WVRQAPGKGLEWVS	22	DINNEGTTTYADSVKG	27
24B6	WVRQAPGKGLEWVS	22	SIYMYDSSTYYADSVKG	29
19G10	WVRQAPGKGLEWVS	22	SIYMYDSSTYYADSVKG	29
45B12	WVRQAPGKGLEWIS	25	DINNEGYETYYADSVKG	37
45D9	WVRQAPGKGLEWIS	25	DINNEGYETYYADSVKG	37
45F8	WVRQAPGKGLEWIS	25	DINNEGYETYYADSVKG	37
45A12	WVRQAPGKGLEWIS	25	DINNEGYETYYADSVKG	37
45B6	WVRQAPGKGLEWIS	25	DINNEGYETYYADSVKG	37
57B6	WVRQAPGKGLEWVS	22	GDNTYDGGTRYQDSVKG	258
59D10	WVRQAPGKGLEWVS	22	GISGVTGGSSTSYADSVKG	259

[0545]

Fab	框架3	SEQ ID	CDR3	SEQ ID
1C2	RFTISRDNHAKNTLILQMNS LKSEDTAVYYCIR	38	GSDYEH	49
9D1	RFTISRDNHAKNTLTQMN SLKPEDTALYYCVR	39	DAGYSNHVPIFDS	50
8B12	RFTISRDNHAKNTLTQMD SLKPEDTALYYCVR	40	DAGYSNHVPIFDS	50
8C12	RFTISRDNHAKNTLTQMD SLKPEDTALYYCVR	40	DAGYSNHVPIFDS	50
9E1	RFTISTDNHAKNTVYLQMN SLKSEDTAVYYCAK	41	DINRSYGSSWSHF GPIFSS	51
5F4	RFTISRDNHAKNTLYLQMN LKSEDTAVYYCAR	42	GMGLAEGLTD	52
5B2	RFTISTDNHAKNTLYLQMNS LRSEDSAVYYCTA	43	SLGLEYG YGD	53
6D5	RVTFTADASTSTAYVELSS LRSEDTAVYYCAS	44	RRRDFDY	54
4D2	RTSISRDTSKNQFTLQLSS VTPEDTAVYYCAR	45	VTGEITYNSGSYYYTLNLF DY	55
9A1	RFAISRDNHAKNTLYLQMN SLKPEDTAVYYCAK	46	EGGSGRYWTNEYDY	56
9G2	RFTISTDNHAKNTLYLQMNS LKPDDTAVYYCAG	47	SSDYEGSFAS	57
9B2	RFTISTDNHAKNTLYLQMNS LKPDDTAVYYCAA	342	SSDYEGLFVS	58
27B3	RFTISRDNHAKNTLTQMN SLKPEDTALYYCVR	39	DAGYSNHVPIFDS	50
24E3	RFTISRDNHAKNTLTQMN SLKPEDTALYYCVR	39	DAGYSNHVPIFDS	50
33D8	RFTISRDNHAKNTLTQMN SLKPEDTALYYCVR	39	DAGYSNHVPIFDS	50
24F2	RFTISRDNHAKNTLTQMN SLKPEDTALYYCVR	39	DAGYSNHVPIFDS	50
24B6	RFTISTDNHAKNTVYLQMN SLKSEDTAVYYCAK	41	DINRSYGSSWSHF GPIFSS	51
19G10	RFTISTDNHAKNTVYLQMN SLKSEDTAVYYCAK	41	DINRSYGSSWSHF GPIFSS	51
45B12	RFTISRDNHAKNTLTQMD	48	DAGYSNHVQIFDS	59

[0546]

	SLKPEDTARYYCVR			
45D9	RFTISRDNNAKNTLTLMQMD SLKPEDTARYYCVR	48	DAGYSNHVQIFDS	59
45F8	RFTISRDNNAKNTLTLMQMD SLKPEDTARYYCVR	48	DAGYSNHVQIFDS	59
45A12	RFTISRDNNAKNTLTLMQMD SLKPEDTARYYCVR	48	DAGYSNHVQIFDS	59
45B6	RFTISRDNNAKNTLTLMQMD SLKPEDTARYYCVR	48	DAGYSNHVQIFDS	59
57B6	RFTISRDNNGKNTLYLQMN SLKPEDTAVYYCAK	260	DTGRGIMGEYGM DY	262
59D10	RFTISRDNNDKNTLYLQMN SLIPEDTAVYYCAT	261	TSGTYFFIPEY EY	263

[0547]

Fab	框架4	SEQ ID
1C2	WGQGTQVTVSS	60
9D1	WGQGTQVIVAS	61
8B12	WGQGTQVIVAS	61
8C12	WGQGTQVIVAS	61
9E1	WGQGTQVTVSS	60
5F4	WGQGTQVTVSS	60
5B2	WGQGTQVTVSS	60
6D5	WGQGTQVTVSS	60
4D2	WGQGTQVTVSS	60
9A1	WGQGTQVTVSS	60
9G2	WGQGTQVTVSS	60
9B2	WGQGTQVTVSS	60
27B3	WGQGTQVIVAS	61
24E3	WGQGTQVIVAS	61
33D8	WGQGTQVIVAS	61
24F2	WGQGTQVIVAS	61
24B6	WGQGTQVTVSS	60
19G10	WGQGTQVTVSS	60
45B12	WGQGTQVIVAS	61
45D9	WGQGTQVIVAS	61
45F8	WGQGTQVIVAS	61
45A12	WGQGTQVIVAS	61
45B6	WGQGTQVIVAS	61
57B6	WGKGTLVTVSS	264
59D10	WGQGTQVTVSS	60

[0548] 表7:CD70特异性大羊驼来源的VL的序列(黑体的Q由琥珀中止密码子编码)

[0549]

Fab	框架1	SEQ ID	CDR1	SEQ ID
1C2	QTVVTQEPSLSVSPGGTVTLTC	62	GLSSGSVTTTNYPG	77
9D1	QAVVTQEPSLSVSPGGTVTLTC	63	GLSSGSVTSSHYPG	78
8B12	QTVVTQEPSLSVSPGGTVTLTC	62	GLSSGSVTSSNYPG	79
8C12	QAVVTQEPSLSVSPGGTVTLTC	63	GLTSGSVTSSNYPD	80
9E1	QAVVTQEPSLSVSPGGTVTLTC	63	GLTSGSVTSSNYPD	80
5F4	QAVVTHPPSLASPGSSVRLTC	64	TLISGDNIGGYDIS	81
5B2	QSALTQPPSVSGTLGKTLTISC	65	AGTSSDVGYGNYVS	82
6D5	QSALTQPSAVSVSLGQTARITC	66	QGGNARFSSFA	83
4D2	QSVLTQPPSLASPGSSVRLTC	67	TLSSGNSVGNYS	84
9A1	QSALTQPSALSVTLGQTAKITC	68	QGGRLGSSYAH	85
9G2	QSVVTQPPSLASPGSSVRLTC	69	TLSSGNSVGNYS	84
9B2	QAVLTQPPSLASPGSSVRLTC	70	TLNSANSVGSYDIS	86
27B3	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC	71	GLKSGSVTSTNFPT	87
24E3	QAVVTQEPSLSVSPGGTVTLTC	63	GLTSGSVTSDNFPV	88
33D8	QSALTQPSTVSVSLGQTARITC	72	RGDSLERYGTN	89
24F2	QSALTQPSAVSVSLGQTARITC	66	RGDTLRNYHAN	90
24B6	QPVLTPSAVSVSLGQTARITC	73	QGGYYTH	91
19G10	NFMLTPSAVSVSLGQTARITC	74	QGGYYTH	91
45B12	QAVLTQPSSSVSVSLGQTAKITC	75	QGGNLGLYGAN	92
45D9	QAVLTQPSSSVSVSLGQTAKITC	75	QGGNLWLYGAN	93
45F8	QAVLTQPSSSVSVSLGQTANITC	76	QGGNLGLYGAN	92
45A12	QAVVTQEPSLSVSPGGTVTLTC	63	GLSSGSATSGNYPE	94
45B6	QAVVTQEPSLSVSPGGTVTLTC	63	GLSSGSVTSSNYPD	95
57B6	QTVVTQEPSLSVSPGGTVTLTC	265	GLKSGSVTSSNYP	267
59D10	QSVLTQPPSVSGSPGKTVTISC	266	AGTSSDVGYGYYVS	268

[0550]

Fab	框架2	SEQ ID	CDR2	SEQ ID
1C2	WFOQTPGOAPRTLIY	96	STSSRHS	109
9D1	WYQQTPGOAPRLLIY	97	NTNSRHS	110
8B12	WYQQTPGOAPRVLIY	98	NTNNRHS	111
8C12	WYQQTPGOAPRLLIY	99	NTNSRHS	110
9E1	WYQQTPGOAPRLLIY	99	NTNSRHS	110
5F4	WYQQKTGSPPRYLLY	100	YYSDSYKHQSS	112
5B2	WYQQLPGTAPKLLIY	101	RVSTRAS	113
6D5	WYQQKPGQAPVQVIY	102	YNTNRPS	114
4D2	WYQQKAGSPPRYLLY	103	YYSDSYKNQGS	115
9A1	WYQQKPGQAPVLIY	104	GNNYRPS	116
9G2	WYQQKAGSPPRYLLY	103	YYSDSVKHQGS	117
9B2	WYQQKAGSPPRYLLY	103	YYSDSLSHQGS	118
27B3	WYQQTPGOAPRLLIY	99	NTNTRHS	119
24E3	WYQQTPGOAPRLLIY	99	TINSRHS	120
33D8	WYQQKPGQAPVLIY	104	DDDSRPS	121
24F2	WYRQKPGQAPVLIY	105	GDDIRPS	122
24B6	WYQQKPGQAPVLIY	104	INNNRPS	123

[0551]

Fab	框架2	SEQ ID	CDR2	SEQ ID
19G10	WYQQKPGQAPVLVIY	104	VNNNRPS	124
45B12	WYQQNPGRAPILLIY	106	GDNYRPL	125
45D9	WYQQNPGRAPILLIY	106	GDNQRP	126
45F8	WYQQNPGRAPILLFY	107	GDNYMPL	127
45A12	WYQQTPGQAPRLIY	108	NTASRHS	128
45B6	WYQQTPGQAPRLIY	99	NTNSRHS	110
57B6	WYQQTPGQAPRLIY	99	NTNSRHS	110
59D10	WYQQFPGMAPKLLIY	269	DVNKRAS	270

[0552]

Fab	框架3	SEQ ID	CDR3	SEQ ID
1C2	GVPSRFSGSISGNKAALTITGAQPEDEADYYC	129	ALEEIGSYTYM	148
9D1	GVPSRFSGSISGNKAALTITGAQPEDEADYYC	129	ALLNIDDGSTM	149
8B12	GVPSRYSGSISGNKAALTITGAEPDEADYYC	130	NLHLGSYTPM	150
8C12	GVPSRFSGSISGNKAALTITGAQPEDEADYYC	131	ALYWGYGTNVDV	151
9E1	GVPSRFSGSISGNKAALTITGAQPEDEADYYC	129	NLYMGSGGSKV	152
5F4	GVPSRFSGSKDASANAGLLISGLQSEDEADYYC	132	SAYKSGSYKAPV	153
5B2	GMPDRFSGSKSGNTASLTISGLQSEDEADYYC	133	ASYTTNNKPV	154
6D5	GIPARFSGSSSGAATLTISGAQAEDADYYC	134	QSYESGNYV	155
4D2	GVPSRFSGSKDPSANAGLLISGLQAEDEADYYC	135	SVSNSGTYPKV	156
9A1	GIPERFSGSSSGDTATLTISGAQAEDAVYYC	136	QSGSSNTNVM	157
9G2	GVPSRFSGSSDASANAGLLISGLQPEDEADYYC	137	SAYKSGSHV	158
9B2	GVPSRFSGSTDASANAGLLISGLQPEDEADYYC	138	SAYNRGSHV	159
27B3	GVPSRFSGSISENKAALTITGAQPEDEAEYFC	139	ALFISNPSVE	160
24E3	GVPSRFSGSITGNKAILTITGAQPEDEADYYC	140	ALYLENFANE	161
33D8	GIPERFSGSSSGATAALTISGAQAEDEGDYYC	141	QSADSSGNAV	162
24F2	GIPERFSGSRLGGTATLTVSGAQAEDADYYC	142	QSSDSSGYRVV	163
24B6	GIPERFSGSISGNTATLTISGAQVEDEADYYC	143	QSGSSSTIPV	164
19G10	GIPERFSGSSSGNTATLTISGAQAEDAAYYC	144	QSGSSSTIPV	164
45B12	GIPERFTISKSGGTATLTIDGAQAEDESDYYC	145	QSADYSGNSV	165
45D9	GIPERFTISKSGGTATLTIDGAQAEDESDYYC	145	QSADYSGNSV	165
45F8	GIPERFTISKSGGTATLTIDGAQAEDESDYYC	146	QSSDYPGNSV	166
45A12	GVPGRFSGSISGNKAALTITGAQPEDEADYYC	147	LLYMGGSDFNFV	167

[0553]

Fab	框架3	SEQ ID	CDR3	SEQ ID
	EDEADYYC			
45B6	GVPSRFSGSISGNKAALTITGAQP EDEADYYC	129	ALYMGSGSNNVV	168
57B6	GVPSRFSGSISGNKAALTITGAQP EDEADYYC	129	ALYMGSGSANAM	271
59D10	GIADRFSGSKAGNTASLTISGLQS EDEADYYC	272	ASYRSSANAV	273

[0554]

Fab	框架4	SEQ ID
1C2	FGGGTHLTVLG	169
9D1	FGGGTHLTVLG	169
8B12	FGGGTKLTVLG	170
8C12	FGGGTKLTVLG	170
9E1	FGGGTKLTVLG	170
5F4	FGGGTHLTVLG	169
5B2	FGGGTHLTVLG	169
6D5	FGGGTTLTVLG	171
4D2	FGGGSKLTVLG	172
9A1	FGGGTHLTVLS	173
9G2	FGGGTKLTVLG	170
9B2	FGGGTKLTVLG	170
27B3	FGGGQLTVLS	174
24E3	FGGGTRLTVLG	175
33D8	FGGGTHLTVLG	169
24F2	FGGGTKLTVLG	170
24B6	FGGGTKLTVLG	170
19G10	FGGGTKLTVLG	170
45B12	FGGGTKLTVLG	170
45D9	FGGGTKLTVLG	170
45F8	FGGGTKLTVLG	170
45A12	FGGGTKLTVLG	170
45B6	FGGGTELTVLG	176
57B6	FGGGTHLTVLG	169
59D10	FGGGTHLTVLG	169

[0555] 表8:全长大羊驼来源的VH

[0556]

Fab	VH结构域的全长序列	SEQ ID
1C2	ELQVVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNYWMHWVRQAPRKG LEWVSTISTDNSRTYYADSVKGRFTISRDAKNTLTILQMNSLKSED AVYYCIRGSDYEHWGQGTQVTVSS	177
9D1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVYYMNWVRQAPGKG LEWVSDINNEGDTTYYADSVKGRFTISRDAKNTLTILQMNSLKPED TALYYCVRDAGYSNHPVIFDSWGQGTQVIVAS	178
8B12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVYYMNWVRQAPGKG LEWVSDINNEGDTTYYADSVKGRFTISRDAKNTLTILQMNSLKPED TALYYCVRDAGYSNHPVIFDSWGQGTQVIVAS	179

[0557]

Fab	VII结构域的全长序列	SEQ ID
8C12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVYYMNWVRQAPGKG LEWVSDINNEGDTTYYADSVKGRFTISRDNKNTLTLMQDSLKPED TALYYCVRDAGYSNHVPIFDSWGQGTQVIVAS	179
9E1	EVQLQESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQAPGKG LEWVSSIYMYDSSTYYADSVKGRFTISTDNKNTVYLQMNSLKSED TAVYYCAKDINRSYGSSWSHFGPIFSSWGQGTQVTVSS	180
5F4	EVQVQESGGGLVHPGGSLRLSCAASGFTFDYAMSWVRQAPGKG LEWVSAISWSGGETFYAESMKGRFTISRNNKNTLYLQMNSLKSED TAVYYCARGMGLAEGLTDWGQGTQVTVSS	181
5B2	QVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNPAMSWVRQAPGKG LEWVSEITNYGYNRYADSVKGRFTISTDNKNTLYLQMNSLRSED SAVYYCTASLGLEYGYGDWGWGQGTQVTVSS	182
6D5	EVQLVQPGAELRKPGASVKVSKASGYTFTSYIDWVRQAPGQGL EWMGRIDPEDGGTKYAQKFGQRTFTADASTSTAYVELSSLRSED TAVYYCASRRRDFDYWGQGTQVTVSS	183
4D2	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLACTVSGGSITTSYYYWSWIRPPGK GLEWMGAIGSRGSTYYSPSLKTRTSISRDTSKNQFTLQLSSVTPED TAVYYCARVTGEITYNSGSYYTLNLFYWGQGTQVTVSS	184
9A1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKG LEWVSDINSGGGSTKYNDSVKGRFAISRDNKNTLYLQMNSLKPED TAVYYCAKEGGSGRYWTNEYDYWGQGTQVTVSS	185
9G2	QVQLVESGGGLMQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMSWSVRQAPGKG LEWVSSIYSDSSYTYADSVKSRFTISTDNKNTLYLQMNSLKPDPT AVYYCAGSSDYEGSFASWGQGTQVTVSS	186
9B2	QLQVVESGGGLMQPGGSLRLSCAASGFTFSGSAMSWSVRQAPGK GLEWVSSIYSHSMYTYADSVKSRFTISTDNKNTLYLQMNSLKPD DTAVYYCAASSDYEGFLVSWGQGTQVTVSS	187
27B3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVYYMNWVRQAPGKG LEWVSDINNEGDTTYYADSVKGRFTISRDNKNTLTLMQNSLKPED TALYYCVRDAGYSNHVPIFDSWGQGTQVIVAS	178
24E3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVYYMNWVRQAPGKG LEWVSDINNEGDTTYYADSVKGRFTISRDNKNTLTLMQNSLKPED TALYYCVRDAGYSNHVPIFDSWGQGTQVIVAS	178
33D8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVYYMNWVRQAPGKG LEWVSDINNEGDTTYYADSVKGRFTISRDNKNTLTLMQNSLKPED TALYYCVRDAGYSNHVPIFDSWGQGTQVIVAS	178
24F2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVYYMNWVRQAPGKG LEWVSDINNEGDTTYYADSVKGRFTISRDNKNTLTLMQNSLKPED TALYYCVRDAGYSNHVPIFDSWGQGTQVIVAS	178
24B6	EVQLQESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQAPGKG LEWVSSIYMYDSSTYYADSVKGRFTISTDNKNTVYLQMNSLKSED TAVYYCAKDINRSYGSSWSHFGPIFSSWGQGTQVTVSS	180
19G10	EVQLQESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQAPGKG LEWVSSIYMYDSSTYYADSVKGRFTISTDNKNTVYLQMNSLKSED TAVYYCAKDINRSYGSSWSHFGPIFSSWGQGTQVTVSS	180
45B12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYYMNWVRQAPGKG LEWISDINNEGYYTYADSVKGRFTISRDNKNTLTLMQDSLKPEDT ARYYCVRDAGYSNHVQIFDSWGQGTQVIVAS	188
45D9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYYMNWVRQAPGKG LEWISDINNEGYYTYADSVKGRFTISRDNKNTLTLMQDSLKPEDT ARYYCVRDAGYSNHVQIFDSWGQGTQVIVAS	188
45F8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYYMNWVRQAPGKG LEWISDINNEGYYTYADSVKGRFTISRDNKNTLTLMQDSLKPEDT ARYYCVRDAGYSNHVQIFDSWGQGTQVIVAS	188
45A12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYYMNWVRQAPGKG LEWISDINNEGYYTYADSVKGRFTISRDNKNTLTLMQDSLKPEDT	188

[0558]

Fab	VII结构域的全长序列	SEQ ID
	ARYYCVRDAGYSNHVQIFDSWGQGTQVIVAS	
45B6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYYMNWVRQAPGKG LEWISDINNEGYYETYYADSVKGRFTISRDNKNTLTLMQMSLKPEDT ARYYCVRDAGYSNHVQIFDSWGQGTQVIVAS	188
57B6	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSHYAMSWVRQAPGKG LEWVSGDNTYDGGTRYQDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDT DTAVYYCAKDTGRGIMGEYGM DYWGKGLTVTVSS	274
59D10	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASELSFSISEMTWVRQAPGKGL EWVSGISGVTGGSSTSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLIPE DTAVYYCATTSGTYFFIPEYEWGQGTQVTVSS	275

[0559]

表9:全长大羊驼来源的VL (黑体的Q由琥珀中止密码子编码)

[0560]

Fab	全长序列	SEQ ID
1C2	QTVVTQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGSVTTTNYPGWFQQTTPGQA PRTLIYSTSSRHSGVPSRFSGSISGNKAALTITGAQPEDEADYYCAL EEIGSYTYMFGGGTHLTVLG	189
9D1	QAVVTQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGSVTSSHYPGWYQQTTPGQ APRLLIFNTNSRHSGVPSRFSGSISGNKAALTITGAQPEDEADYYCA LLNIDDGSTMFGGGTHLTVLG	190
8B12	QTVVTQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGSVTSSNYPGWYQQTTPGQA PRVLIYNTNNRHSGVPSRYSGSISGNKAALTITGAPEDEADYYCNL HLGSYTPMFGGGTKLTVLG	191
8C12	QAVVTQEPSLSVSPGGTVTLTCGLTSGSVTSSNYPDWYQQTTPGQA PRLLIYNTNSRHSGVPSRFSGSISGNKAALTITGAQPEDEADYYCAL YWGYGTNVDVFGGGTKLTVLG	192
9E1	QAVVTQEPSLSVSPGGTVTLTCGLTSGSVTSSNYPDWYQQTTPGQA PRLLIYNTNSRHSGVPSRFSGSISGNKAALTITGAQPEDEADYYCNL YMGSGGSKVFGGGTKLTVLG	193
5F4	QAVVTHPPSLASAPGSSVRLTCTLISGDNIGGYDISWYQOKTGSP RYLLYYYSDSYKHQSSGVPSRFSGSKDASANAGLLISGLQSEDEA DYYCSAYKSGSYKAPVFGGGTHLTVLG	194
5B2	QSALTQPPSVSGTLGKTLTISCAGTSSDVGYGNYVSWYQQLPGTA PKLLIYRVSTRASGMPDRFSGSKSGNTASLTISGLQSEDEADYYCA SYTTNNKPVFGGGTHLTVLG	195
6D5	QSALTQPSAVSVSLGQTARITCQGGNARFSSFAWYQOKPGQAPV QVIYNTNRP SGIPARFSGSSSGAATLTISGAQAEDEADYYCQSY ESGNYVFGGGTTLTVLG	196
4D2	QSVLTQPPSLASAPGSSVRLTCTLSSGNSVGNYDISWYQOKAGSP PRYLLYYYSDSYKNQSGGVPSRFSGSKDPSANAGLLISGLQAEDE ADYYCSVSNSTYKPVFGGGSKLTVLG	197
9A1	QSALTQPSALSVTLGQTAKITCQGGRLGSSYAHWYQOKPGQAPVL VIYGNNYRPSGIPERFSGSSSGDTATLTISGAQAEDEAVYYCQSGS SNTNVMFGGGTHLTVLS	198
9G2	QSVVTQPPSLASAPGSSVRLTCTLSSGNSVGNYDISWYQOKAGSP PRYLLYYYSDSVKHQSGGVPSRFSGSSDASANAGLLISGLQPEDE ADYYCSAYKSGSHVFGGGTKLTVLG	199
9B2	QAVLTQPPSLASAPGSSVRLTCTLNSANSVGSYDISWYQOKAGSP PRYLLYYYSDSLSHQSGGVPSRFSGSTDASANAGLLISGLQPEDE ADYYCSAYNRGSHVFGGGTKLTVLG	200

[0561]

Fab	全长序列	SEQ ID
27B3	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGLKSGSVTSTNFPTWYQQTPGQA PRLIIYNTNTRHSGVPSRFSGSISENKAALTITGAQPEDEAEYFCAL FISNPSVEFGGGTQLTVLS	201
24E3	QAVVTQEPSLSVSPGGTVTLTCGLTSGSVTSDNFPVWYQQTPGQA PRLIIYTINSRHSGVPSRFSGSITGNKAILTITGAQPEDEADYYCALY LENFANEFGGGTRLTVLG	202
33D8	QSALTQPSSTVSVSLGQTARITCRGDSLERYGTNWWYQQKPGQAPVL VIYDDDSRPSGIPERFSGSSSGATAALTISGAQAEDEGDYYCQSAD SSGNAVFGGGTHLTVLG	203
24F2	QSALTQPSAVSVSLGQTARITCRGDTLRNYHANWYRQKPGQAPVL VIYGD DIRPSGIPERFSGSRLGGTATLTVSQAQAEDEADYYCQSSD SSGYRVVFGGGTKLTVLG	204
24B6	QPVLTQPSAVSVSLGQTARITCQGGYYTHWYQQKPGQAPVLVIYIN NNRPSGIPERFSGSISGNTATLTISGAQVEDEADYYCQSGSSSTIPV FGGGTKLTVLG	205
19G10	NFMLTQPSAVSVSLGQTARITCQGGYYTHWYQQKPGQAPVLVIYV NNNRPSGIPERFSGSSSGNTATLTISGAQAEDEAAYYCQSGSSSTI PVFGGGTKLTVLG	206
45B12	QAVLTQPSSSVSVSLGQTAKITCQGGNLGLYGANWYQQNPGRAPIL LIYGDNYRPLGIPERFTISKSGGTATLTIDGAQAEDESDYYCQSADY SGNSVFGGGTKLTVLG	207
45D9	QAVLTQPSSSVSVSLGQTAKITCQGGNLWLYGANWYQQNPGRAPIL LIYGDNQRPPLGIPERFTISKSGGTATLTIDGAQAEDESDYYCQSADY SGNSVFGGGTKLTVLG	208
45F8	QAVLTQPSSSVSVSLGQTANITCQGGNLGLYGANWYQQNPGRAPIL LFYGDNYMPLGIPERFTISKSGGTATLTIDGAQAEENESDYYCQSSDY PGNSVFGGGTKLTVLG	209
45A12	QAVVTQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGSATSGNYPEWYQQTPGQ APRLIIYNTASRHSGVPGRFSGSISGNKAALTITGAQPEDEADYYCL LYMGGSDFNFVFGGGTKLTVLG	210
45B6	QAVVTQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGSVTSSNYPDWYQQTPGQA PRLIIYNTNSRHSGVPSRFSGSISGNKAALTITGAQPEDEADYYCAL YMGSGSNVVFVFGGGTELTVLG	211
57B6	QTVVTQEPSLSVSPGGTVTLTCGLKSGSVTSSNYPAWYQQTPGQA PRLIIYNTNSRHSGVPSRFSGSISGNKAALTITGAQPEDEADYYCAL YMGSGSANAMFGGGTHLTVLG	276
59D10	QSVLTQPPSVSGSPGKTVTISCAGTSSDVGYGYVSWYQQFPGMA PKLLIYDVNKRASGIADRFSGSKAGNTASLTISGLQSEDEADYYCAS YRSSANAVFGGGTHLTVLG	277

[0562] 实施例13:抗CD70mAb 27B3的种系化

[0563] 通过与已知人种系基因序列比较来鉴别具有相同典型折叠结构和与mAb 27B3之VH和VL区最高氨基酸序列同一性的人种系基因片段。与mAb 27B3最接近的人VH和VL区分别为人VH3-48 (89.7%FR同一性) 和人VL8-61 (86.1%FR同一性)。最接近的人种系JH和JL人种系基因片段序列分别为JH5和JL7。图12示出了mAb 27B3之VH和VL区与最接近人种系VH和VL序列的序列比对。SIMPLE抗体27B3与人种系序列的V区的比较鉴别了VH区中的12个候选人源化突变和VL区中的13个(CDR1中2个和CDR2中1个)。图10和11示出了27B3的VH和VL序列中人源化突变的汇总以及覆盖经引入多样性的所需文库大小。

[0564] 表10:27B3VH氨基酸序列中的靶定突变。¶表示用于覆盖所有潜在突变的所需文库大小。

[0565]

Kabat 位置	文库中包含的突变				概率
	骆驼科动物 aa	人种系 aa 选择 1	人种系 aa 选择 2	人种系 aa 选择 3	
46	E	V			0.50
74	A	S			0.50
77	T	S			0.50
79	T	Y			0.50
83/84	KP	KT	RA		0.33
89	L	V			0.50
93/94	AR	AK	VK		0.33
108	Q	L	T	M	0.25
110	E	T			0.50
112	A	S			0.50
					46089

[0566] 表11:27B3VL氨基酸序列中的靶定突变。¶表示用于覆盖所有潜在突变的所需文库大小。*表示CDR1或CDR2区中的突变

[0567]

Kabat 位置	骆驼科动物 aa	人种系 aa 选择 1	人种系 aa 选择 2	人种系 aa 选择 3	概率
2	A	T			0.50
11-12	LT	FS			0.50
26*	K	T			0.50
30*	T	D			0.50
46	L	T			0.50
53*	T	S			0.50
60	S	D			0.50
61	R	C			0.50
67/68	SE	LG			0.50
80/81/84/85	PEDEAE	PEDESD	ADDESD	ADDEAE	0.25
87	F	Y			0.50
					40969

