(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115594765 A
(43)申请公布日 2023.01.13

(21)申请号 202210623357.X

(22)申请日 2016.09.29

(30)优先权数据
15188095.2 2015.10.02 EP
16170363.2 2016.05.19 EP

(62)分案原申请数据
201680057465.8 2016.09.29

(71)申请人 豪夫迈·罗氏有限公司
地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 M·阿曼 P·布伦克尔
C·克劳斯 C·费拉拉科勒
S·格劳-理查兹 R·豪斯
C·克莱因 V·李维斯基
P·乌马纳

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 岑晓东

(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
C12N 15/13(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 31/00(2006.01)

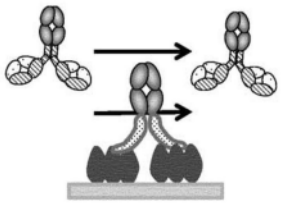
权利要求书1页 说明书228页
序列表305页 附图69页

(54)发明名称

对共刺激性TNF受体特异性的双特异性抗体

(57)摘要

本发明涉及特异性结合OX40的抗体和特异性结合4-1BB的抗体。本发明还涉及对共刺激性TNF受体特异性的双特异性抗体。本发明涉及新颖的双特异性抗原结合分子,其包含(a)至少一个能够特异性结合靶细胞抗原的模块,(b)至少一个能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的模块,和(c)由能够稳定联合的第一和第二亚基构成的Fc域,及生成这些分子的方法和使用它们的方法。



CN 115594765 A

1.一种特异性结合OX40的抗体,其中所述抗体包含

(i)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的轻链可变区VL,

(ii)包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的轻链可变区VL,

(iii)包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的轻链可变区VL,

(iv)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的轻链可变区VL,

(v)包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的轻链可变区VL,

(vi)包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的轻链可变区VL,或

(vii)包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的轻链可变区VL。

2.一种特异性结合4-1BB的抗体,其中所述抗体包含

(i)包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的轻链可变区VL,

(ii)包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的轻链可变区VL,

(iii)包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的轻链可变区VL,

(iv)包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的轻链可变区VL,或

(v)包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的轻链可变区VL。

3.一种多核苷酸,其编码权利要求1或2的抗体。

4.一种药物组合物,其包含权利要求1或2的抗体和至少一种药学可接受赋形剂。

5.权利要求1或2的抗体或权利要求3的药物组合物,其用作药物。

6.权利要求1或2的抗体或权利要求3的药物组合物,其用于

(i)刺激T细胞应答,

(ii)支持激活的T细胞的存活,

(iii)治疗感染,

(iv)治疗癌症,

(v)延迟癌症进展,或

(vi)延长罹患癌症的患者的存活。

7.一种在个体中抑制肿瘤细胞生长的方法,其包括对该个体施用有效量的权利要求1或2的抗体或权利要求3的药物组合物以抑制肿瘤细胞生长。

对共刺激性TNF受体特异性的双特异性抗体

[0001] 本申请是申请日为2016年09月29日、中国申请号为201680057465.8、发明名称为“对共刺激性TNF受体特异性的双特异性抗体”的发明申请的第一分案申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及新颖的双特异性抗原结合分子,其包含(a)至少一个能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的模块,(b)至少一个能够特异性结合靶细胞抗原的模块,和(c)由能够稳定联合的第一和第二亚基构成的Fc域。本发明进一步涉及生成这些分子的方法和使用它们的方法。

[0003] 发明背景

[0004] 肿瘤坏死因子受体(TNFR)家族的数个成员在初始T细胞活化后发挥维持T细胞应答的功能且因此在免疫系统的组织和功能中具有关键作用。CD27,4-1BB(CD137),OX40(CD134),HVEM,CD30,和GITR可对T细胞具有共刺激效果,这意味着它们在初始T细胞活化之后维持T细胞应答 (Watts T.H.(2005)Annu.Rev.Immunol.23,23-68)。这些共刺激性TNFR家族成员的效果常常可以是与CD28的效果和彼此在功能上,在时间上,或在空间上隔离的。不同共刺激物对T细胞激活/存活信号的顺序和瞬时调节可能发挥功能,容许应答长存同时维持对T细胞存活的紧密控制。取决于疾病条件,经共刺激性TNF家族成员的刺激可加重或减轻疾病。尽管有这些复杂性,刺激或阻断TNFR家族共刺激物显示数种治疗性应用的希望,包括癌症,感染性疾病,移植,和自身免疫。

[0005] 在数种共刺激分子中,肿瘤坏死因子(TNF)受体家族成员OX40(CD134) 在效应和记忆T细胞的存活和稳态中发挥关键作用(Croft M.et al.(2009), Immunological Reviews 229,173-191)。OX40(CD134)在数种类型的细胞中表达且调节针对感染,肿瘤和自身抗原的免疫应答,而且已经证明它在T细胞,NKT细胞和NK细胞以及嗜中性粒细胞的表面上的表达(Baumann R.et al. (2004),Eur.J.Immunol.34,2268-2275)且显示出响应多种刺激信号而严格可诱导地或强烈地上调。该分子的功能活性已经在每一种OX40表达性细胞类型中证明,提示在体内OX40介导的活性的复杂调节。与T细胞受体触发组合,T细胞上由其天然配体或激动性抗体实现的OX40啮合引起PI3K和NFκB 信号传导途径的协同激活(Song J.et al.(2008)J.Immunology 180(11), 7240-7248)。继而,这对活化的T细胞导致增强的增殖,升高的细胞因子受体和细胞因子生成及更好的存活。在它在效应$CD4^+$或$CD8^+$T细胞中的共刺激性活性以外,OX40触发最近显示抑制T调节细胞的发育和免疫抑制性功能。这种效果有可能至少部分对增强OX40对抗肿瘤或抗微生物免疫应答的活性负有责任。鉴于OX40卷入能扩充T细胞群体,促进细胞因子分泌,和支持T细胞记忆,激动剂包括抗体和可溶性形式的配体OX40L已经成功用于多种临床前肿瘤模型(Weinberg et al.(2000),J.Immunol.164,2160-2169)。

[0006] TNF受体超家族成员4-1BB(CD137)首先被鉴定为其表达经由T细胞活化诱导的分子(Kwon Y.H.and Weissman S.M.(1989),Proc.Natl.Acad.Sci. USA 86,1963-1967)。随后的研究证实4-1BB在T和B淋巴细胞(Snell等人, 2011;Zhang X.et al.(2010),

J.Immunol.184,787-795),NK细胞(Lin W.et al. (2008),Blood 112,699-707),NKT细胞(Kim D.H.et al.(2008),J.Immunol. 180,2062-2068),单核细胞(Kienzle G.and von Kempis J.(2000),Int.Immunol. 12,73-82;Schwarz H.et al.(1995),Blood 85,1043-1052),嗜中性粒细胞 (Heinisch I.V.et al.(2000),Eur.J.Immunol.30,3441-3446),肥大细胞 (Nishimoto H.et al.(2005),Blood 106,4241-4248)和树突细胞以及非造血来源的细胞如内皮细胞和平滑肌细胞(Broll K.et al.(2001),Am.J.Clin.Pathol.115, 543-549;Olofsson P.S.et al.(2008),Circulation 117,1292-1301)中表达。4-1BB在不同细胞类型中的表达大多可由各种刺激信号诱导和驱动,例如T 细胞受体(TCR)或B细胞受体触发,以及通过共刺激分子或促炎细胞因子的受体诱导的信号传导(Diehl L.et al.(2002),J.Immunol.168,3755-3762;von Kempis J.et al.(1997),Osteoarthritis Cartilage 5, 394-406;Zhang X.et al. (2010),J.Immunol.184,787-795)。

[0007] 已知CD137信号传导刺激NK细胞的IFNγ分泌和增殖(Buechele C.et al.(2012),Eur.J.Immunol.42,737-748;Lin W.et al.(2008),Blood 112, 699-707;Melero I.et al.(1998),Cell Immunol.190,167-172)以及促进DC活化(表现为其存活和分泌细胞因子的能力增加),并上调共刺激分子(Choi B. K.et al.(2009),J.Immunol.182,4107-4115;Futagawa T.et al.(2002),Int. Immunol.14,275-286;Wilcox R.A.et al.(2002),J.Immunol.168, 4262-4267)。然而,CD137最好被表征为调节T细胞的$CD4^+$和$CD8^+$亚群的TCR诱导性活化的共刺激分子。与TCR触发联合,激动性4-1BB特异性抗体增强T细胞的增殖,刺激淋巴因子分泌并降低T淋巴细胞对活化诱导的细胞死亡的敏感性(Snell L.M.et al.(2011)Immunol.Rev.244,197-217)。与4-1BB 抗体对体外T细胞的这些共刺激效应一致,在许多实验性肿瘤模型中将其施用于荷瘤小鼠导致有效的抗肿瘤作用(Melero I.et al.(1997),Nat.Med.3, 682-685;Narazaki H.et al.(2010),Blood 115,1941-1948)。体内消耗实验证明,$CD8^+$T细胞在4-1BB特异性抗体的抗肿瘤作用中起最关键的作用。然而,取决于肿瘤模型或包括抗4-1BB的联合疗法,已经报道了其他类型的细胞如DC,NK细胞或$CD4^+$T细胞的作用(Murillo O.et al.(2009),Eur.J. Immunol.39,2424-2436;Stagg J.et al.(2011),Proc.Natl.Acad.Sci.USA 108, 7142-7147)。

[0008] 在4-1BB激动剂对不同淋巴细胞亚群的直接作用之外,通过4-1BB介导的细胞间粘附分子1(ICAM1)和肿瘤血管内皮上的血管细胞粘附分子1 (VCAM1)的上调,4-1BB激动剂还可以诱导肿瘤中活化T细胞的浸润和保留 (Palazon A.et al.(2011),Cancer Res.71,801-811)。4-1BB触发还可以逆转由暴露于可溶性抗原诱导的T细胞无反应性的状态,其可能有助于破坏肿瘤微环境中或慢性感染期间的免疫耐受性(Wilcox R.A.et al.(2004),Blood 103, 177-184)。

[0009] 似乎4-1BB激动性抗体在体内的免疫调节特性需要在抗体分子上野生型 Fc部分的存在,从而提示Fc-受体结合为此类试剂的药理学活性所需的重要事件,所述试剂被描述为对TNFR超家族的其他的细胞凋亡诱导或免疫调节成员特异的激动性抗体(Li F.and Ravetch J.V.(2011),Science 333, 1030-1034;Teng M.W.et al.(2009),J.Immunol.183,1911-1920)。然而,在小鼠中,具有功能活性Fc域的4-1BB特异性激动性抗体的全身给药也诱导了与肝毒性相关的$CD8^+$T细胞扩增(Dubrot J.et al.(2010),Cancer Immunol. Immunother.59,1223-1233),在不存在功能性Fc受体的情况下,肝毒性减弱或显

著减轻。在人类临床试验(ClinicalTrials.gov,NCT00309023)中,每三周施用一次的有Fc活性的4-1BB激动性抗体(BMS-663513)持续12周诱导了黑素瘤,卵巢癌或肾细胞癌患者的病情稳定。然而,在另一项试验 (NCT00612664)中给予的相同抗体引起4级肝炎,导致试验终止(Simeone E. and Ascierto P.A.(2012),J.Immunotoxicology 9,241-247)。如此,需要新一代激动剂,它们不仅会有效地使4-1BB接合在造血细胞和内皮细胞的表面上,而且还能通过除了与Fc受体结合之外的机制来实现这种接合,以避免不可控制的副作用。

[0010] 可用的临床前和临床数据清楚地表明,能够诱导和增强有效的针对癌症的内源免疫应答的,共刺激性TNFR家族成员诸如Ox40和4-1BB的有效激动剂的临床需求很高。然而,效果几乎从未限于单一细胞类型或经由单一机制的作用,而且设计用于阐明细胞间和细胞内信号传导机制的研究揭示了水平增长中的复杂性。如此,需要优选作用于单一细胞类型的“靶向”激动剂。本发明的抗原结合分子将能够优选地与肿瘤特异性或肿瘤相关靶标结合的模块与能够激动性结合共刺激性TNF受体的模块组合。本发明的抗原结合分子可能能够不仅有效触发TNF受体,而且非常选择性地在期望部位触发TNF受体,由此减轻不想要的副作用。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明涉及组合至少一个能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的模块,即至少一个靶向共刺激性TNF受体的抗原结合位点与至少一个能够特异性结合靶细胞抗原的模块,即至少一个靶向靶细胞抗原的抗原结合位点的双特异性抗原结合分子。这些双特异性抗原结合分子是有利的,因为它们会优选在靶细胞抗原表达的部位激活共刺激性TNF受体,这是由于它们针对靶细胞抗原的结合能力所致。本发明还提供新颖的能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的抗体。与已知的针对共刺激性TNF受体的抗体相比,这些抗体具有对于与能够特异性结合靶细胞抗原的模块组合将它们并入双特异性抗原结合分子有利的特性。

[0013] 在一个方面,本发明提供一种双特异性抗原结合分子,其包含

[0014] (a)至少一个能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的模块,

[0015] (b)至少一个能够特异性结合靶细胞抗原的模块,和

[0016] (c)由能够稳定联合的第一和第二亚基构成的Fc域。

[0017] 在一个特定的方面,该双特异性抗原结合分子包含(a)至少一个能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的模块,其中该共刺激性TNF受体家族成员选自由OX40和4-1BB组成的组,(b)至少一个能够特异性结合靶细胞抗原的模块,和(c)由能够稳定联合的第一和第二亚基构成的Fc域。

[0018] 在一个方面,该共刺激性TNF受体家族成员是OX40。如此,在一个特定的方面,该能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的模块结合包含 SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽。

[0019] 在又一个方面,提供的是一种双特异性抗原结合分子,其包含至少一个能够特异性结合OX40的模块,其中所述模块包含

[0020] VH域,其包含

[0021] (i)包含选自由SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3组成的组的氨基酸序列的 CDR-H1,

[0022] (ii)包含选自由SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5组成的组的氨基酸序列的 CDR-H2,

和

[0023] (iii)包含选自由SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12组成的组的氨基酸序列的CDR-H3,

[0024] 和VL域,其包含

[0025] (iv)包含选自由SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15组成的组的氨基酸序列的CDR-L1,

[0026] (v)包含选自由SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18组成的组的氨基酸序列的CDR-L2,和

[0027] (vi)包含选自由SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24组成的组的氨基酸序列的 CDR-L3。

[0028] 在另一个方面,本发明提供一种双特异性抗原结合分子,其中能够特异性结合OX40的模块包含包含与选自由SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:29,SEQ ID NO:31,SEQ ID NO:33,SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:37组成的组的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的重链可变区VH和包含与SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:30,SEQ ID NO:30,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:34,SEQ ID NO:36和SEQ ID NO:38的氨基酸序列至少约95%,96%,97%, 98%,99%或100%同一的氨基酸序列的轻链可变区VL。

[0029] 特别地,提供了一种双特异性抗原结合分子,其中能够特异性结合 OX40的模块包含

[0030] (i)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:26 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0031] (ii)包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:28 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0032] (iii)包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:30 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0033] (iv)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:32 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0034] (v)包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:34 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0035] (vi)包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:36 的氨基酸序列的轻链可变区VL,或

[0036] (vii)包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:38 的氨基酸序列的轻链可变区VL。

[0037] 在另一个方面,该共刺激性TNF受体家族成员是4-1BB。如此,在一个特定的方面,该能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的模块结合包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的多肽。

[0038] 而且,提供的是一种双特异性抗原结合分子,其包含至少一个能够特异性结合4-1BB的模块,其中所述模块包含

[0039] VH域,其包含

[0040] (i)包含选自由SEQ ID NO:40和SEQ ID NO:41组成的组的氨基酸序列的 CDR-H1，

[0041] (ii)包含选自由SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:43组成的组的氨基酸序列的 CDR-H2,和

[0042] (iii)包含选自由SEQ ID NO:44,SEQ ID NO:45,SEQ ID NO:46,SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48组成的组的氨基酸序列的CDR-H3，

[0043] 和VL域,其包含

[0044] (iv)包含选自由SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:50组成的组的氨基酸序列的 CDR-L1，

[0045] (v)包含选自由SEQ ID NO:51和SEQ ID NO:52组成的组的氨基酸序列的 CDR-L2，和

[0046] (vi)包含选自由SEQ ID NO:53,SEQ ID NO:54,SEQ ID NO:55,SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57组成的组的氨基酸序列的CDR-L3。

[0047] 在另一个方面,本发明提供一种双特异性抗原结合分子,其中能够特异性结合4-1BB的模块包含包含与选自由SEQ ID NO:58,SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:62,SEQ ID NO:64和SEQ ID NO:66组成的组的氨基酸序列至少约95％,96％,97％,98％,99％或100％同一的氨基酸序列的重链可变区 VH和包含与选自由SEQ ID NO:59,SEQ ID NO:61,SEQ ID NO:63,SEQ ID NO:65和SEQ ID NO:67组成的组的氨基酸序列至少约95％,96％,97％, 98％,99％或100％同一的氨基酸序列的轻链可变区。

[0048] 特别地,提供了一种双特异性抗原结合分子,其中能够特异性结合 4-1BB的模块包含

[0049] (i)包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:59 的氨基酸序列的轻链可变区VL，

[0050] (ii)包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:61 的氨基酸序列的轻链可变区VL，

[0051] (iii)包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:63 的氨基酸序列的轻链可变区VL，

[0052] (iv)包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:65 的氨基酸序列的轻链可变区VL,或

[0053] (v)包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:67 的氨基酸序列的轻链可变区VL。

[0054] 在一个特定的方面,本发明提供一种双特异性抗原结合分子,其包含

[0055] (a)至少一个能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的模块，

[0056] (b)至少一个能够特异性结合靶细胞抗原的模块,和

[0057] (c)由能够稳定联合的第一和第二亚基构成的Fc域,其中该能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的模块是Fab片段。在一个方面,如果该双特异性抗原结合分子包含超过一个能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的模块,那么所有能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的模块是Fab片段。

[0058] 在另一个方面,该双特异性抗原结合分子包含(a)至少一个能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的模块,(b)至少一个能够特异性结合靶细胞抗原的模块,其中该靶

细胞抗原选自由成纤维细胞激活蛋白(FAP),黑素瘤相关硫酸软骨素蛋白聚糖(MCSP),表皮生长因子受体(EGFR),癌胚抗原 (CEA),CD19,CD20和CD33组成的组,和(c)由能够稳定联合的第一和第二亚基构成的Fc域。更加特别地,该靶细胞抗原是成纤维细胞激活蛋白 (FAP)。

[0059] 在一个特定的方面,提供的是一种双特异性抗原结合分子,其中能够特异性结合FAP的模块包含

[0060] VH域,其包含

[0061] (i)包含选自由SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69组成的组的氨基酸序列的 CDR-H1,

[0062] (ii)包含选自由SEQ ID NO:70和SEQ ID NO:71组成的组的氨基酸序列的 CDR-H2,和

[0063] (iii)包含选自由SEQ ID NO:72和SEQ ID NO:73组成的组的氨基酸序列的 CDR-H3,

[0064] 和VL域,其包含

[0065] (iv)包含选自由SEQ ID NO:74和SEQ ID NO:75组成的组的氨基酸序列的 CDR-L1,

[0066] (v)包含选自由SEQ ID NO:76和SEQ ID NO:77组成的组的氨基酸序列的 CDR-L2,和

[0067] (vi)包含选自由SEQ ID NO:78和SEQ ID NO:79组成的组的氨基酸序列的 CDR-L3。

[0068] 如此,在又一个方面,本发明提供一种双特异性抗原结合分子,其中

[0069] (i)能够特异性结合OX40的模块包含包含与SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:29,SEQ ID NO:31,SEQ ID NO:33,SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:37的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的重链可变区VH和包含与SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:30,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:34,SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:38的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的轻链可变区,且

[0070] (ii)能够特异性结合FAP的模块包含包含与SEQ ID NO:80或SEQ ID NO:82 的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的重链可变区VH和包含与SEQ ID NO:81或SEQ ID NO:83的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的轻链可变区。

[0071] 在一个方面,本发明提供一种双特异性抗原结合分子,其中

[0072] (i)能够特异性结合OX40的模块包含包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的轻链可变区,且

[0073] (ii)能够特异性结合FAP的模块包含包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列的轻链可变区。

[0074] 在另一个方面,本发明提供一种双特异性抗原结合分子,其中

[0075] (i)能够特异性结合4-1BB的模块包含包含与SEQ ID NO:58,SEQ ID NO:60,SEQ ID NO:62,SEQ ID NO:64或SEQ ID NO:66的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的重链可变区VH和包含与SEQ ID NO:59,SEQ ID NO:61,SEQ ID NO:63,SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:67的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%, 99%或

100％同一的氨基酸序列的轻链可变区，且

[0076] (ii)能够特异性结合FAP的模块包含包含与SEQ ID NO:80或SEQ ID NO:82 的氨基酸序列至少约95％，96％，97％，98％，99％或100％同一的氨基酸序列的重链可变区VH和包含与SEQ ID NO:81或SEQ ID NO:83的氨基酸序列至少约95％，96％，97％，98％，99％或100％同一的氨基酸序列的轻链可变区。

[0077] 在又一个方面，提供的是一种双特异性抗原结合分子，其中所述分子包含

[0078] (a)能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的第一Fab片段，

[0079] (b)能够特异性结合靶细胞抗原的第二Fab片段，和

[0080] (c)由能够稳定联合的第一和第二亚基构成的Fc域。

[0081] 在一个方面，该双特异性抗原结合分子是人，人源化或嵌合抗体。特别地，该Fc域是人IgG域，特别是IgG1 Fc域或IgG4 Fc域。

[0082] 在又一个方面，提供的是一种双特异性抗原结合分子，其中Fc域包含一处或多处降低抗体对Fc受体的结合亲和力和/或效应器功能的氨基酸替代。特别地，该Fc域是人IgG1亚类的，具有氨基酸突变L234A，L235A和 P329G(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0083] 在又一个方面，提供的是一种双特异性抗原结合分子，其中Fc域包含促进Fc域的第一和第二亚基联合的修饰。在一个特定的方面，本发明提供一种双特异性抗原结合分子，其中依照节入穴方法，Fc域的第一亚基包含节且Fc域的第二亚基包含穴。更加特别地，该Fc域的第一亚基包含氨基酸替代S354C和T366W(编号方式依照Kabat EU索引)且该Fc域的第二亚基包含氨基酸替代Y349C，T366S和Y407V(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0084] 特别地，本发明提供一种双特异性抗原结合分子，其包含

[0085] (a)两个能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的模块，

[0086] (b)两个能够特异性结合靶细胞抗原的模块，和

[0087] (c)由能够稳定联合的第一和第二亚基构成的Fc域。

[0088] 如此，提供的是一种双特异性抗原结合分子，其中该双特异性抗原结合分子对于共刺激性TNF受体家族成员和靶细胞抗原二者是二价的。

[0089] 在一个特定的方面，该双特异性抗原结合分子包含

[0090] (a)包含两个能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的Fab片段和Fc域的抗体的两条轻链和两条重链，和

[0091] (b)两个另外的能够特异性结合靶细胞抗原的Fab片段，其中所述另外的Fab 片段各自经肽接头连接至(a)的重链的C端。更加特别地，该两个另外的能够特异性结合靶细胞抗原的Fab片段是交叉Fab片段，其中可变域VL 和VH彼此替换且VL-CH链各自经肽接头连接至(a)的重链的C端。

[0092] 在一个方面，该两个能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的Fab 片段是两个能够特异性结合OX40或4-1BB的Fab片段且该两个另外的能够特异性结合靶细胞抗原的Fab片段是能够特异性结合FAP的交叉Fab片段。

[0093] 在另一个方面，本发明提供一种双特异性抗原结合分子，其包含

[0094] (a)两个能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的模块，

[0095] (b)一个能够特异性结合靶细胞抗原的模块，和

[0096] (c)由能够稳定联合的第一和第二亚基构成的Fc域。

[0097] 如此,提供的是一种双特异性抗原结合分子,其中该双特异性抗原结合分子对于共刺激性TNF受体家族成员是二价的且对于靶细胞抗原是单价的。

[0098] 在一个特定的方面,该双特异性抗原结合分子包含

[0099] (a)包含两个能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的Fab片段和Fc域的抗体的两条轻链和两条重链,和

[0100] (b)能够特异性结合靶细胞抗原的VH和VL域,其中该VH域经肽接头连接至该重链之一的C端且其中该VL域经肽接头连接至第二重链的C端。

[0101] 在另一个方面,本发明提供一种特异性结合OX40的抗体,其中所述抗体包含

[0102] (i)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:26 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0103] (ii)包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:28 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0104] (iii)包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:30 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0105] (iv)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:32 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0106] (v)包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:34 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0107] (vi)包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:36 的氨基酸序列的轻链可变区VL,或

[0108] (vii)包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:38 的氨基酸序列的轻链可变区VL。

[0109] 在还有另一个方面,提供的是一种特异性结合4-1BB的抗体,其中所述抗体包含

[0110] (i)包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:59 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0111] (ii)包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:61 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0112] (iii)包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:63 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0113] (iv)包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:65 的氨基酸序列的轻链可变区VL,或

[0114] (v)包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:67 的氨基酸序列的轻链可变区VL。

[0115] 依照本发明的另一个方面,提供了一种分离的多核苷酸,其编码如之前本文中描述的双特异性抗原结合分子或如之前本文中描述的特异性结合 OX40的抗体或如之前本文中描述的特异性结合4-1BB的抗体。本发明进一步提供一种载体,特别是表达载体,其包含本发明的分离的多核苷酸和一种宿主细胞,其包含本发明的分离的多核苷酸或载体。在一些方面,该宿主细胞是真核细胞,特别是哺乳动物细胞。

[0116] 在另一个方面,提供的是一种用于生成如之前本文中描述的双特异性抗原结合分

子或如之前本文中描述的特异性结合OX40的抗体或如之前本文中描述的特异性结合4-1BB的抗体的方法,其包括下述步骤:(i)在适合于该抗原结合分子表达的条件下培养本发明的宿主细胞,并(ii)回收该抗原结合分子。本发明还涵盖通过本发明的方法生成的双特异性抗原结合分子或特异性结合OX40的抗体或特异性结合4-1BB的抗体。

[0117] 本发明进一步提供一种药物组合物,其包含如之前本文中描述的双特异性抗原结合分子或如之前本文中描述的特异性结合OX40的抗体或如之前本文中描述的特异性结合4-1BB的抗体和至少一种药学可接受赋形剂。

[0118] 本发明还涵盖的是如之前本文中描述的双特异性抗原结合分子或如之前本文中描述的特异性结合OX40的抗体或如之前本文中描述的特异性结合 4-1BB的抗体,或包含该双特异性抗原结合分子或该特异性结合OX40的抗体或该特异性结合4-1BB的抗体的药物组合物,其用作药物。

[0119] 在一个方面,提供的是如之前本文中描述的双特异性抗原结合分子或如之前本文中描述的特异性结合OX40的抗体或如之前本文中描述的特异性结合4-1BB的抗体或本发明的药物组合物,其用于

[0120] (i)刺激T细胞应答,

[0121] (ii)支持激活的T细胞的存活,

[0122] (iii)治疗感染,

[0123] (iv)治疗癌症,

[0124] (v)延迟癌症进展,或

[0125] (vi)延长罹患癌症的患者的存活。

[0126] 在一个具体的实施方案中,提供的是如之前本文中描述的双特异性抗原结合分子或如之前本文中描述的特异性结合OX40的抗体或如之前本文中描述的特异性结合4-1BB的抗体,或本发明的药物组合物,其用于治疗癌症。