[0568] 通过基于PCR的组装建立了涵盖人源化突变之所有组合的VH_27B3和VL_27B3的种系化文库(参见,例如,Stemmer等, Gene (1995) 164:49-53)。通过PCR组装了在某些位置上具有特定突变的重叠寡核苷酸。文库在各个突变位置处包含人和大羊驼氨基酸二者以防止在野生型大羊驼残基对高亲和力结合为关键的情况下完全丧失结合(参见,例如, Baca等, J. Biol. Chem. (1997) 272:10678-10684; Tsurushita等, J. Immunol. Methods (2004) 295:9-19)。VH文库包含约 1×10^{10} 个克隆并且VL文库包含约 8×10^9 个克隆。使VH和VL文库组合并且再转化成具有大小为 1×10^{10} 个克隆的单Fab文库形式(91%具有全长Fab插入),这适合于噬菌体展示筛选。覆盖表10和11中所述所有可能突变的所需多样性超过了原始重链和轻链

文库,但是此外,组合的Fab文库足够大以覆盖所有可能的置换(1.89×10^7)。

[0569] 实施例14:具有高人FR同一性之种系化27B3Fab的选择

[0570] 噬菌体展示用于选择具有对CD70的高亲和力和高人FR同一性二者的种系化27B3Fab。具体地,Flag-TNC-CD70经生物素化并且以多个浓度中与不同量的表达Fab之噬菌体进行孵育。之后在包被链霉亲和素的微量滴定板上捕获噬菌体和Flag-TNC-CD70的复合物并在37°C下用非生物素化的Flag-TNC-CD70进行洗涤。噬菌体被胰蛋白酶洗脱并用于感染TG1细胞。进行五轮选择,并且在每轮中增加洗涤严格性。表12示出了用于每轮选择的条件细节。

[0571] 表12:选择种系化27B3Fab的条件

轮	噬菌体输入 (μ l)	抗原 [pM]	洗涤时间	洗涤温度	洗涤抗原
1	10	24000-2400-240	1小时	RT	PBS
2	1	2400-240-24	ON	37°C	24 nM CD70
3	0.1	240-24-2.4	ON	37°C	2.4 nM CD70
4	0.01	24-2.4-0.24	3天	37°C	240 pM CD70
5	0.1	2.4-0.24-0.024	6天	37°C	24 pM CD70

[0573] 从第3、4和5轮选择洗脱的噬菌体转染进入TG1中并且以克隆铺板;随机挑选各个克隆用于进一步分析。从IPTG诱导的小规模培养物中制备包含Fab的周质级分,在Biacore结合测定中使用包被CD70的CM5芯片来确定每个Fab的解离速率。对具有解离速率与27B3的解离速率类似的Fab的克隆进行测序。表13示出了总人FR序列同一性高于94%的克隆的解离速率,以及各个克隆(VH、VL和总体)的人FR同一性百分比。

[0574] 表14和15示出了经测序Fab克隆的完全氨基酸序列以及表16示出了27B3的CDR氨基酸序列变体。这些序列的检查揭示,轻链的框架1常常在引物区中2位氨基酸出具有额外的(非人)突变(A替换T)。制备在2位具有相应人氨基酸的克隆35G3、40F1和39C3的变体(分别为克隆53C1、53B1和53E1)。另外,可通过使41D12的重链与40F1(53A2)的轻链或与53B1(53H1)的轻链组合来进一步种系化克隆41D12。

[0575] 表13:具有多于94%总人FR同一性之种系化27B3Fab克隆的解离速率。

Fab克隆	VL的FR 同一性%	VH的FR 同一性%	总FR 同一性%	分离频率	解离速率 [$10^{-3}s^{-1}$]
27B3	86.0	89.5	87.9		1.4
36A9	97.5	92.0	94.5	1	1.3
53F1	97.5	92.0	94.5	1	2.3
36D6	94.9	94.3	94.6	2	1.4
53G1	96.2	94.0	95.0	1	2.0
35G3	94.9	95.4	95.2	1	1.7
35F6	94.9	95.4	95.2	1	ND

[0576]

36G2	93.6	96.6	95.2	7	1.1
39D5	93.7	96.6	95.2	2	1.2
42D12	93.7	96.6	95.2	2	1.6
35G1	97.5	94.3	95.7	1	2.3
41D12	92.4	98.9	95.9	4	2.3
41H8	94.9	97.0	96.0	1	2.2
35G2	96.2	96.6	96.4	1	1.7
40F1	94.9	98.0	96.6	1	1.6
39C3	97.5	97.7	97.6	6	2.5

[0577] 表14A:具有多于94%总人同一性的种系化27B3克隆的VH氨基酸序列,其中由FR和CDR组成序列标识。阴影表示人源化突变和粗体表示引物引入的突变。

[0578]

重链克隆	框架1	CDR1	框架2
27B3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SEQ ID NO:2	VYYMN SEQ ID NO:11	WVRQAPGKGLEWVS SEQ ID NO:22
36A9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SEQ ID NO:2	VYYMN SEQ ID NO:11	WVRQAPGKGLEWVS SEQ ID NO:22
53F1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SEQ ID NO:2	VYYMN SEQ ID NO:11	WVRQAPGKGLEWVS SEQ ID NO:22
36D6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SEQ ID NO:2	VYYMN SEQ ID NO:11	WVRQAPGKGLEWVS SEQ ID NO:22
53G1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SEQ ID NO:2	VYYMN SEQ ID NO:11	WVRQAPGKGLEWVS SEQ ID NO:22
35G3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SEQ ID NO:2	VYYMN SEQ ID NO:11	WVRQAPGKGLEWVS SEQ ID NO:22
53C1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SEQ ID NO:2	VYYMN SEQ ID NO:11	WVRQAPGKGLEWVS SEQ ID NO:22
35F6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SEQ ID NO:274	VYYMN SEQ ID NO:11	WVRQAPGKGLEWVS SEQ ID NO:22
36G2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SEQ ID NO:2	VYYMN SEQ ID NO:11	WVRQAPGKGLEWVS SEQ ID NO:22
39D5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SEQ ID NO:2	G YYMN SEQ ID NO:248	WVRQAPGKGLEWVS SEQ ID NO:22
42D12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SEQ ID NO:2	VYYMN SEQ ID NO:11	WVRQAPGKGLEWVS SEQ ID NO:22
35G1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SEQ ID NO:2	VYYMN SEQ ID NO:11	WVRQAPGKGLEWVS SEQ ID NO:22
41D12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SEQ ID NO:2	VYYMN SEQ ID NO:11	WVRQAPGKGLEWVS SEQ ID NO:22
41H8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SEQ ID NO:2	VYYMN SEQ ID NO:11	WVRQAPGKGLEWVS SEQ ID NO:22
35G2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SEQ ID NO:2	VYYMN SEQ ID NO:11	WVRQAPGKGLEWVS SEQ ID NO:22
40F1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SEQ ID NO:2	VYYMN SEQ ID NO:11	WVRQAPGKGLEWVS SEQ ID NO:22
53B1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SEQ ID NO:2	VYYMN SEQ ID NO:11	WVRQAPGKGLEWVS SEQ ID NO:22
39C3	EVQLV A SGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SEQ ID NO:275	VYYMN SEQ ID NO:11	WVRQAPGKGLEWVS SEQ ID NO:22
53E1	EVQLV A SGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SEQ ID NO:275	VYYMN SEQ ID NO:11	WVRQAPGKGLEWVS SEQ ID NO:22
53H1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SEQ ID NO:2	VYYMN SEQ ID NO:11	WVRQAPGKGLEWVS SEQ ID NO:22
53A2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SEQ ID NO:2	VYYMN SEQ ID NO:11	WVRQAPGKGLEWVS SEQ ID NO:22

[0579]

重链克隆	CDR2	框架3	CDR3	框架4
27B3	DINNEGTTYYADSVKG SEQ ID NO:27	RFTISRDNKNTLTQMNSLKPEDTALYYCVR SEQ ID NO:39	DAGYSNHVP1FDS SEQ ID NO:50	WGQGTQVIVAS SEQ ID NO:61
36A9	DENNEGTTYYADSVKG SEQ ID NO:27	RFTISRDNKNTLTQMNSLKPEDTALYYCVR SEQ ID NO:350	DAGYSNHVP1FDS SEQ ID NO:50	WGQGTQVIVAS SEQ ID NO:287
53F1	DENNEGTTYYADSVKG SEQ ID NO:27	RFTISRDNKNTLTQMNSLKPEDTALYYCVR SEQ ID NO:351	DAGYSNHVP1FDS SEQ ID NO:50	WGQGTQVIVAS SEQ ID NO:288
36D6	DENNEGTTYYADSVKG SEQ ID NO:27	RFTISRDNKNTLTQMNSLKPEDTALYYCVR SEQ ID NO:278	DAGYSNHVP1FDS SEQ ID NO:50	WGQGTQVIVAS SEQ ID NO:289
53G1	DENNEGTTYYADSVKG SEQ ID NO:27	RFTISRDNKNTLTQMNSLKPEDTALYYCVR SEQ ID NO:279	DAGYSNHVP1FDS SEQ ID NO:50	WGQGTQVIVAS SEQ ID NO:290
35C3	DINNEGTTYYADSVKG SEQ ID NO:27	RFTISRDNKNTLTQMNSLKPEDTALYYCVR SEQ ID NO:280	DAGYSNHVP1FDS SEQ ID NO:50	WGQGTQVIVAS SEQ ID NO:293
53C1	DINNEGTTYYADSVKG SEQ ID NO:27	RFTISRDNKNTLTQMNSLKPEDTALYYCVR SEQ ID NO:280	DAGYSNHVP1FDS SEQ ID NO:50	WGQGTQVIVAS SEQ ID NO:293
35F6	DENNEGTTYYADSVKG SEQ ID NO:27	RFTISRDNKNTLTQMNSLKPEDTALYYCVR SEQ ID NO:281	DAGYSNHVP1FDS SEQ ID NO:50	WGQGTQVIVAS SEQ ID NO:291
35G2	DENNEGTTYYADSVKG SEQ ID NO:27	RFTISRDNKNTLTQMNSLKPEDTALYYCVR SEQ ID NO:282	DAGYSNHVP1FDS SEQ ID NO:50	WGQGTQVIVAS SEQ ID NO:292
39D6	DENNEGTTYYADSVKG SEQ ID NO:27	RFTISRDNKNTLTQMNSLKPEDTALYYCVR SEQ ID NO:283	DAGYSNHVP1FDS SEQ ID NO:50	WGQGTQVIVAS SEQ ID NO:291
42D12	DENNEGTTYYADSVKG SEQ ID NO:27	RFTISRDNKNTLTQMNSLKPEDTALYYCVR SEQ ID NO:283	DAGYSNHVP1FDS SEQ ID NO:50	WGQGTQVIVAS SEQ ID NO:292
35G1	DENNEGTTYYADSVKG SEQ ID NO:27	RFTISRDNKNTLTQMNSLKPEDTALYYCVR SEQ ID NO:284	DAGYSNHVP1FDS SEQ ID NO:50	WGQGTQVIVAS SEQ ID NO:294
41D12	DENNEGTTYYADSVKG SEQ ID NO:27	RFTISRDNKNTLTQMNSLKPEDTALYYCVR SEQ ID NO:285	DAGYSNHVP1FDS SEQ ID NO:50	WGQGTQVIVAS SEQ ID NO:293
41H8	DENNEGTTYYADSVKG SEQ ID NO:27	RFTISRDNKNTLTQMNSLKPEDTALYYCVR SEQ ID NO:285	DAGYSNHVP1FDS SEQ ID NO:50	WGQGTQVIVAS SEQ ID NO:288
35G2	DENNEGTTYYADSVKG SEQ ID NO:27	RFTISRDNKNTLTQMNSLKPEDTALYYCVR SEQ ID NO:284	DAGYSNHVP1FDS SEQ ID NO:50	WGQGTQVIVAS SEQ ID NO:293
40F1	DENNEGTTYYADSVKG SEQ ID NO:249	RFTISRDNKNTLTQMNSLKPEDTALYYCVR SEQ ID NO:285	DAGYSNHVP1FDS SEQ ID NO:50	WGQGTQVIVAS SEQ ID NO:292
53B1	DENNEGTTYYADSVKG SEQ ID NO:249	RFTISRDNKNTLTQMNSLKPEDTALYYCVR SEQ ID NO:285	DAGYSNHVP1FDS SEQ ID NO:50	WGQGTQVIVAS SEQ ID NO:292
39C3	DENNEGTTYYADSVKG SEQ ID NO:27	RFTISRDNKNTLTQMNSLKPEDTALYYCVR SEQ ID NO:286	DAGYSNHVP1FDS SEQ ID NO:50	WGQGTQVIVAS SEQ ID NO:289
53E1	DENNEGTTYYADSVKG SEQ ID NO:27	RFTISRDNKNTLTQMNSLKPEDTALYYCVR SEQ ID NO:286	DAGYSNHVP1FDS SEQ ID NO:50	WGQGTQVIVAS SEQ ID NO:289
53H1	DENNEGTTYYADSVKG SEQ ID NO:27	RFTISRDNKNTLTQMNSLKPEDTALYYCVR SEQ ID NO:286	DAGYSNHVP1FDS SEQ ID NO:50	WGQGTQVIVAS SEQ ID NO:293
53A2	DENNEGTTYYADSVKG SEQ ID NO:27	RFTISRDNKNTLTQMNSLKPEDTALYYCVR SEQ ID NO:285	DAGYSNHVP1FDS SEQ ID NO:50	WGQGTQVIVAS SEQ ID NO:293

[0580] 表14B:具有多于94%总人同一性的种系化27B3克隆的VH氨基酸序列,具有全VH氨基酸序列之序列标识。

[0581]

SEQ ID NO:	重链克隆	全长VH序列
178	27B3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVYYMNWVRQAPGKGLEWVSINNEGTTYYADSVKG RFTISRDNKNTLTQMNSLKPEDTALYYCVRDAGYSNHVP1FDSWGQGTQVIVAS
212	36A9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVYYMNWVRQAPGKGLEWVSINNEGTTYYADSVKG RFTISRDNKNTLTQMNSLKPEDTALYYCVRDAGYSNHVP1FDSWGQGTQVIVAS

[0582]

213	53F1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVYIMNWVRQAPGKGLEWVSDINNEGTTYYADSVKG RFTISRDNKAKNLTLOMNSLKPEDTAAYYCVRDAGYSNHVPFEDSWGQGTQVIVAS
214	35D6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVYIMNWVRQAPGKGLEWVSDINNEGTTYYADSVKG RFTISRDNKAKNLTLOMNSLKPEDTAAYYCVRDAGYSNHVPFEDSWGQGTQVIVAS
215	53G1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVYIMNWVRQAPGKGLEWVSDINNEGTTYYADSVKG RFTISRDNKAKNLTLOMNSLKPEDTAAYYCVRDAGYSNHVPFEDSWGQGTQVIVAS
216	35G3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVYIMNWVRQAPGKGLEWVSDINNEGTTYYADSVKG RFTISRDNKAKNLTLOMNSLKPEDTAAYYCVRDAGYSNHVPFEDSWGQGTQVIVAS
217	53C1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVYIMNWVRQAPGKGLEWVSDINNEGTTYYADSVKG RFTISRDNKAKNLTLOMNSLKPEDTAAYYCVRDAGYSNHVPFEDSWGQGTQVIVAS
218	35F6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVYIMNWVRQAPGKGLEWVSDINNEGTTYYADSVKG RFTISRDNKAKNLTLOMNSLKPEDTAAYYCVRDAGYSNHVPFEDSWGQGTQVIVAS
219	36G2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVYIMNWVRQAPGKGLEWVSDINNEGTTYYADSVKG RFTISRDNKAKNLTLOMNSLKPEDTAAYYCVRDAGYSNHVPFEDSWGQGTQVIVAS
220	39J5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVYIMNWVRQAPGKGLEWVSDINNEGTTYYADSVKG RFTISRDNKAKNLTLOMNSLKPEDTAAYYCVRDAGYSNHVPFEDSWGQGTQVIVAS
221	42J12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVYIMNWVRQAPGKGLEWVSDINNEGTTYYADSVKG RFTISRDNKAKNLTLOMNSLKPEDTAAYYCVRDAGYSNHVPFEDSWGQGTQVIVAS
222	35G1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVYIMNWVRQAPGKGLEWVSDINNEGTTYYADSVKG RFTISRDNKAKNLTLOMNSLKPEDTAAYYCVRDAGYSNHVPFEDSWGQGTQVIVAS
223	41D12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVYIMNWVRQAPGKGLEWVSDINNEGTTYYADSVKG RFTISRDNKAKNLTLOMNSLKPEDTAAYYCVRDAGYSNHVPFEDSWGQGTQVIVAS
224	41B9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVYIMNWVRQAPGKGLEWVSDINNEGTTYYADSVKG RFTISRDNKAKNLTLOMNSLKPEDTAAYYCVRDAGYSNHVPFEDSWGQGTQVIVAS
225	35G2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVYIMNWVRQAPGKGLEWVSDINNEGTTYYADSVKG RFTISRDNKAKNLTLOMNSLKPEDTAAYYCVRDAGYSNHVPFEDSWGQGTQVIVAS
226	40F1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVYIMNWVRQAPGKGLEWVSDINNEGTTYYADSVKG RFTISRDNKAKNLTLOMNSLKPEDTAAYYCVRDAGYSNHVPFEDSWGQGTQVIVAS
227	53B1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVYIMNWVRQAPGKGLEWVSDINNEGTTYYADSVKG RFTISRDNKAKNLTLOMNSLKPEDTAAYYCVRDAGYSNHVPFEDSWGQGTQVIVAS
228	39C3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVYIMNWVRQAPGKGLEWVSDINNEGTTYYADSVKG RFTISRDNKAKNLTLOMNSLKPEDTAAYYCVRDAGYSNHVPFEDSWGQGTQVIVAS
229	53E1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVYIMNWVRQAPGKGLEWVSDINNEGTTYYADSVKG RFTISRDNKAKNLTLOMNSLKPEDTAAYYCVRDAGYSNHVPFEDSWGQGTQVIVAS
223	53H1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVYIMNWVRQAPGKGLEWVSDINNEGTTYYADSVKG RFTISRDNKAKNLTLOMNSLKPEDTAAYYCVRDAGYSNHVPFEDSWGQGTQVIVAS
223	53A2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVYIMNWVRQAPGKGLEWVSDINNEGTTYYADSVKG RFTISRDNKAKNLTLOMNSLKPEDTAAYYCVRDAGYSNHVPFEDSWGQGTQVIVAS

[0583] 表15A:具有多于94%总人同一性的种系化27B3克隆的VL氨基酸序列,具有由FR和CDR组成之序列标识。阴影表示人源化突变和粗体表示引物引入的突变。

[0584]

轻链克隆	框架1	CDR1	框架2
27B3	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTC SEQ ID NO:71	GLKSGSVTSTNFPT SEQ ID NO:87	WYQQTPGQAPRLLIY SEQ ID NO:99
36A9	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTC SEQ ID NO:294	GLKSGSVTSTNFPT SEQ ID NO:250	WYQQTPGQAPRLLIY SEQ ID NO:99
53F1	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTC SEQ ID NO:295	GLKSGSVTSTNFPT SEQ ID NO:250	WYQQTPGQAPRLLIY SEQ ID NO:99
36D6	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTC SEQ ID NO:296	GLKSGSVTSTNFPT SEQ ID NO:87	WYQQTPGQAPRLLIY SEQ ID NO:99
53G1	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTC SEQ ID NO:294	GLKSGSVTSTNFPT SEQ ID NO:251	WYQQTPGQAPRLLIY SEQ ID NO:99
35G3	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTC SEQ ID NO:295	GLKSGSVTSTNFPT SEQ ID NO:250	WYQQTPGQAPRLLIY SEQ ID NO:99
53C1	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTC SEQ ID NO:294	GLKSGSVTSTNFPT SEQ ID NO:250	WYQQTPGQAPRLLIY SEQ ID NO:99
35F6	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTC SEQ ID NO:294	GLKSGSVTSTNFPT SEQ ID NO:252	WYQQTPGQAPRLLIY SEQ ID NO:99
36G2	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTC SEQ ID NO:71	GLKSGSVTSTNFPT SEQ ID NO:250	WYQQTPGQAPRLLIY SEQ ID NO:99
39D5	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTC SEQ ID NO:296	GLKSGSVTSTNFPT SEQ ID NO:253	WYQQTPGQAPRLLIY SEQ ID NO:99
42D12	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTC SEQ ID NO:295	GLKSGSVTSTNFPT SEQ ID NO:251	WYQQTPGQAPRLLIY SEQ ID NO:99
35G1	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTC SEQ ID NO:294	GLKSGSVTSTNFPT SEQ ID NO:250	WYQQTPGQAPRLLIY SEQ ID NO:99
41D12	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTC SEQ ID NO:71	GLKSGSVTSTNFPT SEQ ID NO:250	WYQQTPGQAPRLLIY SEQ ID NO:99
41H8	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTC SEQ ID NO:295	GLKSGSVTSTNFPT SEQ ID NO:251	WYQQTPGQAPRLLIY SEQ ID NO:99
35G2	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTC SEQ ID NO:294	GLKSGSVTSTNFPT SEQ ID NO:87	WYQQTPGQAPRLLIY SEQ ID NO:99
40F1	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTC SEQ ID NO:295	GLKSGSVTSTNFPT SEQ ID NO:250	WYQQTPGQAPRLLIY SEQ ID NO:99
53B1	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTC SEQ ID NO:294	GLKSGSVTSTNFPT SEQ ID NO:250	WYQQTPGQAPRLLIY SEQ ID NO:99
39C3	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTC SEQ ID NO:295	GLKSGSVTSTNFPT SEQ ID NO:250	WYQQTPGQAPRLLIY SEQ ID NO:99
53E1	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTC SEQ ID NO:294	GLKSGSVTSTNFPT SEQ ID NO:250	WYQQTPGQAPRLLIY SEQ ID NO:99
53H1	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTC SEQ ID NO:294	GLKSGSVTSTNFPT SEQ ID NO:250	WYQQTPGQAPRLLIY SEQ ID NO:99
53A2	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTC SEQ ID NO:295	GLKSGSVTSTNFPT SEQ ID NO:250	WYQQTPGQAPRLLIY SEQ ID NO:99

[0585]

轻链克隆	CDR2	框架3	CDR3	框架4
27B3	NTNTRHS SEQ ID NO:119	GVPDRFSGSISENKAALTIIGAQPEDAEYFC SEQ ID NO:139	ALFISNPSVE SEQ ID NO:160	FGGGTQLTVLS SEQ ID NO:174
36A9	NTNTRHS SEQ ID NO:119	GVPDRFSGSISENKAALTIIGAQPEDAEYFC SEQ ID NO:297	ALFISNPSVE SEQ ID NO:160	FGGGTQLTVLG SEQ ID NO:309
53F1	NTNTRHS SEQ ID NO:119	GVPDRFSGSISENKAALTIIGAQPEDAEYFC SEQ ID NO:297	ALFISNPSVE SEQ ID NO:160	FGGGTQLTVLG SEQ ID NO:309
36D6	NTNTRHS	GVPDRFSGSISENKAALTIIGAQPEDAEYFC	ALFISNPSVE	FGGGTQLTVLG

[0586]

	SEQ ID NO:110	SEQ ID NO:297	SEQ ID NO:160	SEQ ID NO:309
53G1	NTNTRHS SEQ ID NO:110	GVPSRFSGSILGNKAALTIIGACQADEAEYFC	ALFISNPSVE	FGGGTQLTVLG
35G3	NTNTRHS SEQ ID NO:110	GVPSRFSGSILGNKAALTIIGACQADEAEYFC	SEQ ID NO:160	SEQ ID NO:309
53C1	NTNTRHS SEQ ID NO:110	GVPSRFSGSILGNKAALTIIGACQADEAEYFC	SEQ ID NO:160	SEQ ID NO:309
35F6	NTNTRHS SEQ ID NO:110	GVPSRFSGSILGNKAALTIIGACQADEAEYFC	SEQ ID NO:160	SEQ ID NO:309
36G2	NTNTRHS SEQ ID NO:119	GVPSRFSGSILGNKAALTIIGACQADEAEYFC	SEQ ID NO:160	SEQ ID NO:309
39D5	NTNTRHS SEQ ID NO:119	GVPSRFSGSILGNKAALTIIGACQADEAEYFC	SEQ ID NO:160	SEQ ID NO:309
42D12	NTNTRHS SEQ ID NO:119	GVPSRFSGSILGNKAALTIIGACQADEAEYFC	SEQ ID NO:160	SEQ ID NO:309
35G1	NTNTRHS SEQ ID NO:110	GVPSRFSGSILGNKAALTIIGACQADEAEYFC	SEQ ID NO:160	SEQ ID NO:309
41D12	NTNTRHS SEQ ID NO:119	GVPSRFSGSILGNKAALTIIGACQADEAEYFC	SEQ ID NO:160	SEQ ID NO:309
41H8	NTNTRHS SEQ ID NO:110	GVPSRFSGSILGNKAALTIIGACQADEAEYFC	SEQ ID NO:160	SEQ ID NO:309
35G2	NTNTRHS SEQ ID NO:110	GVPSRFSGSILGNKAALTIIGACQADEAEYFC	SEQ ID NO:160	SEQ ID NO:309
40F1	NTNTRHS SEQ ID NO:119	GVPSRFSGSILGNKAALTIIGACQADEAEYFC	SEQ ID NO:160	SEQ ID NO:309
53B1	NTNTRHS SEQ ID NO:119	GVPSRFSGSILGNKAALTIIGACQADEAEYFC	SEQ ID NO:160	SEQ ID NO:309
39C3	NTNTRHS SEQ ID NO:119	GVPSRFSGSILGNKAALTIIGACQADEAEYFC	SEQ ID NO:160	SEQ ID NO:309
53E1	NTNTRHS SEQ ID NO:119	GVPSRFSGSILGNKAALTIIGACQADEAEYFC	SEQ ID NO:160	SEQ ID NO:309
53H1	NTNTRHS SEQ ID NO:119	GVPSRFSGSILGNKAALTIIGACQADEAEYFC	SEQ ID NO:160	SEQ ID NO:309
53A2	NTNTRHS SEQ ID NO:119	GVPSRFSGSILGNKAALTIIGACQADEAEYFC	SEQ ID NO:160	SEQ ID NO:309

[0587] 表15B:具有多于94%总人同一性的种系化27B3克隆的VL氨基酸序列,具有全VL氨基酸序列的序列标识。阴影表示人源化突变和粗体表示引物引入的突变。

[0588]

SEQ ID NO:	轻链克隆	全长VL序列
201	27B3	QAVVTQEPSTLVSPGGIVTLTCGLKSGSVTSINFTWYQQTFGQAPRLLIYNTNTRHS GVPSRFSGSILGNKAALTIIGACQADEAEYFCALFISNPSVEFGGGTQLTVLS
230	35A9	QAVVTQEPSTLVSPGGIVTLTCGLKSGSVTSINFTWYQQTFGQAPRLLIYNTNTRHS GVPSRFSGSILGNKAALTIIGACQADEAEYFCALFISNPSVEFGGGTQLTVLG
231	53F1	QAVVTQEPSTLVSPGGIVTLTCGLKSGSVTSINFTWYQQTFGQAPRLLIYNTNTRHS GVPSRFSGSILGNKAALTIIGACQADEAEYFCALFISNPSVEFGGGTQLTVLG
232	35D6	QAVVTQEPSTLVSPGGIVTLTCGLKSGSVTSINFTWYQQTFGQAPRLLIYNTNTRHS GVPSRFSGSILGNKAALTIIGACQADEAEYFCALFISNPSVEFGGGTQLTVLG
233	53G1	QAVVTQEPSTLVSPGGIVTLTCGLKSGSVTSINFTWYQQTFGQAPRLLIYNTNTRHS GVPSRFSGSILGNKAALTIIGACQADEAEYFCALFISNPSVEFGGGTQLTVLG
234	35G3	QAVVTQEPSTLVSPGGIVTLTCGLKSGSVTSINFTWYQQTFGQAPRLLIYNTNTRHS GVPSRFSGSILGNKAALTIIGACQADEAEYFCALFISNPSVEFGGGTQLTVLG
235	53C1	QAVVTQEPSTLVSPGGIVTLTCGLKSGSVTSINFTWYQQTFGQAPRLLIYNTNTRHS GVPSRFSGSILGNKAALTIIGACQADEAEYFCALFISNPSVEFGGGTQLTVLG
236	35F6	QAVVTQEPSTLVSPGGIVTLTCGLKSGSVTSINFTWYQQTFGQAPRLLIYNTNTRHS

[0589]