[0127] 在另一个具体的方面,本发明提供如之前本文中描述的双特异性抗原结合分子或如之前本文中描述的特异性结合OX40的抗体或如之前本文中描述的特异性结合4-1BB的抗体,其用于治疗癌症,其中与化疗剂,放射和/ 或其它用于癌症免疫疗法的药剂组合施用该双特异性抗原结合分子。

[0128] 在又一个方面,本发明提供一种在个体中抑制肿瘤细胞生长的方法,其包括对该个体施用有效量的如之前本文中描述的双特异性抗原结合分子或如之前本文中描述的特异性结合OX40的抗体或如之前本文中描述的特异性结合4-1BB的抗体,或本发明的药物组合物以抑制肿瘤细胞生长。

[0129] 还提供的是如之前本文中描述的双特异性抗原结合分子或如之前本文中描述的特异性结合OX40的抗体或如之前本文中描述的特异性结合4-1BB 的抗体用于制造用于在有所需要的个体中治疗疾病的药物,特别是用于制造用于治疗癌症的药物的用途,以及一种在个体中治疗疾病的方法,其包括对所述个体施用治疗有效量的组合物,其包含药学可接受形式的本发明的双特异性抗原结合分子。在一个具体的方面,该疾病是癌症。在任何上述方面,该个体是哺乳动物,特别是人。

[0130] 附图简述

[0131] 图1A显示用于制备TNF受体抗体的单体形式的Fc连接的TNF受体抗原。图1B显示用

于测试在TNF配体存在下TNF受体抗体的结合(配体阻断特性)的具有C端Ha标签的二聚体人TNF受体抗原-Fc融合分子。实施例2.4中描述的实验的示意性设置在图1C中显示。

[0132] 图2显示抗OX40抗体对激活的人$CD4^+$和$CD8^+$T细胞的结合。OX40并不在静息的人PBMC上表达(图2A和2C)。人PBMC激活后,$CD4^+$和$CD8^+$T细胞上的OX40上调(图2B和2D)。人$CD8^+$T细胞上的OX40表达比$CD4^+$T细胞上的要低。所描绘的克隆在它们对OX40阳性细胞的结合强度(EC_{50}值以及信号强度)方面有不同。所显示的是作为用作检测二抗的FITC标记的抗人IgG Fcγ特异性山羊IgG F(ab')$_2$片段的荧光强度中值(MFI)的结合。MFI是通过流式细胞术测量的且基线通过减去空白对照的MFI来修正。x轴显示抗体构建物的浓度。所有OX40克隆确实结合激活的,表达OX40的人$CD4^+$T细胞且以更低的程度结合激活的人$CD8^+$T细胞。

[0133] 图3显示抗OX40抗体对激活的小鼠$CD4^+$和$CD8^+$T细胞的结合。在静息的小鼠脾细胞上没有检测到OX40(图3A和3C)。激活后,$CD4^+$和$CD8^+$T细胞上的OX40上调(图3B和3D)。通过用ACK裂解缓冲液对机械匀浆的自6-8 周龄雌性C57BL/6小鼠获得的脾进行红细胞裂解来分离小鼠脾细胞。使用 FACS分析用缀合至FITC的山羊抗人IgG Fc特异性二抗检测抗OX40抗体对细胞表面蛋白质的结合。MFI通过流式细胞术来测量且基线通过减去空白对照的MFI来修正。x轴显示抗体构建物的浓度。只有克隆20B7确实结合激活的,表达OX40的小鼠CD4和CD8 T细胞,但是并不结合静息的T细胞。

[0134] 图4显示抗OX40抗体对激活的食蟹猴$CD4^+$和$CD8^+$T细胞的结合。所描绘的克隆在它们对激活的OX40阳性食蟹猴$CD4^+$T细胞的结合强度(EC_{50}值以及信号强度)方面有不同(图4A)。激活的$CD8^+$T细胞上的OX40表达在这种条件下较低且很难找到选定克隆的任何结合(图4B)。使用FACS分析用缀合至 FITC的山羊抗人IgG Fc特异性二抗检测抗OX40抗体对细胞表面蛋白质的结合。MFI通过流式细胞术来测量且基线通过减去空白对照的MFI来修正。x轴显示抗体构建物的浓度。所有OX40克隆确实结合激活的,表达OX40的食蟹猴$CD4^+$T细胞且以更低的程度结合激活的食蟹猴$CD8^+$T细胞。

[0135] 图5显示缺乏对OX40阴性肿瘤细胞的结合。所描绘的克隆显示不结合 OX40阴性U-78MG(图5A)和WM266-4肿瘤细胞(图5B)。所显示的是作为用作检测二抗的FITC标记的抗人IgG Fcγ特异性山羊IgG F(ab')$_2$片段的荧光强度中值(MFI)的结合。MFI通过流式细胞术来测量且基线通过减去空白对照的MFI来修正。x轴显示抗体构建物的浓度。IgG格式的所有克隆并不结合 OX40阴性肿瘤细胞。结合是对激活的白细胞上的OX40特异性的。

[0136] 图6A至6F显示抗0x40抗体8H9(图6A),20B7(图6B),1G4(图6C), 49B4(图6D),CLC-563(图6E)和CLC-564(图6F)和预形成的复合物hu0x40 配体/hu0x40-Fc之间的相互作用,如通过表面等离振子共振测量的。

[0137] 图7显示本发明的抗人OX40抗体对表达人OX40和报告基因NFκB-萤光素酶的HeLa细胞的影响。所显示的是在有(图7B)或无(图7A)通过二抗的交联的情况下用P329GLALA huIgG1格式的多种抗OX40结合物对报告细胞系中NF-κB信号传导途径的激活。将报告细胞在所示浓度的抗OX40构建物存在下在有或无交联性二级多克隆抗huIgG1 Fcγ特异性山羊IgG F(ab)2片段的情况下(以1:2比率)培养6小时。通过将在0.5秒期间测量到的释放光单位 (URL)对所测试的抗0x40构建物以nM计的浓度绘图来表征活性。由于萤光素酶介导的萤光素变成氧合萤光素的氧化而发射URL。当人$OX40^+$报告细胞系中的OX40轴受到触发时,所有克隆能够诱导NFκB激活。所有克隆因此是激动性的且以剂量依赖性方式激活。通过Fc部

分特异性二抗的交联强烈提高这种激动作用。

[0138] 图8A-8F显示抗人OX40抗体在预激活的人CD4 T细胞中的生物活性。用板固定化的抗Ox40结合物(huIgG1 P329GLALA格式)的共刺激促进亚最佳再刺激的人CD4 T细胞的细胞增殖和成熟并诱导增强的激活表型。将PHA-L预激活的CFSE标记的人CD4 T细胞在用小鼠IgG Fcγ特异性抗体,人IgG Fcγ特异性抗体(均为2μg/mL),小鼠抗人CD3抗体(克隆OKT3,[3ng/mL])和所滴定的抗Ox40结合物(huIgG1 P329GLALA格式)预包被的板上培养4天。所显示的是第4天时的事件计数(图8A),增殖中的($CFSE^{低}$)细胞的百分比(图8B),效应T细胞($CD127^{低}/CD45RA^{低}$)的百分比(图8C)和$CD62L^{低}$(图8D),OX40阳性(图8F)或Tim-3阳性细胞(图8E)的百分比。减去只含有板固定化的抗人 CD3的样品的基线值。因此,这里看得见OX40刺激的增强效果而非亚最佳抗CD3刺激本身的效果。当它们包被至板时,所有克隆均能够支持OX40阳性预激活的CD4 T细胞中的亚最佳TCR刺激。细胞确实存活更好且增殖更多。在肿瘤微环境中,这能导致升高的T细胞的抗肿瘤活性。

[0139] 图9汇总EC_{50}值(所有生物标志物的),作为相应克隆的激动能力的标志物(自图8中显示的曲线计算的值)。效力自左至右升高。将第4天时的事件计数,增殖中的($CFSE^{低}$)细胞的百分比和$CD62L^{低}$,$CD45RA^{低}$或Tim-3阳性细胞的百分比对抗Ox40抗体浓度绘图并使用Prism4(GraphPad Software,USA) 中的内置S型剂量响应表单计算EC_{50}值。

[0140] 图10A-10F显示抗人OX40抗体在溶液中在预激活的人CD4 T细胞中的生物活性。在抗Ox40结合物(hu IgG1 P329GLALA格式)的板固定化缺失下没有检测到对亚最佳再刺激的人CD4 T细胞的细胞增殖,成熟或激活状态的影响。将PHA-L预激活的CFSE-标记的人CD4 T细胞在用小鼠IgG Fcγ特异性抗体和小鼠抗人CD3抗体(克隆OKT3,[3ng/mL])预包被的板上培养4天。将所滴定的抗Ox40结合物(hu IgG1 P329GLALA格式)添加至培养基并贯穿实验存在于溶液中。所显示的是第4天时事件计数(图10A),增殖中的($CFSE^{低}$)细胞的百分比(图10B),效应T细胞($CD127^{低}CD45RA^{低}$)的百分比(图10C)和 $CD62L^{低}$(图10E),OX40阳性(图10F)或Tim-3阳性细胞的百分比(图10E)。减去只含有板固定化的抗人CD3的样品的基线值。因此,这里看得见OX40刺激的增强效果而非亚最佳抗CD3刺激本身的效果。在强交联(P329GLALA格式,在溶液中)缺失下没有改善的TCR刺激。交联因此是二价aOx40格式成为对于T细胞是激动性的所必需的。这种交联会以靶向性格式通过肿瘤或肿瘤基底细胞的细胞表面上表达的FAP来提供。

[0141] 图11显示不同抗OX40克隆的结合强度和激动性能力之间的关联。如实施例2.1.2中描述的实施抗Ox40克隆(huIgG1 P329GLALA格式)对激活的CD4 T细胞的结合。将高台值针对用克隆8H9(huIgG1 P329GLALA格式)获得的值标准化。如实施例3.2中描述的实施抗Ox40克隆(huIgG1 P329GLALA格式) 的生物活性测试并将PD-1表达的高台值针对用克隆8H9(huIgG1 P329GLALA格式)获得的值标准化。将标准化结合针对标准化生物活性绘图,以测试结合强度和激动性能力之间的关联。大多数克隆有直接关联(显示了线性回归,p值0.96;斜率0.91)。然而,两个克隆(49B4,1G4)显示比根据它们的结合强度能预测的要强得多的生物活性。面对低结合能力显示出乎意料的高激动性效力的这个亚组的克隆对于本发明的双特异性抗原结合分子是特别感兴趣的。

[0142] 在图12A中显示本发明的一种例示性双特异性,二价抗原结合分子(2+2 格式)的示意图,其包含两个结合OX40的Fab片段和两个结合FAP的交叉Fab 片段。图12B显示本发明

的一种例示性双特异性,单价抗原结合分子(1+1格式)的示意图,其包含一个结合OX40的Fab片段和一个结合FAP的交叉Fab片段。在图12C中显示SPR实验的设置,其显示对固定化的人OX40或人4-1BB 和人FAP的同时结合。在图12D中显示一种例示性双特异性抗原结合分子的示意图,它对于结合OX40是二价的且对于结合FAP是单价的。它包含两个结合OX40的Fab片段和一个结合FAP的VH和VL域。黑色点作为重链中的节入穴修饰的象征。在图12E中显示SPR实验的设置,其展示对FAP的结合,如实施例5.4.1中描述的。图12F显示如何测量对固定化的人OX40和人FAP的同时结合(实施例5.4.1)。

[0143] 图13A-13D显示双特异性二价2+2构建物(分析物1)对固定化的人OX40 和人FAP(分析物2)的同时结合的SPR图示。在图13E-13H中,显示了双特异性单价1+1构建物(分析物1)对固定化的人OX40和人FAP(分析物2)的同时结合。在图13J-13L中,显示了双特异性2+1构建物(分析物1)对固定化的人 OX40和人FAP(分析物2)的同时结合。图13M显示在基于细胞的FRET测定法(TagLite)中双特异性2+1构建物对hu OX40的结合(实施例5.4.2)。数据显示 2+1构建物中的两个抗OX40 Fab域以与常见IgG抗体相当的方式结合hu OX40。

[0144] 图14A-14D和14E-14H分别显示FAP靶向性单价或二价格式的选定的抗 OX40结合物(克隆8H9,1G4)对静息的和激活的人PBMC的结合。对OX40阳性T细胞的结合特征(图14B和14D)对于常规二价hu IgG格式(空心正方形)和 FAP靶向性二价格式(实心正方形)的克隆是相当的。FAP靶向性单价格式的相同克隆(实心三角形)的结合由于亲合结合的损失而明显更弱。在表达人 OX40的细胞缺失下未能观察到结合(静息的细胞,左图)。所显示的是作为用作检测二抗的FITC标记的抗人IgG Fcγ特异性山羊IgG $F(ab')_2$片段的荧光强度中值(MFI)的结合。MFI通过流式细胞术来测量且基线通过减去空白对照的MFI来修正(见实施例4.3.2.1)。DP88 huIgG1 P329G LALA是用作对照的同种型抗体。x轴显示抗体构建物的浓度。在图14A-14D中能看到克隆1G4 结合激活的,表达OX40的人CD4 T细胞且以更低的程度结合激活的人CD8 T细胞。二价构建物结合比单价构建物要强。构建物并不结合静息的OX40阴性T细胞。图14E-14H显示克隆8H9结合激活的表达OX40的人CD4 T细胞且以更低的程度结合激活的人CD8 T细胞。二价构建物结合比单价构建物要强。构建物并不结合静息的OX40阴性T细胞。在图14J-14M中还显示了二价 FAP靶向性OX40构建物显示比单价抗体格式的相应克隆要强的对OX40阳性细胞的结合特征。图14N-14Q显示不同2+1构建物以相似强度结合OX40阳性 T细胞,不依赖于第二结合模块。

[0145] 图15A和15B显示FAP靶向性单价或二价格式的选定抗OX40结合物(克隆8H9,1G4)对FAP阳性肿瘤细胞的结合。转基因经修饰小鼠胚胎成纤维细胞NIH/3T3-huFAP克隆39或WM266-4细胞表达高水平的人成纤维细胞激活蛋白(huFAP)。只有FAP靶向性单和二价抗Ox40构建物(实心正方形和三角形) 而非人IgG1 P329GLALA格式的相同克隆(空心正方形)分别结合 NIH/3T3-huFAP克隆39细胞(图15A)和WM266-4细胞(图15B)。所显示的是作为用作检测二抗的异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗人IgG Fcγ特异性山羊IgG $F(ab')_2$片段的荧光强度中值(MFI)的结合。MFI是通过流式细胞术测量的。x 轴显示抗体构建物的浓度。二价FAP构建物结合比单价构建物要强。图 15C,15D,15E和15F显示对表达人FAP的肿瘤细胞的结合(更多详情见实施例4.5.4.2)。

[0146] 图16A至16G显示在高交联存在或缺失下单价或二价FAP靶向性格式的选定结合物(8H9,1G4)所致NFκB激活。所显示的是报告细胞中单价(实心三角形)或二价(实心正方形)

FAP靶向性格式或非靶向性hu IgG P329GLALA 抗体(空心正方形)的选定结合物1G4(图16A-16D)和8H9(图16E-16G)所致 NFκB信号传导途径的激活。高交联通过抗hu IgG Fcγ特异性二抗(一抗对二抗比率1:2)或经由表达FAP的NIH/3T3-huFAP克隆39和WM266-4肿瘤细胞 (FAP^+肿瘤细胞对报告细胞比率2:1)任一来提供。NFκB介导的萤光素酶活性通过将在0.5秒期间测量到的释放光单位(URL)对所测试的化合物以nM计的浓度绘图来表征。由于萤光素酶介导的萤光素变成氧合萤光素的氧化而发射URL。通过减去空白对照的URL对值进行基线修正。在图16A中能看到所有含有克隆1G4的构建物均能够在$Ox40^+$HeLa报告细胞中诱导NFκB激活。通过抗IgG Fcγ特异性二抗的交联强烈提高NFκB激活。然而添加FAP阳性细胞(NIH或WM266-4)仅仅提高FAP靶向性分子而非P329GLALA IgG格式的激动潜力。所实施的二价构建物明显比单价构建物要好。在图16E-16G中显示了所有含有克隆8H9的构建物均能够在$OX40^+$HeLa报告细胞中诱导NFκB激活。通过抗IgG Fcγ特异性二抗的交联体强烈提高NFκB激活。然而添加FAP 阳性细胞(NIH)仅仅提高FAP靶向性分子而非P329GLALA IgG格式的激动潜力。所实施的二价构建物略微比单价构建物要好。在图16H,16J和16K中也能看到具有针对OX40的单价结合的构建物(1+1)效率比具有针对OX40的二价结合的构建物(2+1和2+2构建物)要低。进一步的数据在图16L,16M和 16N中及在实施例5.1中给出。

[0147] 板固定化的FAP靶向性单和二价抗OX40(1G4和8H9)构建物对预激活的 CD4 T细胞的亚最佳TCR再刺激的挽救在图17A和17B中及在图18A-18D中显示。板固定化的抗Ox40结合物(huIgG1 P329GLALA格式)的共刺激促进亚最佳再刺激的人CD4 T细胞的细胞增殖和成熟且诱导增强的激活表型。将 PHA-L预激活的CFSE标记的人CD4 T细胞在用小鼠IgG Fcγ特异性抗体,人 IgG Fcγ特异性抗体(均为2μg/mL),小鼠抗人CD3抗体(克隆OKT3,[3 ng/mL])和所滴定的抗Ox40结合物(huIgG1 P329GLALA格式)预包被的板上培养4天。所显示的是第4天时事件计数,增殖中的($CFSE^{低}$)细胞的百分比,效应T细胞($CD127^{低}CD45RA^{低}$)的百分比和$CD62L^{低}$,OX40阳性或Tim-3阳性细胞的百分比。减去只含有板固定化的抗人CD3的样品的基线值。因此,这里看得见OX40刺激的增强效果而非亚最佳抗CD3刺激本身的效果。在图17A和17B中能看到当包被至板时,所有含有克隆8H9的构建物均能够挽救预激活的$Ox40^+$ CD4 T细胞的亚最佳TCR刺激。细胞显示更加激活的($Tim3^+$ FSC^+)表型。二价构建物表现略微比单价构建物要好。在图18A-18D中能观察到当包被至板时,所有含有克隆1G4的构建物均能够挽救预激活的$Ox40^+$ CD4 T细胞的亚最佳TCR刺激。细胞增殖更多且呈现激活($Tim3^+$ $Ox40^+$)表型。二价构建物表现比单价构建物要好。当包被至板时,所实施的两种二价构建物是相当的。

[0148] 在图19中显示了自用板固定化的FAP靶向性单和二价抗OX40(克隆1G4) 构建物挽救亚最佳TCR刺激计算的EC_{50}值。将第4天时增殖中的($CFSE^{低}$)细胞的百分比和$CD127L^{低}$,Tim-3阳性和OX40阳性细胞的百分比对抗OX40抗体浓度绘图并使用Prism4(GraphPad Software,USA)中的内置S型剂量响应表单计算EC_{50}值,作为激动强度的度量。当包被至板时,所有含有克隆1G4 的构建物均能够挽救预激活$Ox40^+$CD4 T细胞的亚最佳TCR刺激。然而,所实施的二价(2+2)构建物比单价(1+1)构建物要好。

[0149] 图20A-20H涉及OX40介导的亚最佳TCR触发的静息的人PBMC的共刺激和通过细胞表面FAP的高交联。当由FAP阳性细胞(NIH)提供交联时只有含有FAP结合模块的构建物能够挽救预激活的$Ox40^+$CD4 T细胞的亚最佳 TCR刺激。所显示的是事件计数(图20B和20D),低

增殖中的(CFSE^{高})细胞的百分比(图20A和20C)或CD62L(图20F和20H),CD127(图20E)或粒酶B活力 CD4^{+}(图20G)和CD8^{+}T细胞的MFI任一。减去只含有抗人CD3(克隆V9, huIgG1),静息的人PBMC和NIH/3T3-huFAP克隆39的样品的基线值。如此,这里显示OX40共刺激的增强效果而非亚最佳抗CD3刺激本身的效果。细胞存活更好,增殖更多且显示更强的激活(CD62L和CD127^{低})表型。所实施的靶向性二价构建物只是略微比单价构建物要好。非靶向性huIgG1P329GLALA中的克隆8H9在进一步交联缺失下未能挽救亚最佳TCR 刺激。在FAP阳性肿瘤微环境中,这能导致升高的T细胞的抗肿瘤活性,由此避免系统性OX40激活。

[0150] 图21A-21C涉及静息的人CD4细胞使用表面固定化的FAP靶向性单和二价抗OX40(1G4)构建物的激活。非靶向性抗Ox40(1G4)huIgG1的共刺激并不挽救亚最佳TCR刺激的CD4和CD8(数据未显示)T细胞。FAP靶向性单和二价抗Ox40构建物通过当前NIH/3T3-huFAP克隆39细胞的高交联在人CD4 细胞中强烈促进增殖,存活(数据未显示)且诱导增强的激活表型。所显示的是CD4 T细胞上的CD25表达的MFI和CD25^{+}CD4 T细胞的百分比。减去只含有抗人CD3(克隆V9,huIgG1),静息的人PBMC和NIH/3T3-huFAP克隆39的样品的基线值。使用GraphPad Prism中内置的功能作为曲线下面积量化化合物的激动效果并显示了三种不同抗Ox40(1G4)构建物的。所实施的靶向性二价(2+2)构建物比单价(1+1)构建物要好。

[0151] 第二项实验中获得的数据分别在图21D-21H和21J-21N中显示。单价抗 OX40构建物(1+1;实心三角形)比二价抗OX40靶向性构建物(半实心圆圈,实心正方形)不太能够挽救TCR刺激。FAP二价结合性2+2构建物与FAP单价结合性2+1构建物相比早就能够在更低的浓度挽救亚最佳TCR刺激。以2+1 格式,高亲和力FAP结合性克隆4B9与低亲和力克隆28H1相比明显更优(图 21J-21N)。这提示观察到的生物活性的EC_{50}值是由对FAP的结合驱动的 (2+2>2+1(4B9)>2+1(28H1)。在图21P中作为曲线下面积针对所分析的标志物量化每种构建物的激动能力并针对彼此绘图。关于观察到的生物活性,FAP(28H1)(2+2)构建物最好,接着是FAP(4B9)(2+1)构建物,然后是 FAP(28H1)(2+1)构建物。

[0152] 在图22A和22B中它显示了含有人IgG1 Fc区的抗Ox40抗体能诱导OX40 阳性细胞裂解。在OX40抗体(人IgG1和人IgG1 P329GLALA)存在下以E:T比率3:1将PkH26标记的HeLa_hOx40_NFκB_Luc1和新鲜分离的NK细胞共培养 24小时。4小时后使用细胞毒性检测试剂盒-LDH(Roche,目录号 11644793001)分析LDH含量。24小时后将细胞用Dapi染色并通过流式细胞术进行分析。使用Dapi阳性死细胞的百分比来计算比裂解。人IgG格式的抗 OX40结合物结合NK细胞上的Fc受体并诱导OX40阳性靶细胞的ADCC。改为使用hu IgG1 P329GLALA格式防止OX40阳性细胞(例如最近激活的T细胞) 的ADCC。

[0153] 图23A-23D显示4种转移至huIgG1 P329G LALA格式的抗人4-1BB特异性克隆(实心菱形:克隆25G7,实心正方形:克隆12B3,实心星形:克隆 11D5,上指三角形:克隆9B11)和1种转移至huIgG1 P329G LALA格式的抗小鼠4-1BB特异性克隆20G2(下指三角形)对静息的和激活的人T细胞的结合。作为阴性对照,使用非4-1BB特异性克隆DP47 huIgG1 P329G LALA抗体(空心灰色圆圈)。上部小图显示对静息的CD4^{+}T细胞(图23A)和激活的 CD4^{+}T细胞(图23B)的结合,而下部小图显示对静息的CD8^{+}T细胞(图23C) 和激活的CD8^{+}T细胞(图23D)的结合。通过将用作检测二抗的FITC标记的或 PE标记的抗人IgG Fcγ特异性山羊IgG F(ab')$_2$片段的荧光中值(MFI)对所测试的抗4-1BB-结合huIgG1 P329G LALA一抗以nM计的浓度绘图来表征结合。MFI通过流式细胞术来测量且基线通过减去空白对照(无一抗)的

MFI来修正。

[0154] 图24A-24D显示对表达4-1BB小鼠T细胞的结合。所显示的是4种抗人 4-1BB结合性huIgG1 P329G LALA抗体克隆(实心菱形:克隆25G7,实心正方形:克隆12B3,实心星形:克隆11D5,上指三角形:克隆9B11)和1种抗小鼠4-1BB结合性huIgG1 P329G LALA抗体克隆20G2(下指三角形)对静息的和激活的小鼠T细胞的结合。作为阴性对照,使用非4-1BB结合性DP47 huIgG1 P329G LALA抗体(空心灰色圆圈)。上部小图显示对静息的小鼠 $CD4^+$T细胞(图24A)和激活的$CD4^+$T细胞(图24B)的结合,而下部小图显示对静息的小鼠$CD8^+$T细胞(图24C)和激活的$CD8^+$T细胞(图24D)的结合。通过将用作检测二抗的FITC标记的抗人IgG Fcγ特异性山羊IgG F(ab')$_2$片段的 MFI对所测试的抗4-1BB-结合huIgG1 P329G LALA一抗以nM计的浓度绘图来表征结合。MFI通过流式细胞术来测量且基线通过减去空白对照(无一抗) 的MFI来修正。

[0155] 图25A-25D显示小鼠IgG对表达4-1BB的小鼠T细胞的结合。所显示的是转移至格式小鼠IgG1 DAPG和小鼠IgG1野生型(wt)的抗小鼠4-1BB结合克隆 20G2对静息的和激活的小鼠T细胞的结合。作为阴性对照,使用商业性非 4-1BB结合性小鼠IgG1 wt同种型对照(空心灰色圆圈,BioLegend,目录号 400153)。在上部小图中显示了对静息的$CD4^+$T细胞(图25A)和激活的$CD4^+$ T细胞(图25B)的结合,而在下部小图中显示了对静息的$CD8^+$T细胞(图25C)和激活的$CD8^+$T细胞(图25D)的结合。通过将用作检测二抗的FITC标记的抗小鼠IgG Fcγ特异性山羊IgG F(ab')$_2$片段的荧光强度中值(MFI)对所测试的抗 -4-1BB-结合moIgG一抗以nM计的浓度绘图来表征结合。MFI通过流式细胞术来测量且基线通过减去空白对照(无一抗)的MFI来修正。

[0156] 图26A和26B显示对表达4-1BB食蟹猴T细胞的结合。所显示的是4种抗人4-1BB结合huIgG1 P329G LALA抗体克隆(实心菱形:克隆25G7,实心正方形:克隆12B3,实心星形:克隆11D5,上指三角形:克隆9B11)对激活的食蟹猴T细胞的结合。作为阴性对照,使用非4-1BB结合性DP47 huIgG1 P329G LALA抗体(空心灰色圆圈)。所显示的分别是对激活的$CD4^+$T细胞(图 26A)和激活的$CD8^+$T细胞(图26B)的结合。通过将用作检测二抗的FITC标记的抗人IgG Fcγ特异性山羊IgG F(ab')$_2$片段的荧光强度中值(MFI)对所测试的抗4-1BB-结合huIgG1 P329G LALA一抗以nM计的浓度绘图来表征结合。 MFI通过流式细胞术来测量且基线通过减去空白对照(无一抗)的MFI来修正。