		GVPDRFSGSILGNKAALTIITGAQPEDESDYFCALFISNPSVEFGGGTQTLTVLG
237	36G2	QAVVTQEPSESVSPGGIVTLTCLGKSGSVTSNFFPTWYQQTTPGQAPRLLIYNTNTRHS GVPRFSGSILGNKAALTIITGAQPEDESDYFCALFISNPSVEFGGGTQTLTVLG
238	39D5	QAVVTQEPSESVSPGGIVTLTCLGKSGSVTSNFFPTWYQQTTPGQAPRLLIYNTNTRHS GVPRFSGSILGNKAALTIITGAQPEDESDYFCALFISNPSVEFGGGTQTLTVLG
239	42D12	QAVVTQEPSESVSPGGIVTLTCLGKSGSVTSNFFPTWYQQTTPGQAPRLLIYNTNTRHS GVPRFSGSILGNKAALTIITGAQPEDESDYFCALFISNPSVEFGGGTQTLTVLG
240	35G1	QAVVTQEPSESVSPGGIVTLTCLGKSGSVTSNFFPTWYQQTTPGQAPRLLIYNTNTRHS GVPRFSGSILGNKAALTIITGAQPEDESDYFCALFISNPSVEFGGGTQTLTVLG
241	41D12	QAVVTQEPSESVSPGGIVTLTCLGKSGSVTSNFFPTWYQQTTPGQAPRLLIYNTNTRHS GVPRFSGSILGNKAALTIITGAQPEDESDYFCALFISNPSVEFGGGTQTLTVLG
242	41H8	QAVVTQEPSESVSPGGIVTLTCLGKSGSVTSNFFPTWYQQTTPGQAPRLLIYNTNTRHS GVPRFSGSILGNKAALTIITGAQPEDESDYFCALFISNPSVEFGGGTQTLTVLG
243	35G2	QAVVTQEPSESVSPGGIVTLTCLGKSGSVTSNFFPTWYQQTTPGQAPRLLIYNTNTRHS GVPRFSGSILGNKAALTIITGAQPEDESDYFCALFISNPSVEFGGGTQTLTVLG
244	40F1	QAVVTQEPSESVSPGGIVTLTCLGKSGSVTSNFFPTWYQQTTPGQAPRLLIYNTNTRHS GVPRFSGSILGNKAALTIITGAQPEDESDYFCALFISNPSVEFGGGTQTLTVLG
245	53B1	QAVVTQEPSESVSPGGIVTLTCLGKSGSVTSNFFPTWYQQTTPGQAPRLLIYNTNTRHS GVPRFSGSILGNKAALTIITGAQPEDESDYFCALFISNPSVEFGGGTQTLTVLG
246	39C3	QAVVTQEPSESVSPGGIVTLTCLGKSGSVTSNFFPTWYQQTTPGQAPRLLIYNTNTRHS GVPRFSGSILGNKAALTIITGAQPEDESDYFCALFISNPSVEFGGGTQTLTVLG
247	53E1	QAVVTQEPSESVSPGGIVTLTCLGKSGSVTSNFFPTWYQQTTPGQAPRLLIYNTNTRHS GVPRFSGSILGNKAALTIITGAQPEDESDYFCALFISNPSVEFGGGTQTLTVLG
244	53H1	QAVVTQEPSESVSPGGIVTLTCLGKSGSVTSNFFPTWYQQTTPGQAPRLLIYNTNTRHS GVPRFSGSILGNKAALTIITGAQPEDESDYFCALFISNPSVEFGGGTQTLTVLG
245	53A2	QAVVTQEPSESVSPGGIVTLTCLGKSGSVTSNFFPTWYQQTTPGQAPRLLIYNTNTRHS GVPRFSGSILGNKAALTIITGAQPEDESDYFCALFISNPSVEFGGGTQTLTVLG

[0590] 实施例15:种系化27B3mAb的温度稳定性

[0591] 在HEK293细胞中作为全长人IgG1分子表达了数个种系化27B3mAb变体。蛋白质A纯化后,评估了种系化27B3mAb变体的温度稳定性。具体地,在PBS缓冲液中使每个mAb以100μg/ml的浓度在多个温度下(相隔2或5℃)孵育1小时。之后以控制方式降低mAb的温度(经2小时降低至25℃,然后在4℃下孵育过夜),然后使用离心以除去聚集物。通过Biacore测量上清液中活性mAb的量(作为总mAb浓度的百分数)。

[0592] 结果(示于表17中)表明,大多数克隆具有与野生型27B3所具有的类似的熔融温度(T_m)。出乎意料地,克隆41D12和35G2示出与27B3相比具有增加的热稳定性。

[0593] 表17:种系化27B3mAb的温度稳定性

mAb 克隆	T_m [°C]	
27B3 (WT)	64.7	64.6
35G1	63.7	
35G3	61.7	

[0594]

53A2	62.2	62.2
41D12	65.9	65.9
35G2	65.6	66.0
40F1	63.5	
53H1	64.1	

[0595] 使用多种技术进一步研究种系化27B3mAb:41D12、35G2和40F1的温度稳定性。在含有0.02%吐温的Delbuco's PBS中制备浓度为100μg/ml的测试mAb(1ml)。还制备了仅由缓冲液(包含0.02%吐温的Delbuco's PBS)组成的阴性对照和由包含0.02%吐温之Delbuco's PBS中的mAb组成的阳性对照。对于每个mAb制备物,将其在4℃、RT和37℃下储存0~8周。在第1、7、14、21、28、35、56和92天取出50μl样品用于分析。将样品储存于-20℃并用作参照。

[0596] 15.1 样品的凝胶过滤分析

[0597] 还通过使用Superdex200 10/300GL柱的凝胶过滤分析了在每个时间点取得的样品。将50 μ l测试样品添加至200 μ l PBS+0.02%吐温-20中。取得样品(125 μ l)用于凝胶过滤分析。在分析前使样品离心以除去较大的聚集物。测量单体峰的%和单体峰的面积以及保留体积。结果示于表19、20和21中。

[0598] 表19:PBS稳定性研究的结果-单体峰%

[0599]

		d1	d7	d14	d21	d28	d35	d56	d92
35G2	参照	99.82	99.84	99.81	99.81	99.80	99.87		
40F1		99.85	99.83	99.83	99.83	99.87	99.86		
41D12		99.84	99.81	99.84	99.75	99.73	99.23	99.82	99.84
35G2	4°C	99.85	99.75	99.74	99.83	99.66	99.84		
40F1		99.65	99.29	99.73	99.77	99.72			
41D12		99.88	99.76	99.83	99.8	99.84		99.81	99.49
35G2	RT	99.78	99.83	99.81	99.87	99.83			
40F1		99.87	99.83	99.84	99.77	99.77			
41D12		99.88	99.86	99.87	99.78	99.73		99.80	99.71
35G2	37°C	99.86	99.80	99.72	99.68	99.48	99.32		
40F1		99.83	99.78	99.78	99.77	99.40	99.27		
41D12		99.89	99.77	99.61	99.71	99.45	99.02	98.66	97.46

[0600] 表20:PBS稳定性研究的结果-单体峰的曲线下面积(mAU * ml)

[0601]

		d1	d7	d14	d21	d28	d35	d56	d92
35G2	参照	67.34	68.46	64.92	66.70	66.69	66.37		
40F1		67.04	67.96	70.36	69.62	69.53	67.23		
41D12		66.41	67.64	61.17	68.53	68.60	66.08	67.48	67.06
35G2	4°C	68.41	67.58	62.55	68.64	68.12	68.42		
40F1		69.86	67.31	65.55	66.76	68.99			
41D12		68.38	69.87	65.61	68.98	69.99		68.85	67.33
35G2	RT	66.76	67.23	71.40	68.55	68.45			
40F1		68.42	69.53	69.17	68.02	70.32			
41D12		66.47	69.01	64.32	69.72	71.56		69.36	67.16
35G2	37°C	67.52	67.14	64.49	61.89	66.51	65.64		
40F1		66.48	67.69	67.35	68.02	68.61	67.23		
41D12		67.09	68.13	61.51	68.97	68.37	68.25	67.78	66.51

[0602] 表21:PBS稳定性研究的结果-保留体积(ml)

[0603]

		d1	d7	d14	d21	d28	d35	d56	d92
35G2	参照	12.17	12.13	12.13	12.15	12.17	12.20		
40F1		12.14	12.09	12.11	12.12	12.14	12.16		
41D12		12.12	12.08	12.10	12.10	12.12	12.14	12.10	12.13
35G2	4°C	12.16	12.12	12.14	12.16	12.17	12.20		
40F1		12.13	12.09	12.11	12.12	12.14			
41D12		12.12	12.08	12.10	12.10	12.13		12.10	12.13
35G2	RT	12.16	12.12	12.14	12.16	12.17			
40F1		12.14	12.09	12.10	12.12	12.13			
41D12		12.12	12.07	12.10	12.10	12.28		12.09	12.13
35G2	37°C	12.16	12.12	12.13	12.14	12.16	12.17		
40F1		12.13	12.09	12.09	12.12	12.12	12.14		
41D12		12.12	12.08	12.08	12.09	12.10	12.12	12.06	12.08

[0604] 图13示出了在37°C下孵育5周后取得的35G2、40F1和41D12样品的凝胶过滤分析的

结果。在较高保留时间(表明存在一些聚集物)和较低保留时间(表明存在一些降解产物)时可见两个小峰。结果表明,大部分蛋白质是完整的并且没有聚集。

[0605] 通过Biacore分析样品

[0606] 使用Biacore对于CD70结合的效力测试了在某些时间点取得的样品。将50 μ l样品添加至200 μ l PBS+0.02%吐温,然后如下稀释1/400:5 μ l样品(1mg/ml)+195 μ l HBS-EP+(Biacore缓冲液),进一步稀释10 μ l+90 μ l HVS-EP+=2.5 μ g/ml。使用高度包被CD70的CM5芯片(4000RU)进行Biacore分析。mAb 40F1、35G2和41D12的结果示于图16中。参照样品为100%样品。

[0607] 结果表明mAb当在37 $^{\circ}$ C下孵育时经时间失去一些效力(对抗原CD70的亲合力)。对于41D12,标绘了斜率和最大信号(R0)两者(参见图16)。

[0608] 接下来,研究种系化27B3mAb:41D12、35G2和40F1的冻融稳定性。因此,使0.7ml mAb(浓度为5mg/ml)在-20 $^{\circ}$ C下冷冻至少6小时,然后在RT下融化1小时。使该循环重复9次(所以总共10个冻融循环),然后通过上述凝胶过滤分析样品。结果表明,10个冻融循环后mAb是稳定的:在凝胶过滤中没有观察到降解产物或聚集物。

[0609] 表22:凝胶过滤稳定性研究PBS的结果(左=10个F/T循环后的值,右为参照样品的值)

[0610]

凝胶过滤	35G2	40F1	41D12
	10/参照	10/参照	10/参照
单体峰%	99.9/99.8	99.8/99.7	99.8/99.8
单体峰面积	67.5/64.7	65.9/67.2	68.2/67.8
保留时间	12.20/12.21	12.15/12.15	12.12/12.12

[0611] 还在如上所述的Biacore中对效力测试了样品。结果表明,10个冻融循环后,mAb仍具有其效力的97%(多于所测试的所有三个mAb)。

[0612] 表23:10个冻融循环后Biacore中的效力(%)

[0613]

	35G2	40F1	41D12
参照	100	100	100
10xFT	97.35	96.96	97.02

[0614] 实施例16:种系化27B3mAb的ADCC效力

[0615] 在HEK293细胞中作为全长人IgG1分子表达了数个种系化27B3变体。蛋白质A纯化后,评估了种系化27B3mAb的ADCC效力。使用实施例7中上文描述地测量了ADCC。

[0616] 对于在Raji共培养测定(如实施例6中描述的)中的ADCC效力和CD70/CD27阻断效力二者,表18中给出了种系化27B3mAb与亲本27B3相比的相对IC50。 <1.0 的数字表示种系化变体相对于亲本27B3的改进IC50。从这些数据可推出,种系化变体41D12维持ADCC效力以及与最佳T_m结合的CD70/CD27阻断效力。

[0617] 表18:种系化27B3变体在基于786-0的ADCC测定中和中和在基于Raji的生物测定中与亲本mAb克隆相比的相对IC50

[0618]	mAb 克隆	相对于27B3的 Raji共培养 测定IC50	种系化mAb相对于27B3的ADCC IC50					
	27B3	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	53A2	0.8	1.5		1.9	1.5	4.6	0.7
	41D12	1.2	1.7	1.1	2.2	1.4	2.0	2.0
	35G2	1.4	1.7	2.1	4.4	1.4	1.9	2.3
	40F1	1.8	1.0	1.5	1.3	1.5	2.1	1.6
	53H1	1.6	0.9	1.8	3.4	2.1	1.9	1.7

[0619] 实施例17:表达非岩藻糖基化的CD70mAb (ARGX-110)的细胞系的构建和选择

[0620] 产生编码种系化27B3克隆41D12之VH和VL氨基酸序列的双基因载体(za同种异型)。下表30给出了编码41D12之重链(SEQ ID NO:344)和轻链(SEQ ID NO:345)的核苷酸序列。

[0621] 通过电穿孔采用双基因载体稳定地转染**Potelligent®**CHOK1SV细胞。进行六轮转染。在每轮中,将来自每次电穿孔的细胞添加至200mL无化学限定动物组分(CDACF)的培养基CM63中,然后以每孔50μL铺在四十个96孔板上。转染后当天,将150μL包含选择剂L-氨基亚砷蛋氨酸(MSX)的CM63培养基添加至每孔中以得到50μM的最终MSX浓度。孵育约3、4和5周之后,使用克隆镜(cloning mirror)针对菌落的存在筛选板。使用显微镜进一步检查经鉴别的菌落以评估菌落是否由单一或多个细胞产生。

[0622] 使用基于Octet的方法对抗体产生鉴别并筛选了两百四十五个菌落。抗体浓度从0至172μg/mL。在筛选的245个细胞系中,对于抗体产生,214个为阳性。基于产率,将细胞系分等级,然后选择最高的70个细胞系。将这些70个细胞系的培养物最初静置培养中培养,最后在悬浮培养中培养。选择表现出可接受生长的三十个细胞系并在一批摇瓶培养产率筛选中进一步评估。在第4、6、8和10天对培养物进行通气并且在第12天进行收获。在使用蛋白质A的含有柱的HPLC中确定抗体在收获上清液样品中的浓度。来自30个细胞系的样品中的抗体浓度从109至877mg/L。基于产率,使用这批摇瓶评估的结果以对细胞系分等级。选择最高的20个细胞系用于进一步评估。

[0623] 使用CDACF培养基在分批补料培养中研究表达ARGX-110抗体的这些20个选定细胞系的生长和产率数据,并且结果示于表24中。如采用蛋白质AHPLC柱确定的,收获时抗体浓度从857至3922mg/L。选择细胞系F13以接种一次性10L细胞袋生物反应器。实现4327mg/L的收获抗体浓度。该细胞系在分批补料摇瓶培养中在收获时实现2711mg/L的抗体浓度并且具有所评估所有6个细胞系(B1、D4、D5、F1、F13和F18)的第二最高特定生产率(2.22pg/细胞/小时)。该细胞系还表现出可接受的生长特征。

[0624] 表24:在CDACF分批补料摇瓶培养中生长的表达ARGX-110抗体的20个选定细胞系的生长和产率的总结。

[0625]

细胞系	最大活 细胞浓度 ($10^6/\text{mL}$)	收获时的 IVC ⁽¹⁾ (10^6 细胞·小时/L)	收获时的 活力 (%)	收获时的 抗体浓度 ⁽²⁾ (mg/L)	比产率 (q_p) ⁽³⁾ (pg/细胞/小时)
A1	8.55	1276	47.1	1536	1.204
A9	4.01	1039	71.5	1033	0.994
B1	8.60	1777	69.9	3922	2.206
B2	5.22	1277	59.7	2938	2.301
D4	9.10	1957	79.5	3346	1.709
D5	7.84	1791	78.5	3258	1.819
D12	7.76	1635	91.2	1424	0.871
D20	7.66	1525	60.6	3130	2.052
D24	4.25	973	28.3	1133	1.164
D30	7.58	1492	93.4	2095	1.405
F1	8.55	1717	41.0	3704	2.157
F13	6.14	1224	46.0	2711	2.215
F18	7.80	1641	50.0	3301	2.011
F20	7.76	1812	68.2	2095	1.156
F21	7.95	1693	39.7	2008	1.186
F22	8.13	1953	87.9	1572	0.805
F29	9.16	1944	88.3	1435	0.738
F31	7.27	1453	73.9	1540	1.060
F33	5.67	1409	7.2	857	0.608
F34	10.04	2049	93.4	1328	0.648
⁽¹⁾ 收获时活细胞浓度的时间积分 ⁽²⁾ 通过蛋白质A HPLC确定 ⁽³⁾ 通过抗体浓度针对活细胞浓度之时间积分的线性回归分析来计算					

[0626] 实施例18:CD70mAb的亲合力

[0627] 18.1 对表达CD70之癌细胞系的亲合力

[0628] 对ARGX-110与SGN70 (描述于US2010/0129362中) 在饱和mAb浓度(至少 $2\mu\text{g}/\text{ml}$) 下的结合通过FACS分析来测试数个癌细胞系。这在 4°C (细胞与mAb孵育1小时) 或在 37°C (细胞与mAb孵育15分钟) 下进行。使用抗hIgG1-Fc-FITC (AF006, Binding Site) 或抗hIgG1-Fc-PE 抗体 (eBioscience, 12-4998) 检测结合。

[0629] 使用流式细胞仪测量荧光。结果总结于表25中。表的第三列示出了ARGX-110是否以低(+)、中(++)或高(+++)亲合力与所测试的多个细胞系相结合。

[0630] 在右列中, 对于在 37°C 下进行的实验, ARGX-110的FACS信号(MFI)除以SGN70的FACS信号(MFI)。这些结果表明ARGX-110比SGN70以更高亲合力与细胞结合, 特别是对于较低拷贝数细胞系尤其如此, 其中, 可预期, 可更容易地发现高亲合力结合的抗体。

[0631] 表25:CD70mAb ARGX-110和SGN70与癌细胞系的结合

[0632]

类型	细胞系	ARGX-110	ARGX-110的FACS 信号/SGN70的 FACS信号
Burkitt淋巴瘤	Raji	+++	1.2
大B细胞淋巴瘤	SU-DHL-6	+	2.4
霍奇金淋巴瘤	L428	+++	1.4
非霍奇金淋巴瘤	MHHPREB1	+++	1.2
套细胞淋巴瘤	Mino	+++	1.0
	Jeko	+++	
	Granta 519	++	0.9
	Rec-1	+	
慢性淋巴细胞白血病	Mec1	+++	1.2
	JVM-3	++	
	JVM-2	+	2.4
皮肤T细胞淋巴瘤	HUT78	+++	1.0
	HH	+	1.7
多发性骨髓瘤	U266	+++	0.8
	JNN-3	+++	
	LP1	++	
	AMO-1	+++	
	RPMI8226	+++	
	MM1.S	++	
	KMS11	+++	
	KMS12MB	+++	
肾细胞癌	786-O	+++	2.1
	Caki-1	++	1.9
	A498	++	1.0
星形细胞瘤	U251	+++	
胃癌	MKN-45	+	10.6
肺癌	A549	+	3.8
	EBC-1	+	8.9
黑素瘤	WM1205-Lu	+++	
	WM852	+	
	WM3248	+++	
	WM793	+	
	WM1552C	++	
	WM115	+++	

[0633]

成胶质细胞瘤	GaMG	+	
	U87MG	++	2.0
	U343	++	
卵巢癌	OAW-42	+	
	SKOV3	+	
	OVCA3	+	
胰腺癌	PANC-1	++	2.9
	PANC-89	+	

[0634] 在又一个实验中,对于不同细胞系确定了CD70mAb (ARGX-110、SGN70和MDX1411[参见上文])经过浓度范围的明显结合亲和力。在4℃下细胞与稀释系列的CD70结合mAb孵育1小时,然后使用抗hIgG1-Fc-FITC或抗hIgG-Fc-PE抗体检测结合。使用流式细胞仪测量荧光并且绘制中值荧光。结果示于图15中。

[0635] 结果表明,三种不同的mAb对细胞上CD70的亲和力是相当的,但对于一些细胞系:SU-DHL-6、A549和MKN45而言,ARGX-110的结合与MDX1411和SGN70相比是更高的。与采用其他细胞系(如U226和许多其他)的EC50相比,对于所有的mAb,与SU-DHL-6、A549和MKN45之结合的EC50高得多,这可能表明mAb仅采用一臂(Fab)结合,不再允许活动性(avidity),从而

导致较低亲和力。事实上,当在Biacore中测试时,ARGX-110相对于SGN70和MDX1411的Fab亲和力和高得多(参见下文)。

[0636] 18.2 对表达CD70之患者细胞的亲和力

[0637] 将从慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 患者 (2位高风险患者,1位低风险患者) 中取得的原代细胞以250,000个细胞/孔铺在含有RPMI 1640+10%FBS的圆底96孔板中并且添加RPMI+10%FBS中5 μ g/ml浓度的mAb。在37℃下最多孵育5小时后,用冰冷的PBS洗涤细胞两次。将Alexa Fluor 647标记的山羊抗人IgG (Invitrogen Cat#21445) 在PBS/1%BSA中稀释1/500并且在4℃下孵育20分钟。用冰冷的PBS洗涤板两次,然后经15分钟在室温下添加4%低聚甲醛以固定细胞。通过FACS测量信号。结果示于图16中。结果表明,ARGX-110很好地与来自CLL患者的细胞相结合,而SGN70几乎没有给出结合信号。

[0638] 18.3 在Biacore中CD70Fab对重组CD70的亲和力

[0639] 在CM5Biacore芯片上固定重组人CD70。根据由Biacore提供的方法和通过使用NHS/EDC试剂盒 (Biacore AB) 进行固定:活化芯片后,制备50 μ g/ml重组CD70在pH 5的10mM醋酸盐缓冲液中的溶液并且注入1 μ l该溶液 (50ng),从而导致约1000RU的表面密度。

[0640] 对于CD70mAb ARGX-110、MDX1411和SGN70,通过胰蛋白酶消化制备Fab。将约100~400 μ g/ml浓度的这些Fab在HEPES缓冲盐水 (0.1M HEPES、1.5M NaCl、30mM EDTA、0.5% v/v表面活性剂P20) 中稀释6倍。将它们注入 (30 μ l) 并使其以30 μ l/分钟的流速通过流动细胞。Fab与CD70结合后,经10分钟监测解离速率。解离后,通过注入5 μ l 10mM NaOH再生流动细胞表面。有时需要多次注入NaOH以再生表面,这取决于Fab的亲和力。通过使用BIAevaluation软件进行解离速率分析。首先,从采用经包被流动细胞获得的sensogram减去空转获得的那些。之后使用拟合动力学应用经10分钟测定解离速率并计算K_d值。解离速率总结于表26中。

[0641] 表26:Fab对与人CD70结合的“解离速率”

[0642]

	解离速率 [10^{-4}s^{-1}]
ARGX-110	1.4
SGN70	7
MDX1411	17

[0643] 18.4 评估裂解由CD70mAb结合之SU-DHL-6细胞的掺入实验

[0644] 将SU-DHL-6细胞 (弥漫性大B细胞淋巴瘤细胞系) 以50,000个细胞/孔移至孔中,之后将其掺入至来自健康供体的300,000个新鲜分离的PBMC/孔中并且以不同浓度添加mAb。使样品孵育2天,然后针对细胞系的消除通过FACS进行分析 (如采用抗人CD19APC (eBioscience 17-0199-42) 测量的)。采用ARGX-110获得了在细胞杀伤中的最佳效力,还给出了最高的裂解%。结果示于图17中。

[0645] 实施例19:CD70mAb的CD27-CD70阻断活性

[0646] CD70与CD27之间的相互作用可有助于肿瘤细胞在肿瘤微环境内存活、增殖和/或免疫抑制。因此,通过ELISA评估CD70mAb用于阻断CD70与CD27之间相互作用的能力。

[0647] 在该测定中,首先用100 μ l PBS中1250倍稀释的抗FLAG M2单克隆抗体 (Sigma Aldrich,F3165) (以达到约3.5 μ g/ml的终浓度) 在4℃下包被微量滴定板 (Nunc Maxisorb) 过夜。用PBS-吐温洗涤板一次,然后在RT下与300 μ l PBS-1%酪蛋白孵育2小时。再用PBS-吐

温洗涤板三次。将100 μ l PBS-0.1%酪蛋白中稀释的5ng/ml (80pM) Flag-TNC-CD70 (The Journal of Immunology, 2009, 183:1851-1861) 添加至板中并在RT下孵育1小时同时摇动。用PBS-吐温洗涤板五次。将待测CD70mAb添加至板中; 通过将抗体储液稀释于PBS-0.1%酪蛋白中实现多个浓度。紧接着其后, 添加50 μ l 1 μ g/ml (终浓度为6.5nM) 重组人CD27Fc嵌合体 (R&D systems 382-CD, MW=46.5kDa) 并且在RT孵育1小时同时摇动。用PBS吐温洗涤板五次。添加100 μ l PBS-0.1%酪蛋白中500倍稀释的生物素化的抗CD27 (eBioscience 13-0271) 并且在RT下将板再孵育一小时同时摇动。用PBS吐温洗涤板五次。添加100 μ l PBS-0.1%酪蛋白中5000倍稀释的Strep-HRP (Jackson Immunoresearch 016-030-084) 并且在RT下将板再孵育一小时同时摇动。用PBS-吐温洗涤板五次。将100 μ l TMB添加至板中并在620nm下测量OD。

[0648] 使用该测定, 将ARGX-110的阻断效力与SGN70和MDX1411的效力相比较。如图18所示, ARGX-110在阻断CD70与CD27之间相互作用中比两种基准mAb的效力强得多 (约100倍) ($IC_{50}ARGX-110=67ng/ml$ 、 $MDX1411=5500ng/ml$ 和 $SGN70=4972ng/ml$)。

[0649] 实施例20: CD70mAb的结合特性

[0650] 20.1 与非人物种之CD70的交叉反应

[0651] 出于评估目的, 确定CD70mAb的动物交叉反应是可用的, 其中动物模型可用于体内验证概念研究, 并且其中物种最合适于毒理学研究。恒河猴CD70与人CD70具有94%同一性, 而食蟹猴CD70与人CD70具有95%同一性。图19示出了来自不同物种之序列的比对。还包括了小鼠和大鼠CD70序列, 从而以强调与人序列相比的差异。

[0652] 对于与以10~20 μ g/ml浓度开始的稀释系列的U266 (人多发性骨髓瘤细胞系)、LCL8664细胞 (恒河猴B细胞淋巴瘤细胞系, ATCC-CRL-1805) 和HSC-F细胞 (食蟹猴T细胞系, 胎脾来源的淋巴细胞, Japanese health science foundation) 相结合, 测试了CD70mAb ARGX-110、SGN70和MDX1411。

[0653] 使用山羊抗人IgG1FITC进行检测。通过FACS分析样品。结果示于图20中。两种猴细胞系上CD70的拷贝数非常低 (在FACS中低信号)。然而, 与SGN70和MDX1411对食蟹猴和恒河猴CD70的亲合力相比, ARGX-110对这些物种CD70具有高亲合力。

[0654] 20.2 CD70mAb的阻断效力

[0655] 使用上述实施例19中描述的阻断ELISA测试了CD70mAb (ARGX-110、SGN70和MDX1411) 用于阻断CD70与CD27之间相互作用的能力。适用该测定以测量每种抗体对人、恒河猴和食蟹猴Flag-TNC-CD70的阻断效力 (Wyzgol, 等, J. Immunol., 2009, 183:1851-1861)。

[0656] 在ELISA中, 将完全一样的条件用于来自不同物种的CD70, 使得可直接比较不同物种之间的 IC_{50} 。结果示于图21中并且支持使用来自人、恒河猴和食蟹猴的细胞所发现的结果。ARGX-110具有不变的效力和由此对与人相比对猴的CD70的不变亲合力, 而SGN70并且尤其是MDX1411对猴CD70比对人CD70具有更低的亲合力。 IC_{50} 值总结于表27中。

[0657] 表27: 对于来自不同物种的CD70在ELISA中阻断CD27-CD70相互作用的 IC_{50}

[0658]	细胞	抑制ELISA中的IC50 [ng/ml]		
		人	恒河猴	食蟹猴
	ARGX-110	39	75	48
	SGN70	54	178	112
	MDX1411	44	>10000	>10000

[0659] 20.3 与变性CD70的结合

[0660] 通过ELISA评估CD70mAb与变性重组CD70的结合。通过在95℃下加热5分钟使重组CD70变性,然后在冰上立即冷却5分钟。采用5μg/ml变性或非变性CD70包被微量滴定板。将板封闭并以10μg/ml施用用于测试的CD70mAb。洗涤后,使用抗人IgG-HRP检测mAb的结合。作为包被的阳性对照,替代使用CD70mAb,施用抗Flag小鼠来源的mAb并且采用抗小鼠-HRP进行检测。TMB用作底物并且在620nm处测量OD。来自该ELISA的结果示于图22中。结果表明,与SGN70、MDX1411 (MDX2H5) 和MDX69A7相比,ARGX-110与不同表位相结合,因为ARGX-110仍与变性的CD70相结合,而其他mAb则不是。在其他mAb当中,一些也与变性的CD70相结合 (fe 5F4、9G2、57B6)。

[0661] 20.4 使用小鼠-人嵌合体的表位作图

[0662] 通过交换人和小鼠CD70的结构域来构建人-小鼠CD70ECD融合蛋白,以对mAb的结构域识别进行作图。使用标准重组DNA和PCR方法进行构建。将小鼠和人嵌合体克隆至具有在ELISA中用于捕获之Flag标签和用于蛋白质三聚化之TNC的真核细胞表达载体中 (Flag-TNC-CD70)。在HEK293细胞中蛋白质表达为可溶性蛋白。不同嵌合体的序列示于图23中。