[0157] 图27A-27E指本发明的抗4-1BB抗体通过表面等离振子共振测定的配体结合特性。显示了人抗4-1BB IgG 25G7,11D5,9B11和12B3和预形成的复合物hu4-1BB配体/hu4-1BB之间的相互作用以及小鼠抗4-1BB克隆20G2和预形成的复合物mu4-1BB配体/mu4-1BB的相互作用。

[0158] 图28A-28C和28D-28F涉及竞争结合实验。图28A-28C显示抗4-1BB IgG 克隆12B3,11D5和25G7与克隆9B11和hu4-1BB预形成的复合物之间的相互作用。图28D-28F显示抗4-1BB IgG克隆12B3,9B11和25G7与克隆11D5和 hu4-1BB预形成的复合物之间的相互作用。能得出抗4-1BB克隆12B3,11D5 和9B11与25G7分享不同空间表位的结论,因为两种抗体能同时结合人 4-1BB。

[0159] 图29A-29D显示杂合4-1BB Fc(kih)变体对抗4-1BB抗体的结合,即 hu4-1BBD1/mu4-1BBD2-Fc(kih)和mu4-1BBD1/hu4-1BBD2-Fc(kih)变体对抗 4-1BB抗体的结合。标有下

划线的是受到抗体识别的4-1BB域。在图 30A-30D中显示了抗人4-1BB抗体11D5,12B3,25G7和9B11对人4-1BB域1 的结合。抗人4-1BB抗体11D5,12B3和9B11结合含有人域1的4-1BB构建物。

[0160] 图31A-31D显示不同抗人4-1BB克隆的体外功能特性。在抗人CD3抗体缺失下(图31A和31C)或在亚最佳浓度的表面固定化的抗人CD3抗体存在下 (图31B和31D)用不同浓度的表面固定化的抗人4-1BB特异性huIgG1 P329G LALA抗体激活预激活的人$CD8^+$T细胞。所显示的是总$CD8^+$T细胞群体中 IFNγ$^+$(A和B)和TNFα$^+$(C和D)$CD8^+$T细胞的频率对表面固定化的4-1BB结合性huIgG1 P329G LALA以pM计的浓度。在CD3刺激存在下4-1BB共刺激能以浓度依赖性方式提高IFNγ (图31B)和TNFα(图31D)分泌。在CD3刺激缺失下,4-1BB的激活对IFNγ (图31A)和TNFα(图31C)分泌没有影响。

[0161] 图32显示抗小鼠4-1BB克隆20G2的体外功能特性。在溶液中在0.5 μg/mL抗小鼠IgG1 CD3仓鼠IgG(克隆145-2C11)和不同浓度的抗小鼠4-1BB 抗体(实心黑色菱形:小鼠IgG,空心黑色菱形:小鼠IgG DAPG)或配合同种型对照(实心灰色圆圈:小鼠IgG1,空心灰色圆圈:小鼠IgG1 DAPG)存在下温育小鼠脾细胞。浓度在x轴上以nM标示。只有抗小鼠4-1BB克隆20G2小鼠IgG1(黑色菱形)能经由表达FcR的细胞交联时,粒酶B(图32小图(a))和Eomesodermin(图32小图(b))的激活能以浓度依赖性方式升高。

[0162] 图33显示抗小鼠4-1BB克隆20G2的体内功能特性。所显示的是3只小鼠每组的结果。用抗小鼠4-1BB克隆20G2小鼠IgG1(灰色条)处理后,$CD8^+$T 细胞在总数方面(a)在肝中积累。别的增殖标志物Ki67在$CD8^+$T细胞上在频率(b)和总数(c)方面上调。它还通过4-1BB(CD137)在$CD8^+$T细胞上在频率(d) 和总数(e)方面的上调诱导正反馈环。在第三次注射后1天看到最强的效果。如果用抗小鼠4-1BB克隆20G2小鼠IgG1 DAPG(黑色条)处理小鼠,那么防止抗体的交联且没有发生4-1BB激活。因此,肝中的$CD8^+$T细胞在数目和表型方面与PBS处理的小鼠中的(白色条)相似。

[0163] 在图34A中显示了本发明的一种例示性双特异性,二价抗原结合分子的示意图,其包含两个结合4-1BB的Fab片段和两个结合FAP的交叉Fab片段 (2+2格式)。在图34B中显示了SPR实验的设置,其显示对固定化的人4-1BB 和人FAP的同时结合。图34C显示本发明的一种例示性双特异性,单价抗原结合分子的示意图,其包含一个结合4-1BB的Fab片段和一个结合FAP的交叉Fab片段(1+1格式)。

[0164] 双特异性二价抗4-1BB/抗FAP构建物的同时结合在图35A-35D中显示。对固定化的人4-1BB使用双特异性构建物作为分析物1并使用人FAP作为分析物2。所有双特异性构建物均能同时结合人4-1BB和人FAP。

[0165] 图36A和36B显示例示性双特异性抗原结合分子,它们是二价抗4-1BB 和单价抗FAP huIgG1 P329GLALA,也称作2+1格式。双特异性抗原结合分子包含两个结合4-1BB的Fab片段和一个结合FAP的VH和VL域。

[0166] 图37A-37C涉及双特异性2+1抗4-1BB和抗FAP构建物的同时结合。图 37A是测定法设置的象形图;图37B和37C显示所检测的2+1格式的双特异性抗原结合分子(分析物1)对固定化的人4-1BB和人FAP的同时结合。

[0167] 图38A-38F显示人-4-1BB特异性克隆11D5(图38A和38C),12B3(图38B 和38D)和25G7(图38E和38F)对静息的$CD4^+$(上部小图)和$CD8^+$T细胞(下部小图)的结合。作为检测二抗

PE缀合的抗人IgG Fcγ片段特异性山羊IgG F(ab2′)片段的荧光强度的几何均值对一抗4-1BB结合性抗体的浓度呈现结合。在所有印迹中使用阴性对照DP47非靶向性huIgG1 P329G LALA(空心黑色圆圈,点线)。构建物无一显示对静息的人$CD4^+$T细胞(图38A,38B和38E) 或静息的$CD8^+$T细胞(图38C,38D和38F)的特异性结合。

[0168] 图39A-39F显示人-4-1BB特异性克隆11D5(图39A和39C),12B3(图39B 和39D)和25G7(图39E和39F)对激活的$CD4^+$(上部小图)和$CD8^+$T细胞(下部小图)的结合。作为检测二抗PE缀合的抗人IgG Fcγ片段特异性山羊IgG F(ab2′)片段的荧光强度的几何均值对一抗4-1BB结合性抗体的浓度显示结合。在所有印迹中使用阴性对照DP47非靶向性huIgG1 P329G LALA(空心黑色圆圈,点线)。所有构建物主要结合激活的人$CD8^+$T细胞(图39C,39D 和39F),其展示比激活的人$CD4^+$T细胞(图39A,39B和39E)要高的4-1BB表达。

[0169] 作为结合曲线的曲线下面积(AUC),图40汇总不同克隆和格式对激活的人$CD8^+$T细胞的结合。不同格式和所使用的抗FAP结合性克隆在图下方作为象形图标示,4-1BB结合性克隆通过柱样式标示:DP47对照分子为白色,含有25G7的分子为黑色,若DP47非靶向性则为黑色带白色条纹,克隆 11D5为灰色,而克隆12B3为白色/黑色格子。

[0170] 图41A-41F显示对表达人FAP的黑素瘤细胞系WM-266-4(图41A,41B 和41E)和NIH/3T3-huFAP克隆19细胞(图41C,41D和41F)的结合。作为检测二抗PE缀合的抗人IgG Fcγ片段特异性山羊IgG F(ab2′)片段的荧光强度的几何均值对一抗4-1BB结合抗体的浓度显示结合。使用含有4-1BB结合性克隆11D5的构建物的结合曲线在图41A和41C中显示,克隆12B3在图41B和41D 中而克隆25G7在图41E和41F中显示。在所有印迹中,使用阴性对照DP47非靶向性huIgG1 P329G LALA(空心黑色圆圈,点线)。只有FAP靶向性格式结合表达FAP的细胞而非它们的亲本抗4-1BB huIgG1P329G LALA抗体。因此,不依赖于格式,所显示的所有FAP靶向性分子特征在于FAP特异性靶向特性。依赖于格式,FAP结合性克隆和靶向模块,一些分子拥有比其它要好的FAP靶向特性。

[0171] 图42汇总对NIH/3T3-huFAP细胞的结合。所显示的是结合曲线的曲线下面积(AUC)。所使用的抗体格式在图下面作为象形图标示,4-1BB结合性克隆通过柱颜色标示:DP47对照分子为白色,含有25G7的分子为黑色,若 DP47非靶向性则为黑色带白色条纹,克隆11D5为灰色而克隆12B3为白色/ 黑色格子。图显示只有FAP靶向性分子而非它们的4-1BB-结合亲本huIgG1 P329G LALA及DP47靶向性4-1BB(25G7)结合分子能结合表达FAP的细胞。

[0172] 图43A-43I显示表达4-1BB的报告细胞系HeLa-hu4-1BB-NFκB-luc中 NFκB介导的萤光素酶活性。作为温育6小时后释放光单位(URL)对激动性人 4-1BB结合性分子的添加浓度在y轴上显示萤光素酶活性。在图43A,43D和 43G中不添加表达FAP的肿瘤细胞。以比率5:1对报告细胞系添加表达FAP的人黑素瘤细胞系WM-266-4(在图43B,43E和43H中)和转染人FAP的 NIH/3T3细胞(在图43C,43F和43I中)并温育6小时。使用含有4-1BB结合性克隆11D5的构建物的激活曲线在图43A,43B和43C中显示,克隆12B3在图 43D,43E和43F中而克隆25G7在图43G,43H和43I中显示。只有FAP靶向性格式在表达FAP的肿瘤细胞存在下诱导萤光素酶活性。激活水平依赖于克隆,格式和表达FAP的肿瘤细胞系。

[0173] 图44A和44B汇总在NIH/3T3-huFAP细胞存在下表达4-1BB的报告细胞系HeLa-hu4-1BB-NFκB-luc中NFκB介导的萤光素酶活性。所显示的是在 NIH/3T3-huFAP细胞存在下激活

曲线的曲线下面积(AUC)。所使用的抗体格式和抗FAP克隆在图下面作为象形图标示,不同激动性4-1BB克隆以不同柱样式标示:DP47对照分子为白色,含有25G7的分子为黑色,克隆11D5为灰色而克隆12B3为白色/黑色格子。图显示只有FAP靶向性分子能诱导背景以上的强激活。激活水平依赖于克隆,FAP靶向和格式。

[0174] 发明详述

[0175] 定义

[0176] 除非另外定义,本文中使用的技术术语和科学术语具有与本发明所属领域中通常使用的相同的含义。出于解释本说明书的目的,以下定义将适用,并且在适当时,以单数形式使用的术语也将包括复数形式,反之亦然。

[0177] 如本文中使用的,术语“抗原结合分子”在其最广义上指的是特异性结合抗原决定簇的分子。抗原结合分子的实例是抗体,抗体片段和支架抗原结合蛋白。

[0178] 如本文中使用的,术语“能够特异性结合靶细胞抗原的模块”是指与抗原决定簇特异性结合的多肽分子。在一个方面,抗原结合模块能够通过其靶细胞抗原激活信号传导。在一个特定方面,抗原结合模块能够将与其连接的实体(例如,TNF家族配体三聚体)引导至靶位点,例如引导至具有抗原决定簇的特定类型的肿瘤细胞或肿瘤基质。能够特异性结合靶细胞抗原的模块包括本文中进一步定义的抗体及其片段。另外,能够特异性结合靶细胞抗原的模块包括本文中进一步定义的支架抗原结合蛋白,例如,基于设计的重复蛋白或设计的重复域的结合域(参见例如WO 2002/020565)。

[0179] 关于抗体或其片段,术语“能够特异性结合靶细胞抗原的模块”是指分子的包含与抗原的部分或全部特异性结合并与其互补的区域的部分。可以例如由一个或多个抗体可变域(也称为抗体可变区)提供能够进行特异性抗原结合的模块。具体地说,能够进行特异性抗原结合的模块包含抗体轻链可变区(VL)和抗体重链可变区(VH)。在一个特定的方面,该“能够特异性结合靶细胞抗原的模块”是Fab片段或交叉Fab片段。

[0180] 术语“能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的模块”指特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的多肽分子。在一个方面,抗原结合模块能够经由共刺激性TNF受体家族成员激活信号传导。能够特异性结合靶细胞抗原的模块包括如本文中进一步定义的抗体和其片段。另外,能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的模块包括如本文中进一步定义的支架抗原结合蛋白,例如基于设计的重复蛋白或设计的重复域的结合域(参见例如WO 2002/020565)。特别地,能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的模块包含抗体轻链可变区(VL)和抗体重链可变区(VH)。在一个特定的方面,“能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的模块”是Fab片段或交叉Fab片段。

[0181] 在本文中以最广义的方式使用术语“抗体”,其涵盖各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体,多克隆抗体,单特异性和多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体片段,只要它们表现出期望的抗原结合活性即可。

[0182] 如本文中使用的术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体的群获得的抗体,即包含该群的单独的抗体是同一的和/或结合同一表位,除了可能的变体抗体之外,例如,含有天然存在的突变的或在单克隆抗体制剂的产生过程中产生的抗体,这样变体通常以少量存在。与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相反,单克隆抗体制剂的每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。

[0183] 如本文中使用的术语“单特异性”抗体表示具有一个或多个结合位点的抗体，所述位点各自与相同抗原的相同表位结合。术语“双特异性”意指抗原结合分子能够特异性地与至少两个不同的抗原决定簇结合。通常，双特异性抗原结合分子包含两个抗原结合位点，每个抗原结合位点对于不同的抗原决定簇是特异性的。在某些实施方案中，双特异性抗原结合分子能够同时结合两个抗原决定簇，尤其是在两个不同细胞上表达的两个抗原决定簇。

[0184] 如本申请内使用的术语“价”表示抗原结合分子中规定数目的对一种独特抗原性决定簇特异性的结合位点的存在。因此，术语“二价”，“四价”和“六价”分别表示抗原结合分子中对某种抗原性决定簇特异性的两个结合位点，四个结合位点和六个结合位点的存在。在本发明的特定方面，依照本发明的双特异性抗原结合分子对于某种抗原性决定簇可以是单价的，意味着它们仅仅具有一个针对所述抗原性决定簇的结合位点，或者它们对于某种抗原性决定簇可以是二价的，意味着它们具有两个针对所述抗原性决定簇的结合位点。

[0185] 术语“全长抗体”，“完整抗体”和“全抗体”在本文中可互换使用，指的是具有与天然抗体结构基本相似的结构的抗体。“天然抗体”指的是具有不同结构的天然存在的免疫球蛋白分子。例如，天然IgG类抗体是约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白，由二硫键结合的两条轻链和两条重链组成。从N末端至C末端，每个重链具有可变区(VH)，也称为可变重域或重链可变域，其后是三个恒定域(CH1，CH2，和CH3)，也称为重链恒定区。类似地，从N 末端至C末端，每个轻链具有可变区(VL)，也称为可变轻域或轻链可变域，其后是轻链恒定域(CL)，也称为轻链恒定区。抗体重链可被指定为五种类型中的一种，称为α(IgA)，δ(IgD)，ε(IgE)，γ (IgG)，或μ(IgM)，其中一些可以进一步分为亚类，例如γ1(IgG1)，γ2(IgG2)，γ3(IgG3)，γ4(IgG4)，α1(IgA1)和α2(IgA2)。基于其恒定域的氨基酸序列，抗体轻链可被指定为两种类型之一，称为卡帕(κ)和兰布达(λ)。

[0186] “抗体片段”指的是除了完整抗体之外的分子，其包含与完整抗体所结合的抗原结合的所述完整抗体的一部分。抗体片段的实例包括但不限于 Fv，Fab，Fab’，Fab’-SH，F(ab’)$_2$；双抗体，三抗体，四抗体，交叉Fab片段；线性抗体；单链抗体分子(例如scFv)；和单域抗体。关于某些抗体片段的综述，参见Hudson等人，Nat Med 9,129-134(2003)。关于scFv片段的综述，参见例如Plückthun，引自The Pharmacology of Monoclonal Antibodies，vol.113，Rosenburg and Moore eds.，Springer-Verlag，New York，pp.269-315 (1994)；还参见WO 93/16185；和美国专利Nos.5,571,894和5,587,458。关于包含补救受体结合表位残基并具有增加的体内半衰期的Fab和F(ab’)2片段的讨论，参见美国专利No.5,869,046。双抗体是具有两个抗原结合位点的可以是二价或双特异性的抗体片段，参见，例如EP 404,097；WO 1993/01161； Hudson等人，Nat Med 9,129-134(2003)；和Hollinger等人，Proc Natl Acad Sci USA 90,6444-6448(1993)。Hudson等人在Nat Med 9,129-134(2003)中也描述了三抗体和四抗体。单域抗体是包含抗体的全部或部分重链可变域或全部或部分轻链可变域的抗体片段。在某些实施方案中，单域抗体是人单域抗体(Domantis，Inc.，Waltham，MA；参见例如美国专利No.6,248,516 B1)。可以通过各种技术制造抗体片段，包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化以及通过重组宿主细胞(例如大肠杆菌或噬菌体)产生，如本文中所述。

[0187] 完整抗体的木瓜蛋白酶消化产生两个完全相同的抗原结合片段，称为“Fab”片段，其各自含有重链和轻链可变区以及轻链的恒定域和重链的第一恒定域(CH1)。因此，如本文

中使用的,术语“Fab片段”是指包含包括轻链的VL域和恒定域(CL)的轻链片段,和重链的VH域和第一恒定域(CH1)的抗体片段。Fab'片段因在重链CH1域的羧基末端增加了少数残基而与Fab片段有所不同,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH是其中恒定域的半胱氨酸残基具有游离巯基的Fab'片段。胃蛋白酶处理产生具有两个抗原结合位点(两个Fab片段)和Fc区的一部分的$F(ab')_2$片段。依照本发明,术语“Fab片段”还包括如下文定义的“交叉Fab片段”或“交换Fab片段”。

[0188] 术语“交叉Fab片段”或“xFab片段”或“交换Fab片段”是指其中重链和轻链的可变区或恒定区之间交换的Fab片段。交叉Fab分子的两种不同链组成是可能的并且包含在本发明的双特异性抗体中:一方面,Fab重链和轻链的可变区被交换,即交换Fab分子包含由轻链可变区(VL)和重链恒定区(CH1) 组成的肽链,以及由重链可变区(VH)和轻链恒定区(CL)组成的肽链。这种交换Fab分子也被称为$CrossFab_{(VLVH)}$。另一方面,当Fab重链和轻链的恒定区被交换时,交换Fab分子包含由重链可变区(VH)和轻链恒定区(CL)组成的肽链,以及由轻链可变区(VL)和重链恒定区(CH1)组成的肽链。这种交换 Fab分子也被称为$CrossFab_{(CLCH1)}$。

[0189] “单链Fab片段”或“scFab”是由抗体重链可变域(VH),抗体恒定域 1(CH1),抗体轻链可变域(VL),抗体轻链恒定域(CL)和接头组成的多肽,其中所述抗体域和所述接头在N末端至C末端方向具有以下顺序之一:a) VH-CH1-接头-VL-CL,b)VL-CL-接头-VH-CH1,c)VH-CL-接头-VL-CH1 或d)VL-CH1-接头-VH-CL;并且其中所述接头是具有至少30个氨基酸,优选32至50个氨基酸之间的多肽。所述单链Fab片段经由CL域和CH1域之间的天然二硫键而被稳定化。另外,通过插入半胱氨酸残基(例如根据Kabat编号在可变重链中的位置44和可变轻链中的位置100)产生链间二硫键,这些单链Fab分子可以进一步被稳定化。

[0190] “交换单链Fab片段”或“x-scFab”是由抗体重链可变域(VH),抗体恒定域 1(CH1),抗体轻链可变域(VL),抗体轻链恒定域(CL)和接头组成的多肽,其中所述抗体域和所述接头在N末端至C末端方向具有以下顺序之一:a) VH-CL-接头-VL-CH1和b)VL-CH1-接头-VH-CL;其中VH和VL一起形成与抗原特异性结合的抗原结合位点,并且其中所述接头是具有至少30个氨基酸的多肽。另外,通过插入半胱氨酸残基(例如根据Kabat编号在可变重链中的位置44和可变轻链中的位置100)产生链间二硫键,这些x-scFab分子可以进一步被稳定化。

[0191] “单链可变片段(scFv)”是用具有10个至约25个氨基酸的短接头肽连接的抗体的重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L)的融合蛋白。该接头通常富含有关柔性的甘氨酸,以及有关溶解性的丝氨酸或苏氨酸,并且可将V_H的N末端与V_L的C末端连接,或反之亦然。尽管去除了恒定区并引入了接头,但该蛋白质保留了原始抗体的特异性。scFv抗体例如描述于Houston,J.S., Methods in Enzymol.203(1991)46-96)。另外,抗体片段包含具有VH域特征或VL域特征的单链多肽,所述VH域特征即能够与VL域一起组装到功能性抗原结合位点上,所述VL域特征即能够与VH域一起组装到功能性抗原结合位点上,从而提供全长抗体的抗原结合特性。

[0192] “支架抗原结合蛋白”在本领域中是已知的,例如,纤连蛋白和设计的锚蛋白重复蛋白(DARPin)已被用作抗原结合域的替代支架,参见例如 Gebauer和Skerra,Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics.Curr Opin Chem Biol 13:245-255(2009)和Stumpp等人,Darpins: A new generation of protein therapeutics.Drug Discovery Today 13:695-701 (2008)。在本发明的一个方面,支架抗

原结合蛋白选自CTLA-4(Evibody),脂质运载蛋白(Anticalin),蛋白A衍生的分子,如蛋白A的Z域(Affibody),A 域(Avimer/Maxibody),血清转铁蛋白(trans-body);设计的锚蛋白重复蛋白 (DARPin),抗体轻链或重链的可变域(单域抗体,sdAb),抗体重链的可变域(纳米抗体,aVH),V_{NAR}片段,纤连蛋白(AdNectin),C型凝集素域 (Tetranectin);新的抗原受体β-内酰胺酶的可变域(V_{NAR}片段),人γ-晶体蛋白或泛素(Affilin分子);人蛋白酶抑制剂的kunitz型域,诸如来自knottin家族的蛋白质的微体,肽适体和纤连蛋白(adnectin)。CTLA-4(细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4)是主要在$CD4^+$T细胞上表达的CD28家族受体。其细胞外域具有类似可变域的Ig折叠。可用异源序列取代对应于抗体的CDR的环,以赋予不同的结合特性。经过工程化而具有不同结合特异性的CTLA-4分子也被称为Evibodies(例如,US7166697B1)。Evibodies的大小与抗体(例如,域抗体) 的分离可变区大约相同。进一步的详情参见Journal of Immunological Methods 248(1-2),31-45(2001)。脂质运载蛋白为细胞外蛋白质家族,其转运小的疏水性分子,如类固醇,胆红素,类视黄醇和脂质。它们具有刚性β-片层二级结构,在锥形结构的开口端具有可被工程化以结合不同的靶抗原的多个环。Anticalin的大小在160-180个氨基酸之间,并且衍生自脂质运载蛋白。进一步的详情参见Biochim Biophys Acta 1482:337-350(2000), US7250297B1和US20070224633。亲和体是衍生自金黄色葡萄球菌蛋白A的支架,其可被工程化以结合抗原。该域由具有约58个氨基酸的三螺旋束组成。通过表面残基的随机化生成了文库。进一步的详情参见Protein Eng. Des.Sel.2004,17,455-462和EP 1641818A1。Avimers是衍生自A域支架家族的多域蛋白。具有约35个氨基酸的天然域采用定义的二硫键结构。多样性是通过改变A域家族所显示的自然变异产生的。进一步的详情参见Nature Biotechnology 23(12),1556-1561(2005)和Expert Opinion on Investigational Drugs 16(6),909-917(June 2007)。转铁蛋白是单体的血清转运糖蛋白。可以通过在允许的表面环中插入肽序列将转铁蛋白工程化以结合不同的靶抗原。工程化转铁蛋白支架的实例包括Trans-body。进一步的详情参见J.Biol. Chem 274,24066-24073(1999)。设计的锚蛋白重复蛋白(DARPin)衍生自锚蛋白,锚蛋白是介导整合膜蛋白与细胞骨架附着的蛋白质家族。单个锚蛋白重复是由两个α-螺旋和β-转角组成的33个残基的基序。通过随机化每个重复的第一个α-螺旋和β-转角中的残基,它们可以被工程化以结合不同的靶抗原。通过增加模块的数量(亲和力成熟法)可以增加它们的结合界面。进一步的详情参见J.Mol.Biol.332,489-503(2003),PNAS 100(4),1700-1705(2003) 和J.Mol.Biol.369,1015-1028(2007)以及US20040132028A1。单域抗体是由单个单体的可变抗体域组成的抗体片段。第一个单域来源于来自骆驼科动物(camelids)抗体重链的可变域(纳米抗体或V_HH片段)。此外,术语单域抗体包括自主的人重链可变域(aVH)或来源于鲨鱼的V_{NAR}片段。纤连蛋白是一种可以被工程化为与抗原结合的支架。Adnectin由人纤连蛋白III型(FN3)的15 个重复单元的第10个域的天然氨基酸序列的主链组成。可以将β-夹心一端的三个环工程化,使Adnectin能够特异性地识别感兴趣的治疗靶标。进一步的详情参见Protein Eng.Des.Sel.18,435-444(2005),US20080139791, WO2005056764和US6818418B1。肽适体是由恒定骨架蛋白组成的组合识别分子,所述骨架蛋白通常是含有在活性位点插入的约束可变肽环的硫氧还蛋白(TrxA)。进一步的详情参见Expert Opin.Biol.Ther.5,783-797(2005)。微体源自长度为25-50个氨基酸的天然存在的微蛋白,其含有3-4个半胱氨酸桥-微蛋白的实例包括KalataBI以及芋螺毒素和半胱氨酸结肽

(knottin)。微蛋白具有可以工程化以包括多达25个氨基酸而不影响微蛋白的整体折叠的环。工程化的半胱氨酸结肽域的更多详情参见WO2008098796。

[0193] 就参考分子而言“结合相同表位的抗原结合分子”是指在竞争测定中阻断参考分子与其抗原的结合的50％或以上的抗原结合分子，相反地，参考分子在竞争测定中阻断抗原结合分子与其抗原的结合的50％或以上。

[0194] 术语“抗原结合域”或“抗原结合位点”是指抗原结合分子的部分，其包含与抗原的部分或全部特异性地结合且互补的区域。在大抗原的情况下，抗原结合分子可能仅与该抗原的特定部分结合，该部分称作表位。抗原结合域可以由例如一个或多个可变域(也称为可变区)提供。优选地，抗原结合域包含抗体轻链可变区(VL)和抗体重链可变区(VH)。

[0195] 如本文中使用的，术语“抗原决定簇”与“抗原”和“表位”同义，并且是指在抗原结合模块与其结合而形成抗原结合模块-抗原复合物的多肽大分子上的位点(例如氨基酸的连续段或由不连续氨基酸的不同区域构成的构象构型)。有用的抗原决定簇可以例如在肿瘤细胞的表面上，病毒感染细胞的表面上，其他病变的细胞表面上，免疫细胞表面上发现，在血清中和/或细胞外基质(ECM)中游离。用作本文中的抗原的蛋白质可以是来自任何脊椎动物来源的蛋白质的任何天然形式，所述脊椎动物包括哺乳动物如灵长类动物(例如人)和啮齿动物(例如小鼠和大鼠)，除非另外指明。在一个具体实施方案中，抗原是人蛋白质。在提及本文中的特定蛋白质的情况下，该术语包括“全长”未加工的蛋白质以及通过在细胞中加工产生的任何形式的蛋白质。该术语还涵盖蛋白质的天然存在的变体，例如，剪接变体或等位基因变体。

[0196] “特异性结合”意指结合对于抗原而言是选择性的，并且可以与不需要的或非特异性的相互作用区别开。抗原结合分子与特异性抗原结合的能力可以通过酶联免疫吸附测定(ELISA)或本领域技术人员熟悉的其他技术来测量，例如，表面等离子体共振(SPR)技术(在BIAcore仪器上分析)(Liljeblad等人，Glyco J 17,323-329(2000))和传统结合测定法(Heeley,Endocr Res 28, 217-229(2002))。在一个实施方案中，抗原结合分子与不相关蛋白的结合程度小于该抗原结合分子与抗原结合的约10％，正如通过例如SPR所测量的。在某些实施方案中，与抗原结合的分子具有≤1μM，≤100nM，≤10nM，≤1nM，≤0.1nM，≤0.01nM或≤0.001nM(例如10^{-8}M或更小，例如10^{-8}M至 10^{-13}M，例如10^{-9}M至10^{-13}M)的解离常数(Kd)。

[0197] “亲和力”或“结合亲和力”是指分子(例如抗体)的单一结合位点与其结合伴侣(例如抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另外指明，如本文中使用的，“结合亲和力”是指反映结合对的成员(例如抗体和抗原)之间的 1:1相互作用的固有结合亲和力。分子X对其伴侣Y的亲和力通常可以通过解离常数(Kd)来表示，亲和力是解离速率常数与结合速率常数(分别为koff和 kon)的比率。因此，等同亲和力可以包含不同的速率常数，只要速率常数的比率保持相同即可。可以通过本领域已知的常用方法测量亲和力，包括本文所述的那些方法。用于测量亲和力的特定方法是表面等离子体共振 (SPR)。

[0198] “亲和力成熟的”抗体指与不拥有此类改变的亲本抗体相比，在一个或多个高变区(HVR)中具有一处或多处改变的抗体，此类改变导致该抗体对抗原的亲和力改善。

[0199] 如本文中使用的“靶细胞抗原”是指存在于靶细胞表面上的抗原决定簇，所述靶细胞例如肿瘤中的细胞，如癌细胞或肿瘤基质细胞。在某些实施方案中，靶细胞抗原是肿瘤细胞表面上的抗原。在一个实施方案中，靶细胞抗原选自成纤维细胞激活蛋白(FAP)，癌胚抗

原(CEA),黑素瘤相关硫酸软骨素蛋白聚糖(MCSP),表皮生长因子受体(EGFR),CD19,CD20和CD33。具体地说,靶细胞抗原是成纤维细胞激活蛋白(FAP)。

[0200] 术语“成纤维细胞激活蛋白(FAP)”,也称为脯氨酰内肽酶FAP或分离酶 (Seprase)(EC 3.4.21),是指任何脊椎动物来源的任何天然FAP,所述脊椎动物包括哺乳动物如灵长类动物(例如人),非人灵长类动物(例如食蟹猴)和啮齿动物(例如小鼠和大鼠),除非另外指明。该术语包括“全长”未加工的FAP 以及通过在细胞中加工产生的任何形式的FAP。该术语还涵盖FAP的天然存在的变体,例如,剪接变体或等位基因变体。在一个实施方案中,本发明的抗原结合分子能够特异性结合人,小鼠和/或食蟹猴FAP。人FAP的氨基酸序列显示在UniProt(www.uniprot.org)登录号Q12884(版本149,SEQ ID NO:84),或NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov/)RefSeq NP_004451.2中。人FAP的细胞外域(ECD)从氨基酸位置26延伸至760。带His标签的人FAP ECD的氨基酸和核苷酸序列分别显示在SEQ ID NO:85和86中。小鼠FAP的氨基酸序列显示在UniProt登录号P97321(版本126,SEQ ID NO:87),或NCBI RefSeq NP_032012.1中。小鼠FAP的细胞外域(ECD)从氨基酸位置26延伸至761。SEQ ID NO:88和89分别显示了带His标签的小鼠FAP ECD的氨基酸和核苷酸序列。SEQ ID NO:90和91分别显示了带His标签的食蟹猴FAP ECD的氨基酸和核苷酸序列。优选地,本发明的抗FAP结合分子与FAP的细胞外域结合。

[0201] 术语“癌胚抗原(CEA)”,也称为癌胚抗原相关细胞粘附分子 5(CEACAM5),是指任何脊椎动物来源的任何天然CEA,所述脊椎动物包括哺乳动物如灵长类动物(例如人),非人灵长类动物(例如食蟹猴)和啮齿动物(例如小鼠和大鼠),除非另外指明。人CEA的氨基酸序列显示在UniProt 登录号P06731(版本151,SEQ ID NO:92)中。术语“黑素瘤相关硫酸软骨素蛋白聚糖(MCSP)”,也称为硫酸软骨素蛋白聚糖4(CSPG4),是指任何脊椎动物来源的任何天然MCSP,所述脊椎动物包括哺乳动物如灵长类动物(例如人),非人灵长类动物(例如食蟹猴)和啮齿动物(例如小鼠和大鼠),除非另外指明。人MCSP的氨基酸序列显示在UniProt登录号Q6UVK1(版本103, SEQ ID NO:93)中。术语“表皮生长因子受体(EGFR)”,也称为原癌基因 c-ErbB-1或受体酪氨酸蛋白激酶erbB-1,是指任何脊椎动物来源的任何天然 EGFR,所述脊椎动物包括哺乳动物如灵长类动物(例如人),非人灵长类动物(例如食蟹猴)和啮齿动物(例如小鼠和大鼠),除非另外指明。人EGFR的氨基酸序列显示在UniProt登录号P00533(版本211,SEQ ID NO:94)中。术语“CD19”是指B淋巴细胞抗原CD19,也称为B淋巴细胞表面抗原B4或T细胞表面抗原Leu-12,包括任何脊椎动物来源的任何天然CD19,所述脊椎动物包括哺乳动物如灵长类动物(例如人),非人灵长类动物(例如食蟹猴)和啮齿动物(例如小鼠和大鼠),除非另外指明。人CD19的氨基酸序列显示在 Uniprot登录号P15391(版本160,SEQ ID NO:95)中。“CD20”是指B淋巴细胞抗原CD20,也称为跨膜4域亚家族A成员1(MS4A1),B淋巴细胞表面抗原B1 或白细胞表面抗原Leu-16,包括任何脊椎动物来源的任何天然CD20,所述脊椎动物包括哺乳动物如灵长类动物(例如人),非人灵长类动物(例如食蟹猴)和啮齿动物(例如小鼠和大鼠),除非另外指明。人CD20的氨基酸序列显示在Uniprot登录号P11836(版本149,SEQ ID NO:96)中。“CD33”是指髓样细胞表面抗原CD33,也称为SIGLEC3或gp67,包括任何脊椎动物来源的任何天然CD33,所述脊椎动物包括哺乳动物如灵长类动物(例如人),非人灵长类动物(例如食蟹猴)和啮齿动物(例如小鼠和大鼠),除非另外指明。人CD33的氨基酸序列显示在Uniprot登录号P20138(版本157,SEQ ID NO:97)中。

[0202] 术语“可变区”或“可变域”是指涉及抗原结合分子与抗原结合的抗体重链或轻链的域。天然抗体的重链和轻链的可变域(分别为VH和VL)通常具有相似的结构,每个域包含四个保守的框架区(FR)和三个高变区(HVR)。参见例如Kindt等人,Kuby Immunology,6th ed.,W.H.Freeman和Co.,第91页 (2007)。单个VH或VL域可足以赋予抗原结合特异性。

[0203] 如本文中使用的术语“高变区”或“HVR”是指在序列上高变/或形成结构上定义的环(“高变环”)的抗体可变域的每个区域。通常,天然四链抗体包含六个HVR:三个在VH中(H1,H2,H3)中,三个在VL中(L1,L2,L3)中。HVR通常包含来自高变环和/或来自“互补决定区”(CDR)的氨基酸残基,后者具有最高的序列变异性和/或涉及抗原识别。示例性的高变环发生在氨基酸残基26-32(L1),50-52(L2),91-96(L3),26-32(H1),53-55(H2),和 96-101(H3)处。(Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987).)示例性的 CDR(CDR-L1,CDR-L2,CDR-L3,CDR-H1,CDR-H2,和CDR-H3)发生在L1的24-34,L2的50-56,L3的89-97,H1的31-35B,H2的50-65,和H3的 95-102氨基酸残基处。(Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda, MD(1991).)高变区(HVR)也被称为互补决定区(CDR),并且在提到形成抗原结合区的可变区的部分时,这些术语在本文中可互换地使用。这个特定的区域已经由Kabat等人在U.S.Dept.of Health and Human Services,"Sequences of Proteins of Immunological Interest"(1983)和Chothia等人在J.Mol.Biol. 196:901-917(1987)中描述,其中定义包括当针对彼此进行比较时的氨基酸残基的重叠或子集。然而,提及抗体的CDR或其变体的任一定义的应用预期在本文中定义和使用的术语的范围内。涵盖如以上每一篇引用的参考文献所定义的CDR的适当氨基酸残基在以下表A中列出作为比较。涵盖特定CDR的确切残基数将取决于CDR的序列和大小而变化。考虑到抗体的可变区氨基酸序列,本领域技术人员可以常规地确定哪些残基包含特定的 CDR。

[0204] 表A:CDR定义[1]

[0205]

CDR	Kabat	Chothia	AbM[2]
V_H CDR1	31-35	26-32	26-35
V_H CDR2	50-65	52-58	50-58
V_H CDR3	95-102	95-102	95-102
V_L CDR1	24-34	26-32	24-34

[0206]

V_L CDR2	50-56	50-52	50-56
V_L CDR3	89-97	91-96	89-97

[0207] [1]表A中所有CDR定义的编号遵循Kabat等人提出的编号规则(见下文)。

[0208] [2]具有如表A中使用的小写“b”的“AbM”是指Oxford Molecular的“AbM”抗体建模软件所定义的CDR。

[0209] Kabat等人还定义了可应用于任何抗体的可变区序列的编号系统。本领域的普通技术人员可以将这个“Kabat编号”系统明确地指定给任何可变区序列,而不依赖于序列本身以外的任何实验数据。如本文中使用的,“Kabat 编号”是指由Kabat等人在U.S.Dept.of Health and Human Services,"Sequence of Proteins of Immunological Interest"

(1983)中提出的编号系统。除非另有说明,抗体可变区中特定氨基酸残基位置编号的提及是根据Kabat编号系统。

[0210] 除了VH中的CDR1之外,CDR通常包含形成高变环的氨基酸残基。CDR还包含作为接触抗原的残基的“特异性决定残基”或“SDR”。SDR被包含在称为缩略CDR(或a-CDR)的CDR区域中。示例性的a-CDR(a-CDR-L1, a-CDR-L2,a-CDR-L3,a-CDR-H1,a-CDR-H2,和a-CDR-H3)发生在L1的 31-34,L2的50-55,L3的89-96,H1的31-35B,H2的50-58,和H3的95-102 氨基酸残基处(参见Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008))。除非另外指明,在本文中根据上文Kabat等人将可变域中的HVR残基和其他残基(例如FR残基)编号。

[0211] “框架”或“FR”是指除了高变区(HVR)残基之外的可变域残基。可变域的 FR通常由FR1,FR2,FR3和FR4四个FR域组成。因此,HVR和FR序列通常在VH(或VL)中以下列顺序出现:FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

[0212] 术语“嵌合”抗体是指其中重链和/或轻链的一部分衍生自特定来源或物种的抗体,同时重链和/或轻链的其余部分衍生自不同的来源或物种。

[0213] 抗体的“类”是指其重链所具有的恒定域或恒定区的类型。有五大类的抗体:IgA,IgD,IgE,IgG和IgM,其中几类可进一步分为亚类(同种型),例如,IgG_1,IgG_2,IgG_3,IgG_4,IgA_1,和IgA_2。对应于不同类型免疫球蛋白的重链恒定域分别称作α,δ,ε,γ,和μ。

[0214] “人源化”抗体是指包含来自非人HVR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基的嵌合抗体。在某些实施方案中,人源化抗体将包含至少一个(通常两个)可变域中的基本上所有的可变域,其中所有或基本上所有的HVR(例如,CDR)对应于非人抗体的HVR,并且所有或基本上所有的FR对应于人抗体的FR。人源化抗体任选地可以包含衍生自人抗体的抗体恒定区的至少一部分。抗体例如非人抗体的“人源化形式”是指经过人源化的抗体。本发明涵盖的其他形式的“人源化抗体”是其中恒定区已经基于原始抗体的恒定区另外加以修饰或改变以产生根据本发明的特性特别是关于C1q结合和/或Fc 受体(FcR)结合的那些抗体。

[0215] “人”抗体是具有这样的氨基酸序列的抗体,所述氨基酸序列对应于人或人细胞产生的抗体或衍生自利用人抗体库或其他的人抗体编码序列的非人来源的抗体的氨基酸序列。人抗体的这个定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0216] 本文中的术语“Fc域”或“Fc区”用于定义含有恒定区的至少一部分的抗体重链的C末端区。该术语包括天然序列Fc区和变体Fc区。IgG Fc区包含 IgG CH2和IgG CH3域。人IgG Fc区的“CH2域”通常从约位置231的氨基酸残基延伸至约位置340的氨基酸残基。在一个实施方案中,碳水化合物链与 CH2域附接。本文中的CH2域可以是天然序列CH2域或变体CH2域。“CH3 域”包含在Fc区中的C末端到CH2域的残基段(即从IgG的约位置341的氨基酸残基到约位置447的氨基酸残基)。本文中的CH3区可以是天然序列CH3域或变体CH3域(例如,具有在其一条链中引入的“突起”(“节”)和在其另一条链中相应的引入的“腔”(“穴”)的CH3域;参见美国专利5,821,333,将其明确地通过提述并入本文)。如本文中所述,这种变体CH3域可用于促进两个不相同的抗体重链的异源二聚化。在一个实施方案中,人IgG重链Fc区从Cys226或从Pro230延伸到重链的羧基末端。然而,Fc区的C末端赖氨酸(Lys447)可能存在或可能不存在。除非在本文中另外说明,Fc区或恒定区中氨基酸残基的编号是根据EU编号系统也称为EU索引进行的,如Kabat等人在Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,

MD,1991中描述。

[0217] “节入穴”技术例如描述于US 5,731,168;US 7,695,936;Ridgway等人，Prot Eng 9,617-621(1996)和Carter,J Immunol Meth 248,7-15(2001)中。通常，该方法包括在第一多肽的界面处引入突起(“节”)并且在第二多肽的界面中引入相应的腔(“穴”)，使得该突起可以定位在该腔中，从而促进异二聚体形成并阻碍同二聚体形成。通过用较大的侧链(例如酪氨酸或色氨酸)替换第一多肽的界面的小氨基酸侧链而构建突起。通过用较小的氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)替换大的氨基酸侧链，在第二多肽的界面中产生与突起具有相同或相似大小的补偿腔。可以通过改变编码多肽的核酸，例如通过位点特异性诱变，或通过肽合成而产生突起和腔。在具体的实施方案中，节修饰包括Fc域的两个亚基之一中的氨基酸替代T366W，并且穴修饰包括Fc 域的两个亚基中的另一个亚基中的氨基酸替代T366S，L368A和Y407V。在一个另外的具体实施方案中，包含节修饰的Fc域的亚基另外包含氨基酸替代S354C，并且包含穴修饰的Fc域的亚基另外包含氨基酸替代Y349C。引入这两个半胱氨酸残基导致在Fc区的两个亚基之间形成二硫桥，从而进一步稳定该二聚体(Carter,J Immunol Methods 248,7-15(2001))。

[0218] “等同于免疫球蛋白Fc区的区域”预期包括免疫球蛋白Fc区的天然存在的等位基因变体，以及具有产生取代，添加或缺失的改变但不实质性地降低免疫球蛋白介导效应器功能(如抗体依赖性细胞细胞毒性)的能力的变体。例如，可以从免疫球蛋白Fc区的N末端或C末端缺失一个或多个氨基酸，而没有生物学功能的实质性丧失。可以根据本领域已知的一般规则来选择这些变体，以便对活性具有最小的影响(参见，例如Bowie,J.U.等人，Science 247:1306-10(1990))。

[0219] 术语“效应器功能”是指可归因于抗体Fc区的那些生物学活性，其随抗体同种型而变化。抗体效应器功能的实例包括:C1q结合和补体依赖性细胞毒性(CDC)，Fc受体结合，抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)，抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)，细胞因子分泌，免疫复合物介导的经由抗原呈递细胞的抗原摄取，细胞表面受体(例如B细胞受体)的下调，和B细胞活化。

[0220] Fc受体结合依赖性效应器功能可以通过抗体的Fc区与Fc受体(FcR，它们是造血细胞上的专门化细胞表面受体)的相互作用来介导。Fc受体属于免疫球蛋白超家族，而且已经显示介导通过免疫复合物的吞噬去除抗体包被的病原体和被相应抗体包被的红细胞和多种其它细胞靶(例如肿瘤细胞)经抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)裂解二者(参见例如Van de Winkel,J.G. and Anderson,C.L.,J.Leukoc.Biol.49(1991)511-524)。FcR通过它们对免疫球蛋白同种型的特异性来定义:针对IgG抗体的Fc受体称作FcγR。Fc受体结合记载于例如Ravetch,J.V.and Kinet,J.P.,Annu.Rev.Immunol.9(1991) 457-492;Capel,P.J.,et al.,Immunomethods 4(1994)25-34;de Haas,M.,et al., J.Lab.Clin.Med.126(1995)330-341;和Gessner,J.E.,et al.,Ann.Hematol.76 (1998)231-248。

[0221] 针对IgG抗体Fc区的受体(FcγR)的交联触发极其广泛的效应器功能，包括吞噬，抗体依赖性细胞细胞毒性，和释放炎症性介导物，以及免疫复合物清除和调节抗体生成。在人中，三类FcγR已经表征，它们是：

[0222] -FcγRI(CD64)以高亲和力结合单体IgG且在巨噬细胞，单核细胞，嗜中性细胞和嗜曙红细胞上表达。IgG Fc区中至少氨基酸残基E233-G236，P238,D265,N297,A327和P329

(编号方式依照Kabat的EU索引)之一处的修饰降低对Fcγ RI的结合。将位置233-236处的IgG2残基替代入IgG1和IgG4 将对Fcγ RI的结合降低103倍并消除针对抗体敏化的红血球的人单核细胞应答 (Armour,K.L.,et al.,Eur.J.Immunol.29(1999)2613-2624)。

[0223] -Fcγ RII(CD32)以中等至低亲和力结合复合的IgG且广泛表达。这种受体可分成两个亚型,Fcγ RIIA和Fcγ RIIB。Fcγ RIIA在牵涉杀伤的许多细胞上找到(例如巨噬细胞,单核细胞,嗜中性细胞)且看来能够激活杀伤过程。Fcγ RIIB看来在抑制性过程中发挥作用且在B细胞,巨噬细胞上并在肥大细胞和嗜曙红细胞上找到。在B细胞上它看来发挥支持进一步免疫球蛋白生成和同种型转换成例如IgE类的功能。在巨噬细胞上,Fcγ RIIB起抑制经由 Fcγ RIIA介导的吞噬的作用。在嗜曙红细胞和肥大细胞上,B形式可有助于经由结合其分开的受体的IgE遏制这些细胞的激活。例如,对包含至少在氨基酸残基E233-G236,P238,D265,N297,A327,P329,D270,Q295, A327,R292,和K414(编号方式依照Kabat的EU索引)之一处具有突变的 IgG Fc区的抗体找到降低的对Fcγ RIIA的结合。

[0224] -Fcγ RIII(CD16)以中等至低亲和力结合IgG且以两种类型存在。Fcγ RIIIA在NK细胞,巨噬细胞,嗜曙红细胞和一些单核细胞和T细胞上找到且介导ADCC。Fcγ RIIIB在嗜中性细胞上高表达。例如,对包含至少在氨基酸残基E233-G236,P238,D265,N297,A327,P329,D270,Q295, A327,S239,E269,E293,Y296,V303,A327,K338和D376(编号方式依照Kabat的EU索引)之一处具有突变的IgG Fc区的抗体找到降低的对 Fcγ RIIIA的结合。

[0225] 人IgG1上针对Fc受体的结合位点的定位,上文所述突变位点和用于测量对Fcγ RI和Fcγ RIIA的结合的方法记载于Shields,R.L.,et al.J.Biol.Chem. 276(2001)6591-6604。

[0226] 术语“ADCC”或“抗体依赖性细胞细胞毒性”是通过Fc受体结合介导的功能且指在效应细胞存在下如本文中报告的抗体对靶细胞的裂解。抗体诱导介导ADCC的初始步骤的能力通过测量它们对表达Fcγ 受体的细胞,诸如重组表达Fcγ RI和/或Fcγ RIIA的细胞,或NK细胞(本质上表达Fcγ RIIIA)的结合来调查。特别地,测量对NK细胞上的Fcγ R的结合。

[0227] “激活性Fc受体”是被抗体Fc区接合之后引出信号传导事件的Fc受体,所述事件刺激带有该受体的细胞履行效应器功能。激活性Fc受体包括 Fcγ RIIIa(CD16a),Fcγ RI(CD64),Fcγ RIIa(CD32),和FcαRI(CD89)。特定的激活性Fc受体是人Fcγ RIIIa(参见UniProt登录号P08637,版本141)。

[0228] “肿瘤坏死因子受体超家族”或“TNF受体超家族”当前由27种受体组成。它是一组特征在于经细胞外富半胱氨酸域(CRD)结合肿瘤坏死因子(TNF)的能力的细胞因子受体。这些假重复通过受体链内由高度保守的半胱氨酸残基生成的链内二硫化物来定义。除神经生长因子(NGF)以外,所有TNF与原型TNF-α同源。以它们的活性形式,绝大多数TNF受体在质膜中形成三聚体复合物。因而,大多数TNF受体含有跨膜域(TMD)。数种这些受体还含有细胞内死亡域(DD),它在配体结合后募集胱天蛋白酶相互作用蛋白以启动胱天蛋白酶激活的外在途径。其它缺乏死亡域的TNF超家族受体结合TNF受体相关因子并激活能导致增殖或分化的细胞内信号传导途径。这些受体还能启动凋亡,但是它们经间接机制这样做。在调节凋亡以外,数种TNF超家族受体牵涉调节免疫细胞功能,诸如B细胞稳态和激活,天然杀伤细胞激活,和T细胞共刺激。数种其它受体调节细胞类型特异性应答,诸如毛囊发育和破骨细胞发育。TNF受体超家族的成员包括下面的:肿瘤坏死因子受体1(1A)(TNFRSF1A,CD120a),肿瘤

坏死因子受体2(1B)(TNFRSF1B，CD120b)，淋巴毒素β受体(LTBR,CD18)，OX40(TNFRSF4，CD134)，CD40(Bp50)，Fas受体(Apo-1,CD95,FAS)，诱饵受体3(TR6,M68，TNFRSF6B)，CD27(S152,Tp55)，CD30(Ki-1,TNFRSF8)，4-1BB (CD137,TNFRSF9)，DR4(TRAILR1,Apo-2,CD261，TNFRSF10A)，DR5(TRAILR2,CD262,TNFRSF10B)，诱饵受体1(TRAILR3,CD263,TNFRSF10C)，诱饵受体2(TRAILR4,CD264,TNFRSF10D)，RANK (CD265,TNFRSF11A)，骨保护素(OCIF,TR1，TNFRSF11B)，TWEAK受体(Fn14,CD266,TNFRSF12A)，TACI(CD267,TNFRSF13B)，BAFF受体(CD268,TNFRSF13C)，疱疹病毒进入介导物(HVEM,TR2,CD270，TNFRSF14)，神经生长因子受体(p75NTR,CD271,NGFR)，B细胞成熟抗原(CD269,TNFRSF17)，糖皮质激素诱导的TNFR相关的(GITR,AITR，CD357,TNFRSF18)，TROY(TNFRSF19)，DR6(CD358,TNFRSF21)，DR3(Apo-3，TRAMP,WS-1,TNFRSF25)和Ectodysplasin A2受体 (XEDAR,EDA2R)。

[0229] 肿瘤坏死因子受体(TNFR)家族的数个成员在初始T细胞活化后发挥维持T细胞应答的功能。术语“共刺激性TNF受体家族成员”或“共刺激性TNF家族受体”指TNF受体家族成员的一个亚组，它们能够共刺激T细胞的增殖和细胞因子生成。该术语指来自任何脊椎动物来源，包括哺乳动物诸如灵长类(例如人)，非人灵长类(例如食蟹猴)和啮齿类(例如小鼠和大鼠)的任何天然TNF家族受体，除非另有说明。在本发明的具体实施方案中，共刺激性TNF受体家族成员选自由OX40(CD134)，4-1BB(CD137)，CD27，HVEM(CD270)，CD30，和GITR组成的组，它们都对T细胞具有共刺激效果。更加特别地，共刺激性TNF受体家族成员选自由OX40和4-1BB组成的组。

[0230] TNF受体家族成员的进一步信息，特别是序列可以自公众可访问的数据库诸如Uniprot(www.uniprot.org)获得。例如，人共刺激性TNF受体具有下面的氨基酸序列：人OX40(UniProt登录号P43489,SEQ ID NO:98)，人 4-1BB(UniProt登录号Q07011,SEQ ID NO:99)，人CD27(UniProt登录号 P26842,SEQ ID NO:100)，人HVEM(UniProt登录号Q92956，SEQ ID NO:101)，人CD30(UniProt登录号P28908,SEQ ID NO:102)，和人GITR (UniProt登录号Q9Y5U5,SEQ ID NO:103)。

[0231] 如本文中使用的，术语“OX40”指来自任何脊椎动物来源，包括哺乳动物诸如灵长类(例如人)和啮齿类(例如小鼠和大鼠)的任何天然OX40，除非另有说明。该术语涵盖“全长”，未加工的OX40以及因细胞中的加工所致的任何形式的OX40。该术语还涵盖OX40的天然发生变体，例如剪接变体或等位基因变体。一种例示性的人OX40的氨基酸序列显示于SEQ ID NO: 98(Uniprot P43489,version 112)且一种例示性的鼠OX40的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:104(Uniprot P47741,version 101)。

[0232] 术语“抗OX40抗体”，“抗OX40”，“OX40抗体”和“特异性结合 OX40的抗体”指能够以足够的亲和力结合OX40，使得抗体可用作靶向 OX40中的诊断和/或治疗剂的抗体。在一个实施方案中，抗OX40抗体对无关的、非OX40蛋白的结合程度小于抗体对OX40的结合的约10％，如例如通过放射性免疫测定法(RIA)或流式细胞术(FACS)测量的。在某些实施方案中，结合OX40的抗体具有≤1μM、≤100nM、≤10nM、≤1nM、≤0.1 nM、≤0.01nM、或≤0.001nM(例如10^{-6}M或更少，例如10^{-68}M至10^{-13}M，例如10^{-8}M至10^{-10}M)的解离常数(K_D)。。