[0663] 采用3.5μg/ml小鼠M2抗Flag mAb (Sigma Aldrich, F3165) 包被Maxisorb (Nunc) 微量滴定板并且捕获不同的嵌合体。以10μg/ml浓度开始并进行3倍稀释来施用稀释系列的待测试CD70mAb。2小时后,使用16000稀释的抗人-Fc-HRP检测结合。采用ABTS进行染色并且在405nm处测量OD。作为阳性对照,施用能够与人和小鼠CD70以良好亲和力相结合以及与嵌合人-小鼠CD70变体相结合的CD27-Fc。结合的EC50值总结于表28中。

[0664] 表28:图23中所示的ARGX-110与人-小鼠CD70嵌合体的结合

[0665]

EC50 [ng/ml]	ARGX-110	CD27
人	22	79
嵌合体-1	27	159
嵌合体-2.1	15	51
嵌合体-2.2	16	56
嵌合体-2.3	15	
嵌合体-2.4	14	76
嵌合体-2	NB	99
嵌合体-3	NB	94
嵌合体-4	NB	51
小鼠	NB	41

[0666] NB=无结合

[0667] 结果表明,ARGX-110可以与人Flag-TNC-CD70以及与嵌合体1、2.1、2.2、2.3和2.4

相结合,但是不与嵌合体2、3和4以及小鼠Flag-TNC-CD70相结合。这表明ARGX-110的表位在下述氨基酸序列内:HIQVTLAICSS (SEQ ID NO:342)。

[0668] 实施例21:不同肿瘤细胞系与原代肿瘤细胞的CD70内化

[0669] 已经表明,CD70抗体与肾癌来源之细胞系786-0和A498的结合导致抗体-受体复合物的快速(1小时内)内化(Adam等,Br. J. Cancer (2006) 95:298-306)。为了测试mAb ARGX-110、SGN70和MDX1411的内化,将786-0细胞培养在96孔微量滴定板中并在37℃下孵育过夜。添加2.5μg/ml mAb并与细胞在37℃下孵育0~24小时。用stripping缓冲液(150mM NaCl, 100mM甘氨酸, pH=2.5;代码“内(IN)”表示通过CD70内化的mAb的量)或PBS(代码“外(OUT)”并且表示与细胞外面的受体结合的mAb的量)经5分钟洗涤板3次。随后,采用4%低聚甲醛在RT下将细胞固定30分钟,采用PBS洗涤,然后与0.2% Triton-X-100 (“IN”)或PBS (“OUT”)孵育5分钟。接下来,洗涤细胞两次并在RT下与100mM甘氨酸孵育10分钟,然后与PBS+1% BSA孵育30分钟。最后,在采用Li-Cor Odyssey红外扫描仪分析之前,采用山羊抗人Fc (Jackson immunoresearch 109-005-098)和抗山羊IRDYE800 (Li-cor 926-32214)对细胞进行染色。作为时间函数的mAb外%示于图24中。

[0670] 结果表明,所有mAb的内化均是相当的并且没有mAb完全内化。最初(0至2小时),mAb内化进行地非常快速,但是之后似乎达到了稳定状态,其中约30%的mAb保留在细胞外面,甚至在37℃下孵育24小时后也是如此。

[0671] 还使用其他细胞系评估了CD70结合mAb的内化。在这些实验中,使用根据下述方案的FACS分析测量了作为时间函数的细胞外面mAb的信号。与上述方法相比,确定该可替换的方案是可靠的读出(参见图24,右图)。

[0672] 对于悬浮细胞,将细胞离心、计数并将沉淀重悬于培养基中至 5×10^5 个细胞/ml的密度,然后96孔V底板的每孔添加100μl该悬液。对于贴附细胞,将细胞接种于96孔板中并在37℃、5% CO₂下开始培养,直到细胞完全贴附。以使得线性细胞生长额外48小时的密度将细胞铺板。

[0673] 将用于测试的mAb稀释并与细胞在37℃、5% CO₂下孵育不同的时期:24小时、8小时、6小时、4小时、2小时、1小时、30分钟、15分钟、5分钟、0分钟(=无mAb)。孵育后,在冰上用冷的FACS缓冲液洗涤板以终止内化反应。在该阶段,使用细胞解离溶液(Sigma)使贴附细胞从板上脱离并转移至V底96孔板。接下来,在4℃下使细胞旋转沉降。通过温和地反转板来除去上清液。通过将细胞沉淀温和地重悬于100μl冷的FACS缓冲液中来洗涤细胞两次。洗涤后,将细胞沉淀重悬于100μl抗hu IgG-FITC (FACS缓冲液中1/500稀释)中。在4℃下将板孵育30分钟同时摇动,然后用冷的FACS缓冲液再洗涤细胞三次。将细胞重悬于100μl FACS缓冲液中并立即测量荧光。相对于时间绘制中值平均荧光强度(MFI)。

[0674] 数个实验重复两次或更多次。来自两个实验的结果是非常相当的。在一些实验中,使用U266、SU-DHL-6和Raji细胞,使用浓度范围(20ng/ml~5μg/ml)以观察mAb浓度是否对内化速率有作用。没有观察到这样的作用(数据未示出)。

[0675] 所测试不同细胞系的结果示于表29中并且表明内化不是常见现象,事实上是十分稀有的事件。表29总结了不同细胞系在6小时后内化的百分比。这些结果示出了大部分ARGX-110保持与细胞外面结合,使得细胞更易于受ADCC、CDC和ADCP的作用。

[0676] 表29:6小时后不同细胞系上CD70mAb的内化%

[0677]

类型	细胞系	6小时后的内化%	每个指征的平均%
Burkitt淋巴瘤	Raji	2	2
大B细胞淋巴瘤	SU-DHL-6	3	3
霍奇金淋巴瘤	L428	15	15
非霍奇金淋巴瘤	MHHPREB1	19	19
套细胞淋巴瘤	Mino	12	7
	Granta 519	7	
	Rec-1	2	
慢性淋巴细胞白血病	Mec1	3	7
	JVM-2	8	
	JVM-3	11	
	Patient HR	5	
	Patient LR	8	
皮肤T细胞淋巴瘤	HUT78	35	33
	HH	31	
多发性骨髓瘤	U266	38	34
	AMO-1	36	
	RPMI8226	38	
	MM1.S	35	
	KMS12MB	49	
肾细胞癌	786-O	58	54
	Caki-1	37	
	A498	66	
星形细胞瘤	U251	52	52
胃癌	MKN-45	0	0
肺癌	A549	0	3
	EBC-1	6	
黑素瘤	WM1205-Lu	45	44
	WM3248	34	
	WM115	52	
成胶质细胞瘤	U87MG	10	21
	U343	32	
卵巢癌	SKOV3	51	51
胰腺癌	PANC-1	29	25
	PANC-89	20	

[0678] 表30:编码选定CD70抗体的核苷酸序列

[0679]

mAb		
41D12	重链 SEQ ID NO: 344	gcccgcaccATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCCAC CGCCACAGGCGTCCACTCTGAGGTGCAGCTCGTGGAGTCTGGG GGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTACCTTCAGTGTCTACTACATGAACCTGGGTC CGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTCGAGTGGGTCTCAGATATTA ATAATGAAGGTGGTACTACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGC CGATTACCATCTCCAGAGACAACTCTAAGAACAGCCTGTATCT GCAAATGAACAGCCTGCGCGCCGAGGACACGGCCGTGTACTAC TGCGCGAGAGATGCCGGATATAGCAACCATGTACCCATCTTTGA TTCTTGGGGCCAGGGGACCCTGGTCACTGTCTCCTCAGCCAGTA CAAAAGGTCCAAGTGTGTTCCCTCTTGCTCCCTCATCCAAGAGTA CCAGTGGAGGCACCGCGCTCTTGGCTGCTTGGTTAAGGATTAT TTCCCAGAGCCTGTCACTGTTTCATGGAACCTCCGGCGCCTTGACA TCTGGTGTGCATACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGTCAAGTGGCCTC TACAGCCTCAGTAGCGTGGTCACTGTGCCAGCAGCTCTCTCGG CACACAACTTATATCTGTAATGTGAATCATAAGCCTTCAAATACC AAGGTGGATAAGAAAGTGGAACCAAAATCATGTGACAAGACACAC ACCTGCCCTCCTTGTCCAGCCCCCGAAGTGTGGGTGGGCCAG CGTGTTCCTGTTTCCTCCTAAACCCAAAGACACTCTGATGATTAGT AGGACCCCGAGAAGTCACTTGCGTGGTGGTTGACGTGTACATGA AGATCCCGAGGTCAAGTTCAATTGGTATGTTGACGGGGTCAAGT TCACAACGCTAAACTAAACCAAGAGAGGAACAGTATAACTCTAC CTACCGGGTGGTGAAGTGTCTGACTGTCTCCATCAAGACTGGCT GAATGGCAAAGAATACAAGTGTAAAGTGAGCAACAAAGCCCTGC CCGCTCCTATAGAGAAAACAATATCCAAAGCCAAAGGTCAACCTC GCGAGCCACAGGTGTACACCTCCCAACCAAGCCGCGATGAACCT ACTAAGAACCAAGTCTCTCTTACTTGCTGGTTAAGGGGTTCTAT CCATCCGACATTGCAGTCGAGTGGGAGTCAATGGACAGCCTGA GAACAACCTACAAAACCAACCCCTCCTGTTCTGGATTCTGACGGATC TTTCTTCCTTTATTCTAAACTCACCGTGGATAAAAGCAGGTGGCAG CAGGGCAACGTGTTGAGCTGTTCCGTTATGCATGAGGCCCTGCA TAACCATTATACCCAGAAGTCTTTGTCCCTCAGTCCAGGAAAGTG A kozak 前导序列 可变区 λ 恒定区
	轻链 SEQ ID NO: 345	gcccgcaccATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCCAC CGCCACAGGCGTCCACTCTCAGGCAGTGGTGACCCAGGAGCCT TCCCTGACAGTGTCTCCAGGAGGGACGGTCACGCTCACCTGCG GCCTCAAATCTGGGTCTGTCACTTCCGATAACTTCCCCACTTGGT ACCAGCAGACACCAGGCCAGGCTCCCCGATTGCTTATCTACAA CACAAACACCCGTCACTCTGGCGTCCCCGACCGTTCTCCGGAT CCATCCTGGGCAACAAAGCCGCCCTCACCATCACGGGGGCCCA GGCCGACGACGAGGCCGAATATTTCTGTGCTCTGTTTATAAGTA ATCCTAGTGTGAGTTCGGCGGAGGGACCCAACTGACCGTCCTA GGTCAACCTAAAGCAGCACCTTCAGTACTCTGTTTCCACCTAGT TCAGAGGAACTGCAGGCCAATAAAGCCACACTCGTCTGCCTCAT CAGTGACTTCTACCCAGGAGCCGTGACCGTGGCCTGGAAAGCCG ACAGTAGCCCCGTGAAGGCCGGGGTGGAGACAACAACCTCCTAGT AAACAGAGTAATAACAAATATGCCGCTAGTAGTTATCTCTCCCTCA CTCCCGAGCAGTGAAGTCTCACAGAAGTACTCTTGTGAGGTTA

[0680]

		CTCACGAGGGTTCCACAGTGGAAAAGACTGTGGCCCCTACTGAA TGTAGTTGA kozak 前导序列 可变区 λ 恒定区
57B6	重链 SEQ ID NO: 346	CAGTTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTG GGGGGTCTCTGAGACTC TCTTGTGCAGCCTCTGGATTGAGCTTCAGTCACTATGCCATGAGC TGGGTCCGCCAGGCT CCAGGAAAGGGGCTAGAGTGGGTCTCAGGTGATAATACCTACGA TGGTGGTACAAGGTAT CAAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGG CAAGAACACGCTGTAT CTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTGTATTA CTGTGCAAAAGATACT GGTAGAGGCATTATGGGGGAGTACGGCATGGACTACTGGGGCAA AGGGACCCTGGTCACC GTCTCCTCA
	轻链 SEQ ID NO: 347	CAGACTGTGGTGACCCAGGAGCCGTCCTGTGAGTGTCTCCAGG AGGGACGGTCACACTC ACCTGCGGCCTCAAGTCTGGGTCTGTCACTTCCAGTAACTACCT GCTTGGTACCAGCAG ACACCAGGCCAGGCTCCCCGATTGCTTATCTACAACACAAACAGC CGTCACTCTGGGGTC CCCAGTCGCTTCTCCGGATCCATCTCTGGGAACAAAGCCGCCCT CACCATCACGGGGGCC CAGCCCGAGGACGAGGCCGACTATTACTGTGCTCTGTACATGGG TAGTGGTAGTGCCAAT GCTATGTTCCGCGGAGGGACCCATCTGACCGTCCTGGGTCA
59D10	重链 SEQ ID NO: 348	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTG GGGGGTCTCTGAGACTC TCCTGTGCAGCGTCCGAATTGTCCTTCAGTATTTCTGAGATGACC TGGGTCCGCCAGGCT CCAGGAAAGGGGCTCGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTGGTGTAA TGGTGGTAGTAGTACA AGTTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGA CAACGACAAGAACAG TTGTATCTACAAATGAACAGCCTGATACCCGAGGACACGGCCGTA TATTACTGTGCAACA ACTAGTGGTACTTACTACTTCATCCCCGAGTATGAGTACTGGGGC CAGGGGACCCAGGTC ACCGTCTCCTCA
	轻链 SEQ ID NO: 349	CAGTCTGTGCTGACCCAGCCTCCCTCCGTGTCTGGGTCTCCAGG AAAGACGGTCACCATC TCCTGTGCAGGAACGAGCAGTGATGTTGGGTATGGATACTATGTC TCCTGGTATCAACAG TTCCAGGAATGGCCCCCAAACCTCCTGATATATGACGTCAATAAA CGGGCCTCAGGGATC GCTGATCGCTTCTCTGGCTCCAAGGCCGGCAACACTGCCTCCCT GACCATCTCTGGGCTC CAGTCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGTGCCTCATATAGAAGT AGCGCCAATGCTGTG TTCGGCGGAGGGACCCATCTGACCGTCCTGGGT

eolf=seq1.txt

序列表

<110> arGEN-X BV

<120> 针对CD70的抗体

<130> NLM/P116378W000

<150> US 61453390

<151> 2011-03-16

<150> US 61503871

<151> 2011-07-01

<160> 351

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 30

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 1

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser
20 25 30

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 2

[0001]

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 3

<211> 30

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp
20 25 30

<210> 4

<211> 30

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 4

Glu Val Gln Val Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

<210> 5

<211> 30

<212> PRT

eolf-seql.txt

<213> 大羊驼

<400> 5

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser
20 25 30

<210> 6

<211> 30

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 6

Gln Val Gln Leu Val Glu Pro Gly Ala Gln Leu Arg Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

<210> 7

<211> 30

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 7

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

Thr Leu Ser Leu Ala Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr
20 25 30

[0002]

<210> 8

<211> 30

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 8

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Met Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 9

<211> 30

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 9

Gln Leu Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Met Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 10

Asn Tyr Trp Met His
1 5

ee1f-seq1.txt

[0003]

<210> 11
<211> 5
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 11
Val Tyr Tyr Met Asn
1 5

<210> 12
<211> 5
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 12
Asp Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 13
<211> 5
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 13
Thr Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 14
<211> 5
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 14
Asn Pro Ala Met Ser
1 5

<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 15
Ser Tyr Tyr Ile Asp
1 5

<210> 16
<211> 7
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 16
Thr Ser Tyr Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 17
<211> 5
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 17
Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 18
<211> 5

eolf :seq1.txt

<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 18

Ser Ser Ala Met Ser
1 5

<210> 19
<211> 5
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 19

Gly Ser Ala Met Ser
1 5

<210> 20
<211> 5
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 20

Ala Tyr Tyr Met Asn
1 5

<210> 21
<211> 14
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 21

Trp Val Arg Gln Ala Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10

[0004]

<210> 22
<211> 14
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 22

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10

<210> 23
<211> 14
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 23

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 24
<211> 14
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 24

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 25
<211> 14
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 25

eolf-seql.txt

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ser
1 5 10

<210> 26
<211> 17
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 26

Thr Ile Ser Thr Asp Asn Ser Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 27
<211> 17
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 27

Asp Ile Asn Asn Glu Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 28
<211> 17
<212> PRT
<213> 大羊驼

[0005]

<400> 28

Asp Ile Asn Asn Glu Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 29
<211> 17
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 29

Ser Ile Tyr Met Tyr Asp Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 30
<211> 17
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 30

Ala Ile Ser Trp Ser Gly Gly Glu Thr Phe Tyr Ala Glu Ser Met Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 31

eolf-seql.txt

<211> 17
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 31

Glu Ile Thr Asn Tyr Gly Tyr Asn Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 32
<211> 17
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 32

Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 33
<211> 16
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 33

Ala Ile Gly Ser Arg Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Thr
1 5 10 15

[0006]

<210> 34
<211> 17
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 34

Asp Ile Asn Ser Gly Gly Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 35
<211> 17
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 35

Ser Ile Tyr Ser Asp Ser Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 36
<211> 17
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 36

Ser Ile Tyr Ser His Ser Met Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

eolf-seql.txt

Ser

<210> 37
<211> 17
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 37

Asp Ile Asn Asn Glu Gly Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 38
<211> 32
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 38

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp His Ala Lys Asn Thr Leu Ile Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ile Arg
20 25 30

<210> 39
<211> 32
<212> PRT
<213> 大羊驼

[0007]

<400> 39

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Thr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Val Arg
20 25 30

<210> 40
<211> 32
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 40

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Thr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asp Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Val Arg
20 25 30

<210> 41
<211> 32
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 41

Arg Phe Thr Ile Ser Thr Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

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

<210> 42
<211> 32

eolf-seql.txt

<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 42

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 43
<211> 32
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 43

Arg Phe Thr Ile Ser Thr Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ala
20 25 30

<210> 44
<211> 32
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 44

Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Ala Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Val Glu
1 5 10 15

[0008]

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

<210> 45
<211> 32
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 45

Arg Thr Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Thr Leu Gln
1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 46
<211> 32
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 46

Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

<210> 47
<211> 32
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 47

Arg Phe Thr Ile Ser Thr Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln

1	5	10	15
Met Asn Ser Leu Lys Pro Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Gly			
	20	25	30

<210> 48
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 大羊驼

<400> 48

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Thr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asp Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Val Arg
20 25 30

<210> 49
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 大羊驼

<400> 49

Gly Ser Asp Tyr Glu His
1 5

<210> 50
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 大羊驼

<400> 50

[0009]

Asp Ala Gly Tyr Ser Asn His Val Pro Ile Phe Asp Ser
1 5 10

<210> 51
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 大羊驼

<400> 51

Asp Ile Asn Arg Ser Tyr Gly Ser Ser Trp Ser His Phe Gly Pro Ile
1 5 10 15

Phe Ser Ser

<210> 52
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 大羊驼

<400> 52

Gly Met Gly Leu Ala Glu Gly Leu Thr Asp
1 5 10

<210> 53
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 大羊驼

<400> 53

Ser Leu Gly Leu Glu Tyr Gly Tyr Gly Asp
1 5 10

[0010]

<210> 54
<211> 7
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 54

Arg Arg Arg Asp Phe Asp Tyr
1 5

<210> 55
<211> 21
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 55

Val Thr Gly Glu Ile Thr Tyr Asn Ser Gly Ser Tyr Tyr Tyr Thr Leu
1 5 10 15

Asn Leu Phe Asp Tyr
20

<210> 56
<211> 14
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 56

Glu Gly Gly Ser Gly Arg Tyr Trp Thr Asn Glu Tyr Asp Tyr
1 5 10

<210> 57
<211> 10
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 57

Ser Ser Asp Tyr Glu Gly Ser Phe Ala Ser
1 5 10

<210> 58
<211> 10
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 58

Ser Ser Asp Tyr Glu Gly Leu Phe Val Ser
1 5 10

<210> 59
<211> 13
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 59

Asp Ala Gly Tyr Ser Asn His Val Glu Ile Phe Asp Ser
1 5 10

<210> 60
<211> 11
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 60

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 61
<211> 11
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 61

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Ile Val Ala Ser
1 5 10

<210> 62
<211> 22
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 62

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys
20

<210> 63
<211> 22
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 63

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys
20

[0011]

<210> 64
<211> 22
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 64

Gln Ala Val Val Thr His Pro Pro Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Arg Leu Thr Cys
20

<210> 65
<211> 22
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 65

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

Thr Leu Thr Ile Ser Cys
20

<210> 66
<211> 22
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 66

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ser Ala Val Ser Val Ser Leu Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys
20

<210> 67
<211> 22
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 67

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Arg Leu Thr Cys
20

<210> 68
<211> 22
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 68

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ser Ala Leu Ser Val Thr Leu Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Lys Ile Thr Cys
20

<210> 69
<211> 22
<212> PRT
<213> 大羊驼

[0012]

<400> 69

Gln Ser Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Arg Leu Thr Cys
20

<210> 70
<211> 22
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 70

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Arg Leu Thr Cys
20

<210> 71
<211> 22
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 71

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys
20

<210> 72

<211> 22
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 72

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ser Thr Val Ser Val Ser Leu Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys
20

<210> 73
<211> 22
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 73

Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Ser Ala Val Ser Val Ser Leu Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys
20

<210> 74
<211> 22
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 74

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro Ser Ala Val Ser Val Ser Leu Gly Gln
1 5 10 15

[0013]

Thr Ala Arg Ile Thr Cys
20

<210> 75
<211> 22
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 75

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Val Ser Leu Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Lys Ile Thr Cys
20

<210> 76
<211> 22
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 76

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Val Ser Leu Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Asn Ile Thr Cys
20

<210> 77
<211> 14
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 77

[0014]

Gly Leu Ser Ser Gly Ser Val Thr Thr Thr Asn Tyr Pro Gly
1 5 10

<210> 78
<211> 14
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 78

Gly Leu Ser Ser Gly Ser Val Thr Ser Ser His Tyr Pro Gly
1 5 10

<210> 79
<211> 14
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 79

Gly Leu Ser Ser Gly Ser Val Thr Ser Ser Asn Tyr Pro Gly
1 5 10

<210> 80
<211> 14
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 80

Gly Leu Thr Ser Gly Ser Val Thr Ser Ser Asn Tyr Pro Asp
1 5 10

<210> 81
<211> 14
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 81

Thr Leu Ile Ser Gly Asp Asn Ile Gly Gly Tyr Asp Ile Ser
1 5 10

<210> 82
<211> 14
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 82

Ala Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Tyr Gly Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 83
<211> 11
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 83

Gln Gly Gly Asn Ala Arg Phe Ser Ser Phe Ala
1 5 10

<210> 84
<211> 14
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 84

Thr Leu Ser Ser Gly Asn Ser Val Gly Asn Tyr Asp Ile Ser
1 5 10

<210> 85
<211> 11
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 85

Gln Gly Gly Arg Leu Gly Ser Ser Tyr Ala His
1 5 10

<210> 86
<211> 14
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 86

Thr Leu Asn Ser Ala Asn Ser Val Gly Ser Tyr Asp Ile Ser
1 5 10

<210> 87
<211> 14
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 87

Gly Leu Lys Ser Gly Ser Val Thr Ser Thr Asn Phe Pro Thr
1 5 10

<210> 88
<211> 14
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 88

[0015] Gly Leu Thr Ser Gly Ser Val Thr Ser Asp Asn Phe Pro Val
1 5 10

<210> 89
<211> 11
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 89

Arg Gly Asp Ser Leu Glu Arg Tyr Gly Thr Asn
1 5 10

<210> 90
<211> 11
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 90

Arg Gly Asp Thr Leu Arg Asn Tyr His Ala Asn
1 5 10

<210> 91
<211> 7
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 91

Gln Gly Gly Tyr Tyr Thr His
1 5

<210> 92
<211> 11
<212> PRT
<213> 大羊驼

<00> 92

Gln Gly Gly Asn Leu Gly Leu Tyr Gly Ala Asn
1 5 10

<210> 93

<211> 11

<212> PRT

<213> 大羊驼

<00> 93

Gln Gly Gly Asn Leu Trp Leu Tyr Gly Ala Asn
1 5 10

<210> 94

<211> 14

<212> PRT

<213> 大羊驼

<00> 94

Gly Leu Ser Ser Gly Ser Ala Thr Ser Gly Asn Tyr Pro Glu
1 5 10

<210> 95

<211> 14

<212> PRT

<213> 大羊驼

<00> 95

Gly Leu Ser Ser Gly Ser Val Thr Ser Ser Asn Tyr Pro Asp
1 5 10

[0016]

<210> 96

<211> 15

<212> PRT

<213> 大羊驼

<00> 96

Trp Phe Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Thr Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 97

<211> 15

<212> PRT

<213> 大羊驼

<00> 97

Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Phe
1 5 10 15

<210> 98

<211> 15

<212> PRT

<213> 大羊驼

<00> 98

Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Val Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 99

<211> 15

<212> PRT

<213> 大羊驼

<00> 99

Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr

[0017]

1	5	10	15
<210> 100			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 大羊驼			
<400> 100			
Trp Tyr Gln Gln Lys Thr Gly Ser Pro Pro Arg Tyr Leu Leu Tyr			
1	5	10	15
<210> 101			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 大羊驼			
<400> 101			
Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr			
1	5	10	15
<210> 102			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 大羊驼			
<400> 102			
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Gln Val Ile Tyr			
1	5	10	15
<210> 103			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 大羊驼			
<400> 103			
Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Ser Pro Pro Arg Tyr Leu Leu Tyr			
1	5	10	15
<210> 104			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 大羊驼			
<400> 104			
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr			
1	5	10	15
<210> 105			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 大羊驼			
<400> 105			
Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr			
1	5	10	15
<210> 106			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 大羊驼			
<400> 106			
Trp Tyr Gln Gln Asn Pro Gly Arg Ala Pro Ile Leu Leu Ile Tyr			
1	5	10	15
<210> 107			

<211> 15
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 107

Trp Tyr Gln Gln Asn Pro Gly Arg Ala Pro Ile Leu Leu Phe Tyr
1 5 10 15

<210> 108
<211> 15
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 108

Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Ile Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 109
<211> 7
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 109

Ser Thr Ser Ser Arg His Ser
1 5

<210> 110
<211> 7
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 110

[0018]

Asn Thr Asn Ser Arg His Ser
1 5

<210> 111
<211> 7
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 111

Asn Thr Asn Asn Arg His Ser
1 5

<210> 112
<211> 11
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 112

Tyr Tyr Ser Asp Ser Tyr Lys His Gln Ser Ser
1 5 10

<210> 113
<211> 7
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 113

Arg Val Ser Thr Arg Ala Ser
1 5

<210> 114
<211> 7
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 114

Tyr Asn Thr Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 115

<211> 11

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 115

Tyr Tyr Ser Asp Ser Tyr Lys Asn Gln Gly Ser
1 5 10

<210> 116

<211> 7

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 116

Gly Asn Asn Tyr Arg Pro Ser
1 5

<210> 117

<211> 11

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 117

Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys His Gln Gly Ser
1 5 10

[0019]

<210> 118

<211> 11

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 118

Tyr Tyr Ser Asp Ser Leu Ser His Gln Gly Ser
1 5 10

<210> 119

<211> 7

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 119

Asn Thr Asn Thr Arg His Ser
1 5

<210> 120

<211> 7

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 120

Thr Ile Asn Ser Arg His Ser
1 5

<210> 121

<211> 7

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 121

Asp Asp Asp Ser Arg Pro Ser
1 5

[0020]

<210> 122
<211> 7
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 122

Gly Asp Asp Ile Arg Pro Ser
1 5

<210> 123
<211> 7
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 123

Ile Asn Asn Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 124
<211> 7
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 124

Val Asn Asn Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 125
<211> 7
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 125

Gly Asp Asn Tyr Arg Pro Leu
1 5

<210> 126
<211> 7
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 126

Gly Asp Asn Gln Arg Pro Leu
1 5

<210> 127
<211> 7
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 127

Gly Asp Asn Tyr Met Pro Leu
1 5

<210> 128
<211> 7
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 128

Asn Thr Ala Ser Arg His Ser
1 5

<210> 129
<211> 32

<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 129

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Ile Ser Gly Asn Lys Ala Ala
1 5 10 15

Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 130
<211> 32
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 130

Gly Val Pro Ser Arg Tyr Ser Gly Ser Ile Ser Gly Asn Lys Ala Ala
1 5 10 15

Leu Thr Ile Thr Gly Ala Glu Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 131
<211> 32
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 131

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Ile Ser Gly Asn Lys Ala Ala
1 5 10 15

[0021]

Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 132
<211> 34
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 132

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala
1 5 10 15

Gly Leu Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 133
<211> 32
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 133

Gly Met Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 134
<211> 32
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 134

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Gly Ala Ala Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 135

<211> 34

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 135

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Pro Ser Ala Asn Ala
1 5 10 15

Gly Leu Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 136

<211> 32

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 136

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asp Thr Ala Thr
1 5 10 15

[0022]

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

<210> 137

<211> 34

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 137

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Ser Asp Ala Ser Ala Asn Ala
1 5 10 15

Gly Leu Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 138

<211> 34

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 138

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Thr Asp Ala Ser Ala Asn Ala
1 5 10 15

Gly Leu Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 139
<211> 32
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 139

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Ile Ser Glu Asn Lys Ala Ala
1 5 10 15

Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Phe Cys
20 25 30

<210> 140
<211> 32
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 140

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Ile Thr Gly Asn Lys Ala Ile
1 5 10 15

Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 141
<211> 32
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 141

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Thr Ala Ala
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 142
<211> 32
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 142

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Arg Leu Gly Gly Thr Ala Thr
1 5 10 15

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

<210> 143
<211> 32
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 143

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Ile Ser Gly Asn Thr Ala Thr
1 5 10 15