[0233] 如本文中使用的，术语“4-1BB”指来自任何脊椎动物来源，包括哺乳动物诸如灵长类(例如人)和啮齿类(例如小鼠和大鼠)的任何天然4-1BB，除非另有说明。该术语涵盖“全长”，未加工的4-1BB以及因细胞中的加工所致的任何形式的4-1BB。该术语还涵盖4-1BB的

天然发生变体,例如剪接变体或等位基因变体。一种例示性的人4-1BB的氨基酸序列显示于SEQ ID NO: 99(Uniprot登录号Q07011),一种例示性的鼠4-1BB的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:105(Uniprot登录号P20334)且一种例示性的食蟹猴4-1BB(来自 Macaca mulatta)氨基酸序列显示于SEQ ID NO:106(Uniprot登录号 F6W5G6)。

[0234] 术语“抗4-1BB抗体”,“抗4-1BB”,“4-1BB抗体”和“特异性结合 4-1BB的抗体”指能够以足够的亲和力结合4-1BB,使得抗体可用作靶向 4-1BB中的诊断和/或治疗剂的抗体。在一个实施方案中,抗4-1BB抗体对无关的、非4-1BB蛋白的结合程度小于抗体对4-1BB的结合的约10%,如例如通过放射性免疫测定法(RIA)或流式细胞术(FACS)测量的。在某些实施方案中,结合4-1BB的抗体具有≤1μM、≤100nM、≤10nM、≤1nM、≤0.1 nM、≤0.01nM、或≤0.001nM(例如10^{-6}M或更少,例如10^{-68}M至10^{-13}M,例如10^{-8}M至10^{-10}M)的解离常数(K_D)。

[0235] 术语“肽接头”是指包含一个或多个氨基酸,典型的是约2-20个氨基酸的肽。肽接头在本领域中是已知的或描述于本文中。适合的非免疫原性接头肽例如是,$(G_4S)_n$,$(SG_4)_n$或$G_4(SG_4)_n$肽接头,其中“n”通常为1至10之间的数字,通常为2至4,特别是2,即,这些肽选自GGGGS(SEQ ID NO:107),GGGGSGGGGS(SEQ ID NO:108),SGGGGSGGGG(SEQ ID NO:109)和GGGGSGGGGSGGGG(SEQ ID NO:110),但也包括序列GSPGSSSSGS (SEQ ID NO:111),$(G_4S)_3$(SEQ ID NO:112),$(G_4S)_4$(SEQ ID NO:113), GSGSGSGS(SEQ ID NO:114),GSGSGNGS(SEQ ID NO:115),GGSGSGSG (SEQ ID NO:116),GGSGSG(SEQ ID NO:117),GGSG(SEQ ID NO:118),GGSGNGSG(SEQ ID NO:119),GGNGSGSG(SEQ ID NO:120)和GGNGSG (SEQ ID NO:121)。特别感兴趣的肽接头是(G_4S)(SEQ ID NO:107),$(G_4S)_2$或 GGGGSGGGGS(SEQ ID NO:108)和GSPGSSSSGS(SEQ ID NO:111)。

[0236] 在本申请中使用的术语“氨基酸”表示包含丙氨酸(三字母代码:ala,单字母代码:A),精氨酸(arg,R),天冬酰胺(asn,N),天冬氨酸(asp,D),半胱氨酸(cys,C),谷氨酰胺(gln,Q),谷氨酸(glu,E),甘氨酸(gly,G),组氨酸(his,H),异亮氨酸(ile,I),亮氨酸(leu,L),赖氨酸(lys,K),甲硫氨酸(met,M),苯丙氨酸(phe,F),脯氨酸(pro,P),丝氨酸(ser,S),苏氨酸(thr,T),色氨酸(trp,W),酪氨酸(tyr,Y)和缬氨酸(val,V)的天然存在的羧基α-氨基酸的组。

[0237] “融合”或“连接”意指组分(例如Fab片段和抗体的重链)通过肽键直接连接或经由一个或多个肽接头连接。

[0238] 相对于参考多肽(蛋白质)序列的“氨基酸序列同一性百分比(%)”定义为在序列比对和引入空位(如果需要的话,达到最大序列同一性百分比,并且不考虑作为序列同一性的一部分的任何保守取代)之后候选序列中与参考多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。以本领域技术人员熟知的各种方法可实现为了确定氨基酸序列同一性百分比的比对,例如,利用可公开获得的计算机软件,如BLAST,BLAST-2,ALIGN.SAWI或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可确定用于比对序列的适当参数,包括在所比较的序列的全长上实现最大比对所需要的任何算法。然而,出于本文的目的,通过使用序列比较计算机程序ALIGN-2生成了氨基酸序列同一性%值。ALIGN-2序列比较计算机程序由Genentech公司创作,并且源代码已在美国版权局(U.S.Copyright Office,Washington D.C.,20559) 与用户文件一起备案,在美国版权局以美国版权登记号TXU510087登记。ALIGN-2程序可从加利福尼亚州南旧金山的Genentech公司公开获得,或者可以从源代码编

译。ALIGN-2程序应当编译为供在包括数字UNIX V4.0D在内的UNIX操作系统上使用。所有序列比较参数均由ALIGN-2程序设定且没有变化。在采用ALIGN-2进行氨基酸序列比较的情形下，给定氨基酸序列A 相对于(与，或针对)给定氨基酸序列B的氨基酸序列同一性％(或者可表述为给定氨基酸序列A相对于(与，或针对)给定氨基酸序列B具有或包含一定的氨基酸序列同一性％)计算如下：

[0239] 100乘以分数X/Y

[0240] 其中X为通过序列比对程序ALIGN-2在A与B的程序比对中评定为相同匹配的氨基酸残基的数目，且其中Y为B中的氨基酸残基的总数。应当理解的是，在氨基酸序列A的长度不等于氨基酸序列B的长度的情况下，A相对于B的氨基酸序列同一性％不会等于B相对于A的氨基酸序列同一性％。除非另外特别说明，否则使用ALIGN-2计算机程序如前一段所述获得在本文中使用的所有氨基酸序列同一性％值。

[0241] 在某些实施方案中，考虑了本文提供的含有TNF配体三聚体的抗原结合分子的氨基酸序列变体。例如，可能希望改善含有TNF配体三聚体的抗原结合分子的结合亲和力和/或其他生物学性质。含有TNF配体三聚体的抗原结合分子的氨基酸序列变体可以通过向编码所述分子的核苷酸序列引入适当的修饰，或通过肽合成来制备。这些修饰包括，例如，抗体氨基酸序列中的残基的缺失和/或插入和/或取代。可以进行缺失，插入和取代的任何组合以得到最终的构建体，条件是最终构建体具有期望的特征，例如抗原结合。取代型诱变的感兴趣部位包括HVR和框架(FR)。在表B中的标题“优选取代”下提供了保守取代，并且在下文中参照氨基酸侧链类别(1)至(6)进一步加以描述。可以将氨基酸替代引入感兴趣的分子中，并筛选出具有期望活性的产物，所述活性例如保留/改善的抗原结合，降低的免疫原性，或增强的ADCC或CDC。

[0242] 表B

[0243]

原始残基	示例性取代	优选取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser

[0244]

Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

[0245] 可以根据常见的侧链性质将氨基酸分组：

[0246] (1)疏水的：正亮氨酸，Met，Ala，Val，Leu，Ile；

[0247] (2)中性亲水的：Cys，Ser，Thr，Asn，Gln；

[0248] (3)酸性的：Asp，Glu；

[0249] (4)碱性的：His，Lys，Arg；

[0250] (5)影响链取向的残基：Gly，Pro；

[0251] (6)芳香族的：Trp，Tyr，Phe。

[0252] 非保守取代需要将这些类之一的成员替换为另一类。

[0253] 术语“氨基酸序列变体”包括其中在亲本抗原结合分子(例如人源化或人抗体)的一个或多个高变区残基中存在氨基酸替代的实质性变体。通常，经过选择用于进一步研究的所得变体相对于亲本抗原结合分子在某些生物学特性(例如，增加的亲和力，降低的免疫原性)方面将具有改变(例如提高)和/ 或将具有基本上保留的亲本抗原结合分子的某些生物学特性。示例性的取代变体是亲和力成熟抗体，可以方便地例如使用例如本文所述的那些基于噬菌体展示的亲和力成熟技术来产生所述抗体。简言之，将一个或多个 HVR残基突变，并且将变体抗原结合分子展示在噬菌体上并针对特定的生物学活性(例如结合亲和力)进行筛选。在某些实施方案中，取代，插入或缺失可以在一个或多个HVR内进行，只要这些改变基本上不降低抗原结合分子结合抗原的能力即可。例如，可以在HVR中进行基本上不降低结合亲和力的保守改变(例如本文中提供的保守取代)。用于鉴定可能被靶向诱变的抗体残基或区域的有用方法被称为“丙氨酸扫描诱变”，如Cunningham和Wells (1989)Science，244:1081-1085所述。在该方法中，鉴定残基或一组靶残基 (例如，带电残基，如Arg，Asp，His，Lys和Glu)，并用中性或带负电的氨基酸(例如丙氨酸或聚丙氨酸)替换，以确定抗体与

抗原的相互作用是否受到影响。可以在针对初始取代显示功能敏感性的氨基酸位置引入进一步的取代。替代地，或另外地，抗原-抗原结合分子复合物的晶体结构用于鉴定抗体和抗原之间的接触点。这样的接触残基和相邻残基可以作为取代候选物被靶向或消除。可以筛选变体以确定它们是否具备期望的特性。

[0254] 氨基酸序列插入包括长度从一个残基到含有一百个或更多个残基的多肽的氨基和/或羧基末端融合，以及单个或多个氨基酸残基的序列间插入。末端插入的实例包括具有N末端甲硫氨酰残基的本发明的双特异性抗原结合分子。分子的其他插入变体包括与多肽的N末端或C末端的融合，以增加双特异性抗原结合分子的血清半衰期。

[0255] 在某些实施方案中，改变本文中提供的双特异性抗原结合分子以增加或降低抗体被糖基化的程度。通过改变氨基酸序列从而产生或去除一个或多个糖基化位点，可以方便地获得分子的糖基化变体。当双特异性抗原结合分子包含Fc区时，附着于其上的碳水化合物可能被改变。由哺乳动物细胞产生的天然抗体通常包含支链的双触角(biantennary)寡糖，其通常通过N 键与Fc区的CH2域的Asn297连接。参见，例如Wright等人，TIBTECH 15:26-32(1997)。寡糖可以包括各种碳水化合物，例如甘露糖，N-乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)，半乳糖和唾液酸，以及与在双触角寡糖结构的“茎”中的 GlcNAc附接的岩藻糖。在一些实施方案中，可以对双特异性抗原结合分子进行寡糖修饰，以产生具有某些改良特性的变体。在一个方面，提供了具有缺乏与Fc区附接(直接或间接)的岩藻糖的碳水化合物结构的本发明的双特异性抗原结合分子或抗体的变体。这样的岩藻糖基化变体可具有改善的 ADCC功能，参见，例如美国专利公开Nos.US 2003/0157108(Presta,L.)或 US 2004/0093621(Kyowa Hakko Kogyo Co.,Ltd)。在另一个方面，提供了具有两分型寡糖的本发明的双特异性抗原结合分子或抗体的变体，例如，其中与Fc区附接的双触角寡糖被GlcNAc两分。这些变体可以具有降低的岩藻糖基化和/或改善的ADCC功能，参见例如WO 2003/011878(Jean-Mairet等人)；美国专利No.6,602,684(Umana等人)；和US 2005/0123546(Umana等人)。还提供了与Fc区附接的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的变体。这样的抗体变体可以具有改善的CDC功能，并被描述于例如WO 1997/30087 (Patel等人)；WO 1998/58964(Raju,S.)；和WO 1999/22764(Raju,S.)中。

[0256] 在某些方面，可能希望产生本发明的双特异性抗原结合分子的半胱氨酸工程化的变体，例如“thioMAb”，其中该分子的一个或多个残基被半胱氨酸残基取代。在特定方面，取代的残基出现在分子的可接近位置。通过用半胱氨酸取代那些残基，由此反应性硫醇基团被定位在抗体的可接近位点，并且可以用于将抗体与其他模块(例如药物模块或接头-药物模块)缀合以产生免疫缀合物。在某些方面，任何一个或多个以下残基可以被半胱氨酸取代：轻链的V205(Kabat编号)；重链的A118(EU编号)；和重链Fc区的 S400(EU编号)。可以按照例如美国专利No.7,521,541中的描述产生半胱氨酸工程化的抗原结合分子。

[0257] 术语“多核苷酸”是指分离的核酸分子或构建体，例如，信使 RNA(mRNA)，病毒来源的RNA或质粒DNA(pDNA)。多核苷酸可以包含常规的磷酸二酯键或非常规键(例如，可见于肽核酸(PNA)中的酰胺键)。术语“核酸分子”是指任何一个或多个核酸区段，例如，存在于多核苷酸中的 DNA或RNA片段。

[0258] 关于“分离的”核酸分子或多核苷酸，意指已经从其天然环境中移出的核酸分子，DNA或RNA。例如，编码包含在载体中的多肽的重组多核苷酸出于本发明的目的被认为是分

离的。分离的多核苷酸的另外的例子包括保持在异源宿主细胞中的重组多核苷酸或溶液形式的纯化的(部分地或基本上纯化的)多核苷酸。分离的多核苷酸包括通常含有多核苷酸分子的细胞中所含的多核苷酸分子,但多核苷酸分子在染色体外存在或在与其天然染色体位置不同的染色体位置处存在。分离的RNA分子包括本发明的体内或体外 RNA转录物,以及正链和负链形式以及双链形式。根据本发明的分离的多核苷酸或核酸还包括合成产生的此类分子。另外,多核苷酸或核酸可以是或可以包括调节元件,例如启动子,核糖体结合位点或转录终止子。

[0259] 关于具有至少例如与本发明的参考核苷酸序列95%“相同”的核苷酸序列的核酸或多核苷酸,意指除了该多核苷酸序列可以包括至多该参考核苷酸序列的每100个核苷酸的5个点突变之外,所述多核苷酸的核苷酸序列与参考序列相同。换句话说,为了获得具有与参考核苷酸序列至少95%相同的核苷酸序列的多核苷酸,参考序列中至多5%的核苷酸可以被缺失或被另一个核苷酸取代,或者,在参考序列中,总核苷酸的至多5%的多个核苷酸可被插入参考序列。参考序列的这些改变可以发生在参考核苷酸序列的5’或3’ 末端位置或那些末端位置之间的任何位置,独立散布在参考序列的残基之间或在参考序列内的一个基团或多个连续的基团中。实际情况是,使用例如上面针对多肽所讨论的已知的计算机程序(例如ALIGN-2),可以常规地确定任何特定的多核苷酸序列是否与本发明的核苷酸序列具有至少80%, 85%,90%,95%,96%,97%,98%或99%同一性。

[0260] 术语“表达盒”是指重组或合成产生的多核苷酸,其具有一系列允许特定核酸在靶细胞中转录的特定核酸元件。重组表达盒可以掺入质粒,染色体,线粒体DNA,质体DNA,病毒或核酸片段中。通常,除了其他序列之外,表达载体的重组表达盒部分包括待转录的核酸序列和启动子。在某些实施方案中,本发明的表达盒包含编码本发明的双特异性抗原结合分子或其片段的多核苷酸序列。

[0261] 术语“载体”或“表达载体”与“表达构建体”是同义的,并且是指用于将与其可操作地相关联的特定基因引入靶细胞中并且指导所述特定基因的表达的DNA分子。该术语包括作为自身复制核酸结构的载体以及组入其已被引入的宿主细胞的基因组中的载体。本发明的表达载体包括表达盒。表达载体允许大量稳定的mRNA的转录。一旦表达载体进入靶细胞内,则通过细胞转录和/或翻译机制产生由该基因编码的核糖核酸分子或蛋白质。在一个实施方案中,本发明的表达载体包含含有编码本发明的双特异性抗原结合分子或其片段的多核苷酸序列的表达盒。

[0262] 术语“宿主细胞”,“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用,并且是指在其中引入了外源核酸的细胞,包括这些细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“转化细胞”,其包括初级转化细胞和从其衍生的后代,而不考虑传代次数。后代在核酸含量方面与亲本细胞可能不完全相同,而可能含有突变。在本文中包括具有与在原始转化细胞中所筛选或选择相同的功能或生物学活性的突变体后代。宿主细胞是可用于产生本发明的双特异性抗原结合分子的任何类型的细胞系统。宿主细胞包括培养的细胞,例如培养的哺乳动物细胞,例如CHO细胞,BHK细胞,NS0细胞,SP2/0细胞,YO骨髓瘤细胞,P3X63小鼠骨髓瘤细胞,PER细胞,PER.C6细胞或杂交瘤细胞,酵母细胞,昆虫细胞和植物细胞,在此仅列举少数,还有包含在转基因动物,转基因植物或培养的植物或动物组织内的细胞。

[0263] 药剂的“有效量”是指导致其所施用的细胞或组织的生理学变化所必需的量。

[0264] 药剂(例如药物组合物)的“治疗有效量”是指在剂量和时间段方面有效实现期望的治疗或预防结果所需的量。例如,治疗有效量的药剂消除,减少,延迟,最小化或预防疾病的不利影响。

[0265] “个体”或“受试者”为哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯养动物(例如母牛,绵羊,猫,狗和马),灵长类动物(例如人类和非人灵长类动物如猴子),兔,和啮齿动物(例如小鼠和大鼠)。具体地说,个体或受试者是人。

[0266] 术语“药物组合物”是指其为这样的形式的制剂,所述形式允许其中所含的活性成分的生物学活性是有效的,并且所述制剂不含另外的对该制剂所施用的受试者具有不可接受的毒性的组分。

[0267] “药学上可接受的赋形剂”是指药物组合物中除了活性成分以外的对受试者无毒的成分。药学上可接受的赋形剂包括但不限于缓冲剂,稳定剂或防腐剂。

[0268] 术语“包装说明书”用于指通常包括在治疗产品的商业包装中的说明书,其包含关于使用这种治疗产品的适应症,用法,剂量,给药,联合疗法,禁忌症和/或警告的信息。

[0269] 如本文中使用的,“治疗”(“treatment”)(及其语法变化例如“治疗”(“treat”)或“治疗”(“treating”))是指试图改变被治疗个体的自然病程的临床干预,所述临床干预可用于预防或在临床病理过程中进行。期望的治疗效果包括但不限于预防疾病的发生或复发,症状减轻,疾病的任何直接或间接病理结果的削减,预防转移,降低疾病进展速度,改善或减轻疾病状态,以及缓解或改善预后。在一些实施方案中,本发明的分子用于延缓疾病的发展或减缓疾病的进展。

[0270] 如本文中使用的术语“癌症”是指增殖性疾病,例如淋巴瘤,淋巴细胞性白血病,肺癌,非小细胞肺癌(NSCL),支气管肺泡细胞肺癌,骨癌,胰腺癌,皮肤癌,头颈癌,皮肤或眼内黑素瘤,子宫癌,卵巢癌,直肠癌,肛门区癌,胃癌,胃的癌,结肠癌,乳腺癌,子宫癌,输卵管癌,子宫内膜癌,子宫颈癌,阴道癌,外阴癌,霍奇金病,食道癌,小肠癌,内分泌系统的癌症,甲状腺癌,甲状旁腺癌,肾上腺癌,软组织肉瘤,尿道癌,阴茎癌,前列腺癌,膀胱癌,肾癌或输尿管癌,肾细胞癌,肾盂癌,间皮瘤,肝细胞癌,胆道癌,中枢神经系统(CNS)肿瘤,脊索瘤,脑干神经胶质瘤,多形性胶质母细胞瘤,星形细胞瘤,神经鞘瘤,室管膜瘤,成神经管细胞瘤,脑膜瘤,鳞状细胞癌,垂体腺瘤和尤文氏肉瘤,包括任何上述癌症的难治性形式,或上述一种或多种癌症的组合。

[0271] 本发明的双特异性抗体

[0272] 本发明提供了具有特别有利的性质的新颖的双特异性抗原结合分子,所述性质诸如可生产性、稳定性、结合亲和力、生物学活性、靶向效率和降低的毒性。

[0273] 例示性的双特异性抗原结合分子

[0274] 在一个方面,本发明提供双特异性抗原结合分子,其包含

[0275] (a)至少一个能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的模块,

[0276] (b)至少一个能够特异性结合靶细胞抗原的模块,和

[0277] (c)由能够稳定联合的第一和第二亚基构成的Fc域。

[0278] 在一个特定的方面,这些双特异性抗原结合分子特征在于激动性结合共刺激性TNF受体家族成员。特别地,该共刺激性TNF受体家族成员选自由 OX40和4-1BB组成的组。

[0279] 结合OX40的双特异性抗原结合分子

[0280] 在一个方面，该共刺激性TNF受体家族成员是OX40。特别地，本发明提供双特异性抗原结合分子，其中该能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的模块结合包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽。

[0281] 在一个方面，提供的是一种双特异性抗原结合分子，其包含至少一个能够特异性结合OX40的模块，其中所述模块包含VH域，其包含

[0282] (i)包含选自由SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3组成的组的氨基酸序列的 CDR-H1，

[0283] (ii)包含选自由SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5组成的组的氨基酸序列的 CDR-H2，和

[0284] (iii)包含选自由SEQ ID NO:6，SEQ ID NO:7，SEQ ID NO:8，SEQ ID NO:9， SEQ ID NO:10，SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12组成的组的氨基酸序列的CDR-H3，

[0285] 和VL域，其包含

[0286] (iv)包含选自由SEQ ID NO:13，SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15组成的组的氨基酸序列的CDR-L1，

[0287] (v)包含选自由SEQ ID NO:16，SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18组成的组的氨基酸序列的CDR-L2，和

[0288] (vi)包含选自由SEQ ID NO:19，SEQ ID NO:20，SEQ ID NO:21，SEQ ID NO:22，SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24组成的组的氨基酸序列的 CDR-L3。

[0289] 特别地，提供的是一种双特异性抗原结合分子，其包含至少一个能够特异性结合OX40的模块，其中所述模块包含

[0290] (a)VH域，其包含包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR-H1，包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的CDR-H2，包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的 CDR-H3和VL域，其包含包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的CDR-L1，包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR-L2和包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的CDR-L3，

[0291] (b)VH域，其包含包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR-H1，包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的CDR-H2，包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的 CDR-H3和VL域，其包含包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的CDR-L1，包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR-L2和包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的CDR-L3，

[0292] (c)VH域，其包含包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR-H1，包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的CDR-H2，包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的 CDR-H3和VL域，其包含包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的CDR-L1，包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR-L2和包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR-L3，

[0293] (d)VH域，其包含包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR-H1，包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的CDR-H2，包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的 CDR-H3和VL域，其包含包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的CDR-L1，包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR-L2和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的CDR-L3，

[0294] (e)VH域，其包含包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR-H1，包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的CDR-H2，包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的 CDR-H3和VL域，其包含包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDR-L1，包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的CDR-L2和包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的CDR-L3，

[0295] (f)VH域,其包含包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR-H1,包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的CDR-H2,包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的 CDR-H3和VL域,其包含包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDR-L1,包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的CDR-L2和包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的CDR-L3,或

[0296] (g)VH域,其包含包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR-H1,包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的CDR-H2,包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的 CDR-H3和VL域,其包含包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDR-L1,包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的CDR-L2和包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CDR-L3。

[0297] 在一个方面,本发明提供一种双特异性抗原结合分子,其包含至少一个能够特异性结合OX40的模块,其中所述模块包含VH域,其包含包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR-H1,包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的 CDR-H2,包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR-H3和VL域,其包含包含 SEQ ID NO:13的氨基酸序列的CDR-L1,包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR-L2和包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的CDR-L3。

[0298] 在另一个方面,本发明提供一种双特异性抗原结合分子,其中能够特异性结合OX40的模块包含包含与选自由SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:29,SEQ ID NO:31,SEQ ID NO:33,SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:37组成的组的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的重链可变区VH和包含与SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:30,SEQ ID NO:30,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:34,SEQ ID NO:36和SEQ ID NO:38的氨基酸序列至少约95%,96%,97%, 98%,99%或100%同一的氨基酸序列的轻链可变区VL。

[0299] 特别地,提供的是一种双特异性抗原结合分子,其中能够特异性结合 OX40的模块包含

[0300] (i)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:26 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0301] (ii)包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:28 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0302] (iii)包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:30 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0303] (iv)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:32 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0304] (v)包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:34 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0305] (vi)包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:36 的氨基酸序列的轻链可变区VL,或

[0306] (vii)包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:38 的氨基酸序列的轻链可变区VL。

[0307] 在一个特定的方面,提供的是一种双特异性抗原结合分子,其中能够特异性结合OX40的模块包含包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链可变区 VH和包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的轻链可变区VL。

[0308] 结合4-1BB的双特异性抗原结合分子

[0309] 在另一个方面,该共刺激性TNF受体家族成员是4-1BB。特别地,本发明提供双特异性抗原结合分子,其中能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的模块结合包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的多肽。

[0310] 在一个方面,提供的是一种双特异性抗原结合分子,其包含至少一个能够特异性结合4-1BB的模块,其中所述模块包含

[0311] VH域,其包含

[0312] (i)包含选自由SEQ ID NO:40和SEQ ID NO:41组成的组的氨基酸序列的 CDR-H1,

[0313] (ii)包含选自由SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:43组成的组的氨基酸序列的CDR-H2,和

[0314] (iii)包含选自由SEQ ID NO:44,SEQ ID NO:45,SEQ ID NO:46,SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48组成的组的氨基酸序列的CDR-H3,

[0315] 和VL域,其包含

[0316] (iv)包含选自由SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:50组成的组的氨基酸序列的 CDR-L1,

[0317] (v)包含选自由SEQ ID NO:51和SEQ ID NO:52组成的组的氨基酸序列的 CDR-L2,和

[0318] (vi)包含选自由SEQ ID NO:53,SEQ ID NO:54,SEQ ID NO:55,SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57组成的组的氨基酸序列的CDR-L3。

[0319] 特别地,提供的是一种双特异性抗原结合分子,其包含至少一个能够特异性结合4-1BB的模块,其中所述模块包含

[0320] (a)VH域,其包含包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDR-H1,包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的CDR-H2,包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的 CDR-H3和VL域,其包含包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的CDR-L1,包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的CDR-L2和包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的CDR-L3,

[0321] (b)VH域,其包含包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的CDR-H1,包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的CDR-H2,包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的 CDR-H3和VL域,其包含包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的CDR-L1,包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的CDR-L2和包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的CDR-L3,

[0322] (c)VH域,其包含包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDR-H1,包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的CDR-H2,包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的 CDR-H3和VL域,其包含包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的CDR-L1,包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的CDR-L2和包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的CDR-L3,

[0323] (d)VH域,其包含包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDR-H1,包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的CDR-H2,包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的 CDR-H3和VL域,其包含包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的CDR-L1,包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的CDR-L2和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的CDR-L3,或

[0324] (e)VH域,其包含包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDR-H1,包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的CDR-H2,包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的 CDR-H3和VL域,其包含包含SEQ

ID NO:49的氨基酸序列的CDR-L1,包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的CDR-L2和包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的CDR-L3。

[0325] 在另一个方面,本发明提供一种双特异性抗原结合分子,其中能够特异性结合4-1BB的模块包含包含与选自由SEQ ID NO:58,SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:62,SEQ ID NO:64和SEQ ID NO:66组成的组的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的重链可变区 VH和包含与选自由SEQ ID NO:59,SEQ ID NO:61,SEQ ID NO:63,SEQ ID NO:65和SEQ ID NO:67组成的组的氨基酸序列至少约95%,96%,97%, 98%,99%或100%同一的氨基酸序列的轻链可变区。