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

<210> 144
<211> 32
<212> PRT
<213> 大羊驼

[0023]

<400> 144

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Ala Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 145

<211> 32

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 145

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ser Gly Gly Thr Ala Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Asp Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ser Asp Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 146

<211> 32

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 146

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ser Gly Gly Thr Ala Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Asp Gly Ala Gln Ala Glu Asn Glu Ser Asp Tyr Tyr Cys
20 25 30

[0024]

<210> 147

<211> 32

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 147

Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser Ile Ser Gly Asn Lys Ala Ala
1 5 10 15

Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 148

<211> 11

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 148

Ala Leu Glu Glu Ile Gly Ser Tyr Thr Tyr Met
1 5 10

<210> 149

<211> 11

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 149

Ala Leu Leu Asn Ile Asp Asp Gly Ser Thr Met
1 5 10

<210> 150

<211> 10

<212> PRT

colf-seql.txt

<213> 大羊驼

<400> 150

Asn Leu His Leu Gly Ser Tyr Thr Pro Met
1 5 10

<210> 151

<211> 12

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 151

Ala Leu Tyr Trp Gly Tyr Gly Thr Asn Val Asp Val
1 5 10

<210> 152

<211> 11

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 152

Asn Leu Tyr Met Gly Ser Gly Gly Ser Lys Val
1 5 10

<210> 153

<211> 12

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 153

Ser Ala Tyr Lys Ser Gly Ser Tyr Lys Ala Pro Val
1 5 10

[0025]

<210> 154

<211> 10

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 154

Ala Ser Tyr Thr Thr Asn Asn Lys Pro Val
1 5 10

<210> 155

<211> 9

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 155

Gln Ser Tyr Glu Ser Gly Asn Tyr Val
1 5

<210> 156

<211> 11

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 156

Ser Val Ser Asn Ser Gly Thr Tyr Lys Pro Val
1 5 10

<210> 157

<211> 10

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 157

```
                                eof-seq1.txt
Gln Ser Gly Ser Ser Asn Thr Asn Val Met
1          5          10

<210> 158
<211> 9
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 158

Ser Ala Tyr Lys Ser Gly Ser His Val
1          5

<210> 159
<211> 9
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 159

Ser Ala Tyr Asn Arg Gly Ser His Val
1          5

<210> 160
<211> 10
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 160

Ala Leu Phe Ile Ser Asn Pro Ser Val Glu
1          5          10

[0026] <210> 161
        <211> 10
        <212> PRT
        <213> 大羊驼

        <400> 161

Ala Leu Tyr Leu Glu Asn Phe Ala Asn Glu
1          5          10

<210> 162
<211> 10
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 162

Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Asn Ala Val
1          5          10

<210> 163
<211> 11
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 163

Gln Ser Ser Asp Ser Ser Gly Tyr Arg Val Val
1          5          10

<210> 164
<211> 10
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 164

Gln Ser Gly Ser Ser Ser Thr Ile Pro Val
1          5          10
```

eolf-seql.txt

<210> 165
<211> 10
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 165

Gln Ser Ala Asp Tyr Ser Gly Asn Ser Val
1 5 10

<210> 165
<211> 10
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 165

Gln Ser Ala Asp Tyr Ser Gly Asn Ser Val
1 5 10

<210> 167
<211> 10
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 167

Gln Ser Ser Asp Tyr Pro Gly Asn Ser Val
1 5 10

<210> 168
<211> 12
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 168

[0027]

Leu Leu Tyr Met Gly Gly Ser Asp Phe Asn Phe Val
1 5 10

<210> 169
<211> 11
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 169

Phe Gly Gly Gly Thr His Leu Thr Val Leu Gly
1 5 10

<210> 170
<211> 11
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 170

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
1 5 10

<210> 171
<211> 11
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 171

Phe Gly Gly Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu Gly
1 5 10

<210> 172
<211> 11
<212> PRT
<213> 大羊驼

eolf-seql.txt

<400> 172

Phe Gly Gly Gly Ser Lys Leu Thr Val Leu Gly
1 5 10

<210> 173

<211> 11

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 173

Phe Gly Gly Gly Thr His Leu Thr Val Leu Ser
1 5 10

<210> 174

<211> 11

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 174

Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Ser
1 5 10

<210> 175

<211> 11

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 175

Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Gly
1 5 10

[0028]

<210> 176

<211> 11

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 176

Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Thr Val Leu Gly
1 5 10

<210> 177

<211> 115

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 177

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Ser Thr Ile Ser Thr Asp Asn Ser Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

eolf-seql.txt

Ile Arg Gly Ser Asp Tyr Glu His Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 178
<211> 122
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 178

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Tyr
20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Asp Ile Asn Asn Glu Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

[0029]

Val Arg Asp Ala Gly Tyr Ser Asn His Val Pro Ile Phe Asp Ser Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Ile Val Ala Ser
115 120

<210> 179
<211> 122
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 179

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Tyr
20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Asp Ile Asn Asn Glu Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Asp Ala Gly Tyr Ser Asn His Val Pro Ile Phe Asp Ser Trp
100 105 110

eolf-seql.txt

Gly Gln Gly Thr Gln Val Ile Val Ala Ser
115 120

<210> 180
<211> 128
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 180

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

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

Ser Ser Ile Tyr Met Tyr Asp Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Asp Ile Asn Arg Ser Tyr Gly Ser Ser Trp Ser His Phe Gly
100 105 110

[0030]

Pro Ile Phe Ser Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 181
<211> 119
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 181

Glu Val Gln Val Gln Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Ala Ile Ser Trp Ser Gly Gly Glu Thr Phe Tyr Ala Glu Ser Met
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Met Gly Leu Ala Glu Gly Leu Thr Asp Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

eolf-seql.txt

115

<210> 182
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 大羊驼

<400> 182

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Asn Pro
 20 25 30

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

Ser Gln Ile Thr Asn Tyr Gly Tyr Asn Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Ala Ser Leu Gly Leu Glu Tyr Gly Tyr Gly Asp Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

[0031]

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 183
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 大羊驼

<400> 183

Glu Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Ala Glu Leu Arg Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Ile Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Ala Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Val Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ser Arg Arg Arg Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

colf-seql.txt

<210> 184
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> 大羊驼

<400> 184

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

Thr Leu Ser Leu Ala Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Thr Ser
 20 25 30

Tyr Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Met Gly Ala Ile Gly Ser Arg Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Pro Ser
 50 55 60

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

Thr Leu Gln Leu Ser Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Val Thr Gly Glu Ile Thr Tyr Asn Ser Gly Ser Tyr Tyr
 100 105 110

Tyr Thr Leu Asn Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
 115 120 125

[0032]

Val Ser Ser
 130

<210> 185
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 大羊驼

<400> 185

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Ser Asp Ile Asn Ser Gly Gly Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Lys Glu Gly Gly Ser Gly Arg Tyr Trp Thr Asn Glu Tyr Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

eolf-seql.txt

<210> 186
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 大羊驼

<400> 186

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Met Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ser
 20 25 30

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

Ser Ser Ile Tyr Ser Asp Ser Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Thr Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Gly Ser Ser Asp Tyr Glu Gly Ser Phe Ala Ser Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

[0033]

<210> 187
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 大羊驼

<400> 187

Gln Leu Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Met Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser
 20 25 30

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

Ser Ser Ile Tyr Ser His Ser Met Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Thr Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ala Ser Ser Asp Tyr Glu Gly Leu Phe Val Ser Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 188
 <211> 122

eolf seq1.txt

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 188

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ala Tyr
20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ser Asp Ile Asn Asn Glu Gly Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Asp Ala Gly Tyr Ser Asn His Val Gln Ile Phe Asp Ser Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Ile Val Ala Ser
115 120

<210> 189

<211> 112

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 189

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Leu Ser Ser Gly Ser Val Thr Thr Thr
20 25 30

Asn Tyr Pro Gly Trp Phe Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Thr
35 40 45

Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Ser Arg His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Ile Ser Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Glu Glu Ile Gly
85 90 95

Ser Tyr Thr Tyr Met Phe Gly Gly Gly Thr His Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 190

<211> 112

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 190

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

[0034]

eolf-seql.txt

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Leu Ser Ser Gly Ser Val Thr Ser Ser
20 25 30

His Tyr Pro Gly Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
35 40 45

Leu Ile Phe Asn Thr Asn Ser Arg His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Ile Ser Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Gln Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Leu Asn Ile Asp
85 90 95

Asp Gly Ser Thr Met Phe Gly Gly Gly Thr His Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 191
<211> 111
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 191

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Leu Ser Ser Gly Ser Val Thr Ser Ser
20 25 30

Asn Tyr Pro Gly Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Val
35 40 45

Leu Ile Tyr Asn Thr Asn Asn Arg His Ser Gly Val Pro Ser Arg Tyr
50 55 60

Ser Gly Ser Ile Ser Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Glu Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Leu His Leu Gly Ser
85 90 95

Tyr Thr Pro Met Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 192
<211> 113
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 192

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Leu Thr Ser Gly Ser Val Thr Ser Ser
20 25 30

Asn Tyr Pro Asp Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Asn Thr Asn Ser Arg His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe

[0035]

```

                                eolf-seql.txt
      50                        55                        60

Ser Gly Ser Ile Ser Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65                        70                        75                        80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Tyr Trp Gly Tyr
                        85                        90                        95

Gly Thr Asn Val Asp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100                        105                        110

Gly

<210> 193
<211> 112
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 193

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Leu Thr Ser Gly Ser Val Thr Ser Ser
20                        25                        30

Asn Tyr Pro Asp Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
35                        40                        45

[0036] Leu Ile Tyr Asn Thr Asn Ser Arg His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50                        55                        60

Ser Gly Ser Ile Ser Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65                        70                        75                        80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Leu Tyr Met Gly Ser
85                        90                        95

Gly Gly Ser Lys Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100                        105                        110

<210> 194
<211> 119
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 194

Gln Ala Val Val Thr His Pro Pro Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ser
1                        5                        10                        15

Ser Val Arg Leu Thr Cys Thr Leu Ile Ser Gly Asp Asn Ile Gly Gly
20                        25                        30

Tyr Asp Ile Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Thr Gly Ser Pro Pro Arg Tyr
35                        40                        45

Leu Leu Tyr Tyr Tyr Ser Asp Ser Tyr Lys His Gln Ser Ser Gly Val
50                        55                        60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Leu
65                        70                        75                        80

```

```

                                eof-seq1.txt
Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
      85                      90                      95

Ser Ala Tyr Lys Ser Gly Ser Tyr Lys Ala Pro Val Phe Gly Gly Gly
      100                    105                    110

Thr His Leu Thr Val Leu Gly
      115

<210> 195
<211> 111
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 195

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

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

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

Leu Ile Tyr Arg Val Ser Thr Arg Ala Ser Gly Met Pro Asp Arg Phe
      50                    55                      60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
      65                    70                      75                      80

[0037] Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Tyr Thr Thr Asn
      85                      90                      95

Asn Lys Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr His Leu Thr Val Leu Gly
      100                    105                    110

<210> 196
<211> 107
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 196

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ser Ala Val Ser Val Ser Leu Gly Gln
1      5                      10                      15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gln Gly Gly Asn Ala Arg Phe Ser Ser Phe
      20                    25                      30

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Gln Val Ile Tyr
      35                    40                      45

Tyr Asn Thr Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
      50                    55                      60

Ser Ser Gly Gly Ala Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Ala Glu
      65                    70                      75                      80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Glu Ser Gly Asn Tyr Val
      85                      90                      95

Phe Gly Gly Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu Gly
      100                    105

```

eolf-seql.txt

<210> 197
<211> 118
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 197

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Arg Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gly Asn Ser Val Gly Asn
20 25 30

Tyr Asp Ile Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Ser Pro Pro Arg Tyr
35 40 45

Leu Leu Tyr Tyr Tyr Ser Asp Ser Tyr Lys Asn Gln Gly Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Pro Ser Ala Asn Ala Gly Leu
65 70 75 80

Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Val Ser Asn Ser Gly Thr Tyr Lys Pro Val Phe Gly Gly Gly Ser
100 105 110

Lys Leu Thr Val Leu Gly
115

[0038]

<210> 198
<211> 108
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 198

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ser Ala Leu Ser Val Thr Leu Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Lys Ile Thr Cys Gln Gly Gly Arg Leu Gly Ser Ser Tyr Ala
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gly Asn Asn Tyr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Ser Gly Ser Ser Asn Thr Asn Val
85 90 95

Met Phe Gly Gly Gly Thr His Leu Thr Val Leu Ser
100 105

<210> 199
<211> 115
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 199

eolf-seql.txt

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

<210> 200
<211> 116
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 200

[0039]

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

<210> 201
<211> 111
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 201

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

colf-seql.txt

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Leu Lys Ser Gly Ser Val Thr Ser Thr
20 25 30

Asn Phe Pro Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Asn Thr Asn Thr Arg His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Ile Ser Glu Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Phe Cys Ala Leu Phe Ile Ser Asn
85 90 95

Pro Ser Val Glu Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Ser
100 105 110

<210> 202
<211> 111
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 202

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Leu Thr Ser Gly Ser Val Thr Ser Asp
20 25 30

[0040]

Asn Phe Pro Val Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Thr Ile Asn Ser Arg His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Ile Thr Gly Asn Lys Ala Ile Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Glu Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Tyr Leu Glu Asn
85 90 95

Phe Ala Asn Glu Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 203
<211> 108
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 203

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ser Thr Val Ser Val Ser Leu Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Arg Gly Asp Ser Leu Glu Arg Tyr Gly Thr
20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Asp Asp Asp Ser Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

	eolf-seql.txt																			
	50				55															60
	Ser	Ser	Gly	Ala	Thr	Ala	Ala	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Ala	Gln	Ala	Glu				
	65				70					75						80				
	Asp	Glu	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ser	Ala	Asp	Ser	Ser	Gly	Asn	Ala				
					85					90					95					
	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	His	Leu	Thr	Val	Leu	Gly								
					100					105										
<210>	204																			
<211>	109																			
<212>	PRT																			
<213>	大羊驼																			
<400>	204																			
	Gln	Ser	Ala	Leu	Thr	Gln	Pro	Ser	Ala	Val	Ser	Val	Ser	Leu	Gly	Gln				
	1				5					10					15					
	Thr	Ala	Arg	Ile	Thr	Cys	Arg	Gly	Asp	Thr	Leu	Arg	Asn	Tyr	His	Ala				
					20				25					30						
	Asn	Trp	Tyr	Arg	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Leu	Val	Ile	Tyr				
			35					40					45							
	Gly	Asp	Asp	Ile	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser				
		50					55				60									
[0041]	Arg	Leu	Gly	Gly	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Gly	Ala	Gln	Ala	Glu				
	65				70					75						80				
	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ser	Ser	Asp	Ser	Ser	Gly	Tyr	Arg				
					85					90					95					
	Val	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly							
					100					105										
<210>	205																			
<211>	104																			
<212>	PRT																			
<213>	大羊驼																			
<400>	205																			
	Gln	Pro	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Ser	Ala	Val	Ser	Val	Ser	Leu	Gly	Gln				
	1				5					10					15					
	Thr	Ala	Arg	Ile	Thr	Cys	Gln	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Thr	His	Trp	Tyr	Gln				
					20				25					30						
	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Leu	Val	Ile	Tyr	Ile	Asn	Asn	Asn				
			35					40					45							
	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Ile	Ser	Gly	Asn				
		50					55				60									
	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Ala	Gln	Val	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp				
	65				70					75						80				
	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Thr	Ile	Pro	Val	Phe	Gly	Gly				
					85					90					95					

eolf-seql.txt

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100

<210> 206
<211> 104
<212> PRT
<213> 大羊驼

<=00> 206

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro Ser Ala Val Ser Val Ser Leu Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gln Gly Gly Tyr Tyr Thr His Trp Tyr Gln
20 25 30

Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Val Asn Asn Asn
35 40 45

Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn
50 55 60

Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Ala
65 70 75 80

Tyr Tyr Cys Gln Ser Gly Ser Ser Ser Thr Ile Pro Val Phe Gly Gly
85 90 95

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100

[0042]

<210> 207
<211> 108
<212> PRT
<213> 大羊驼

<=00> 207

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Val Ser Leu Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Lys Ile Thr Cys Gln Gly Gly Asn Leu Gly Leu Tyr Gly Ala
20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Asn Pro Gly Arg Ala Pro Ile Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Gly Asp Asn Tyr Arg Pro Leu Gly Ile Pro Glu Arg Phe Thr Ile Ser
50 55 60

Lys Ser Gly Gly Thr Ala Thr Leu Thr Ile Asp Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ser Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Tyr Ser Gly Asn Ser
85 90 95

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105

<210> 208
<211> 108
<212> PRT
<213> 大羊驼

<=00> 208

eolf-seql.txt

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Val Ser Leu Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Lys Ile Thr Cys Gln Gly Gly Asn Leu Trp Leu Tyr Gly Ala
20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Asn Pro Gly Arg Ala Pro Ile Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Gly Asp Asn Gln Arg Pro Leu Gly Ile Pro Glu Arg Phe Thr Ile Ser
50 55 60

Lys Ser Gly Gly Thr Ala Thr Leu Thr Ile Asp Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ser Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Tyr Ser Gly Asn Ser
85 90 95

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105

<210> 209
<211> 108
<212> PRT
<213> 太羊驼
<400> 209

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Val Ser Leu Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Asn Ile Thr Cys Gln Gly Gly Asn Leu Gly Leu Tyr Gly Ala
20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Asn Pro Gly Arg Ala Pro Ile Leu Leu Phe Tyr
35 40 45

Gly Asp Asn Tyr Met Pro Leu Gly Ile Pro Glu Arg Phe Thr Ile Ser
50 55 60

Lys Ser Gly Gly Thr Ala Thr Leu Thr Ile Asp Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asn Glu Ser Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ser Asp Tyr Pro Gly Asn Ser
85 90 95

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105

<210> 210
<211> 113
<212> PRT
<213> 太羊驼
<400> 210

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Leu Ser Ser Gly Ser Ala Thr Ser Gly
20 25 30

Asn Tyr Pro Glu Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
35 40 45

eolf-seqL.txt

Ile Ile Tyr Asn Thr Ala Ser Arg His Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Ile Ser Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Leu Tyr Met Gly Gly
85 90 95

Ser Asp Phe Asn Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

Gly

<210> 211
<211> 113
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 211

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Leu Ser Ser Gly Ser Val Thr Ser Ser
20 25 30

Asn Tyr Pro Asp Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
35 40 45

[0044]

Leu Ile Tyr Asn Thr Asn Ser Arg His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Ile Ser Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Tyr Met Gly Ser
85 90 95

Gly Ser Asn Asn Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Thr Val Leu
100 105 110

Gly

<210> 212
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

<400> 212

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Tyr
20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

eolf-seql.txt

Ser Asp Ile Asn Asn Glu Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Val Arg Asp Ala Gly Tyr Ser Asn His Val Pro Ile Phe Asp Ser Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Ile Val Ser Ser
115 120

<210> 213

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 种系化抗体序列

<400> 213

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Tyr
20 25 30

[0045]

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Asp Ile Asn Asn Glu Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Val Arg Asp Ala Gly Tyr Ser Asn His Val Pro Ile Phe Asp Ser Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ala Ser
115 120

<210> 214

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 种系化抗体序列

<400> 214

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Tyr
20 25 30

colf-seql.txt

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Asp Ile Asn Asn Glu Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Asp Ala Gly Tyr Ser Asn His Val Pro Ile Phe Asp Ser Trp
100 105 110

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

<210> 215
<211> 122
<212> PRT
<213> 人L

<220>
<223> 种系化抗体序列

<400> 215

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Tyr
20 25 30

[0046]

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Asp Ile Asn Asn Glu Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Val Arg Asp Ala Gly Tyr Ser Asn His Val Pro Ile Phe Asp Ser Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Ile Val Ser Ser
115 120

<210> 216
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

<400> 216

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Tyr

	eolf-seql.txt	
	20	25
	30	
	Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
	35	40
	45	
	Ser Asp Ile Asn Asn Glu Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
	50	55
	60	
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Thr	
	65	70
	75	80
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
	85	90
	95	
	Ala Arg Asp Ala Gly Tyr Ser Asn His Val Pro Ile Phe Asp Ser Trp	
	100	105
	110	
	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
	115	120
<210>	217	
<211>	122	
<212>	PRT	
<213>	人工	
<220>		
<223>	种系化抗体序列	
<400>	217	
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
	1	5
	10	15
[0047]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Tyr	
	20	25
	30	
	Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
	35	40
	45	
	Ser Asp Ile Asn Asn Glu Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
	50	55
	60	
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Thr	
	65	70
	75	80
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
	85	90
	95	
	Ala Arg Asp Ala Gly Tyr Ser Asn His Val Pro Ile Phe Asp Ser Trp	
	100	105
	110	
	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
	115	120
<210>	218	
<211>	122	
<212>	PRT	
<213>	人工	
<220>		
<223>	种系化抗体序列	
<400>	218	
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
	1	5
	10	15

eolf-seql.txt

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ser Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Tyr
20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Asp Ile Asn Asn Glu Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Asp Ala Gly Tyr Ser Asn His Val Pro Ile Phe Asp Ser Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ala Ser
115 120

<210> 219

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 种系化抗体序列

<400> 219

[0048]

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Tyr
20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Gln Trp Val
35 40 45

Ser Asp Ile Asn Asn Glu Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Asp Ala Gly Tyr Ser Asn His Val Pro Ile Phe Asp Ser Trp
100 105 110

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

<210> 220

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 种系化抗体序列

<400> 220

eolf-seql.txt

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Asp Ile Asn Asn Glu Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Asp Ala Gly Tyr Ser Asn His Val Pro Ile Phe Asp Ser Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ala Ser
115 120

<210> 221

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工

<220>

[0049]

<223> 种系化抗体序列

<400> 221

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Tyr
20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Asp Ile Asn Asn Glu Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Asp Ala Gly Tyr Ser Asn His Val Pro Ile Phe Asp Ser Trp
100 105 110

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

<210> 222

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工

<220>

eolf-seql.txt

<223> 种系化抗体序列

<400> 222

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

Ser Val Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Tyr
20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Asp Ile Asn Asn Glu Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Ala Gly Tyr Ser Asn His Val Pro Ile Phe Asp Ser Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ala Ser
115 120

<210> 223

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工

[0050]

<220>

<223> 种系化抗体序列

<400> 223

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Tyr
20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Asp Ile Asn Asn Glu Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Ala Gly Tyr Ser Asn His Val Pro Ile Phe Asp Ser Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 224

<211> 122

<212> PRT

eolf-seql.txt

<213> 人工

<220>

<223> 种系化抗体序列

<400> 224

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Tyr
20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Asp Ile Asn Asn Glu Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Ala Gly Tyr Ser Asn His Val Pro Ile Phe Asp Ser Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ala Ser
115 120

[0051]

<210> 225

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 种系化抗体序列

<400> 225

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Tyr
20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Asp Ile Asn Asn Glu Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Ala Gly Tyr Ser Asn His Val Pro Ile Phe Asp Ser Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

eolf-seql.txt

<210> 226
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

<400> 226

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

[0052]

<210> 227
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

<400> 227

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

eolf-seql.txt

115

120

<210> 228
<211> 122
<212> PRT
<213> 人丁

<220>
<223> 种系化抗体序列

<400> 228

Glu Val Gln Leu Val Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Tyr
20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Asp Ile Asn Asn Glu Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Ala Gly Tyr Ser Asn His Val Pro Ile Phe Asp Ser Trp
100 105 110

[0053]

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

<210> 229
<211> 122
<212> PRT
<213> 人丁

<220>
<223> 种系化抗体序列

<400> 229

Glu Val Gln Leu Val Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Tyr
20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Asp Ile Asn Asn Glu Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Ala Gly Tyr Ser Asn His Val Pro Ile Phe Asp Ser Trp
100 105 110

eolf-seqL.txt

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

<210> 230
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

<400> 230

Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Asn Phe Pro Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Asn Thr Asn Thr Arg His Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ser Asp Tyr Phe Cys Ala Leu Phe Ile Ser Asn
85 90 95

[0054]

Pro Ser Val Glu Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 231
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

<400> 231

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Asn Phe Pro Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Asn Thr Asn Thr Arg His Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ser Asp Tyr Phe Cys Ala Leu Phe Ile Ser Asn
85 90 95

Pro Ser Val Glu Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

eolf-seql.txt

<210> 232
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

<400> 232

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Leu Lys Ser Gly Ser Val Thr Ser Thr
20 25 30

Asn Phe Pro Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Asn Thr Asn Ser Arg His Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ser Asp Tyr Phe Cys Ala Leu Phe Ile Ser Asn
85 90 95

Pro Ser Val Glu Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

[0055]

<210> 233
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

<400> 233

Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Leu Thr Ser Gly Ser Val Thr Ser Thr
20 25 30

Asn Phe Pro Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Asn Thr Asn Ser Arg His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ser Asp Tyr Phe Cys Ala Leu Phe Ile Ser Asn
85 90 95

Pro Ser Val Glu Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 234
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工

* * *

eolf-seql.txt

<220>

<223> 种系化抗体序列

<400> 234

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Asn Phe Pro Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Asn Thr Asn Ser Arg His Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Arg Gly Ala
65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Phe Ile Ser Asn
85 90 95

Pro Ser Val Glu Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 235

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工

[0056]

<220>

<223> 种系化抗体序列

<400> 235

Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Asn Phe Pro Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Asn Thr Asn Ser Arg His Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Arg Gly Ala
65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Phe Ile Ser Asn
85 90 95

Pro Ser Val Glu Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 236

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 种系化抗体序列

<400> 236

eofl seq1.txt

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

<210> 237

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 种系化抗体序列

<400> 237

[0057]

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

<210> 238

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 种系化抗体序列

<400> 238

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

eolf-seql.txt

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Val Thr Ser Gly Ser Val Thr Ser Asp
20 25 30

Asn Phe Pro Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Asn Thr Asn Thr Arg His Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ser Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Phe Ile Ser Asn
85 90 95

Pro Ser Val Glu Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 239
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

<400> 239

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Leu Thr Ser Gly Ser Val Thr Ser Thr
20 25 30

Asn Phe Pro Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Asn Thr Asn Thr Arg His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ala Glu Tyr Phe Cys Ala Leu Phe Ile Ser Asn
85 90 95

Pro Ser Val Glu Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 240
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

<400> 240

Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Asn Phe Pro Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu

[0058]

```

                                eof=seq1.txt
                                45
                                35          40
Leu Ile Tyr Asn Thr Asn Ser Arg His Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50          55          60

Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 65          70          75          80

Gln Ala Asp Asp Glu Ser Asp Tyr Phe Cys Ala Leu Phe Ile Ser Asn
          85          90          95

Pro Ser Val Glu Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly
          100          105          110

```

```

<210> 241
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

<400> 241

```

```

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

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

Asn Phe Pro Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
          35          40          45

```

[0059]

```

Leu Ile Tyr Asn Thr Asn Thr Arg His Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50          55          60

Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 65          70          75          80

Gln Ala Asp Asp Glu Ala Gln Tyr Phe Cys Ala Leu Phe Ile Ser Asn
          85          90          95

Pro Ser Val Glu Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly
          100          105          110

```

```

<210> 242
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

<400> 242

```

```

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly
 1          5          10          15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Leu Thr Ser Gly Ser Val Thr Ser Thr
          20          25          30

Asn Phe Pro Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
          35          40          45

```

```

Leu Ile Tyr Asn Thr Asn Ser Arg His Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50          55          60

```

eolf-seql.txt

Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ser Asp Tyr Phe Cys Ala Leu Phe Ile Ser Asn
85 90 95

Pro Ser Val Glu Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 243

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 种系化抗体序列

<400> 243

Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Leu Lys Ser Gly Ser Val Thr Ser Thr
20 25 30

Asn Phe Pro Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Asn Thr Asn Ser Arg His Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

[0060]

Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ala Leu Phe Ile Ser Asn
85 90 95

Pro Ser Val Glu Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 244

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 种系化抗体序列

<400> 244

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Asn Phe Pro Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Asn Thr Asn Thr Arg His Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

eolf-seql.txt

Gln Ala Asp Asp Glu Ala Glu Tyr Phe Cys Ala Leu Phe Ile Ser Asn
85 90 95

Pro Ser Val Glu Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 245

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 种系化抗体序列

<400> 245

Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Asn Phe Pro Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Asn Thr Asn Thr Arg His Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

[0061]

Gln Ala Asp Asp Glu Ala Glu Tyr Phe Cys Ala Leu Phe Ile Ser Asn
85 90 95

Pro Ser Val Glu Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 246

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 种系化抗体序列

<400> 246

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Asn Phe Pro Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Asn Thr Asn Thr Arg His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ser Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Phe Ile Ser Asn
85 90 95

Pro Ser Val Glu Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110 eolf-seql.txt

<210> 247
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

<400> 247

Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Asn Phe Pro Thr Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Asn Thr Asn Thr Arg His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ser Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Phe Ile Ser Asn
85 90 95

Pro Ser Val Glu Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

[0062]

<210> 248
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

<400> 248

Gly Tyr Tyr Met Asn
1 5

<210> 249
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

<400> 249

Asp Ile Asn Asn Glu Gly Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 250
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

eolf-seql.txt

<400> 250

Gly Leu Lys Ser Gly Ser Val Thr Ser Asp Asn Phe Pro Thr
1 5 10

<210> 251

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 种系化抗体序列

<400> 251

Gly Leu Thr Ser Gly Ser Val Thr Ser Thr Asn Phe Pro Thr
1 5 10

<210> 252

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 种系化抗体序列

<400> 252

Gly Leu Thr Ser Gly Ser Val Thr Ser Asp Asn Phe Pro Thr
1 5 10

<210> 253

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 种系化抗体序列

<400> 253

Gly Val Thr Ser Gly Ser Val Thr Ser Asp Asn Phe Pro Thr
1 5 10

<210> 254

<211> 30

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 254

Gln Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser
20 25 30

<210> 255

<211> 30

<212> PRT

<213> 大羊驼

<400> 255

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Leu Ser Phe Ser
20 25 30

<210> 256

<211> 5

[0063]

eolf-seql.txt

<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 256

His Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 257
<211> 5
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 257