[0326] 特别地,提供的是一种双特异性抗原结合分子,其中能够特异性结合 4-1BB的模块包含

[0327] (i)包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:59 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0328] (ii)包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:61 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0329] (iii)包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:63 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0330] (iv)包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:65 的氨基酸序列的轻链可变区VL,或

[0331] (v)包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:67 的氨基酸序列的轻链可变区VL。

[0332] 本发明的双特异性抗原结合分子进一步特征在于包含至少一个能够特异性结合靶细胞抗原的模块。如此,该双特异性抗原结合分子拥有胜过能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的常规抗体的优势,即它们在靶细胞,典型地是癌症细胞处选择性诱导共刺激性T细胞应答。在一个方面,该靶细胞抗原选自由成纤维细胞激活蛋白(FAP),黑素瘤相关硫酸软骨素蛋白聚糖(MCSP),表皮生长因子受体(EGFR),癌胚抗原(CEA),CD19,CD20 和CD33组成的组。

[0333] 双特异性抗原结合分子,其中该靶细胞抗原是FAP

[0334] 在一个特定的方面,该靶细胞抗原是成纤维细胞激活蛋白(FAP)。FAP 结合模块已经描述于WO 2012/02006,通过援引将其完整包括。下文描述了特别感兴趣的FAP结合模块。

[0335] 在一个方面,本发明提供一种双特异性抗原结合分子,其中能够特异性结合FAP的模块包含

[0336] VH域,其包含

[0337] (i)包含选自由SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69组成的组的氨基酸序列的 CDR-H1,

[0338] (ii)包含选自由SEQ ID NO:70和SEQ ID NO:71组成的组的氨基酸序列的 CDR-H2,和

[0339] (iii)包含选自由SEQ ID NO:72和SEQ ID NO:73组成的组的氨基酸序列的 CDR-H3,

[0340] 和VL域,其包含

[0341] (iv)包含选自由SEQ ID NO:74和SEQ ID NO:75组成的组的氨基酸序列的 CDR-

L1，

[0342] (v)包含选自由SEQ ID NO:76和SEQ ID NO:77组成的组的氨基酸序列的 CDR-L2，和

[0343] (vi)包含选自由SEQ ID NO:78和SEQ ID NO:79组成的组的氨基酸序列的 CDR-L3。

[0344] 特别地，提供的是一种双特异性抗原结合分子，其中能够特异性结合 FAP的模块包含

[0345] (a)VH域，其包含包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列的CDR-H1，包含 SEQ ID NO:70的氨基酸序列的CDR-H2，包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的CDR-H3和VL域，其包含包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列的CDR-L1，包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列的CDR-L2和包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列的CDR-L3，或

[0346] (b)VH域，其包含包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的CDR-H1，包含 SEQ ID NO:71的氨基酸序列的CDR-H2，包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列的CDR-H3和VL域，其包含包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列的CDR-L1，包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列的CDR-L2和包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列的CDR-L3。

[0347] 在一个特定的方面，该能够特异性结合FAP的模块包含VH域，其包含包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的CDR-H1，包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列的CDR-H2，包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列的CDR-H3和VL域，其包含包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列的CDR-L1，包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列的CDR-L2和包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列的CDR-L3。

[0348] 特别地，提供的是一种双特异性抗原结合分子，其中能够特异性结合 FAP的模块包含

[0349] (i)包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:81 的氨基酸序列的轻链可变区VL，或

[0350] (ii)包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:83 的氨基酸序列的轻链可变区VL。

[0351] 结合OX40和FAP的双特异性抗原结合分子

[0352] 在又一个方面，提供的是一种双特异性抗原结合分子，其中

[0353] (i)能够特异性结合OX40的模块包含包含与SEQ ID NO:25，SEQ ID NO:27， SEQ ID NO:29，SEQ ID NO:31，SEQ ID NO:33，SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:37的氨基酸序列至少约95％，96％，97％，98％，99％或100％同一的氨基酸序列的重链可变区VH，和包含与SEQ ID NO:26，SEQ ID NO:28， SEQ ID NO:30，SEQ ID NO:32，SEQ ID NO:34，SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:38的氨基酸序列至少约95％，96％，97％，98％，99％或100％同一的氨基酸序列的轻链可变区，且

[0354] (ii)能够特异性结合FAP的模块包含包含与SEQ ID NO:80或SEQ ID NO:82 的氨基酸序列至少约95％，96％，97％，98％，99％或100％同一的氨基酸序列的重链可变区VH和包含与SEQ ID NO:81或SEQ ID NO:83的氨基酸序列至少约95％，96％，97％，98％，99％或100％同一的氨基酸序列的轻链可变区。

[0355] 在一个特定的方面，提供的是一种双特异性抗原结合分子，其中

[0356] (a)能够特异性结合OX40的模块包含包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的重链可变

区VH和包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的轻链可变区且能够特异性结合FAP的模块包含包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的轻链可变区，

[0357] (b)能够特异性结合OX40的模块包含包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的轻链可变区且能够特异性结合FAP的模块包含包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列的轻链可变区，

[0358] (c)能够特异性结合OX40的模块包含包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的轻链可变区且能够特异性结合FAP的模块包含包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的轻链可变区，

[0359] (d)能够特异性结合OX40的模块包含包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的轻链可变区且能够特异性结合FAP的模块包含包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列的轻链可变区，

[0360] (e)能够特异性结合OX40的模块包含包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的轻链可变区且能够特异性结合FAP的模块包含包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的轻链可变区，

[0361] (f)能够特异性结合OX40的模块包含包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的轻链可变区且能够特异性结合FAP的模块包含包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列的轻链可变区，

[0362] (g)能够特异性结合OX40的模块包含包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的轻链可变区且能够特异性结合FAP的模块包含包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的轻链可变区，

[0363] (h)能够特异性结合OX40的模块包含包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的轻链可变区且能够特异性结合FAP的模块包含包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列的轻链可变区，

[0364] (i)能够特异性结合OX40的模块包含包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的轻链可变区且能够特异性结合FAP的模块包含包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的轻链可变区，

[0365] (j)能够特异性结合OX40的模块包含包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的轻链可变区且能够特异性结合FAP的模块包含包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列的轻链可变区，

[0366] (k)能够特异性结合OX40的模块包含包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的轻链可变区且能够特异性结合FAP的模块包含包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的轻链可变区，

[0367] (l)能够特异性结合OX40的模块包含包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的轻链可变区且能够特异性结合FAP的模块包含包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列的轻链可变区，

[0368] (m)能够特异性结合OX40的模块包含包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的轻链可变区且能够特异性结合FAP的模块包含包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的轻链可变区,或

[0369] (n)能够特异性结合OX40的模块包含包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的轻链可变区且能够特异性结合FAP的模块包含包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列的轻链可变区。

[0370] 在一个特定的方面,本发明提供一种双特异性抗原结合分子,其中能够特异性结合OX40的模块包含包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的轻链可变区且能够特异性结合 FAP的模块包含包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列的重链可变区VH和包含 SEQ ID NO:81的氨基酸序列的轻链可变区,或其中能够特异性结合OX40的模块包含包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的轻链可变区且能够特异性结合FAP的模块包含包含 SEQ ID NO:82的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列的轻链可变区。

[0371] 结合4-1BB和FAP的双特异性抗原结合分子

[0372] 在另一个方面,提供的是一种双特异性抗原结合分子,其中

[0373] (i)能够特异性结合4-1BB的模块包含包含与SEQ ID NO:58,SEQ ID NO:60,SEQ ID NO:62,SEQ ID NO:64或SEQ ID NO:66的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的重链可变区VH和包含与SEQ ID NO:59,SEQ ID NO:61,SEQ ID NO:63,SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:67的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%, 99%或100%同一的氨基酸序列的轻链可变区,且

[0374] (ii)能够特异性结合FAP的模块包含包含与SEQ ID NO:80或SEQ ID NO:82 的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的重链可变区VH和包含与SEQ ID NO:81或SEQ ID NO:83的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的轻链可变区。

[0375] 在一个特定的方面,提供的是一种双特异性抗原结合分子,其中

[0376] (a)能够特异性结合4-1BB的模块包含包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的轻链可变区且能够特异性结合FAP的模块包含包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的轻链可变区，

[0377] (b)能够特异性结合4-1BB的模块包含包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的轻链可变区且能够特异性结合FAP的模块包含包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列的轻链可变区，

[0378] (c)能够特异性结合4-1BB的模块包含包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的轻链可变区且能够特异性结合FAP的模块包含包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的轻链可变区，

[0379] (d)能够特异性结合4-1BB的模块包含包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的轻链可变区且能够特异性结合FAP的模块包含包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列的轻链可变区，

[0380] (e)能够特异性结合4-1BB的模块包含包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的轻链可变区且能够特异性结合FAP的模块包含包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的轻链可变区，

[0381] (f)能够特异性结合4-1BB的模块包含包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的轻链可变区且能够特异性结合FAP的模块包含包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列的轻链可变区，

[0382] (g)能够特异性结合4-1BB的模块包含包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的轻链可变区且能够特异性结合FAP的模块包含包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的轻链可变区，

[0383] (h)能够特异性结合4-1BB的模块包含包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的轻链可变区且能够特异性结合FAP的模块包含包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列的轻链可变区，

[0384] (i)能够特异性结合4-1BB的模块包含包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的轻链可变区且能够特异性结合FAP的模块包含包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的轻链可变区,或

[0385] (j)能够特异性结合4-1BB的模块包含包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的轻链可变区且能够特异性结合FAP的模块包含包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列的轻链可变区。

[0386] 双特异性,单价抗原结合分子(1+1格式)

[0387] 在一个方面,本发明涉及双特异性抗原结合分子,其包含(a)一个能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的模块,(b)一个能够特异性结合靶细胞抗原的模块,和(c)由能

够稳定联合的第一和第二亚基构成的Fc域。

[0388] 在一个特定的方面,提供的是一种双特异性抗原结合分子,其中所述分子包含

[0389] (a)能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的第一Fab片段,

[0390] (b)能够特异性结合靶细胞抗原的第二Fab片段,和

[0391] (c)由能够稳定联合的第一和第二亚基构成的Fc域。

[0392] 在一个方面,提供的是一种双特异性抗原结合分子,其中所述分子包含

[0393] (a)能够特异性结合OX40的第一Fab片段,

[0394] (b)能够特异性结合靶细胞抗原的第二Fab片段,和

[0395] (c)由能够稳定联合的第一和第二亚基构成的Fc域。

[0396] 在又一个方面,提供的是一种双特异性抗原结合分子,其中所述分子包含

[0397] (a)能够特异性结合OX40的第一Fab片段,

[0398] (b)能够特异性结合FAP的第二Fab片段,和

[0399] (c)由能够稳定联合的第一和第二亚基构成的Fc域。

[0400] 在一个特定的方面,本发明提供一种双特异性抗原结合分子,其包含

[0401] (a)包含SEQ ID NO:303的氨基酸序列的第一重链,包含SEQ ID NO:182的氨基酸序列的第一轻链,

[0402] 包含SEQ ID NO:229的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:217 的氨基酸序列的第二轻链,或

[0403] (b)包含SEQ ID NO:231的氨基酸序列的第一重链,包含SEQ ID NO:186的氨基酸序列的第一轻链,

[0404] 包含SEQ ID NO:229的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:217 的氨基酸序列的第二轻链,或

[0405] (c)包含SEQ ID NO:233的氨基酸序列的第一重链,包含SEQ ID NO:190的氨基酸序列的第一轻链,

[0406] 包含SEQ ID NO:229的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:217 的氨基酸序列的第二轻链,或

[0407] (d)包含SEQ ID NO:235的氨基酸序列的第一重链,包含SEQ ID NO:194的氨基酸序列的第一轻链,

[0408] 包含SEQ ID NO:229的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:217 的氨基酸序列的第二轻链,或

[0409] (e)包含SEQ ID NO:237的氨基酸序列的第一重链,包含SEQ ID NO:198的氨基酸序列的第一轻链,

[0410] 包含SEQ ID NO:229的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:217 的氨基酸序列的第二轻链,或

[0411] (f)包含SEQ ID NO:239的氨基酸序列的第一重链,包含SEQ ID NO:202的氨基酸序列的第一轻链,

[0412] 包含SEQ ID NO:229的氨基酸序列的第二重链,和包含SEQ ID NO:217 的氨基酸序列的第二轻链。

[0413] 在一个方面,提供的是一种双特异性抗原结合分子,其中所述分子包含

[0414] (a)能够特异性结合4-1BB的第一Fab片段，

[0415] (b)能够特异性结合靶细胞抗原的第二Fab片段，和

[0416] (c)由能够稳定联合的第一和第二亚基构成的Fc域。

[0417] 在又一个方面，提供的是一种双特异性抗原结合分子，其中所述分子包含

[0418] (a)能够特异性结合4-1BB的第一Fab片段，

[0419] (b)能够特异性结合FAP的第二Fab片段，和

[0420] (c)由能够稳定联合的第一和第二亚基构成的Fc域。

[0421] 在一个特定的方面，本发明提供一种双特异性抗原结合分子，其包含

[0422] (a)包含SEQ ID NO:295的氨基酸序列的第一重链，包含SEQ ID NO:261的氨基酸序列的第一轻链，

[0423] 包含SEQ ID NO:229的氨基酸序列的第二重链，和包含SEQ ID NO:217 的氨基酸序列的第二轻链，或

[0424] (b)包含SEQ ID NO:297的氨基酸序列的第一重链，包含SEQ ID NO:265的氨基酸序列的第一轻链，

[0425] 包含SEQ ID NO:229的氨基酸序列的第二重链，和包含SEQ ID NO:217 的氨基酸序列的第二轻链，或

[0426] (c)包含SEQ ID NO:299的氨基酸序列的第一重链，包含SEQ ID NO:269的氨基酸序列的第一轻链，

[0427] 包含SEQ ID NO:229的氨基酸序列的第二重链，和包含SEQ ID NO:217 的氨基酸序列的第二轻链，或

[0428] (d)包含SEQ ID NO:301的氨基酸序列的第一重链，包含SEQ ID NO:273的氨基酸序列的第一轻链，

[0429] 包含SEQ ID NO:229的氨基酸序列的第二重链，和包含SEQ ID NO:217 的氨基酸序列的第二轻链。

[0430] 双特异性，二价抗原结合分子(2+2格式)

[0431] 在另一个方面，本发明涉及一种双特异性抗原结合分子，其包含

[0432] (a)两个能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的模块，

[0433] (b)两个能够特异性结合靶细胞抗原的模块，和

[0434] (c)由能够稳定联合的第一和第二亚基构成的Fc域。

[0435] 在一个方面，该双特异性抗原结合分子对于共刺激性TNF受体家族成员和靶细胞抗原二者是二价的。

[0436] 在一个方面，本发明的双特异性抗原结合分子包含

[0437] (a)包含两个能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的Fab片段和Fc域的抗体的两条轻链和两条重链，和

[0438] (b)两个另外的能够特异性结合靶细胞抗原的Fab片段，其中所述另外的Fab 片段各自经肽接头连接至(a)的重链的C端。

[0439] 在一个特定的方面，该肽接头是$(G_4S)_4$。

[0440] 在另一个方面，该两个另外的能够特异性结合靶细胞抗原的Fab片段是交换Fab片段，其中可变域VL和VH彼此替换且VL-CH链各自经肽接头连接至(a)的重链的C端。

[0441] 特别地，本发明涉及双特异性抗原结合分子，其中两个能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的Fab片段是两个能够特异性结合OX40或 4-1BB的Fab片段且两个另外的能够特异性结合靶细胞抗原的Fab片段是能够特异性结合FAP的交换Fab片段。

[0442] 在一个方面，本发明涉及一种双特异性抗原结合分子，其包含(a)两个能够特异性结合OX40的模块，(b)两个能够特异性结合FAP的模块，和(c)由能够稳定联合的第一和第二亚基构成的Fc域。

[0443] 在一个特定的方面，本发明提供一种双特异性抗原结合分子，其包含

[0444] (a)各自包含SEQ ID NO:216的氨基酸序列的两条重链，包含SEQ ID NO:182的氨基酸序列的第一轻链，和包含SEQ ID NO:217的氨基酸序列的第二轻链，或

[0445] (b)各自包含SEQ ID NO:219的氨基酸序列的两条重链，包含SEQ ID NO:186的氨基酸序列的第一轻链，和包含SEQ ID NO:217的氨基酸序列的第二轻链，或

[0446] (c)各自包含SEQ ID NO:221的氨基酸序列的两条重链，包含SEQ ID NO:190的氨基酸序列的第一轻链，和包含SEQ ID NO:217的氨基酸序列的第二轻链，或

[0447] (d)各自包含SEQ ID NO:223的氨基酸序列的两条重链，包含SEQ ID NO:194的氨基酸序列的第一轻链，和包含SEQ ID NO:217的氨基酸序列的第二轻链，或

[0448] (e)各自包含SEQ ID NO:225的氨基酸序列的两条重链，包含SEQ ID NO:198的氨基酸序列的第一轻链，和包含SEQ ID NO:217的氨基酸序列的第二轻链，或

[0449] (f)各自包含SEQ ID NO:227的氨基酸序列的两条重链，包含SEQ ID NO:202的氨基酸序列的第一轻链，和包含SEQ ID NO:217的氨基酸序列的第二轻链。

[0450] 在一个方面，本发明涉及一种双特异性抗原结合分子，其包含(a)两个能够特异性结合4-1BB的模块，(b)两个能够特异性结合FAP的模块，和(c)由能够稳定联合的第一和第二亚基构成的Fc域。

[0451] 在一个特定的方面，本发明提供一种双特异性抗原结合分子，其包含

[0452] (a)各自包含SEQ ID NO:287的氨基酸序列的两条重链，包含SEQ ID NO:261的氨基酸序列的第一轻链，和包含SEQ ID NO:217的氨基酸序列的第二轻链，或

[0453] (b)各自包含SEQ ID NO:289的氨基酸序列的两条重链，包含SEQ ID NO:265的氨基酸序列的第一轻链，和包含SEQ ID NO:217的氨基酸序列的第二轻链，或

[0454] (c)各自包含SEQ ID NO:291的氨基酸序列的两条重链，包含SEQ ID NO:269的氨基酸序列的第一轻链，和包含SEQ ID NO:217的氨基酸序列的第二轻链，或

[0455] (d)各自包含SEQ ID NO:293的氨基酸序列的两条重链，包含SEQ ID NO:273的氨基酸序列的第一轻链，和包含SEQ ID NO:217的氨基酸序列的第二轻链。

[0456] 对于结合共刺激性TNF受体家族成员是二价的且对于结合靶细胞抗原是单价的双特异性抗原结合分子(2+1格式)

[0457] 在另一个方面，本发明提供一种双特异性抗原结合分子，其包含

[0458] (a)两个能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的模块，

[0459] (b)一个能够特异性结合靶细胞抗原的模块，和

[0460] (c)由能够稳定联合的第一和第二亚基构成的Fc域。

[0461] 如此，提供的是一种双特异性抗原结合分子，其中该双特异性抗原结合分子对于共刺激性TNF受体家族成员是二价的且对于靶细胞抗原是单价的。

[0462] 在一个特定的方面,该双特异性抗原结合分子包含 (a)包含两个能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的Fab片段和Fc域的抗体的两条轻链和两条重链,和

[0463] (b)能够特异性结合靶细胞抗原的VH和VL域,其中该VH域经肽接头连接至该重链之一的C端且其中该VL域经肽接头连接至第二重链的C端。

[0464] 在另一个特定的方面,该双特异性抗原结合分子包含

[0465] (a)包含两个能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的Fab片段和Fc域的抗体的两条轻链和两条重链,和

[0466] (b)能够特异性结合靶细胞抗原的VH和VL域,其中该VH域经肽接头连接至 Fc节重链的C端且其中该VL域经肽接头连接至Fc穴重链的C端。

[0467] 在另一个特定的方面,该双特异性抗原结合分子包含

[0468] (a)包含两个能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的Fab片段和Fc域的抗体的两条轻链和两条重链,和

[0469] (b)能够特异性结合靶细胞抗原的VH和VL域,其中该VH域经肽接头连接至 Fc穴重链的C端且其中该VL域经肽接头连接至Fc节重链的C端。特别地,本发明涉及双特异性抗原结合分子,其中两个能够特异性结合共刺激性 TNF受体家族成员的Fab片段是两个能够特异性结合OX40或4-1BB的 Fab片段且能够特异性结合靶细胞抗原的VH和VL域能够特异性结合 FAP。

[0470] 在一个方面,本发明涉及一种双特异性抗原结合分子,其包含(a)两个能够特异性结合OX40的Fab片段,(b)能够特异性结合FAP的VH和VL域,和 (c)由能够稳定联合的第一和第二亚基构成的Fc域。

[0471] 在一个特定的方面,本发明提供一种双特异性抗原结合分子,其包含

[0472] (a)各自包含SEQ ID NO:186的氨基酸序列的两条轻链,包含SEQ ID NO:306的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:307的氨基酸序列的第二重链,或

[0473] (b)各自包含SEQ ID NO:186的氨基酸序列的两条轻链,包含SEQ ID NO:310的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:311的氨基酸序列的第二重链。

[0474] 在一个方面,本发明涉及一种双特异性抗原结合分子,其包含(a)两个能够特异性结合4-1BB的Fab片段,(b)能够特异性结合FAP的VH和VL域,和(c)由能够稳定联合的第一和第二亚基构成的Fc域。

[0475] 在一个特定的方面,本发明提供一种双特异性抗原结合分子,其包含

[0476] (a)各自包含SEQ ID NO:261的氨基酸序列的两条轻链,包含SEQ ID NO:318的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:319的氨基酸序列的第二重链,或

[0477] (b)各自包含SEQ ID NO:265的氨基酸序列的两条轻链,包含SEQ ID NO:322的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:323的氨基酸序列的第二重链,或

[0478] (c)各自包含SEQ ID NO:269的氨基酸序列的两条轻链,包含SEQ ID NO:326的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:327的氨基酸序列的第二重链,或

[0479] (d)各自包含SEQ ID NO:273的氨基酸序列的两条轻链,包含SEQ ID NO:330的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:331的氨基酸序列的第二重链,或

[0480] (e)各自包含SEQ ID NO:261的氨基酸序列的两条轻链,包含SEQ ID NO:334的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:335的氨基酸序列的第二重链,或

[0481] (f)各自包含SEQ ID NO:265的氨基酸序列的两条轻链,包含SEQ ID NO:338的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:339的氨基酸序列的第二重链,或

[0482] (g)各自包含SEQ ID NO:269的氨基酸序列的两条轻链,包含SEQ ID NO:342的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:343的氨基酸序列的第二重链,或

[0483] (h)各自包含SEQ ID NO:273的氨基酸序列的两条轻链,包含SEQ ID NO:346的氨基酸序列的第一重链,和包含SEQ ID NO:347的氨基酸序列的第二重链。

[0484] 降低Fc受体结合和/或效应器功能的Fc域修饰

[0485] 本发明的双特异性抗原结合分子进一步包含由能够稳定联合的第一和第二亚基构成的Fc域。

[0486] 在某些方面,可以将一处或多处氨基酸修饰引入本文中提供的抗体的 Fc区中,由此生成Fc区变体。Fc区变体可以包含在一个或多个氨基酸位置包含氨基酸修饰(例如替代)的人Fc区序列(例如人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区)。

[0487] Fc域赋予本发明的双特异性抗体以有利的药动学特性,包括长血清半衰期,其有助于在靶组织中的较好积累和有利的组织-血液分配比。然而,同时它可能导致不想要的本发明的双特异性抗体对表达Fc受体的细胞而非优选的携带抗原的细胞的靶向。因而,在具体的实施方案中,本发明的双特异性抗体的Fc域展现出与天然IgG Fc域,特别是IgG1 Fc域或IgG4 Fc域相比降低的对Fc受体的结合亲和力和/或降低的效应器功能。更加特别地,Fc域是IgG1 Fc域。

[0488] 在一个此类方面,Fc域(或包含所述Fc域的本发明的双特异性抗原结合分子)展现出与天然IgG1 Fc域(或包含天然IgG1 Fc域的本发明的双特异性抗原结合分子)相比少于50%,优选少于20%,更优选少于10%且最优选少于 5%的对Fc受体的结合亲和力,和/或与天然IgG1 Fc域(或包含天然IgG1 Fc域的本发明的双特异性抗原结合分子)相比少于50%,优选少于20%,更优选少于10%且最优选少于5%的效应器功能。在一个方面,Fc域(或包含所述Fc 域的本发明的双特异性抗原结合分子)没有实质性结合Fc受体和/或诱导效应器功能。在一个特定的方面,所述Fc受体是Fcγ受体。在一个方面,所述Fc 受体是人Fc受体。在一个方面,所述Fc受体是活化性Fc受体。在一个具体的方面,所述Fc受体是活化性人Fcγ受体,更具体地是人FcγRIIIa,FcγRI或 FcγRIIa,最具体地是人FcγRIIIa。在一个方面,所述Fc受体是抑制性Fc受体。在一个具体的方面,所述Fc受体是抑制性人Fcγ受体,更具体地是人 FcγRIIB。在一个方面,效应器功能是CDC,ADCC,ADCP,和细胞因子分泌中的一项或多项。在一个特定的方面,所述效应器功能是ADCC。在一个方面,所述Fc域展现出与天然IgG1 Fc域相比基本相似的对新生儿Fc受体 (FcRn)的结合亲和力。当Fc域(或包含所述Fc域的本发明的双特异性抗原结合分子)展现出超过约70%,特别是超过约80%,更特别是超过约90%的天然IgG1 Fc域(或包含天然IgG1 Fc域的本发明的双特异性抗原结合分子)对 FcRn的结合亲和力时,实现基本相似的对FcRn的结合。

[0489] 在一个特定的方面,Fc域工程化改造为具有与非工程化Fc域相比降低的对Fc受体的结合亲和力和/或降低的效应器功能。在一个特定的方面,本发明的双特异性抗原结合分子的Fc域包含一处或多处降低Fc域对Fc受体的结合亲和力和/或效应器功能的氨基酸突变。通常,Fc域的两个亚基的每一个中存在相同的一处或多处氨基酸突变。在一个方面,所述氨基酸突变降低Fc域对Fc受体的结合亲和力。在另一个方面,所述氨基酸突变将Fc域对

Fc受体的结合亲和力降低至少2倍，至少5倍，或至少10倍。在一个方面，包含工程化Fc域的本发明的双特异性抗原结合分子展现出与包含非工程化 Fc域的本发明的双特异性抗体相比少于20％，特别是少于10％，更特别是少于5％的对Fc受体的结合亲和力。在一个特定的方面，所述Fc受体是Fcγ受体。在其它方面，所述Fc受体是人Fc受体。在一个方面，所述Fc受体是抑制性Fc受体。在一个具体的方面，所述Fc受体是抑制性人Fcγ受体，更具体地是人Fcγ RIIB。在一些方面，所述Fc受体是活化性Fc受体。在一个具体的方面，所述Fc受体是活化性人Fcγ受体，更特别是人Fcγ RIIIa，Fcγ RI或 Fcγ RIIa，最特别是人Fcγ RIIIa。优选地，对这些受体的每一种的结合是降低的。在一些方面，对补体成分的结合亲和力，特别是对C1q的结合亲和力也是降低的。在一个方面，对新生儿Fc受体(FcRn)的结合亲和力没有降低。当Fc域(或包含所述Fc域的本发明的双特异性抗原结合分子)展现出非工程化形式的Fc域(或包含所述非工程化形式的Fc域的本发明的双特异性抗原结合分子)对FcRn的结合亲和力的超过约70％时，实现基本相似的对FcRn的结合，即保留该Fc域对所述受体的结合亲和力。Fc域或包含所述Fc域的本发明的双特异性抗原结合分子可以展现出超过约80％和甚至超过约90％的此类亲和力。在某些实施方案中，本发明的双特异性抗原结合分子的Fc域工程化改造为具有与非工程化Fc域相比降低的效应器功能。所述降低的效应器功能可包括但不限于下列一项或多项：降低的补体依赖性细胞毒性(CDC)，降低的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)，降低的抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)，降低的细胞因子分泌，降低的免疫复合物介导的抗原呈递细胞的抗原摄取，降低的对NK细胞的结合，降低的对巨噬细胞的结合，降低的对单核细胞的结合，降低的对多形核细胞的结合，降低的诱导凋亡的直接信号传导，降低的树突细胞成熟，或降低的T细胞引发。