Ile Ser Glu Met Thr
1 5

<210> 258
<211> 17
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 258

Gly Asp Asn Thr Tyr Asp Gly Gly Thr Arg Tyr Gln Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 259
<211> 19
<212> PRT
<213> 大羊驼

[0064]

<400> 259

Gly Ile Ser Gly Val Thr Gly Gly Ser Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 260
<211> 32
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 260

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

<210> 261
<211> 32
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 261

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Asp Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Ile Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr
20 25 30

<210> 262

eolf-seql.txt

<211> 14
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 262

Asp Thr Gly Arg Gly Ile Met Gly Glu Tyr Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 263
<211> 13
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 263

Thr Ser Gly Thr Tyr Tyr Phe Ile Pro Glu Tyr Glu Tyr
1 5 10

<210> 264
<211> 11
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 264

Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 265
<211> 22
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 265

[0065]

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys
20

<210> 266
<211> 22
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 266

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys
20

<210> 267
<211> 14
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 267

Gly Leu Lys Ser Gly Ser Val Thr Ser Ser Asn Tyr Pro Ala
1 5 10

<210> 268
<211> 14
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 268

Ala Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Ser

1 5 10 eolf-seql.txt

<210> 269
<211> 15
<212> PRT
<213> 大羊驼
<400> 269
Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Gly Met Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 270
<211> 7
<212> PRT
<213> 大羊驼
<400> 270
Asp Val Asn Lys Arg Ala Ser
1 5

<210> 271
<211> 12
<212> PRT
<213> 大羊驼
<400> 271
Ala Leu Tyr Met Gly Ser Gly Ser Ala Asn Ala Met
1 5 10

[0066] <210> 272
<211> 32
<212> PRT
<213> 大羊驼
<400> 272
Gly Ile Ala Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ala Gly Asn Thr Ala Ser
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 273
<211> 10
<212> PRT
<213> 大羊驼
<400> 273
Ala Ser Tyr Arg Ser Ser Ala Asn Ala Val
1 5 10

<210> 274
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 种系化抗体序列
<400> 274
Gln Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser His Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

eolf=seq1.txt
45

35 40

Ser Gly Asp Asn Thr Tyr Asp Gly Gly Thr Arg Tyr Gln Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Gln Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Thr Gly Arg Gly Ile Met Gly Glu Tyr Gly Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 275
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

<400> 275

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Leu Ser Phe Ser Ile Ser
20 25 30

Gln Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Gly Val Thr Gly Gly Ser Ser Thr Ser Tyr Ala Asp
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Thr Thr Ser Gly Thr Tyr Tyr Phe Ile Pro Glu Tyr Glu
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 276
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

<400> 276

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Leu Lys Ser Gly Ser Val Thr Ser Ser
20 25 30

eolf-seql.txt

Asn Tyr Pro Ala Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Asn Thr Asn Ser Arg His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Ile Ser Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Tyr Met Gly Ser
85 90 95

Gly Ser Ala Asn Ala Met Phe Gly Gly Gly Thr His Leu Thr Val Leu
100 105 110

Gly

<210> 277

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 种系化抗体序列

<400> 277

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

[0068]

Thr Val Thr Ile Ser Cys Ala Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Tyr Gly
20 25 30

Tyr Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Gly Met Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Asp Val Asn Lys Arg Ala Ser Gly Ile Ala Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ala Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Tyr Arg Ser Ser
85 90 95

Ala Asn Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr His Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 278

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 种系化抗体序列

<400> 278

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Val Arg
20 25 30

eolf-seql.txt

<210> 279
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

<400> 279

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Val Arg
20 25 30

<210> 280
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

<400> 280

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Thr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

[0069]

<210> 281
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

<400> 281

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg
20 25 30

<210> 282
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

<400> 282

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Thr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg
20 25 30

<210> 283
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

eolf-seql.txt

<400> 283

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg
20 25 30

<210> 284

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 种系化抗体序列

<400> 284

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 285

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 种系化抗体序列

<400> 285

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 286

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 种系化抗体序列

<400> 286

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 287

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 种系化抗体序列

<400> 287

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Ile Val Ser Ser
1 5 10

<210> 288

<211> 11

<212> PRT

[0070]

eolf-seql.txt

<213> 人工

<220>

<223> 种系化抗体序列

<400> 288

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ala	Ser
1			5						10	

<210> 289

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 种系化抗体序列

<400> 289

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1			5						10	

<210> 290

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 种系化抗体序列

<400> 290

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Ile	Val	Ser	Ser
1			5						10	

[0071]

<210> 291

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 种系化抗体序列

<400> 291

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ala	Ser
1			5						10	

<210> 292

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 种系化抗体序列

<400> 292

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1			5						10	

<210> 293

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 种系化抗体序列

<400> 293

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1			5						10	

eolf-seql.txt

<210> 294
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

<400> 294

Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys
20

<210> 295
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

<400> 295

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys
20

<210> 296
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

<400> 296

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys
20

<210> 297
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

<400> 297

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala
1 5 10 15

Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Asp Asp Glu Ser Asp Tyr Phe Cys
20 25 30

<210> 298
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

<400> 298

[0072]

eolf-seql.txt

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala
1 5 10 15

Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Asp Asp Glu Ser Asp Tyr Phe Cys
20 25 30

<210> 299
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

<400> 299

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala
1 5 10 15

Leu Thr Ile Arg Gly Ala Gln Ala Asp Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 300
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

<400> 300

[0073]

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala
1 5 10 15

Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ser Asp Tyr Phe Cys
20 25 30

<210> 301
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

<400> 301

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala
1 5 10 15

Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ser Asp Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 302
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

<400> 302

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala
1 5 10 15

Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Asp Asp Glu Ala Glu Tyr Phe Cys
20 25 30

eolf-seql.txt

<210> 303
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

<400> 303

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala
1 5 10 15

Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Asp Asp Glu Ala Glu Tyr Phe Cys
20 25 30

<210> 304
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

<400> 304

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala
1 5 10 15

Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys
20 25 30

<210> 305
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

<400> 305

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala
1 5 10 15

Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Asp Asp Glu Ser Asp Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 306
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X是任意氨基酸, 优选D, T, S或E

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X是任意氨基酸, 优选I

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X是任意氨基酸, 优选A, S, T或Y

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)

[0074]

eolf-seql.txt

<223> X是任意氨基酸, 优选N, M, S或T

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)...(5)

<223> X是任意氨基酸, 优选E, D, Y或H

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)...(6)

<223> X是任意氨基酸, 优选G, D, S或N

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)...(7)

<223> X是任意氨基酸, 优选G, Y, S, D或M

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8)...(8)

<223> X是任意氨基酸, 优选T, E, S, N, Y或R

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9)...(9)

<223> X是任意氨基酸, 优选T, A或R

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (17)...(17)

<223> X是任意氨基酸, 优选G或S

<400> 306

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1			5						10					15	

Xaa

[0075]

<210> 307

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 种系化抗体序列

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)...(1)

<223> X是任意氨基酸, 优选V, G或A

<400> 307

Xaa	Tyr	Tyr	Met	Asn
1			5	

<210> 308

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 种系化抗体序列

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)...(1)

<223> X是任意氨基酸, 优选D, T, S, N或G

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)...(2)

<223> X是任意氨基酸, 优选Y, S或P

eolf-seql.txt

<400> 308

Xaa Xaa Ala Met Ser
1 5

<210> 309

<211> 11
<212> PRT
<213> 人工

<220>

<223> 种系化抗体序列

<400> 309

Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly
1 5 10

<210> 310

<211> 7
<212> PRT
<213> 人工

<220>

<223> 种系化抗体序列

<220>

<221> MISC FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> X是任意氨基酸, 优选N或S

<220>

<221> MISC FEATURE

<222> (3) .. (3)

<223> X是任意氨基酸, 优选N, S或A

[0076]

<220>

<221> MISC FEATURE

<222> (4) .. (4)

<223> X是任意氨基酸, 优选S, N或T

<400> 310

Xaa Thr Xaa Xaa Arg His Ser
1 5

<210> 311

<211> 11
<212> PRT
<213> 人工

<220>

<223> 种系化抗体序列

<220>

<221> MISC FEATURE

<222> (6) .. (6)

<223> X是任意氨基酸, 优选Y, V或L

<220>

<221> MISC FEATURE

<222> (7) .. (7)

<223> X是任意氨基酸, 优选K或S

<220>

<221> MISC FEATURE

<222> (8) .. (8)

<223> X是任意氨基酸, 优选H或N

<220>

<221> MISC FEATURE

<222> (10) .. (10)

<223> X是任意氨基酸, 优选G或S

<400> 311

eolf-seql.txt

Tyr Tyr Ser Asp Ser Xaa Xaa Xaa Gln Xaa Ser
1 5 10

<210> 312
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X是任意氨基酸, 优选V, I或Y

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X是任意氨基酸, 优选N或T

<400> 312

Xaa Asn Xaa Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 313
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

[0077]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X是任意氨基酸, 优选Y

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X是任意氨基酸, 优选R或M

<400> 313

Gly Asp Asn Xaa Xaa Pro Leu
1 5

<210> 314
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X是任意氨基酸, 优选D或G

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X是任意氨基酸, 优选S或I

<400> 314

Xaa Asp Asp Xaa Arg Pro Ser
1 5

<210> 315
<211> 14

eolf-seql.txt

<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X是任意氨基酸, 优选S或T

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X是任意氨基酸, 优选V或A

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> X是任意氨基酸, 优选S或T

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X是任意氨基酸, 优选S, T或G

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> X是任意氨基酸, 优选N或H

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> X是任意氨基酸, 优选G, D或E

<400> 315

[0078] Gly Leu Xaa Ser Gly Ser Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Tyr Pro Xaa
1 5 10

<210> 316
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 种系化抗体序列

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X是任意氨基酸, 优选S, N或I

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X是任意氨基酸, 优选G或A

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X是任意氨基酸, 优选N或D

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X是任意氨基酸, 优选N或S

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X是任意氨基酸, 优选V或I

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X是任意氨基酸, 优选N或S

eolf-seqL.txt

<400> 316

Thr Leu Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Tyr Asp Ile Ser
1 5 10

<210> 317

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 种系化抗体序列

<220>

<221> MISC FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> X是任意氨基酸, 优选G或W

<400> 317

Gln Gly Gly Asn Leu Xaa Leu Tyr Gly Ala Asn
1 5 10

<210> 318

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 种系化抗体序列

<220>

<221> MISC FEATURE

<222> (4)..(4)

[0079] <223> X是任意氨基酸, 优选S或T

<220>

<221> MISC FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> X是任意氨基酸, 优选E或R

<220>

<221> MISC FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> X是任意氨基酸, 优选R或N

<220>

<221> MISC FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> X是任意氨基酸, 优选G或H

<220>

<221> MISC FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> X是任意氨基酸, 优选T或A

<400> 318

Arg Gly Asp Xaa Leu Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Asn
1 5 10

<210> 319

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 种系化抗体序列

<220>

<221> MISC FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X是任意氨基酸, 优选V或L

eolf-seql.txt

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X是任意氨基酸, 优选K或T

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X是任意氨基酸, 优选T或D

<400> 319

Gly Xaa Xaa Ser Gly Ser Val Thr Ser Xaa Asn Phe Pro Thr
1 5 10

<210> 320
<211> 10
<212> PRT
<213> 人

<400> 320

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
1 5 10

<210> 321
<211> 5
<212> PRT
<213> 人

<400> 321

Cys Pro Pro Cys Pro
1 5

[0080]

<210> 322
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 322

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
1 5

<210> 323
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 323

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr
1 5 10

<210> 324
<211> 50
<212> PRT
<213> 人

<400> 324

Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys
1 5 10 15

Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro
20 25 30

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
35 40 45

Cys Pro
50

eolf-seql.txt

<210> 325
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 325

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
1 5

<210> 326
<211> 7
<212> PRT
<213> 人

<400> 326

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
1 5

<210> 327
<211> 5
<212> PRT
<213> 人

<400> 327

Cys Pro Ser Cys Pro
1 5

<210> 328
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

[0081]

<400> 328

Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
1 5

<210> 329
<211> 3
<212> PRT
<213> 人

<400> 329

Glu Arg Lys
1

<210> 330
<211> 10
<212> PRT
<213> 人

<400> 330

Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 331
<211> 7
<212> PRT
<213> 人

<400> 331

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro
1 5

<210> 332
<211> 142

eolf-seql.txt

<212> PRT

<213> 人

<400> 332

Ser Leu Gly Trp Asp Val Ala Glu Leu Gln Leu Asn His Thr Gly Pro
1 5 10 15

Gln Gln Asp Pro Arg Leu Tyr Trp Gln Gly Gly Pro Ala Leu Gly Arg
20 25 30

Ser Phe Leu His Gly Pro Gln Leu Asp Lys Gly Gln Leu Arg Ile His
35 40 45

Arg Asp Gly Ile Tyr Met Val His Ile Gln Val Thr Leu Ala Ile Cys
50 55 60

Ser Ser Thr Thr Ala Ser Arg His His Pro Thr Thr Leu Ala Val Gly
65 70 75 80

Ile Cys Ser Pro Ala Ser Arg Ser Ile Ser Leu Leu Arg Leu Ser Phe
85 90 95

His Gln Gly Cys Thr Ile Ala Ser Gln Arg Leu Thr Pro Leu Ala Arg
100 105 110

Gly Asp Thr Leu Cys Thr Asn Leu Thr Gly Thr Leu Leu Pro Ser Arg
115 120 125

Asn Thr Asp Glu Thr Phe Phe Gly Val Gln Trp Val Arg Pro
130 135 140

[0082]

<210> 333

<211> 142

<212> PRT

<213> 人丁

<220>

<223> 嵌合序列

<400> 333

His Pro Glu Pro His Thr Ala Glu Leu Gln Leu Asn Leu Thr Val Pro
1 5 10 15

Arg Lys Asp Pro Thr Leu Arg Trp Gly Ala Gly Pro Ala Leu Gly Arg
20 25 30

Ser Phe Leu His Gly Pro Gln Leu Asp Lys Gly Gln Leu Arg Ile His
35 40 45

Arg Asp Gly Ile Tyr Met Val His Ile Gln Val Thr Leu Ala Ile Cys
50 55 60

Ser Ser Thr Thr Ala Ser Arg His His Pro Thr Thr Leu Ala Val Gly
65 70 75 80

Ile Cys Ser Pro Ala Ser Arg Ser Ile Ser Leu Leu Arg Leu Ser Phe
85 90 95

His Gln Gly Cys Thr Ile Ala Ser Gln Arg Leu Thr Pro Leu Ala Arg
100 105 110

Gly Asp Thr Leu Cys Thr Asn Leu Thr Gly Thr Leu Leu Pro Ser Arg
115 120 125

eolf-seql.txt

Asn Thr Asp Glu Thr Phe Phe Gly Val Gln Trp Val Arg Pro
130 135 140

<210> 334

<211> 142

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 嵌合序列

<400> 334

His Pro Glu Pro His Thr Ala Glu Leu Gln Leu Asn Leu Thr Val Pro
1 5 10 15

Arg Lys Asp Pro Thr Leu Arg Trp Gly Ala Gly Pro Ala Leu Gly Arg
20 25 30

Ser Phe Thr His Gly Pro Glu Leu Asp Lys Gly Gln Leu Arg Ile His
35 40 45

Arg Asp Gly Ile Tyr Met Val His Ile Gln Val Thr Leu Ala Ile Cys
50 55 60

Ser Ser Thr Thr Ala Ser Arg His His Pro Thr Thr Leu Ala Val Gly
65 70 75 80

Ile Cys Ser Pro Ala Ser Arg Ser Ile Ser Leu Leu Arg Leu Ser Phe
85 90 95

[0083]

His Gln Gly Cys Thr Ile Ala Ser Gln Arg Leu Thr Pro Leu Ala Arg
100 105 110

Gly Asp Thr Leu Cys Thr Asn Leu Thr Gly Thr Leu Leu Pro Ser Arg
115 120 125

Asn Thr Asp Glu Thr Phe Phe Gly Val Gln Trp Val Arg Pro
130 135 140

<210> 335

<211> 142

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 嵌合序列

<400> 335

His Pro Glu Pro His Thr Ala Glu Leu Gln Leu Asn Leu Thr Val Pro
1 5 10 15

Arg Lys Asp Pro Thr Leu Arg Trp Gly Ala Gly Pro Ala Leu Gly Arg
20 25 30

Ser Phe Thr His Gly Pro Glu Leu Glu Glu Gly His Leu Arg Ile His
35 40 45

Arg Asp Gly Ile Tyr Met Val His Ile Gln Val Thr Leu Ala Ile Cys
50 55 60

Ser Ser Thr Thr Ala Ser Arg His His Pro Thr Thr Leu Ala Val Gly
65 70 75 80

eolf-seql.txt

Ile Cys Ser Pro Ala Ser Arg Ser Ile Ser Leu Leu Arg Leu Ser Phe
85 90 95

His Gln Gly Cys Thr Ile Ala Ser Gln Arg Leu Thr Pro Leu Ala Arg
100 105 110

Gly Asp Thr Leu Cys Thr Asn Leu Thr Gly Thr Leu Leu Pro Ser Arg
115 120 125

Asn Thr Asp Glu Thr Phe Phe Gly Val Gln Trp Val Arg Pro
130 135 140

<210> 336

<211> 142

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 嵌合序列

<400> 336

His Pro Glu Pro His Thr Ala Glu Leu Gln Leu Asn Leu Thr Val Pro
1 5 10 15

Arg Lys Asp Pro Thr Leu Arg Trp Gly Ala Gly Pro Ala Leu Gly Arg
20 25 30

Ser Phe Thr His Gly Pro Glu Leu Glu Glu Gly His Leu Arg Ile His
35 40 45

[0084]

Gln Asp Gly Leu Tyr Arg Leu His Ile Gln Val Thr Leu Ala Ile Cys
50 55 60

Ser Ser Thr Thr Ala Ser Arg His His Pro Thr Thr Leu Ala Val Gly
65 70 75 80

Ile Cys Ser Pro Ala Ser Arg Ser Ile Ser Leu Leu Arg Leu Ser Phe
85 90 95

His Gln Gly Cys Thr Ile Ala Ser Gln Arg Leu Thr Pro Leu Ala Arg
100 105 110

Gly Asp Thr Leu Cys Thr Asn Leu Thr Gly Thr Leu Leu Pro Ser Arg
115 120 125

Asn Thr Asp Glu Thr Phe Phe Gly Val Gln Trp Val Arg Pro
130 135 140

<210> 337

<211> 142

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 嵌合序列

<400> 337

His Pro Glu Pro His Thr Ala Glu Leu Gln Leu Asn Leu Thr Val Pro
1 5 10 15

Arg Lys Asp Pro Thr Leu Arg Trp Gly Ala Gly Pro Ala Leu Gly Arg
20 25 30

eolf-seql.txt

<400> 330

His Pro Glu Pro His Thr Ala Glu Leu Gln Leu Asn Leu Thr Val Pro
1 5 10 15

Arg Lys Asp Pro Thr Leu Arg Trp Gly Ala Gly Pro Ala Leu Gly Arg
20 25 30

Ser Phe Thr His Gly Pro Glu Leu Glu Glu Gly His Leu Arg Ile His
35 40 45

Gln Asp Gly Leu Tyr Arg Leu His Ile Gln Val Thr Leu Ala Asn Cys
50 55 60

Ser Ser Pro Gly Ser Thr Leu Gln His Arg Ala Thr Leu Ala Val Gly
65 70 75 80

Ile Cys Ser Pro Ala Ser Arg Ser Ile Ser Leu Leu Arg Leu Ser Phe
85 90 95

His Gln Gly Cys Thr Ile Ala Ser Gln Arg Leu Thr Pro Leu Ala Arg
100 105 110

Gly Asp Thr Leu Cys Thr Asn Leu Thr Gly Thr Leu Leu Pro Ser Arg
115 120 125

Asn Thr Asp Glu Thr Phe Phe Gly Val Gln Trp Val Arg Pro
130 135 140

[0086]

<210> 340

<211> 142

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 嵌合序列

<400> 340

His Pro Glu Pro His Thr Ala Glu Leu Gln Leu Asn Leu Thr Val Pro
1 5 10 15

Arg Lys Asp Pro Thr Leu Arg Trp Gly Ala Gly Pro Ala Leu Gly Arg
20 25 30

Ser Phe Thr His Gly Pro Glu Leu Glu Glu Gly His Leu Arg Ile His
35 40 45

Gln Asp Gly Leu Tyr Arg Leu His Ile Gln Val Thr Leu Ala Asn Cys
50 55 60

Ser Ser Pro Gly Ser Thr Leu Gln His Arg Ala Thr Leu Ala Val Gly
65 70 75 80

Ile Cys Ser Pro Ala Ala His Gly Ile Ser Leu Leu Arg Gly Arg Phe
85 90 95

Gly Gln Asp Cys Thr Val Ala Leu Gln Arg Leu Thr Tyr Leu Val His
100 105 110

Gly Asp Val Leu Cys Thr Asn Leu Thr Gly Thr Leu Leu Pro Ser Arg
115 120 125

```

                                eof-seqL.txt
Asn Thr Asp Glu Thr Phe Phe Gly Val Gln Trp Val Arg Pro
 130                      135                      140

<210> 341
<211> 142
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 341

His Pro Glu Pro His Thr Ala Glu Leu Gln Leu Asn Leu Thr Val Pro
 1                      5                      10                      15

Arg Lys Asp Pro Thr Leu Arg Trp Gly Ala Gly Pro Ala Leu Gly Arg
 20                      25                      30

Ser Phe Thr His Gly Pro Glu Leu Glu Glu Gly His Leu Arg Ile His
 35                      40                      45

Gln Asp Gly Leu Tyr Arg Leu His Ile Gln Val Thr Leu Ala Asn Cys
 50                      55                      60

Ser Ser Pro Gly Ser Thr Leu Gln His Arg Ala Thr Leu Ala Val Gly
 65                      70                      75                      80

Ile Cys Ser Pro Ala Ala His Gly Ile Ser Leu Leu Arg Gly Arg Phe
 85                      90                      95

Gly Gln Asp Cys Thr Val Ala Leu Gln Arg Leu Thr Tyr Leu Val His
 100                     105                     110

[0087] Gly Asp Val Leu Cys Thr Asn Leu Thr Leu Pro Leu Leu Pro Ser Arg
 115                     120                     125

Asn Ala Asp Glu Thr Phe Phe Gly Val Gln Trp Ile Cys Pro
 130                      135                      140

<210> 342
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> CD70表位

<400> 342

His Ile Gln Val Thr Leu Ala Ile Cys Ser Ser
 1                      5                      10

<210> 343
<211> 32
<212> PRT
<213> 大羊驼

<400> 343

Arg Phe Thr Ile Ser Thr Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1                      5                      10                      15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
 20                      25                      30

<210> 344
<211> 1425
<212> DNA
<213> 人工

```

eolf-seql.txt

<220>

<223> 种系化核苷酸序列

<400> 344

```

gccgccacca tgggctgggc ctgcatac cgtttcttgg tggccaccgc cacaggcgtc      60
cactctgagg tgcagctcgt ggagtcggg ggagcttgg tgcagcttg ggggtctctg      120
agaactctct gtgcagctc tggattcacc ttcagtgtct actacatgaa ctgggtccgc      180
caggctccag ggaaggggc cgugtgggc tcagatatta ataaigaagg tggtaactca      240
tactatgcag actccgtgaa gggccgaite accatctcca gagacaactc taagaacagc      300
ctgtatctgc aatgaacag ccgcgcgcgc gaggacacgg ccgigtacta ctgcgcgaga      360
gaigccggat atagaacca tgtacccttc ttgtattctt ggggccaggg gaccttggtc      420
actgtctctt cagccagtac aaaaggctca agtgtgttcc ctcttctccc ctcatccaag      480
agtaaccagt gagccaccgc cgtcttggc tcttggta aggattattt cccagagcct      540
gtcactgttt catggaactc cggcgcttgg acatctgggt tgcatacctt tccagccgtg      600
ctgcagtcac gggcctctc cagcctcagt agcgttggtc ctgtgcccag cagctctctc      660
ggcacacaaa cttatctctg taatgtgaat cataagcctt caaatacca ggtggataag      720
aaagtggaac caaaatcatg tgacaagaca cacacctgcc ctcttcttcc agccccgaa      780
ctgtctgggt gggccagcgt gtctctgttt cctctctaac ccaagacac tctgatgatt      840
agtaggaccc cagaagtcac ttgcgtgggt gttagcgtgt cacatgaaga tcccgaggtc      900
aagttcaatt ggtatgttga cggggtcgaa gttcacaacg ctaaaactaa accaagagag      960
gaacagtata actctactca cggggtgggt agtgttctga ctgtctctca tcaagactgg      1020
ctgaatggca aagaatacca gtgtaagggt agcaacaaag cctgcccgc tctatagag      1080
[0088] aaaaatata ccaagccaa aggtcaacct cgcgagccac aggtgtacac cctcccacca      1140
agccgcgatg aactactcaa gaaccaagtc tctcttctt gccctggtta ggggttctat      1200
ccatccgaca ttgcagtcga gtgggagttt aatggacagc ctgagaacaa ctacaaaaac      1260
acccctctct ttctggattc tgacggatct ttcttctttt attctaaact caccgtggat      1320
aaaagcaggt ggcagcaggg caacgtgttc agctgttccg ttatgcata ggccttgcct      1380
aaccattata cccagaagtc ttgtccctc agtccaggaa agtga      1425

```

<210> 345

<211> 717

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 种系化核苷酸序列

<400> 345

```

gccgccacca tgggctgggc ctgcatac cgtttcttgg tggccaccgc cacaggcgtc      60
cactctcagg cagtgggtac ccaggagcct tccctgacag tgtctcagg agggacggtc      120
acgtctacct gggcctcaa atctgggtct gtacattccg ataaattccc cacttggtae      180
cagcagacac caggccagga tccccgattg cttatctaca acacaaacac ccgtcactct      240
ggcgtccccc accgttctc cggatccatc ctgggcaaca aagccgcctt caccatcacg      300
ggggcccagg ccgacgacga ggccgaatat ttctgtctc tgttcataag taatctagt      360
gttagtttcc ggggaggga ccaacigacc gtcctaggic aacctaaagc agcacctica      420
gttactctgt ttccacctag ttcagaggaa ctgcaggcca ataaagccac actcgtctgc      480
ctcatcagtg actctaccc aggagccgtg accgtggcct ggaaagccga cagtgcctcc      540
gtgaagcccg ggttgagac aacaactcct agtaaacaga gtaataacaa atatgccgct      600

```

eolf-seql.txt	
agtagttatc tctccctcac tcccagcag tgggaagtc acagaagta ctttgtcag	660
gttactcacg agggttccac agtggaaaag actgtggccc ctactgaatg tagttga	717
<210> 346	
<211> 369	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 种系化核苷酸序列	
<400> 346	
cagttgcagc tggtagagtc tgggggagge ttggtagcagc ctgggggggc tctgagactc	60
tcttgtcagc cctctggatt cagcttcagt cactatgcca tgagctgggt cegccagget	120
ccaggaaagg ggctagagtg ggtctcaggt gataatacct acgatgggtg tacaaggat	180
caagactccg tgaaggcccg attcaccatc tccagagaca atggcaagaa cacgtgtat	240
ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac acggccgtgt attactgtgc aaaagatact	300
ggttagaggca ttatggggga gtacggcatg gaactacggg gcaaaggac cctggtcacc	360
gtctctca	369
<210> 347	
<211> 341	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 种系化核苷酸序列	
<400> 347	
cagactgtgg tgaccagga gccgtccctg tcagtgtctc caggaggac ggtcacactc	60
acctggggc tcaagctgg gtctgtact tccagtaact acctgcttg gtaccagcag	120
acaccaggcc aggtccccc attgttate tacaacacaa acagccgtca ctciggggtc	180
cccagtcgt tctccggatc catctctggg aacaaagccg cctcaccat caccggggcc	240
cagcccagg acgagccga ctattactgt gctctgtaca tgggtagtgg tagtgccaat	300
gtatgttgc gggaggagac ccatcgaac gtcctgggtc a	341
<210> 348	
<211> 372	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 种系化核苷酸序列	
<400> 348	
gaggtgcagc tggtagagtc tgggggagge ttggtagcagc ctgggggggc tctgagactc	60
tcttgtcagc cgtccgaatt gtccttcagt attctgaga tgacctgggt cegccagget	120
ccaggaaagg ggctcagtg ggtctcaggt attagtgtg taactgggtg tagtagtaca	180
agttatgcag actccgtgaa gggccgattc accatctcca gagacaacga caagaacacg	240
ttgtatctac aaatgaacag cctgataccc gaggacacgg ccgtatatta ctgtgcaaca	300
actagtggtc cttaactact catccccgag taigagtact ggggccaggg gaccaggtc	360
accgtctcct ca	372
<210> 349	
<211> 333	
<212> DNA	
<213> 人工	