[0490] 具有降低的效应器功能的抗体包括那些具有Fc区残基238，265，269， 270，297，327和329中的一个或多个的替代的(美国专利No.6,737,056)。此类Fc突变体包括在氨基酸位置265，269，270，297和327中的两处或更多处具有替代的Fc突变体，包括残基265和297替代成丙氨酸的所谓的“DANA”Fc突变体(美国专利No.7,332,581)。描述了具有改善的或降低的对FcR的结合的某些抗体变体(见例如美国专利No.6,737,056；WO 2004/056312，及Shields，R.L.et al.，J.Biol.Chem.276(2001)6591-6604)。

[0491] 在本发明的一个方面，Fc域包含在E233，L234，L235，N297，P331和 P329位置处的氨基酸替代。在一些方面，Fc域包含氨基酸替代L234A和 L235A (“LALA”)。在一个此类实施方案中，Fc域是IgG1 Fc域，特别是人 IgG1 Fc域。在一个方面，Fc域包含在位置P329处的氨基酸替代。在一个更加具体的方面，氨基酸替代是P329A或P329G，特别是P329G。在一个实施方案中，Fc域包含在位置P329处的氨基酸替代和又一处选自下组的氨基酸替代：E233P，L234A，L235A，L235E，N297A，N297D或P331S。在更具体的实施方案中，所述Fc域包含氨基酸突变L234A，L235A和P329G (“P329G LALA”)。氨基酸替代组合“P329G LALA”几乎完全消除了人IgG1 Fc域的Fcγ受体结合，如记载于PCT专利申请No.WO 2012/130831 A1。所述文件还描述了制备此类突变体Fc域的方法和用于测定其特性(诸如Fc受体结合或效应器功能)的方法。此类抗体是具有突变L234A和L235A或具有突变 L234A，L235A和P329G(编号方式依照Kabat et al，Kabat et al.，Sequences of Proteins of Immunological Interest，5th Ed.Public Health Service，National Institutes of Health，Bethesda，MD，1991的EU索引)的IgG1。

[0492] 在一个方面,Fc域为IgG4 Fc域。在一个更具体的实施方案中,Fc域是包含在位置S228(Kabat编号)处的氨基酸替代具体地为氨基酸替代S228P的 IgG4 Fc域。在一个更具体的实施方案中,Fc域是包含氨基酸替代L235E和 S228P和P329G的IgG4 Fc域。这种氨基酸替代降低体内IgG4抗体的Fab臂交换(参见Stubenrauch et al.,Drug Metabolism and Disposition 38,84-91 (2010))。

[0493] 具有延长的半衰期和改善的对新生儿Fc受体(FcRn)的结合的抗体记载于US 2005/0014934,新生儿Fc受体(FcRn)负责将母体IgG转移至胎儿(Guyer, R.L.et al., J.Immunol.117(1976)587-593及Kim,J.K.et al.,J.Immunol.24 (1994)2429-2434)。那些抗体包含其中具有改善Fc区对FcRn结合的一处或多处替代的Fc区。此类Fc变体包括那些在Fc区残基238,256,265,272, 286,303,305,307,311,312,317,340,356,360,362,376,378,380,382,413,424或434中的一处或多处具有替代,例如,Fc区残基434 的替代的(美国专利No.7,371,826)。还可见Duncan,A.R.and Winter,G., Nature 322(1988)738-740;US 5,648,260;US 5,624,821;及WO 94/29351,其关注Fc区变体的其它例子。

[0494] 可以例如通过ELISA或通过使用诸如BIAcore仪(GE Healthcare)的标准仪器的表面等离子体共振(SPR)容易地确定与Fc受体的结合,并且可以例如通过重组表达获得Fc受体。适合的此类结合测定描述于本文中。或者,可以使用已知表达特定Fc受体的细胞系例如表达FcγIIIa受体的人NK细胞来评估Fc域或包含Fc域的细胞活化性双特异性抗原结合分子针对Fc受体的结合亲和力。可以通过本领域已知的方法测量Fc域或包含Fc域的本发明的双特异性抗体的效应器功能。适合的用于测量ADCC的测定法描述于本文中。评估感兴趣分子的ADCC活性的体外测定法的其他实例描述于美国专利No. 5,500,362;Hellstrom等人,Proc.Natl Acad Sci USA 83,7059-7063(1986)和 Hellstrom等人,Proc Natl Acad Sci USA 82,1499-1502(1985);美国专利No. 5,821,337;Bruggemann等人,J Exp Med 166,1351-1361(1987)。或者,可以采用非放射性测定方法(参见,例如ACTI™ non-radioactive cytotoxicity assay for flow cytometry(CellTechnology,Inc.Mountain View,CA);CytoTox 96® non-radioactive cytotoxicity assay(Promega,Madison,WI))。用于这种测定法的有用的效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。替代地,或另外地,可以在体内,例如,在Clynes等人,Proc Natl Acad Sci USA 95,652-656(1998)中公开的动物模型中评估感兴趣分子的ADCC活性。

[0495] 下一节描述本发明的包含降低Fc受体结合和/或效应器功能的Fc域修饰的双特异性抗原结合分子的优选方面。在一个方面,本发明涉及双特异性抗原结合分子,其包含(a)至少一个能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的模块,(b)至少一个能够特异性结合靶细胞抗原的模块,和(c)由能够稳定联合的第一和第二亚基构成的Fc域,其中该Fc域包含一处或多处降低抗体对Fc受体,特别是Fcγ受体的结合亲和力的氨基酸替代。在另一个方面,本发明涉及双特异性抗原结合分子,其包含(a)至少一个能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的模块,(b)至少一个能够特异性结合靶细胞抗原的模块,和(c)由能够稳定联合的第一和第二亚基构成的Fc域,其中该Fc域包含一处或多处降低效应器功能的氨基酸替代。在特定的方面,该Fc域是人 IgG1亚类的,其具有氨基酸突变L234A,L235A和P329G(编号方式依照 Kabat EU索引)。

[0496] 促进异源二聚化的Fc域修饰

[0497] 本发明的双特异性抗原结合分子包含与Fc域的两个亚基中的一个或另一个融合的不同抗原结合位点，因此该Fc域的两个亚基可包含在两条不相同的多肽链中。这些多肽的重组共表达和随后的二聚化导致两种多肽的数种可能的组合。为了在重组生产中提高本发明的双特异性抗体的产率和纯度，因此在本发明的双特异性抗原结合分子的Fc域中引入促进期望多肽的联合的修饰会是有利的。

[0498] 因此，在特定的方面，本发明涉及双特异性抗原结合分子，其包含(a) 至少一个能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的模块，(b)至少一个能够特异性结合靶细胞抗原的模块，和(c)由能够稳定联合的第一和第二亚基构成的Fc域，其中该Fc域包含促进Fc域的第一和第二亚基联合的修饰。人 IgG Fc域的两个亚基之间最广泛的蛋白质-蛋白质相互作用的位点在Fc域的 CH3域中。因此，在一个方面，所述修饰在Fc域的CH3域中。

[0499] 在一个具体的方面，所述修饰是所谓的“节入穴”修饰，包括在Fc域的两个亚基之一中的“节”修饰和Fc域的两个亚基的另一个中的“穴”修饰。因此，本发明涉及双特异性抗原结合分子，其包含(a)至少一个能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的模块，(b)至少一个能够特异性结合靶细胞抗原的模块，和(c)由能够稳定联合的第一和第二亚基构成的Fc域，其中依照该节入穴方法，该Fc域的第一亚基包含节且该Fc域的第二亚基包含穴。在一个特定的方面，该Fc域的第一亚基包含氨基酸替代S354C和T366W(EU编号方式)且该Fc域的第二亚基包含氨基酸替代Y349C，T366S和Y407V(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0500] “节入穴”技术例如描述于US 5,731,168;US 7,695,936;Ridgway等人Prot Eng 9,617-621(1996)and Carter,J Immunol Meth 248,7-15(2001)中。通常，该方法包括在第一多肽的界面处引入突起(“节”)并且在第二多肽的界面中引入相应的腔(“穴”)，使得该突起可以定位在该腔中，从而促进异二聚体形成并阻碍同二聚体形成。通过用较大的侧链(例如酪氨酸或色氨酸)替换第一多肽的界面的小氨基酸侧链而构建突起。通过用较小的氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)替换大的氨基酸侧链，在第二多肽的界面中产生与突起具有相同或相似大小的补偿腔。

[0501] 因此，在一个方面，在本发明的双特异性抗原结合分子的Fc域的第一亚基的CH3结构域中，将氨基酸残基替换为具有较大侧链体积的氨基酸残基，由此在第一亚基的CH3结构域内产生可定位于第二亚基的CH3结构域内的腔中的突起;并且在Fc域的第二亚基的CH3结构域中，将氨基酸残基替换为具有较小侧链体积的氨基酸酸残基，由此在第二亚基的CH3结构域内产生可将第一亚基的CH3结构域内的突起定位在其中的腔。可以通过改变编码多肽的核酸，例如通过位点特异性诱变、或通过肽合成而产生突起和腔。在一个具体方面，在Fc域的第一亚基的CH3结构域中，第366位的苏氨酸残基替换为色氨酸残基(T366W)，而在Fc域的第二亚基的CH3结构域中，第407位酪氨酸残基替换为缬氨酸残基(Y407V)。在一个方面，在Fc域的第二亚基中，另外将366位的苏氨酸残基替换为丝氨酸残基(T366S)，将368位的亮氨酸残基替换为丙氨酸残基(L368A)。

[0502] 在还有又一个方面，在Fc域的第一亚基中，另外将第354位的丝氨酸残基替换为半胱氨酸残基(S354C)，而在Fc域的第二亚基中，另外将第349位酪氨酸残基替换为半胱氨酸残基(Y349C)。引入这两个半胱氨酸残基导致在 Fc域的两个亚基之间形成二硫桥，其进一步使该二聚体稳定(Carter(2001)，J Immunol Methods 248,7-15)。在一个特定的方面，该Fc域的第一亚基包含氨基酸替代S354C和T366W(EU编号方式)且该Fc域的第二亚基包含氨

基酸替代Y349C,T366S和Y407V(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0503] 在一个替代方面,促进Fc域的第一和第二亚基的联合的修饰包括介导静电操纵效应的修饰,例如,如PCT公开WO 2009/089004中所述。通常,这种方法包括通过将两个Fc域亚基的界面处的一个或多个氨基酸残基替换为带电氨基酸残基,使得在静电方面不利于同二聚体形成,但在静电方面有利于异二聚化。

[0504] 如本文中报告的双特异性抗体的重链的C端可以是以氨基酸残基PGK结束的完整C端。重链的C端可以是缩短的C端,其中去除了一个或两个C端氨基酸残基。在一个优选的方面,重链的C端是以PG结束的缩短的C端。在如本文中报告的所有方面的一个方面,包含包括如本文中规定的C端CH3域的重链的双特异性抗体包含C端甘氨酸-赖氨酸二肽(G446和K447,编号方式依照Kabat EU索引)。在如本文中报告的所有方面的一个实施方案中,包含包括如本文中规定的C端CH3域的重链的双特异性抗体包含C端甘氨酸残基 (G446,编号方式依照Kabat EU索引)。

[0505] Fab域中的修饰

[0506] 在一个方面,本发明涉及一种双特异性抗原结合分子,其包含(a)能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的第一Fab片段,(b)能够特异性结合靶细胞抗原的第二Fab片段,和(c)由能够稳定联合的第一和第二亚基构成的 Fc域,其中在该Fab片段之一中可变域VH和VL或恒定域CH1和CL任一是交换的。该双特异性抗体依照Crossmab技术来制备。

[0507] 具有一个结合臂中的域替换/交换的多特异性抗体(CrossMabVH-VL或CrossMabCH-CL)详细记载于WO2009/080252和Schaefer,W.et al,PNAS,108 (2011)11187-1191。它们清楚地减少由针对第一抗原的轻链与错误的针对第二抗原的重链错配引起的副产物(与没有此类域交换的办法相比)。

[0508] 在一个方面,本发明涉及一种双特异性抗原结合分子,其包含(a)能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的第一Fab片段,(b)能够特异性结合靶细胞抗原的第二Fab片段,和(c)由能够稳定联合的第一和第二亚基构成的 Fc域,其中在该Fab片段之一中恒定域CL和CH1彼此替换使得该CH1域是轻链的一部分且该CL域是重链的一部分。更加特别地,在能够特异性结合靶细胞抗原的第二Fab片段中恒定域CL和CH1彼此替换使得该CH1域是轻链的一部分且该CL域是重链的一部分。

[0509] 在一个特定的方面,本发明涉及一种双特异性抗原结合分子,其包含(a) 能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的第一Fab片段,(b)能够特异性结合靶细胞抗原的第二Fab片段,其中恒定域CL和CH1彼此替换使得该CH1 域是轻链的一部分且该CL域是重链的一部分。此类分子称作单价双特异性抗原结合分子。

[0510] 在另一个方面,本发明涉及一种双特异性抗原结合分子,其包含(a)包含两个能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的Fab片段和Fc域的抗体的两条轻链和两条重链,和(b)两个另外的能够特异性结合靶细胞抗原的Fab 片段,其中所述另外的Fab片段各自经肽接头连接至(a)的重链的C端。在一个特定的方面,该另外的Fab片段是Fab片段,其中可变域VL和VH彼此替换使得该VH域是轻链的一部分且该VL域是重链的一部分。

[0511] 如此,在一个特定的方面,本发明包含一种双特异性抗原结合分子,其包含(a)包含两个能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的Fab片段和 Fc域的抗体的两条轻链和两条重链,和(b)两个另外的能够特异性结合靶细胞抗原的Fab片段,其中所述两个另外的

能够特异性结合靶细胞抗原的Fab 片段是交换Fab片段,其中可变域VL和VH彼此替换且VL-CH链各自经肽接头连接至(a)的重链的C端。

[0512] 在另一个方面,及为了进一步改善正确配对,该包含(a)能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的第一Fab片段,(b)能够特异性结合靶细胞抗原的第二Fab片段,和(c)由能够稳定联合的第一和第二亚基构成的Fc域的双特异性抗原结合分子可含有带不同电荷的氨基酸替代(所谓的“带电荷残基”)。在交叉或非交叉CH1和CL域中引入这些修饰。在一个特定的方面,本发明涉及一种双特异性抗原结合分子,其中在CL域之一中位置123(EU编号方式)处的氨基酸被精氨酸(R)替换且位置124(EU编号方式)处的氨基酸被赖氨酸(K)替代且其中在CH1域之一中位置147(EU编号方式)处的和位置213 (EU编号方式)处的氨基酸被谷氨酸(E)替代。

[0513] 更加特别地,本发明涉及一种双特异性结合分子,其包含Fab,其中在与TNF配体家族成员邻近的CL域中位置123(EU编号方式)处的氨基酸被精氨酸(R)替换且位置124(EU编号方式)处的氨基酸被赖氨酸(K)替代,且其中在与TNF配体家族成员邻近的CH1域中位置147(EU编号方式)处的和位置 213(EU编号方式)处的氨基酸被谷氨酸(E)替代。

[0514] 本发明的例示性抗体

[0515] 在一个方面,本发明提供新的特异性结合OX40的抗体和抗体片段。这些抗体具有与已知的OX40抗体相比卓越的特性,使得它们尤其适合于并入包含另一个能够特异性结合靶细胞抗原的抗原结合模块的双特异性抗原结合分子。

[0516] 特别地,提供的是一种特异性结合OX40的抗体,其中所述抗体包含

[0517] (a)VH域,其包含包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR-H1,包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的CDR-H2,包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的 CDR-H3和VL域,其包含包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的CDR-L1,包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR-L2和包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的CDR-L3,

[0518] (b)VH域,其包含包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR-H1,包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的CDR-H2,包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的 CDR-H3和VL域,其包含包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的CDR-L1,包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR-L2和包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的CDR-L3,

[0519] (c)VH域,其包含包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR-H1,包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的CDR-H2,包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的 CDR-H3和VL域,其包含包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的CDR-L1,包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR-L2和包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR-L3,

[0520] (d)VH域,其包含包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR-H1,包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的CDR-H2,包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的 CDR-H3和VL域,其包含包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的CDR-L1,包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR-L2和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的CDR-L3,

[0521] (e)VH域,其包含包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR-H1,包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的CDR-H2,包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的 CDR-H3和VL域,其包含包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDR-L1,包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的CDR-L2和包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的CDR-L3,

[0522] (f)VH域,其包含包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR-H1,包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的CDR-H2,包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的 CDR-H3和VL域,其包含包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDR-L1,包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的CDR-L2和包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的CDR-L3,或

[0523] (g)VH域,其包含包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR-H1,包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的CDR-H2,包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的CDR-H3和VL域,其包含包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDR-L1,包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的CDR-L2和包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的CDR-L3。在一个方面,提供的是一种特异性结合OX40的抗体,其中所述抗体包含

[0524] (i)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:26 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0525] (ii)包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:28 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0526] (iii)包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:30 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0527] (iv)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:32 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0528] (v)包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:34 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0529] (vi)包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:36 的氨基酸序列的轻链可变区VL,或

[0530] (vii)包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:38 的氨基酸序列的轻链可变区VL。

[0531] 在又一个方面,提供的是一种与特异性结合OX40的抗体竞争结合的抗体,其中所述抗体包含

[0532] (i)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:26 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0533] (ii)包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:28 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0534] (iii)包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:30 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0535] (iv)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:32 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0536] (v)包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:34 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0537] (vi)包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:36 的氨基酸序列的轻链可变区VL,或

[0538] (vii)包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:38 的氨基酸序列的轻链可变区VL。

[0539] 在一个方面,提供的是一种与特异性结合OX40的抗体竞争结合的抗体,其中所述抗体包含包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的轻链可变区VL。特别地,提供的是一种特异性结合OX40的抗体,其中所述抗体包含包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的轻链可变区VL。

[0540] 在又一个方面,提供的是一种特异性结合OX40且对于人和鼠OX40交叉反应性的抗体,其中所述抗体包含包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的轻链可变区VL。

[0541] 在另一个方面,本发明提供新的特异性结合4-1BB的抗体和抗体片段。这些抗体具有与已知的4-1BB抗体相比卓越的特性,使得它们尤其适合于并入包含另一个能够特异性结合靶细胞抗原的抗原结合模块的双特异性抗原结合分子。

[0542] 特别地,提供的是一种特异性结合4-1BB的抗体,其中所述抗体包含

[0543] (a)VH域,其包含包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDR-H1,包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的CDR-H2,包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的 CDR-H3和VL域,其包含包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的CDR-L1,包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的CDR-L2和包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的CDR-L3,

[0544] (b)VH域,其包含包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的CDR-H1,包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的CDR-H2,包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的 CDR-H3和VL域,其包含包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的CDR-L1,包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的CDR-L2和包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的CDR-L3,

[0545] (c)VH域,其包含包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDR-H1,包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的CDR-H2,包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的 CDR-H3和VL域,其包含包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的CDR-L1,包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的CDR-L2和包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的CDR-L3,

[0546] (d)VH域,其包含包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDR-H1,包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的CDR-H2,包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的 CDR-H3和VL域,其包含包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的CDR-L1,包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的CDR-L2和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的CDR-L3,或

[0547] (e)VH域,其包含包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDR-H1,包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的CDR-H2,包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的 CDR-H3和VL域,其包含包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的CDR-L1,包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的CDR-L2和包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的CDR-L3。

[0548] 在一个方面,本发明提供一种特异性结合4-1BB的抗体,其中所述抗体包含

[0549] (i)包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:59 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0550] (ii)包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:61 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0551] (iii)包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:63 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0552] (iv)包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:65 的氨基酸序列的轻链可变区VL,或

[0553] (v)包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:67 的氨基酸序列的轻链可变区VL。

[0554] 在又一个方面,本发明提供一种与特异性结合4-1BB的抗体竞争结合的抗体,其中所述抗体包含

[0555] (i)包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:59 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0556] (ii)包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:61 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0557] (iii)包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:63 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0558] (iv)包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:65 的氨基酸序列的轻链可变区VL,或

[0559] (v)包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:67 的氨基酸序列的轻链可变区VL。

[0560] 多核苷酸

[0561] 本发明进一步提供了编码如本文中描述的双特异性抗原结合分子的分离的多核苷酸或其片段。

[0562] 编码本发明的双特异性抗体的分离的多核苷酸可以表述为编码整个抗原结合分子的单个多核苷酸或共表达的多个(例如两个或更多个)多核苷酸。由共表达的多核苷酸编码的多肽可以通过例如二硫键或其他手段联合以形成功能性抗原结合分子。例如,免疫球蛋白的轻链模块可以由与免疫球蛋白的重链模块分开的多核苷酸编码。重链多肽将在共表达时与轻链多肽联合以形成免疫球蛋白。

[0563] 在一些方面,该分离的多核苷酸编码依照如本文中描述的发明的双特异性分子中包含的多肽。

[0564] 在一个方面,本发明针对一种分离的多核苷酸,其编码双特异性抗原结合分子,其包含(a)至少一个能够特异性结合OX40的模块,(b)至少一个能够特异性结合靶细胞抗原的模块,和(c)由能够稳定联合的第一和第二亚基构成的Fc域。

[0565] 在另一个方面,提供的是一种分离的多核苷酸,其编码双特异性抗原结合分子,其包含(a)至少一个能够特异性结合4-1BB的模块,(b)至少一个能够特异性结合靶细胞抗原的模块,和(c)由能够稳定联合的第一和第二亚基构成的Fc域。

[0566] 在又一个方面,本发明针对一种分离的多核苷酸,其包含编码特异性结合OX40的抗体或抗体片段的序列。

[0567] 在另一个方面,提供的是一种分离的多核苷酸,其包含编码特异性结合 4-1BB的抗体或抗体片段的序列。

[0568] 在某些实施方案中,该多核苷酸或核酸是DNA。在其它实施方案中,本发明的多核苷酸是RNA,例如处于信使RNA(mRNA)的形式。本发明的 RNA可以是单链或双链的。

[0569] 重组方法

[0570] 可以例如通过固态肽合成(例如Merrifield固相合成)或重组生产获得本发明的双特异性抗体。对于重组生产,分离一个或多个编码例如上文所述的双特异性抗原结合分子或其多肽片段的多核苷酸,并将其插入到一个或多个载体中用于进一步在宿主细胞中克隆和/或表达。可以使用常规程序容易地分离这样的多核苷酸并将其测序。在本发明的一个方面,提供了包含一个或多个本发明的多核苷酸的载体,优选表达载体。可使用本领域技术人员熟知的方法构建包括双特异性抗原结合分子(片段)的编码序列以及适当的转录/翻译控制信号的表达载体。这些方法包括体外重组DNA技术、合成技术和体内重组/遗传重组。参见,例如描述于Maniatis等人,MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL,Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.(1989);和Ausubel等人,CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY,Greene Publishing Associates and Wiley Interscience,N.Y.(1989)中的技术。表达载体可以是质粒、病毒的一部分,或者可以是核酸片段。表达载体包括将编码双特异性抗原结合分子或其多肽片段的多核苷酸(即,编码区)与启动子和/或其他转录或翻译控制元件以可操作地关联的方式克隆到其中的表达盒。如本文中使用的,“编码区”是由翻译成氨基酸的密码子组成的核酸模块。虽然“终止密码子”(TAG、TGA或TAA)不翻译成氨基酸,但如果存在的话,它可被认为是编码区的一部分,但任何侧翼序列,例如启动子、核糖体结合位点、转录终止子、内含子、5’和3’非翻译区等不是编码区的一部分。在单个多核苷酸构建体中,例如,在单个载体上,或在单独的多核苷酸构建体中,例如,在单独的(不同的)载体上可以存在两个或更多个编码区。此外,任何载体可以包含单个编码区,或者可以包含两个或更多个编码区,例如本发明的载体可以编码一个或多个多肽,其通过蛋白水解切割在翻译后或以共翻译方式分离成最终的蛋白质。另外,本发明的载体、多核苷酸或核酸可以编码异源编码区,所述异源编码区与编码本发明的双特异性抗原结合分子或其多肽片段或其变体或衍生物的多核苷酸融合或未融合。异源编码区包括但不限于专门的元件或基序,例如分泌信号肽或异源功能结构域。可操作地关联是指这样一种方式:基因产物例如多肽的编码区与一个或多个调节序列相关联以使基因产物的表达在调节序列的影响或控制下进行。如果启动子功能的诱导导致编码所需基因产物的 mRNA的转录,并且如果两个DNA片段之间的连接性质不干扰表达调控序列指导基因产物表达的能力或不干扰DNA模板被转录的能力,则所述两个 DNA片段(例如多肽编码区和与其关联的启动子)是“可操作地关联的”。因此,如果启动子能够影响编码多肽的核酸的转录,则启动子区与该核酸可操作地关联。启动子可以是仅在预定细胞中指导实质性DNA转录的细胞特异性启动子。除了启动子之外,其他转录控制元件例如增强子、操纵子、阻抑物和转录终止信号,可与多核苷酸可操作地关联以指导细胞特异性转录。

[0571] 本文中公开了适合的启动子和其他转录控制区。许多转录控制区是本领域中的技术人员已知的。这些包括但不限于在脊椎动物细胞中起作用的转录控制区,例如但不限于来自巨细胞病毒(例如立即早期启动子,与内含子A结合)、猿猴病毒40(例如早期启动子)和逆转录病毒(如,例如劳斯肉瘤病毒)的启动子和增强子区段。其他转录控制区包括衍生自脊椎动物基因如肌动蛋白、热休克蛋白、牛生长激素和兔α珠蛋白的那些转录控制区,以及能够控制真核细胞中基因表达的其他序列。另外的适合的转录控制区包括组织特异性启动子和增强子以及诱导型启动子(例如四环素诱导型启动子)。类似地,许多翻译控制元件是本领域普通技术人员已知的。这些包括但不限于核糖体结合位点、翻译起始和终止密码子

以及衍生自病毒系统的元件 (特别是内部核糖体进入位点或IRES,也称为CITE序列)。表达盒还可以包括诸如复制起点的其他特征、和/或诸如逆转录病毒长末端重复序列(LTR)或腺相关病毒(AAV)反向末端重复序列(ITR)的染色体整合元件。