[0089]

eolf-seql.txt

<220>

<223> 种系化核苷酸序列

<400> 349

cagctctgtgc tgacccagcc tccctccgtg tctgggtctc caggaaagac ggtcaccatc 60

tcctgtgcag gaaccagcag tgatgttggg tatggatact atgtctcctg gtatcaacag 120

ttcccaggaa tggcccccaa actcctgata tatgacgtca ataaacgggc ctcagggatc 180

gtgatgcgt tctctggctc caaggccggc aacactgect cctgaccat ctcgggctc 240

cagctctgagg acgaggctga ttattactgt gccatata gaagtagcgc caatgctgtg 300

ttcgccggag ggacccatct gaccgtcctg ggt 333

<210> 350

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 种系化抗体序列

[0090]

<400> 350

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Thr Leu Gln
1 5 10 15Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg
20 25 30

<210> 351

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 种系化抗体序列

<400> 351

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Thr Leu Gln
1 5 10 15Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg
20 25 30

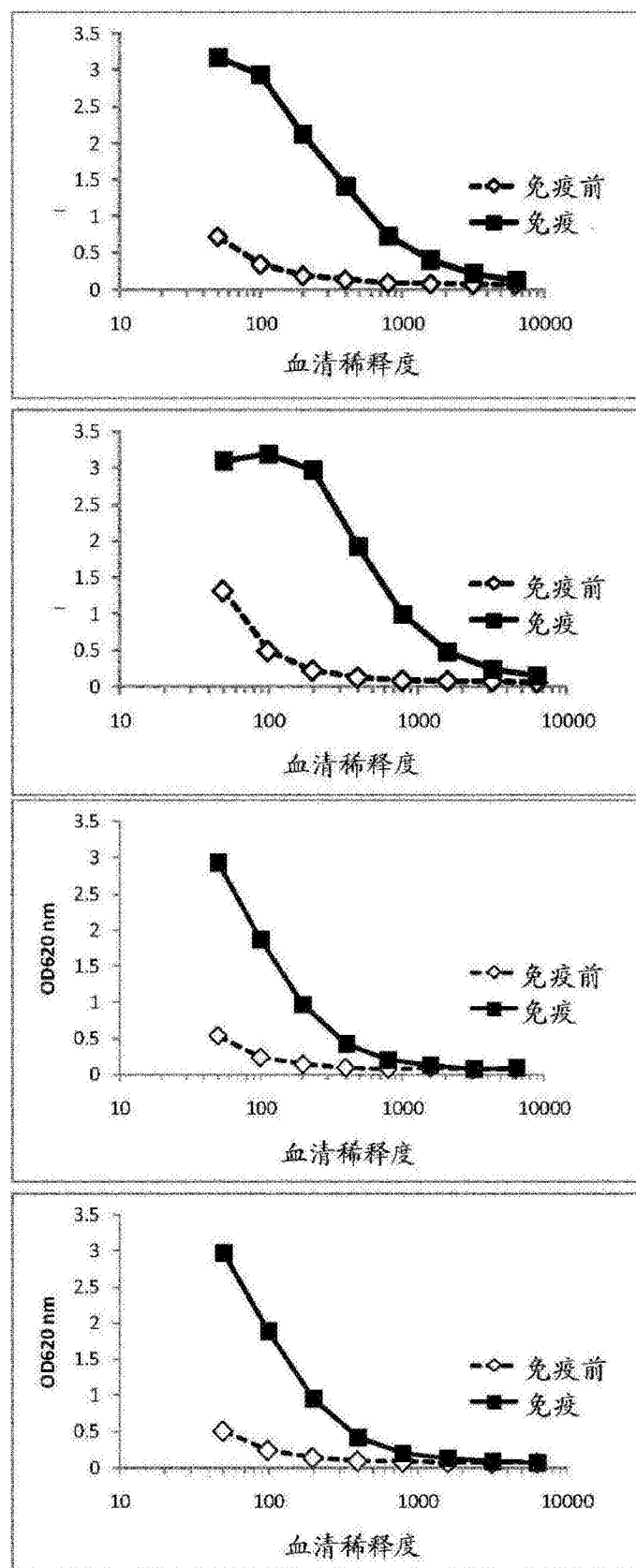


图1

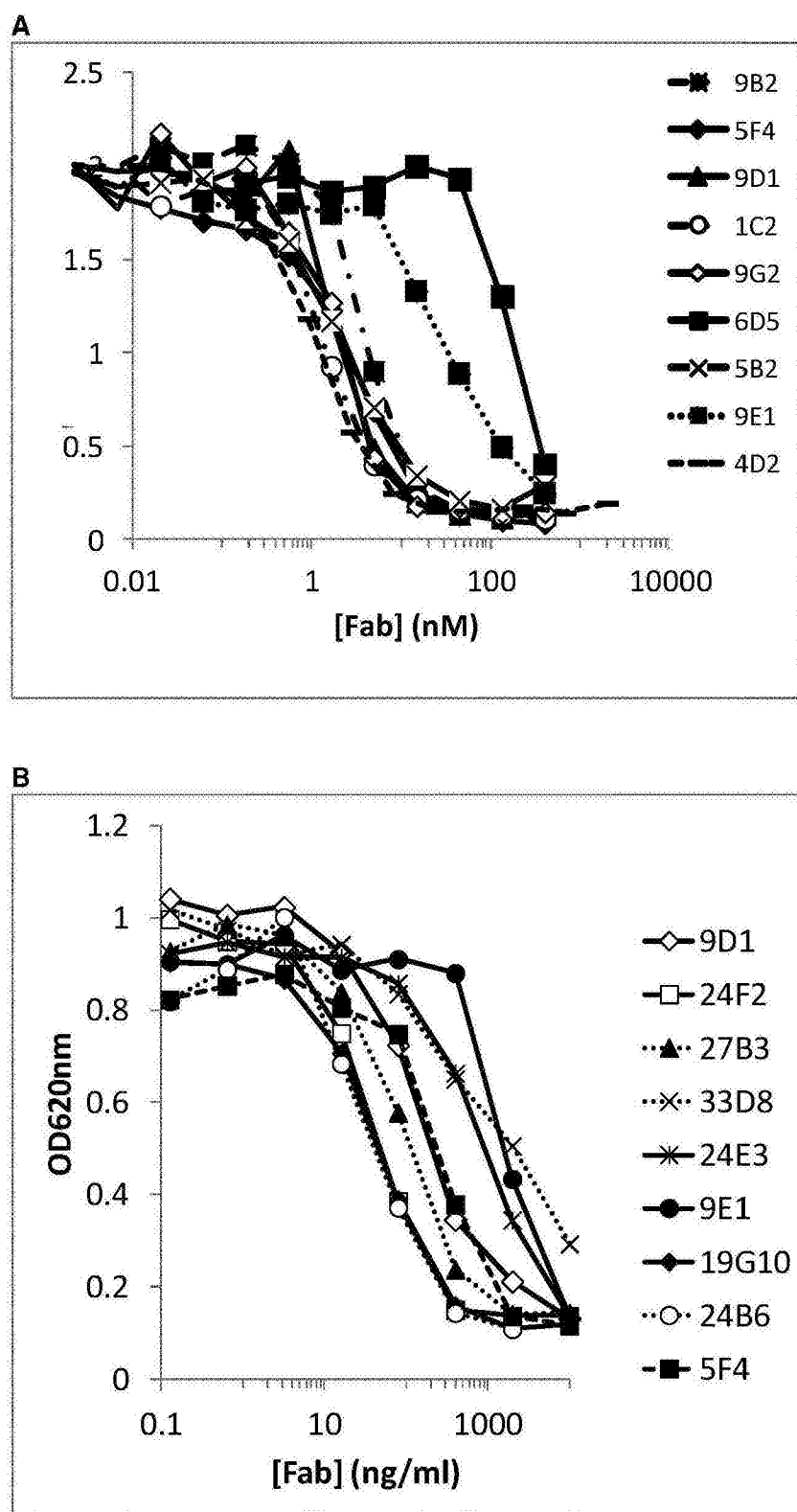


图2

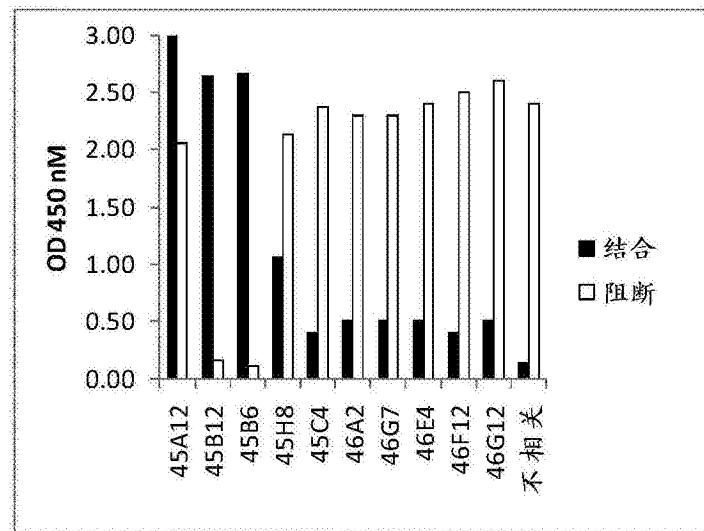
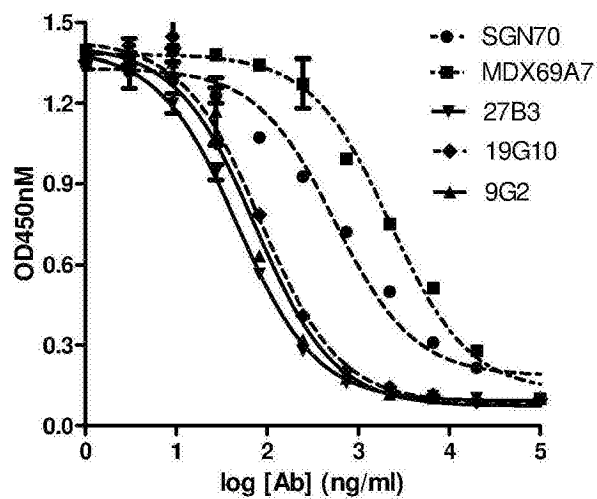
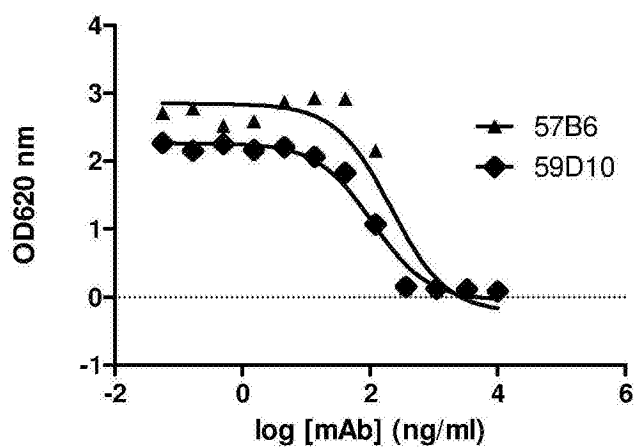


图3

A



B



C

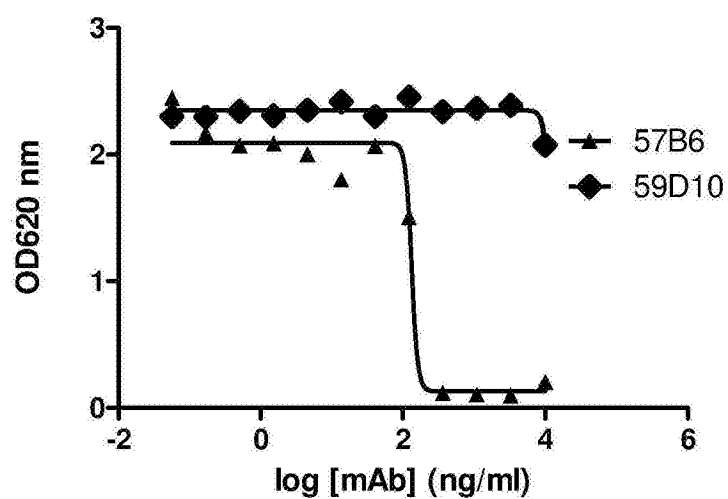


图4

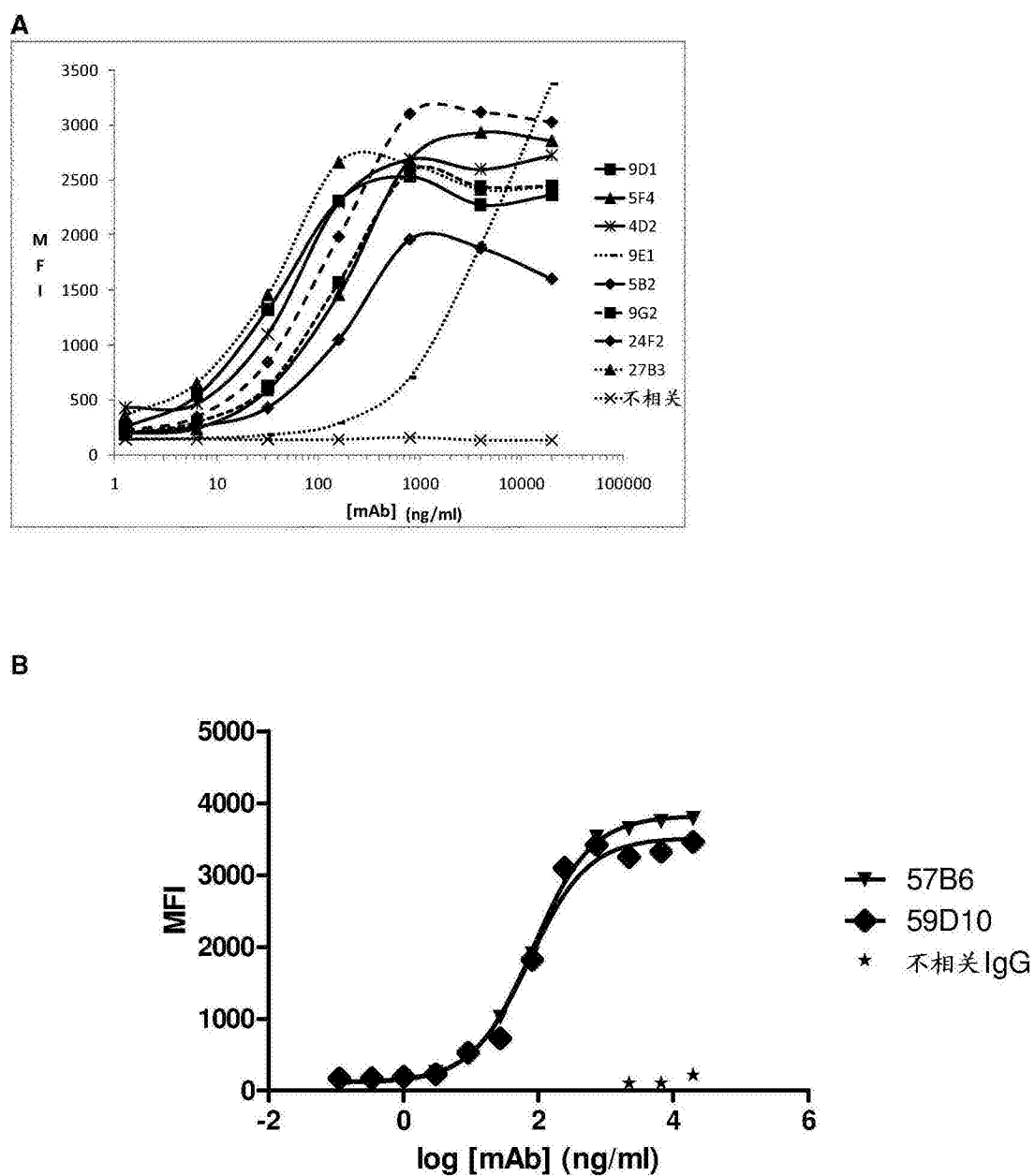


图5

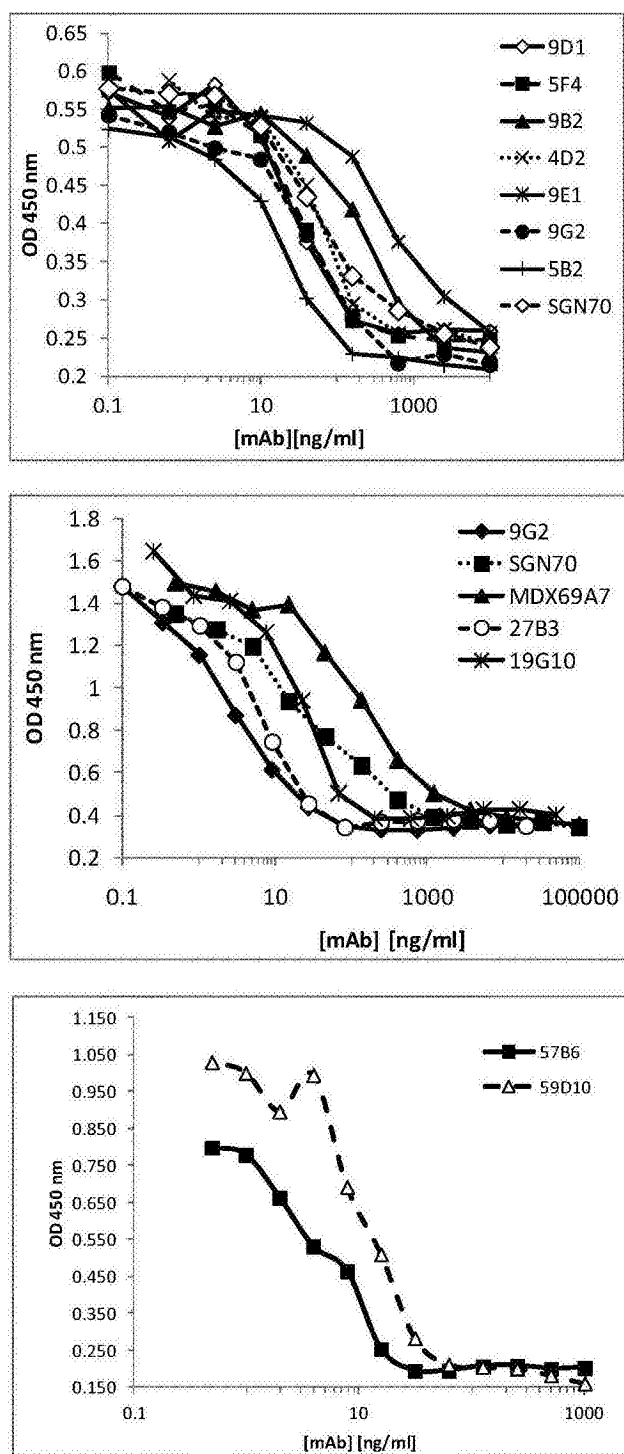


图6

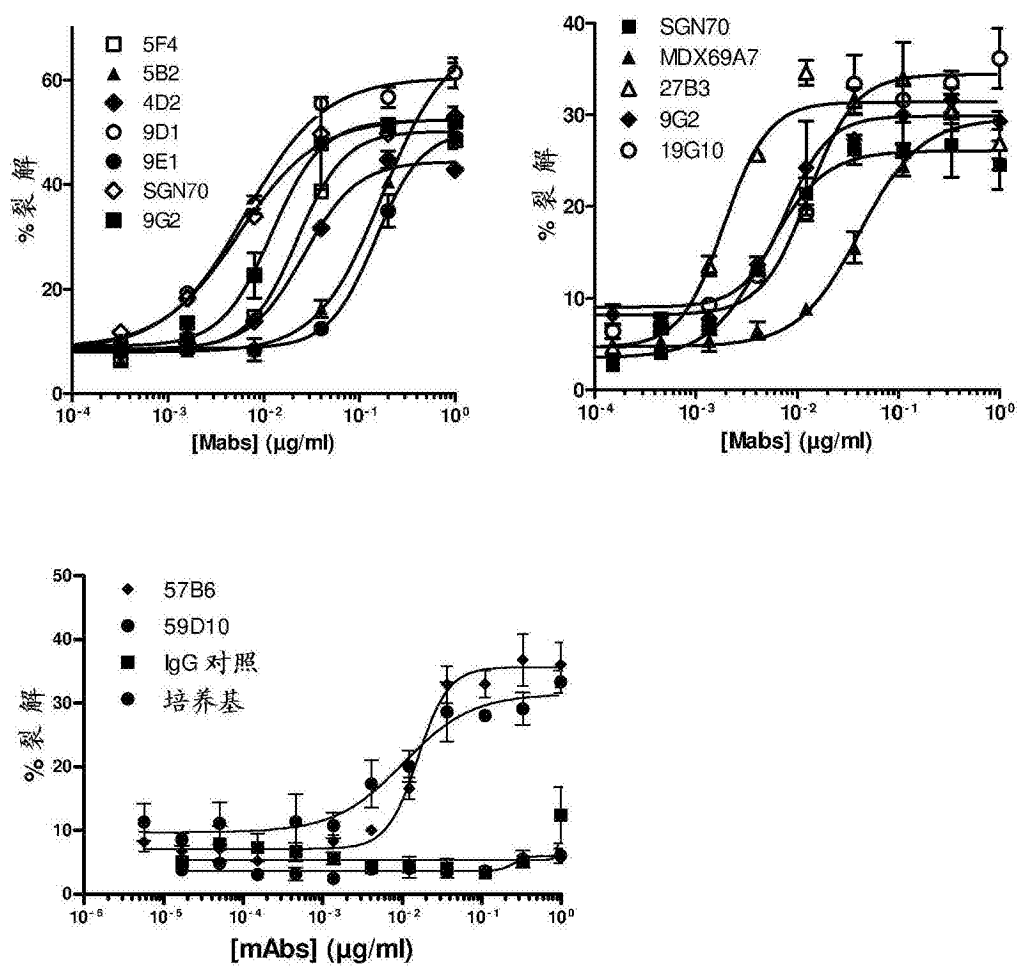


图7

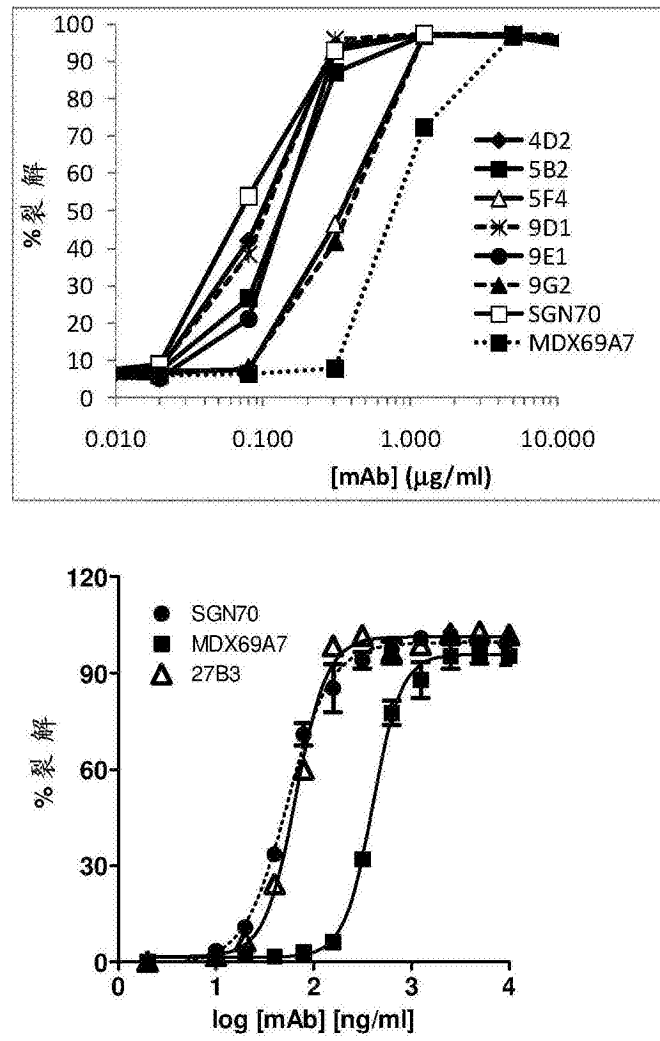


图8

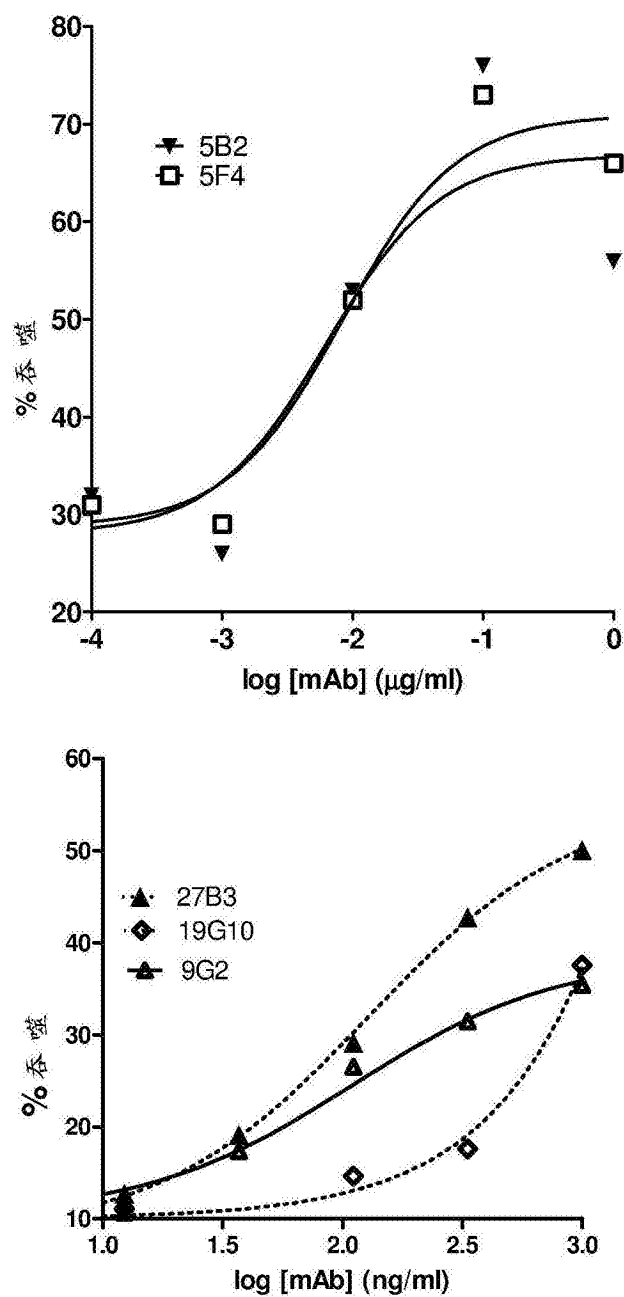


图9

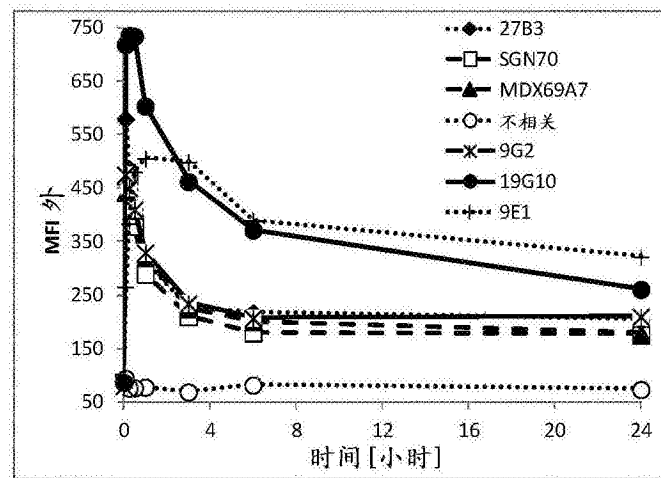
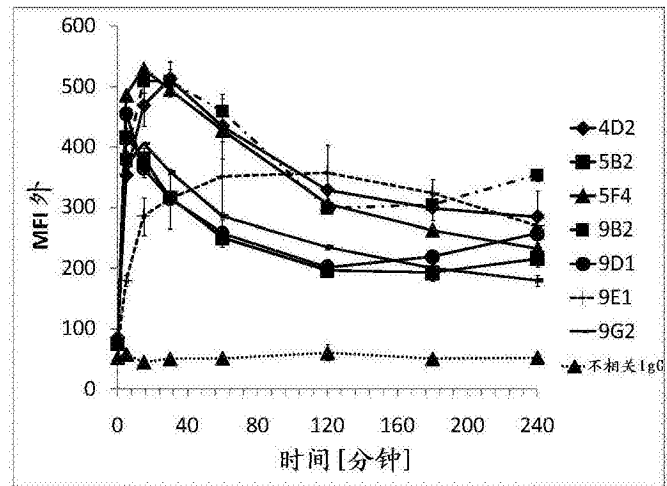


图10

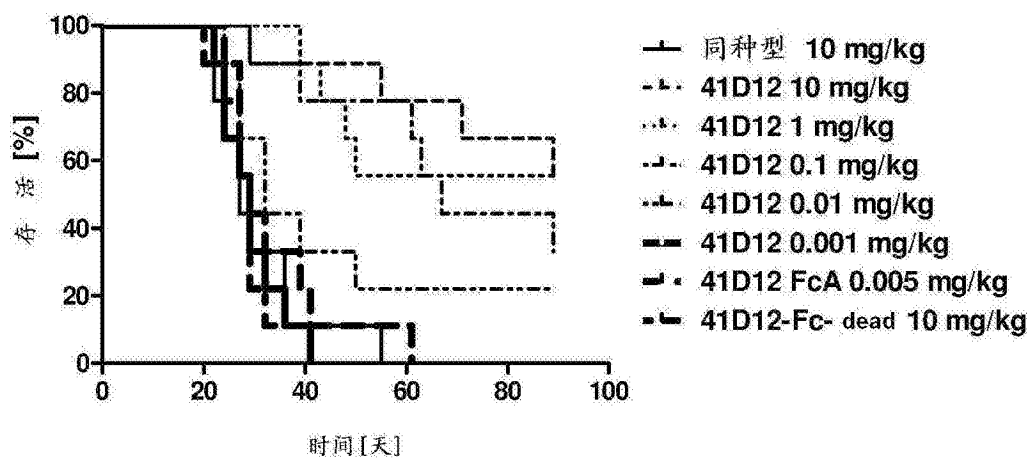


图11

轻链	FR1	CDR1	FR2
名称	FR1	CDR1	FR2
Z73650 IGLV8-61*01	QTVVTQEPS FSVSPGGTIVTLTC	GLSSGSV STSYPPS	WYQQTTPGQAPRTLIIY
27B3	QAVVTQEPS LTVSPGGTIVTLTC	GLKSGSV TSTNFPT	WYQQTTPGQAPRLIIY

CDR2	FR3	CDR3	FR4
CDR2	FR3	CDR3	FR4
ST	NTRSS GVPDRFSGSILG NKAALTITGAQADDESYYC VL		AV FGGGTQLTVL
NT	NTRHS GVPSRFSGSISE NKAALTITGAQPEDEAEYFC ALFISNPS		VE FGGGTQLTVL

重链	FR1	CDR1	FR2	CDR2
名称	FR1	CDR1	FR2	CDR2
Z12358 IGHV3-48*03	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SYEMN	WVRQAPGKGLEWVS YISS	SGSTIYYADSVKGG
27B3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	VYYMN	WVRQAPGKGLEWVS DINN	EGGTIYYADSVKGG

FR3	CDR3	FR4
FR3	CDR3	FR4
RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR		DS WGQGTTLTVSS
RFTISRDNAKNTLTLMNSLKPEDTALYYCVR	DAGYSNHVPIF	DS WGQGTQVIVAS

图12

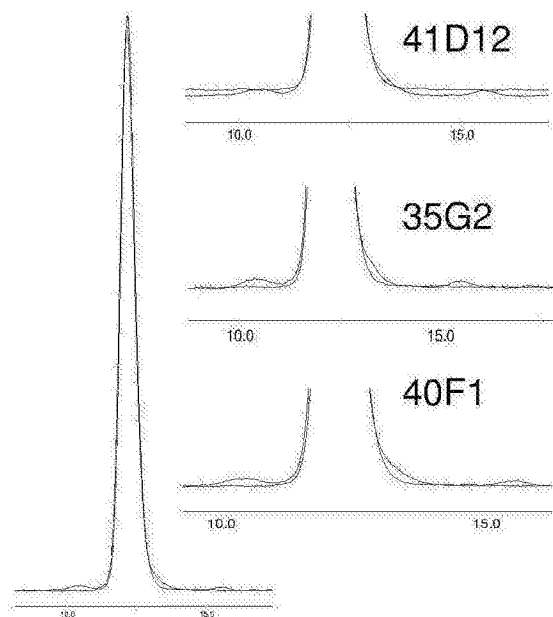


图13

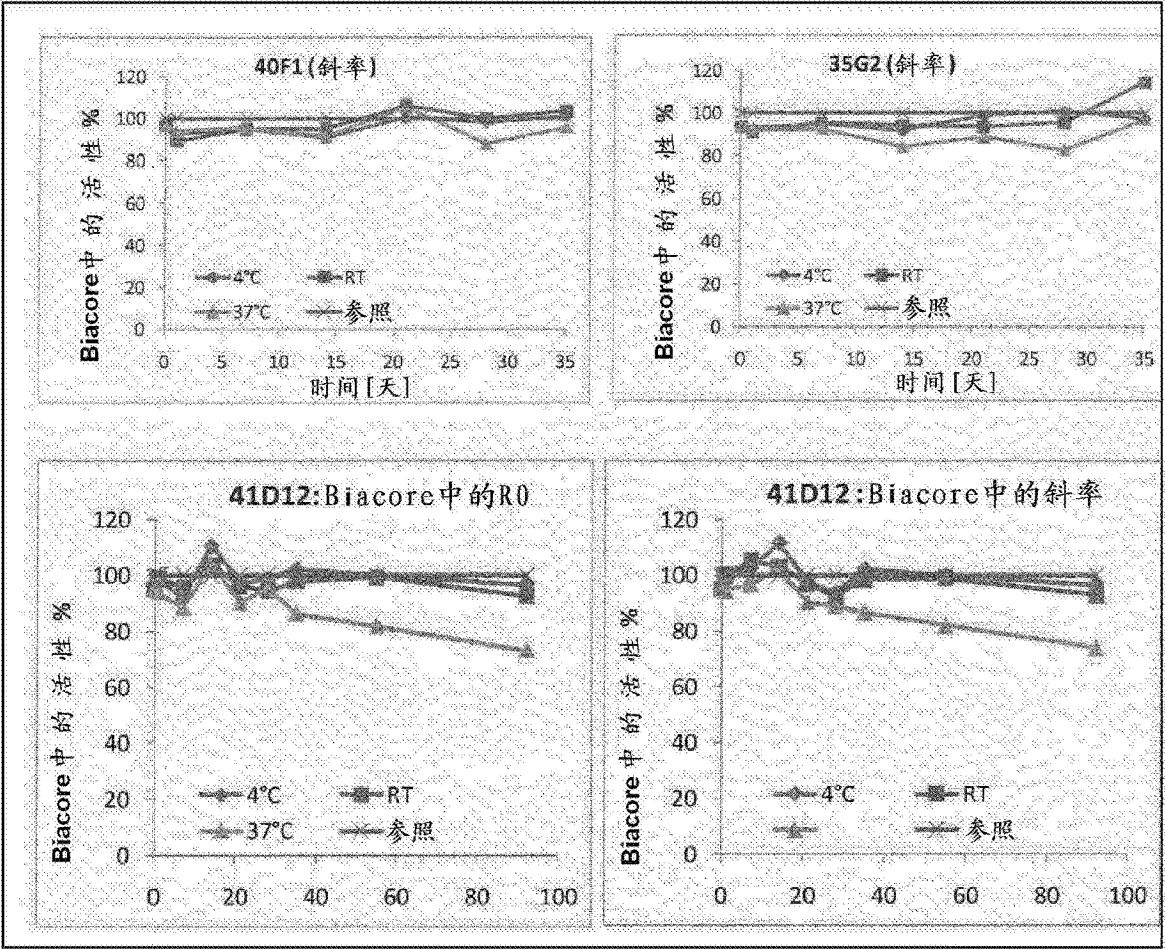


图14

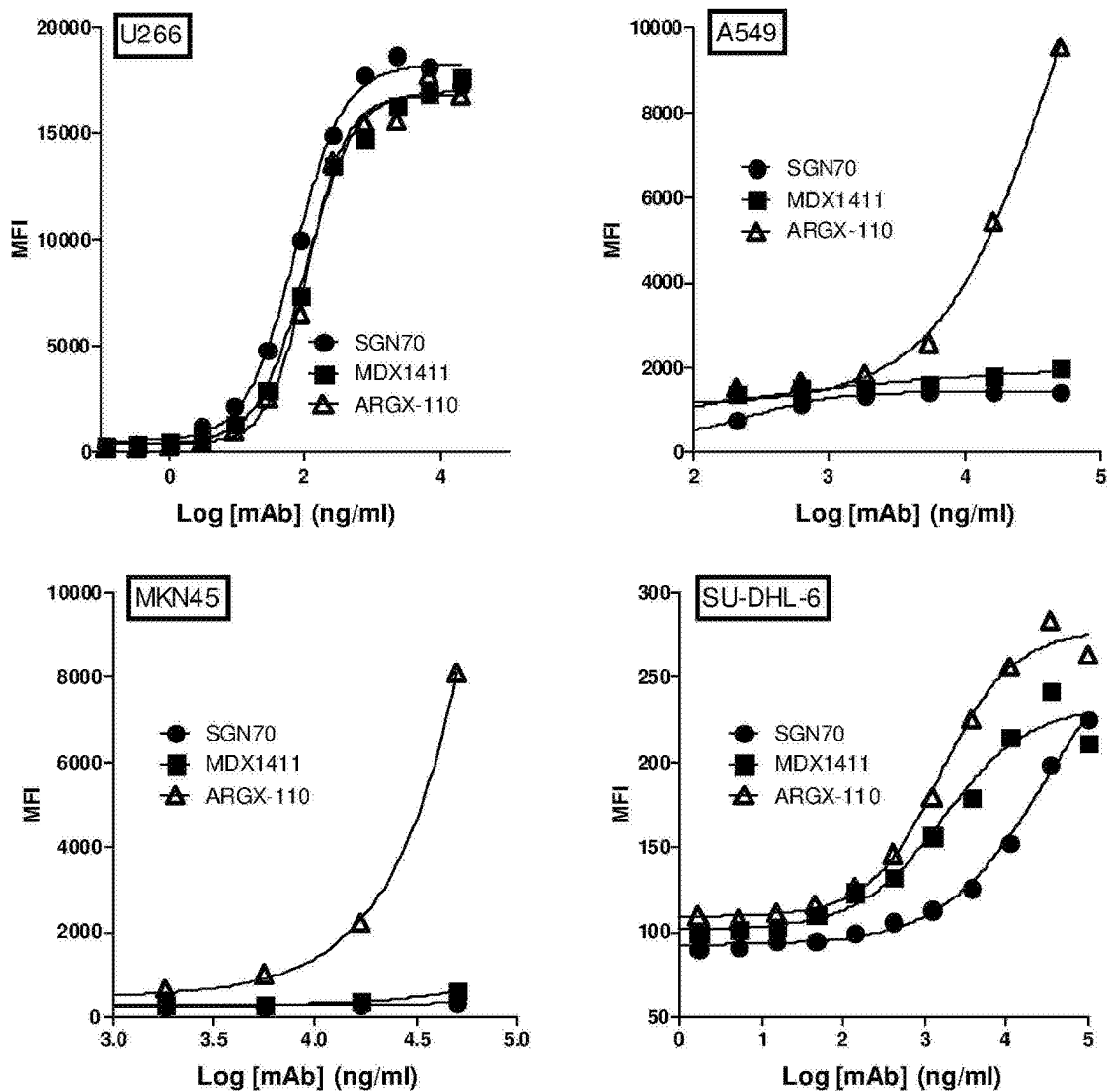


图15

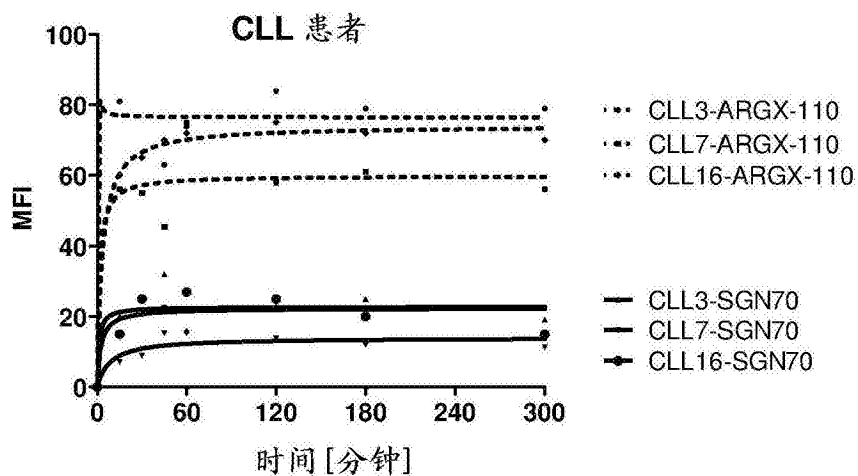


图16

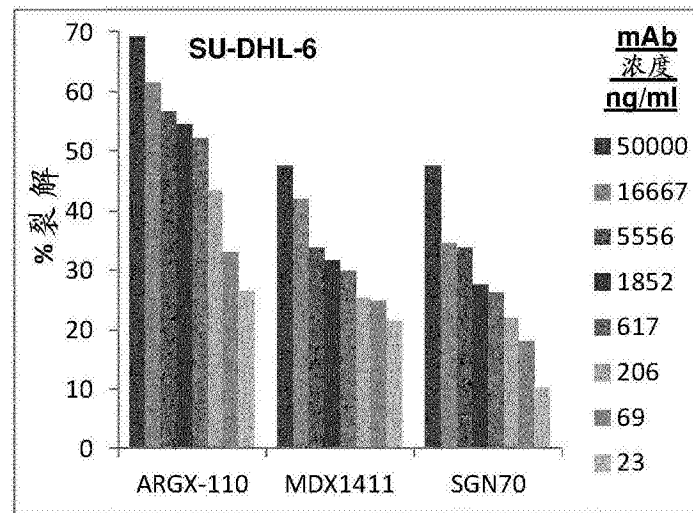


图17

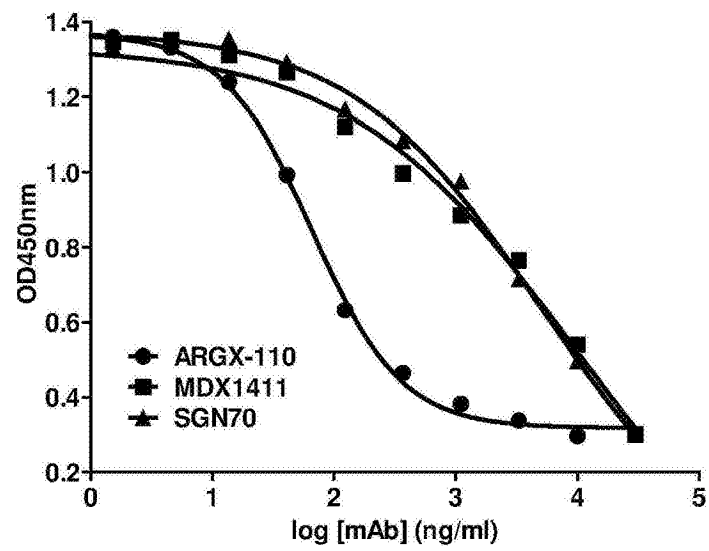


图18

人	QRFAQAQQQLPLESLGWDVAELQLNHTGPQQDPRLYWQGGPALGRSFLHGPELDKGQL
食蟹猴	QRLSRAQQQLPLESLGWDIAELQLNHTGPQQDPRLYWQGGPALGRSFLHGPELDKGQL
恒河猴	QRLSRAQQQLPLESLGWDIAELQLNHTGPQQDPRLYWQGGPALGRSFLRGPELDKGQL
小鼠	SGLLSKQQQRELEHPEPHTAELQLNLTVPKDFTLRWGAGPALGRSFTHGPELEEGHL
大鼠	GGHLSKPOHVLEPPPELHVAELQLNLTDPOKDLTLRWGAGPALGRSFTHGPGLEKGNL
人	RIHRDGIYMVHIQVTLAICSSSTASR HHPTTLAVGICSPASRSISLLR
食蟹猴	RIRRDGIYMVHIQVTLAICSSSTSRHHPTTLAVGICSPASRSISLLR
恒河猴	RIRRDGIYMVHIQVTLAICSSSTSRHHPTTLAVGICSPASRSISLLR
小鼠	RIHQDGLYRLHIQVTLANCSSPGSTL QHRATLAVGICSPAAGISLLR
大鼠	RIHQDGIYRLHIQVTLANCSSSGSAL QHRASLVVGICSPAVHIISLLR
人	LSFHQGCCTIASQRLTPLARGDTLCTNLTGTLPSRNTDETFFGVQWVRP
食蟹猴	LSFHQGCCTIASQRLTPLARGDTLCTNLTGTLPSRNTDETFFGVQWVRP
恒河猴	LSFHQGCCTIASQRLTPLARGDTLCTNLTGTLPSRNTDETFFGVQWVRP
小鼠	GRFGQDCTVALQRLTYLVHGDVLCNTLTPLPSRNADETFFGVQWICP
大鼠	RRFGQDCTVSLQRLTPLARGDVLCNLTQPLPSRNADETFFGVQRVYWP

图19

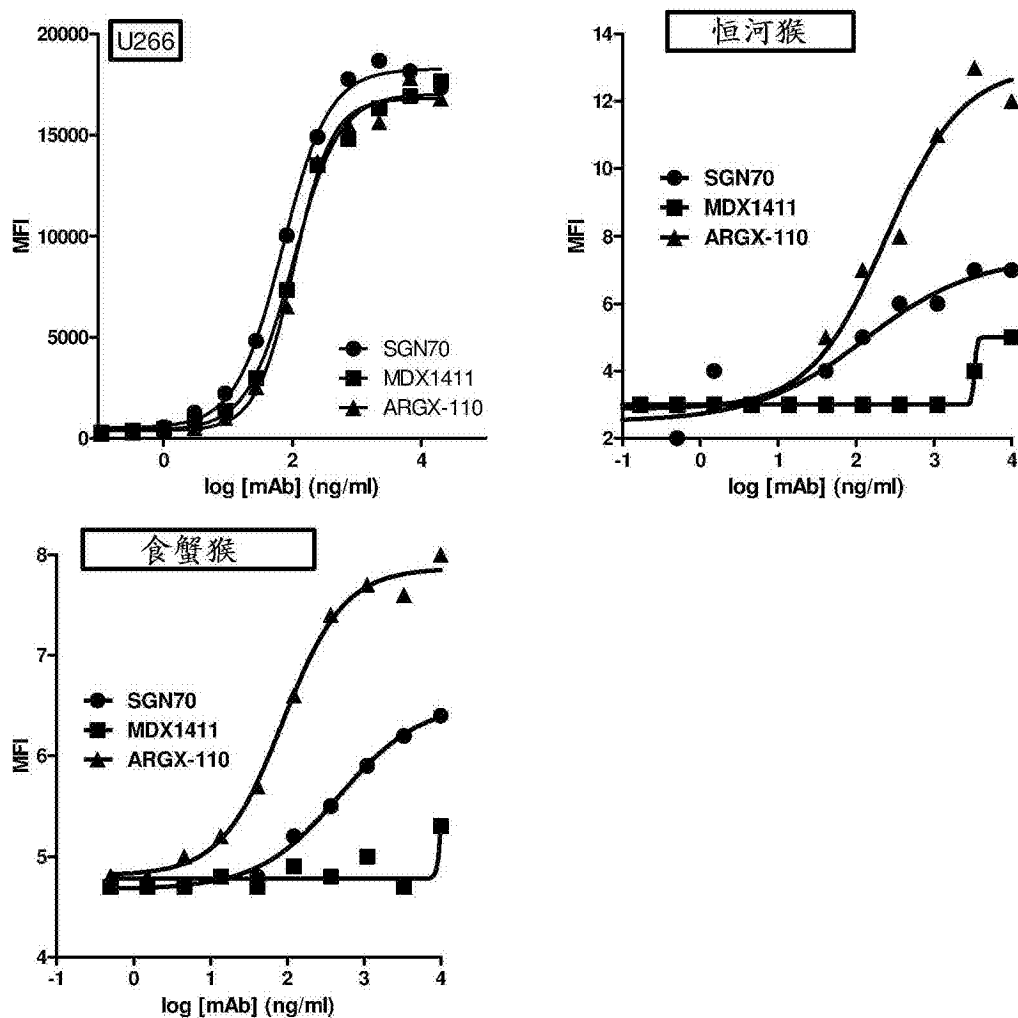


图20

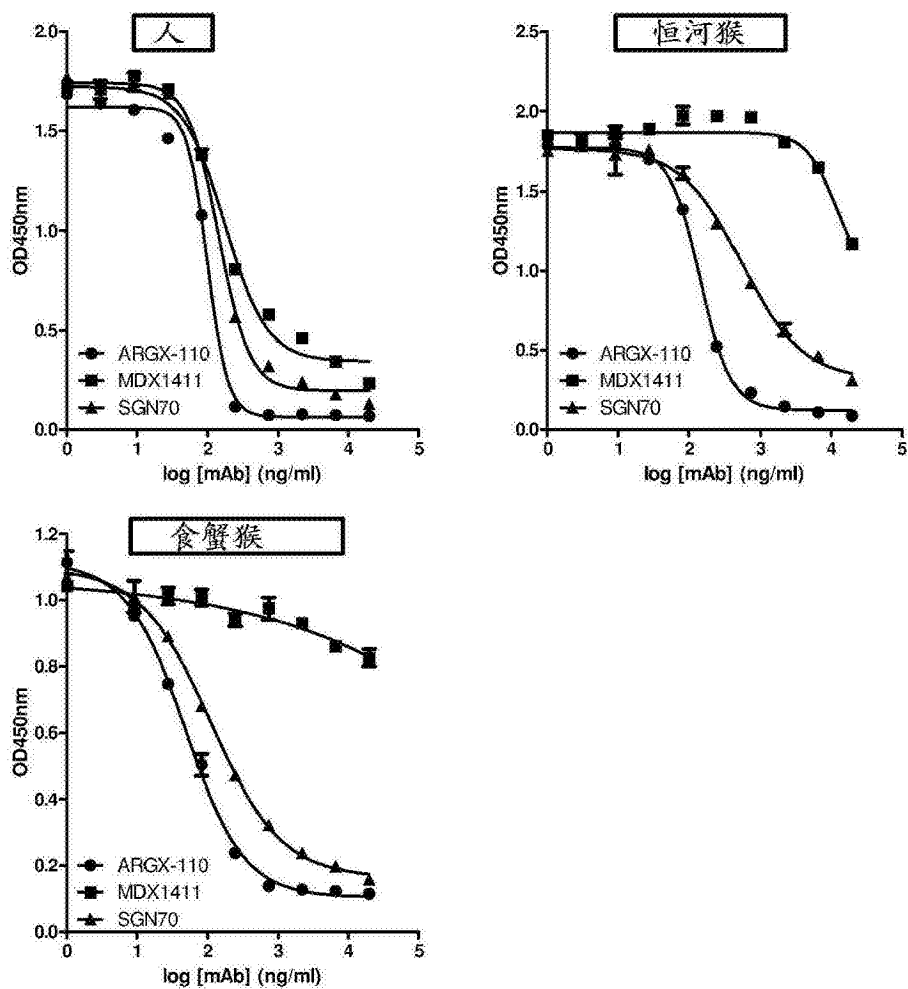


图21

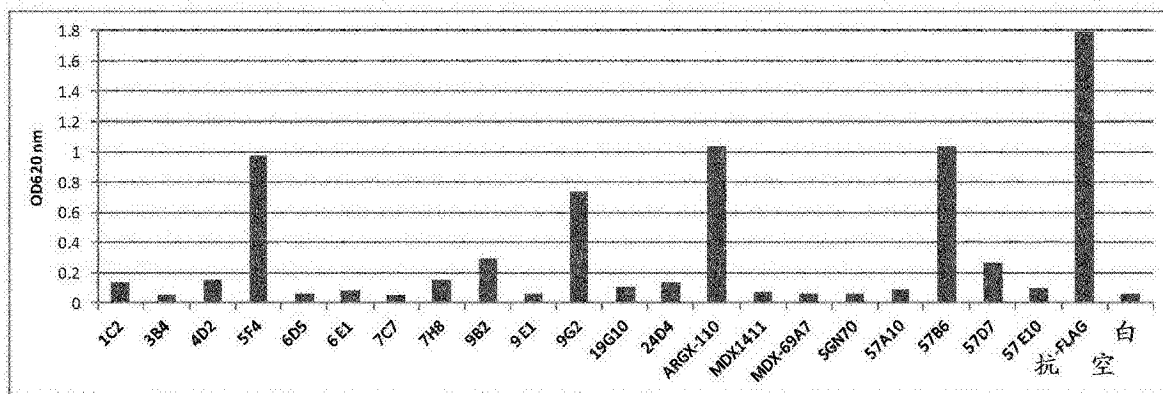


图22

人		SLGWDVAELQLNHTGPQQDPRLYWQGG
嵌合体	1	HPEPHTAELQLNLTVPKDPTRLRWGAG
嵌合体	2.1	HPEPHTAELQLNLTVPKDPTRLRWGAG
嵌合体	2.2	HPEPHTAELQLNLTVPKDPTRLRWGAG
嵌合体	2.3	HPEPHTAELQLNLTVPKDPTRLRWGAG
嵌合体	2.4	HPEPHTAELQLNLTVPKDPTRLRWGAG
嵌合体	2	HPEPHTAELQLNLTVPKDPTRLRWGAG
嵌合体	3	HPEPHTAELQLNLTVPKDPTRLRWGAG
嵌合体	4	HPEPHTAELQLNLTVPKDPTRLRWGAG
小鼠		HPEPHTAELQLNLTVPKDPTRLRWGAG
人		PALGRSFLHGPELDKGQLRIHRDGIYMVHIQVTLAICS
嵌合体	1	PALGRSFLHGPELDKGQLRIHRDGIYMVHIQVTLAICS
嵌合体	2.1	PALGRSFTHGPELDKGQLRIHRDGIYMVHIQVTLAICS
嵌合体	2.2	PALGRSFTHGPELEEGHLRIHRDGIYMVHIQVTLAICS
嵌合体	2.3	PALGRSFTHGPELEEGHLRIHQDGLYRLHIQVTLAICS
嵌合体	2.4	PALGRSFTHGPELEEGHLRIHQDGLYRLHIQVTLAICS
嵌合体	2	PALGRSFTHGPELEEGHLRIHQDGLYRLHIQVTLANCS
嵌合体	3	PALGRSFTHGPELEEGHLRIHQDGLYRLHIQVTLANCS
嵌合体	4	PALGRSFTHGPELEEGHLRIHQDGLYRLHIQVTLANCS
小鼠		PALGRSFTHGPELEEGHLRIHQDGLYRLHIQVTLANCS
人		STTASR HHPTTLAVGICSPASRSISLLRLSFHQGCTIASQRLTPLARGDT
嵌合体	1	STTASR HHPTTLAVGICSPASRSISLLRLSFHQGCTIASQRLTPLARGDT
嵌合体	2.1	STTASR HHPTTLAVGICSPASRSISLLRLSFHQGCTIASQRLTPLARGDT
嵌合体	2.2	STTASR HHPTTLAVGICSPASRSISLLRLSFHQGCTIASQRLTPLARGDT
嵌合体	2.3	STTASR HHPTTLAVGICSPASRSISLLRLSFHQGCTIASQRLTPLARGDT
嵌合体	2.4	STTASR HHPTTLAVGICSPASRSISLLRLSFHQGCTIASQRLTPLARGDT
嵌合体	2	STTASR HHPTTLAVGICSPASRSISLLRLSFHQGCTIASQRLTPLARGDT
嵌合体	3	SPGSTL QHRATLAVGICSPASRSISLLRLSFHQGCTIASQRLTPLARGDT
嵌合体	4	SPGSTL QHRATLAVGICSPAAGHISLLRGRFGQDCTVALQRLTYLVHGDV
小鼠		SPGSTL QHRATLAVGICSPAAGHISLLRGRFGQDCTVALQRLTYLVHGDV
人		LCTNLTGTLLPSRNTDETFFGVQWVRP
嵌合体	1	LCTNLTGTLLPSRNTDETFFGVQWVRP
嵌合体	2.1	LCTNLTGTLLPSRNTDETFFGVQWVRP
嵌合体	2.2	LCTNLTGTLLPSRNTDETFFGVQWVRP
嵌合体	2.3	LCTNLTGTLLPSRNTDETFFGVQWVRP
嵌合体	2.4	LCTNLTGTLLPSRNTDETFFGVQWVRP
嵌合体	2	LCTNLTGTLLPSRNTDETFFGVQWVRP
嵌合体	3	LCTNLTGTLLPSRNTDETFFGVQWVRP
嵌合体	4	LCTNLTGTLLPSRNTDETFFGVQWVRP
小鼠		LCTNLTGTLLPSRNTDETFFGVQWVRP

图23

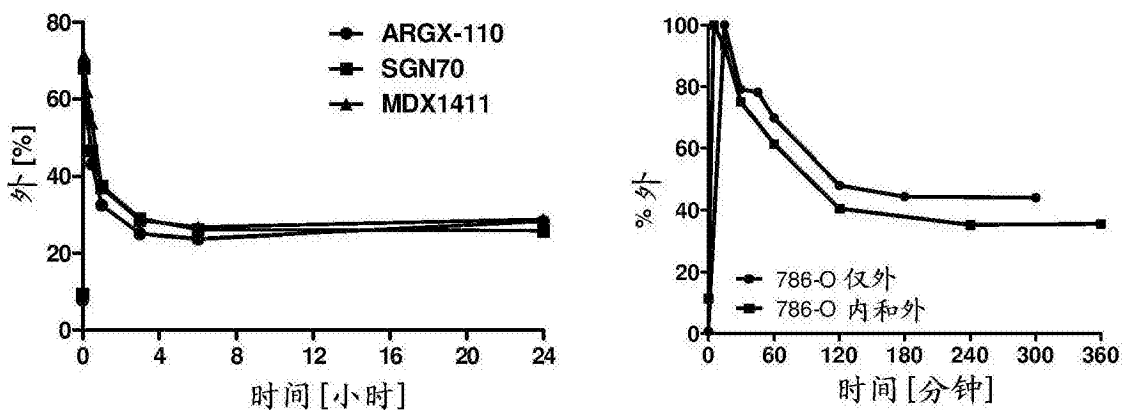


图24