[0572] 本发明的多核苷酸和核酸编码区可以与另外的编码分泌肽或信号肽的编码区相关联,所述分泌肽或信号肽指导由本发明的多核苷酸编码的多肽的分泌。例如,如果希望分泌双特异性抗原结合分子或其多肽片段,则编码信号序列的DNA可以位于编码本发明的双特异性抗原结合分子或其多肽片段的核酸的上游。根据信号假说,由哺乳动物细胞分泌的蛋白质具有信号肽或分泌前导序列,所述信号肽或分泌前导序列在起始生长蛋白质链输出穿过粗面内质网后被从成熟蛋白质切割下来。本领域普通技术人员知道,脊椎动物细胞分泌的多肽通常具有与多肽的N末端融合的信号肽,其被从翻译的多肽切割下来以产生多肽的分泌或"成熟"形式。在某些实施方案中,使用了天然信号肽例如免疫球蛋白重链或轻链信号肽、或该序列的功能衍生物,所述衍生物保留了指导与其可操作地相关联的多肽分泌的能力。或者,可以使用异源哺乳动物信号肽或其功能衍生物。例如,野生型前导序列可以替代为人组织纤溶酶原激活物(TPA)或小鼠β-葡糖醛酸糖苷酶的前导序列。

[0573] 编码可用于促进后续纯化(例如组氨酸标签)或辅助标记融合蛋白的短蛋白质序列的DNA可以包括在编码本发明的双特异性抗原结合分子或其多肽片段的多核苷酸的内部或末端。

[0574] 在本发明的一个另外的方面,提供了包含一个或多个本发明的多核苷酸的宿主细胞。在某些方面,提供了包含一个或多个本发明的载体的宿主细胞。多核苷酸和载体可分别掺入关于核苷酸和载体的单一或组合地在本文中描述的任何特征。在一个方面,宿主细胞包含(例如已经转化或转染)包含编码本发明的双特异性抗原结合分子的(一部分)的多核苷酸的载体。如本文中使用的,术语"宿主细胞"是指可以被工程化以产生本发明的融合蛋白或其片段的任何种类的细胞系统。适合于复制和支持抗原结合分子表达的宿主细胞是本领域熟知的。可以使用特定的表达载体适当地转染或转导这样的细胞,并且可以培养大量含有载体的细胞用于接种大规模发酵罐以获得足够量的用于临床应用的抗原结合分子。适合的宿主细胞包括原核微生物,如大肠杆菌,或各种真核细胞,如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)、昆虫细胞等。例如,尤其是在不需要糖基化时,可以在细菌中产生多肽。表达后,可以从菌体糊分离出作为可溶性级分的多肽,并可将其进一步纯化。除了原核生物之外,诸如丝状真菌或酵母的真核微生物是编码多肽的载体的适合克隆或表达宿主,包括其糖基化途径已被"人源化"的导致产生具有部分或完全人糖基化样式的多肽的真菌和酵母菌株。参见Gerngross,Nat Biotech 22,1409-1414(2004),和Li等人,Nat Biotech 24,210-215(2006)。

[0575] 用于表达(糖基化)多肽的适合宿主细胞也源自多细胞生物(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。已经鉴定了可以与昆虫细胞结合使用尤其是用于转染草地贪夜蛾(Spodoptera frugiperda)细胞的许多杆状病毒株。植物细胞培养物也可以用作宿主。参见例如美国专利Nos.5,959,177、6,040,498、6,420,548、7,125,978、和6,417,429(描述了用于在转基因植物中产生抗体的PLANTIBODIES™技术)。脊椎动物细胞也可以用作宿主。例如,适于在悬液中生长的哺乳动物细胞系可能是有用的。有用的哺乳动物宿主细胞系的其他实例是经SV40(COS-7)转化的猴肾CV1 系;人胚胎肾细胞系(例

如,在Graham等人,J Gen Virol 36,59(1977))中描述的293或293T细胞;仓鼠婴肾细胞(BHK);小鼠sertoli细胞(如在Mather, Biol Reprod 23,243-251(1980)中所述的TM4细胞);猴肾细胞(CV1);非洲绿猴肾细胞(VERO-76);人宫颈癌细胞(HELA);犬肾细胞(MDCK);Buffalo 大鼠肝细胞(BRL 3A);人肺细胞(W138);人肝细胞(Hep G2);小鼠乳腺肿瘤细胞(MMT 060562);TRI细胞(如在Mather等人,Annals N.Y.Acad Sci 383, 44-68(1982)中描述);MRC 5细胞和FS4细胞。其他有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,包括dhfr-CHO细胞(Urlaub等人,Proc Natl Acad Sci USA 77,4216(1980));和骨髓瘤细胞系如YO、NSO、P3X63和 Sp2/0。对于适用于蛋白质产生的某些哺乳动物宿主细胞系的综述,参见例如Yazaki和Wu,Methods in Molecular Biology,Vol.248(B.K.C.Lo,ed.,Humana Press,Totowa,NJ),pp.255-268(2003)。宿主细胞包括培养的细胞,例如培养的哺乳动物细胞、酵母细胞、昆虫细胞、细菌细胞和植物细胞,在此仅列举少数,还有包括在转基因动物、转基因植物或培养的植物或动物组织内的细胞。在一个实施方案中,宿主细胞是真核细胞,优选哺乳动物细胞,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,人胚胎肾(HEK)细胞或淋巴样细胞 (例如YO、NSO、Sp20细胞)。在这些系统中表达外源基因的标准技术在本领域中是已知的。可以将表达包含免疫球蛋白重链或轻链的多肽的细胞工程化,以便也表达另一个免疫球蛋白链,使得所表达的产物是具有重链和轻链两者的免疫球蛋白。

[0576] 在一个方面,提供了产生本发明的双特异性抗原结合分子或其多肽片段的方法,其中所述方法包括在适于表达本发明的双特异性抗原结合分子或其多肽片段的条件下培养如本文中提供的包含编码本发明的双特异性抗原结合分子或其多肽片段的多核苷酸的宿主细胞,并从宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收本发明的双特异性抗原结合分子或其多肽片段。

[0577] 可以通过本领域已知的技术如高效液相色谱法、离子交换色谱法、凝胶电泳、亲和色谱法、尺寸排阻色谱法等来纯化如本文中描述制备的本发明的双特异性分子。用于纯化特定蛋白质的实际条件将部分地取决于诸如净电荷、疏水性、亲水性等因素,并且对于本领域技术人员将是显而易见的。对于亲和色谱法纯化,可以使用与双特异性抗原结合分子结合的抗体、配体、受体或抗原。例如,为了本发明的融合蛋白的亲和色谱法纯化,可以使用具有蛋白A或蛋白G的基质。可以基本上如实施例中描述依次使用蛋白A或G亲和色谱法和尺寸排阻色谱法分离抗原结合分子。双特异性抗原结合分子或其片段的纯度可以通过各种熟知的分析方法中的任何一种加以测定,包括凝胶电泳、高压液相色谱法等。例如,正如通过还原和非还原性SDS-PAGE证实,如实施例中描述表达的双特异性抗原结合分子显示是完整且正确组装的。

[0578] 测定法

[0579] 可以通过本领域已知的各种测定法来鉴定、筛选或通过其物理/化学性质和/或生物学活性来表征在本文中提供的抗原结合分子。

[0580] 1.亲和力测定

[0581] 根据实施例中提出的通过表面等离子体共振(SPR)的方法,使用标准仪器如BIAcore仪器(GE Healthcare)、以及可以通过诸如重组表达获得的受体或靶蛋白,可以测定在本文中提供的双特异性抗原结合分子,抗体和抗体片段与相应的TNF受体的亲和力。通过表面等离子体共振(SPR),使用标准仪器如BIAcore仪器(GE Healthcare)、以及可以通过

诸如重组表达获得的受体或靶蛋白，也可以测定双特异性抗原结合分子与靶细胞抗原的亲和力。在实施例2中描述了用于测量结合亲和力的具体的说明性和示例性实施方案。根据一个方面，使用BIACORE® T100仪(GE Healthcare)通过表面等离子体共振在25℃测量K_D。

[0582] 2.结合测定和其他测定

[0583] 例如通过流式细胞术(FACS)，使用表达特定受体或靶抗原的细胞系，可以评价在本文中提供的双特异性抗原结合分子与相应的受体表达细胞的结合。在一个方面，在结合测定中使用表达TNF受体的外周血单核细胞 (PBMC)。在分离后(幼稚PMBC)或刺激后(活化的PMBC)直接使用这些细胞。在另一个方面，使用活化的小鼠脾细胞(表达TNF受体分子)来证明本发明的双特异性抗原结合分子或抗体与相应的TNF受体表达细胞的结合。在又一个方面，使用自健康食蟹猴(Macaca fascicularis)肝素化血液分离的 PBMC来显示双特异性抗原结合分子或抗体与相应的食蟹猴TNF受体表达细胞的结合。

[0584] 在又一个方面，使用表达靶细胞抗原(例如FAP)的癌细胞系来证明抗原结合分子与靶细胞抗原的结合。

[0585] 在另一个方面，可以使用竞争测定来鉴定与特异性抗体或抗原结合分子分别竞争结合靶标或TNF受体的抗原结合分子。在某些实施方案中，这种竞争性抗原结合分子结合的表位(例如线性或构象表位)与特异性抗靶标抗体或特异性抗TNF受体抗体结合的相同。用于抗体所结合的表位的作图的详细示例性方法提供于Morris(1996)“Epitope Mapping Protocols,”in Methods in Molecular Biology vol.66(Humana Press,Totowa,NJ)中。

[0586] 3.活性测定

[0587] 在一个方面，提供了用于鉴定具有生物学活性的与特定靶细胞抗原和特定TNF受体结合的双特异性抗原结合分子的测定法。生物学活性可以包括例如通过表达靶细胞抗原的细胞上的TNF受体的激动性信号传导。还提供了通过测定法鉴定为具有这样的体外生物学活性的双特异性抗原结合分子。

[0588] 在某些方面，测试了本发明的双特异性抗原结合分子的这种生物学活性。此外，用于检测细胞裂解的测定法(例如通过测量LDH释放)、诱导的凋亡动力学(例如通过测量半胱天冬酶3/7活性)或凋亡(例如使用TUNEL测定) 是本领域熟知的。另外，可以通过评估复合物对各种淋巴细胞亚群如NK细胞、NKT细胞或γδT细胞的存活、增殖和淋巴因子分泌的影响，或评估其调节抗原呈递细胞如树突细胞、单核细胞/巨噬细胞或B细胞的表型和功能的能力来评估此类复合物的生物学活性。

[0589] 药物组合物、制剂和给药途径

[0590] 在又一个方面，本发明提供了包含本文中提供的任一种双特异性抗原结合分子或抗体的药物组合物，以供例如在任何下列治疗方法中使用。在一个实施方案中，药物组合物包含本文中提供的任一种双特异性抗原结合分子和至少一种药学上可接受的赋形剂。在另一个实施方案中，药物组合物包含本文中提供的任一种双特异性抗原结合分子和至少一种另外的例如如下文所述的治疗剂。

[0591] 本发明的药物组合物包含治疗有效量的一种或多种溶解或分散在药学上可接受的赋形剂中的双特异性抗原结合分子。短语“药学的或药学上可接受的”是指在采用的剂量和浓度下通常对接受者无毒的分子实体和组合物，即在适当施用于动物时例如人时不产生不利的、过敏的或其他不良的反应。根据本公开内容，包含至少一种依照本发明的双特异性

抗原结合分子或抗体和任选地另外的活性成分的药物组合物的制备将是本领域技术人员已知的，如Remington's Pharmaceutical Sciences第18版，Mack Printing Company，1990所例示，通过提述将其并入本文。具体地说，组合物是冻干制剂或水溶液。如本文中使用的，正如本领域普通技术人员已知，"药学上可接受的赋形剂"包括溶剂、缓冲剂、分散介质、包衣、表面活性剂、抗氧化剂、防腐剂(例如抗菌剂、抗真菌剂)、等渗剂、盐、稳定剂中任一种和全部及其组合。

[0592] 肠胃外组合物包括为通过注射给药而设计的那些，例如皮下、皮内、病灶内、静脉内、动脉内、肌内、鞘内或腹膜内注射。为了注射，可以将本发明的双特异性抗原结合分子或抗体配制在水溶液中，优选在生理学相容的缓冲液如汉克斯溶液、林格氏溶液或生理盐水缓冲液中。溶液可以含有配制剂，例如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。或者，双特异性抗原结合分子或抗体在使用前可处于粉末形式以与适合的载体(例如无菌无热原水)组构。根据需要，通过将在适当溶剂中的本发明的抗原结合分子以所要求的量并入下文列举的多种其他成分中来制备无菌注射溶液。可以例如通过无菌过滤膜进行过滤而容易地实现无菌性。通常，通过将各种灭菌的活性成分并入无菌载体中来制备分散体，所述无菌载体含有基础分散介质和/或其他成分。在用于制备无菌注射溶液，悬浮液或乳状液的无菌粉末的情况下，优选制备方法为真空干燥和冷冻干燥技术，从而产生来自其先前无菌过滤的液体介质的活性成分加上任何其他期望的成分的粉末。必要时应该适当缓冲该液体介质并且在注射之前首先用足够盐水或葡萄糖使液体稀释剂变得等张。在制造和储存条件下该组合物必须是稳定的，并且保持对抗微生物诸如细菌和真菌的污染作用。应当理解，内毒素污染应该最低限度地保持在安全水平，例如低于0.5ng/mg蛋白质。适合的药学上可接受的赋形剂包括但不限于：诸如磷酸盐、柠檬酸盐、和其他有机酸的缓冲剂；包括抗坏血酸和甲硫氨酸在内的抗氧化剂；防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵；氯化六甲双铵；苯扎氯铵、苄索氯铵；苯酚、丁醇或苄醇；烷基对羟基苯甲酸酯，如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯；儿茶酚；间苯二酚；环己醇；3-戊醇；和间甲酚)；低分子量(少于约10个残基)多肽；蛋白质，如血清白蛋白、明胶、或免疫球蛋白；亲水性聚合物，如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸、或赖氨酸；单糖类、二糖类、和其他碳水化合物类，包括葡萄糖、甘露糖、或糊精；螯合剂，如EDTA；糖类，如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇；成盐反离子，如钠；金属复合物(例如，Zn-蛋白质复合物)；和/或非离子型表面活性剂，如聚乙二醇(PEG)。水性注射悬液可含有增加该悬液粘度的化合物，例如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇、或葡聚糖等。任选地，悬液还可以含有适合的稳定剂或增加化合物的溶解度以允许制备高度浓缩的溶液的药剂。另外，这些活性化合物的悬液可制备为适当的油性注射悬液。适合的亲脂性溶剂或载体包括脂肪油(如芝麻油)、合成脂肪酸酯(如ethyl cleats或甘油三酯)、或脂质体。

[0593] 可以例如通过凝聚技术或通过界面聚合将活性成分包埋在制备的微胶囊中，例如分别在胶体药物递送系统(例如，脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊)或在粗乳液中的羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚甲基丙烯酸甲酯微胶囊。这样的技术公开于Remington's Pharmaceutical Sciences(18th Ed.Mack Printing Company，1990)中。可以制备持续释放制剂。持续释放制剂的适合实例包括含有该多肽的固体疏水聚合物的半透性基质，所述基质呈成形物品的形式，例如薄膜、或微胶囊。在特定实施方案中，通过在组合物中使用延迟吸收的药剂，例如单硬脂酸铝、明胶或其组合，可延长注射组合物的吸收。

[0594] 本文中的示例性药学上可接受的赋形剂还包括诸如可溶性中性活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP)的间质药物分散剂,例如人可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白,例如rHuPH20(HYLENEX®,Baxter International,Inc.)。在美国专利公开No.2005/0260186和2006/0104968中描述了包括rHuPH20的某些示例性的sHASEGP和使用方法。在一个方面,将sHASEGP与一种或多种另外的糖胺聚糖酶如软骨素酶组合。

[0595] 示例性的冻干抗体配制剂描述于美国专利No.6,267,958中。水性抗体配制剂包括美国专利No.6,171,586和WO2006/044908中描述的那些,后一种配制剂包括组氨酸-乙酸盐缓冲液。

[0596] 除前述组合物之外,抗原结合分子还可配制为贮库制剂。此类长效配制剂可通过植入(例如皮下或肌内)或通过肌内注射给予。因此,例如,融合蛋白可以用适合的聚合材料或疏水材料(例如作为可接受的油中的乳液)或离子交换树脂配制,或配制为微溶的衍生物,例如微溶盐。

[0597] 包含本发明的双特异性抗原结合分子或抗体的药物组合物可以通过常规的混合、溶解、乳化、包封、包埋或冻干过程进行制造。可以使用有利于将蛋白质加工成药学上可使用的制剂的一种或多种生理学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂或助剂以常规方式配制药物组合物。适当的配制剂取决于所选择的给药途径。

[0598] 可以将双特异性抗原结合分子配制成游离酸或碱、中性或盐形式的组合物。药学上可接受的盐是基本保留游离酸或碱的生物学活性的盐。这些盐包括酸加成盐,例如由蛋白质组合物的游离氨基形成的或与无机酸例如盐酸或磷酸形成的那些,或与诸如乙酸、草酸、酒石酸或扁桃酸的有机酸形成的那些。与游离羧基形成的盐也可以衍生自无机碱,例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁;或诸如异丙胺、三甲胺、组氨酸或普鲁卡因的有机碱。与相应的游离碱形式相比,药物盐在水性溶剂和其他质子溶剂中的溶解度更高。

[0599] 在被治疗的特殊适应症需要时,本文中的组合物还可含有一种以上的活性成分,优选地,所述活性成分具有彼此无不良影响的互补活性。这样的活性成分以对预期目的有效的量适当地组合存在。

[0600] 用于体内给药的制剂通常是无菌的。可以例如通过无菌过滤膜进行过滤而容易地实现无菌性。

[0601] 治疗方法和组合物

[0602] 本文中提供的任何双特异性抗原结合分子或抗体均可在治疗方法中使用。

[0603] 为了在治疗方法中使用,本发明的双特异性抗原结合分子或抗体可以以符合良好医学实践的方式配制、给药和施用。在这种情况下考虑的因素包括正在治疗的具体紊乱、被治疗的具体哺乳动物、个体患者的临床状况、紊乱的原因、药剂的递送部位、给药方法、给药方案、以及执业医师已知的其他因素。

[0604] 在一个方面,提供了用作药剂的本发明的双特异性抗原结合分子或抗体。

[0605] 在另外的方面,提供了本发明的双特异性抗原结合分子或抗体,其用于 (i)刺激或增强T细胞应答,(ii)支持激活的T细胞的存活,(iii)治疗感染,(iv) 治疗癌症,(v)延迟癌症进展,或(vi)延长罹患癌症的患者的存活。在一个特定的方面,提供了在治疗疾病中使用尤其是在癌症治疗中使用的本发明的双特异性抗原结合分子或抗体。

[0606] 在某些方面，提供了在治疗方法中使用的本发明的双特异性抗原结合分子或抗体。在一个方面，本发明提供了用于治疗有需要的个体中的疾病的如本文中描述的双特异性抗原结合分子或抗体。在某些方面，本发明提供了在治疗患有疾病的个体的方法中使用的双特异性抗原结合分子或抗体，所述方法包括向个体施用治疗有效量的双特异性抗原结合分子或抗体。在某些方面，待治疗的疾病是癌症。需要治疗的受试者、患者或“个体”通常是哺乳动物，更具体地说是人。

[0607] 在一个方面，提供的是一种用于(i)刺激或增强T细胞应答，(ii)支持激活的T细胞的存活，(iii)治疗感染，(iv)治疗癌症，(v)延迟癌症进展或(vi)延长罹患癌症的患者的存活的方法，其中该方法包括将治疗有效量的本发明的双特异性抗原结合分子或抗体施用有所需要的个体。

[0608] 在又一个方面，本发明提供本发明的双特异性抗原结合分子或抗体在制造或制备用于治疗有需要的个体中的疾病的药剂中的用途。在一个方面，所述药剂用于在治疗疾病的方法中使用，所述方法包括向患有疾病的个体施用治疗有效量的药剂。在某些方面，待治疗的疾病是增殖性紊乱，具体地是癌症。癌症的实例包括但不限于膀胱癌、脑癌、头颈癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫癌、子宫颈癌、子宫内膜癌、食道癌、结肠癌、结肠直肠癌、直肠癌、胃癌、前列腺癌、血癌、皮肤癌、鳞状细胞癌、骨癌、和肾癌。癌症的其它实例包括癌瘤、淋巴瘤(例如霍奇金氏和非霍奇金氏淋巴瘤)、母细胞瘤、肉瘤和白血病。可以使用本发明的双特异性抗原结合分子或抗体进行治疗的其他细胞增殖紊乱包括但不限于位于腹部、骨骼、乳腺、消化系统、肝脏、胰腺、腹膜、内分泌腺(肾上腺、甲状旁腺、垂体、睾丸、卵巢、胸腺、甲状腺)、眼、头颈部、神经系统(中枢和外周)、淋巴系统、盆腔、皮肤、软组织、脾脏、胸部、和泌尿生殖系统的肿瘤。还包括癌前状态或病变和癌症转移。在某些实施方案中，癌症选自肾细胞癌、皮肤癌、肺癌、结肠直肠癌、乳腺癌、脑癌、头颈癌。技术人员容易认识到，在许多情况下，本发明的双特异性抗原结合分子或抗体可能不能提供治愈，而可能提供益处。在一些方面，具有一些益处的生理变化也被认为是治疗有益的。因此，在一些方面，提供生理变化的本发明的双特异性抗原结合分子或抗体的量被认为是“有效量”或“治疗有效量”。

[0609] 为了预防或治疗疾病，本发明的双特异性抗原结合分子或抗体的适当剂量(当单独使用或与一种或多种其他另外的治疗剂组合使用时)将取决于待治疗疾病的类型、给药途径、患者的体重、具体的分子、疾病的严重程度和病程、给予本发明的双特异性抗原结合分子或抗体是用于预防还是治疗目的、先前或同时的治疗干预、患者的临床病史、和对融合蛋白的反应、和主治医师的决定。在任何情况下，负责给药的医师将决定组合物中活性成分的浓度和个体受试者的适当剂量。本文中考虑到各种给药方案，包括但不限于在各个时间点上的单次或多次给药、推注给药和脉冲输注。

[0610] 一次性地或以一系列治疗的方式适当地向患者施用本发明的双特异性抗原结合分子或抗体。根据疾病的类型和严重程度，约1μg/kg至15 mg/kg(例如0.1mg/kg-10mg/kg)的双特异性抗原结合分子可以是向患者施用的初始候选剂量，例如无论是通过一次或多次分开给药，还是通过连续输注。取决于上面提到的因素，一个典型的日剂量可能在约1μg/kg至100 mg/kg或更高的范围内。对于数天或更长时间的反复给药，根据病情，治疗通常将持续到出现期望的疾病症状的抑制时为止。本发明的双特异性抗原结合分子或抗体的一个示例性剂量将在约0.005mg/kg至约10mg/kg的范围内。在其他实例中，剂量还可以包含每次给

药从约1μg/kg体重、约5μg/kg体重、约10μg/kg体重、约50μg/kg体重、约100μg/kg体重、约200μg/kg体重、约350μg/kg体重、约500μg/kg体重、约1mg/kg体重、约5mg/kg体重、约10 mg/kg体重、约50mg/kg体重、约100mg/kg体重、约200mg/kg体重、约350 mg/kg体重、约500mg/kg体重、至约1000mg/kg体重或更多，以及其中可推导的任何范围。在本文中所列数字的可推导范围的实例中，可以基于上述数字以约5mg/kg体重至约100mg/kg体重、约5μg/kg体重至约500mg/kg体重等范围进行施用。因此，可向患者施用约0.5mg/kg、2.0mg/kg、5.0mg/kg 或10mg/kg(或其任何组合)的一个或多个剂量。这样的剂量可以间歇施用，例如，每周或每三周一次(例如使得患者接受约2个至约20个，或例如约6个剂量的融合蛋白)。可以施用初始较高的负荷剂量，然后施用一个或多个较低的剂量。然而，其他剂量方案可能是有用的。通过常规技术和测定法易于监测这种疗法的进展。

[0611] 通常以有效实现预期目的的量使用本发明的双特异性抗原结合分子或抗体。为了用于治疗或预防疾病状况，以治疗有效量施用或应用本发明的双特异性抗原结合分子或抗体或其药物组合物。治疗有效量的确定完全在本领域技术人员的能力范围内，尤其是在根据本文中提供的详细公开内容的情况下。

[0612] 对于全身给药，可以根据体外测定法(例如细胞培养物测定法)初步估计治疗有效剂量。然后可以在动物模型中配制剂量以达到包括在细胞培养中确定的IC_{50}在内的循环浓度范围。这类信息可以用来更精确地确定用于人的剂量。

[0613] 也可以使用本领域熟知的技术根据体内数据(例如，动物模型)估计初始剂量。根据动物数据，本领域普通技术人员可以容易地优化对人的给药。

[0614] 可以单独调整剂量和间隔以提供足以维持治疗效果的本发明的双特异性抗原结合分子或抗体的血浆水平。通常注射给药的患者剂量为约0.1至50 mg/kg/天，一般为约0.5至1mg/kg/天。可以通过每天施用多个剂量来实现治疗有效的血浆水平。可以例如通过HPLC测量血浆中的水平。

[0615] 在局部给药或选择性吸收的情况下，本发明的双特异性抗原结合分子或抗体的有效局部浓度可能与血浆浓度无关。本领域技术人员将能够优化治疗有效的局部剂量而无需过度实验。

[0616] 本文中描述的发明的双特异性抗原结合分子或抗体的治疗有效剂量通常将提供治疗益处而不引起实质性毒性。可以通过细胞培养或实验动物中的标准药物程序来确定融合蛋白的毒性和治疗效果。可使用细胞培养物测定法和动物研究来确定LD_{50}(对群体的50％致死的剂量)和ED_{50}(在50％的群体中治疗有效的剂量)。毒性与疗效之间的剂量比为治疗指数，它可以被表示为比率LD_{50}/ED_{50}。表现出较大治疗指数的双特异性抗原结合分子是优选的。在一个方面，本发明的双特异性抗原结合分子或抗体表现出高治疗指数。从细胞培养物测定法和动物研究中获得的数据可以在配制适合于在人类中使用的剂量范围中加以使用。剂量优选地处在循环浓度范围内，其包括具有很小或没有毒性的ED_{50}。取决于多种因素，例如采用的剂型、所用给药途径、受试者的状况等，剂量可以在这个范围内变化。考虑到患者的状况，个体医师可以选择确切的配方、给药途径和剂量(参见，例如Fingl等人，1975，in: The Pharmacological Basis of Therapeutics，Ch.1，p.1，通过提述将其完整并入本文)。

[0617] 用本发明的融合蛋白治疗患者的主治医师知道如何并且何时由于毒性、器官功能障碍等而终止、中断或调整给药。相反，如果临床反应不足 (排除毒性)，主治医师也会知道

将治疗调整到更高水平。在感兴趣紊乱的管理中，施用剂量的大小将随着待治疗病症的严重程度、给药途径等而变化。可以例如部分地通过标准预后评价方法来评价病症的严重程度。此外，剂量和可能的剂量频率也将根据个体患者的年龄、体重和反应而变化。

[0618] 其他药剂和治疗

[0619] 本发明的双特异性抗原结合分子或抗体可以在治疗中与一种或多种其他药剂联合给药。例如，本发明的双特异性抗原结合分子或抗体可以与至少一种另外的治疗剂共同给药。术语“治疗剂”涵盖可用于治疗需要这种治疗的个体中的症状或疾病的任何药剂。这种另外的治疗剂可包含任何适合于被治疗的特定适应症的任何活性成分，优选地，所述活性成分具有彼此无不良影响的互补活性。在某些实施方案中，另外的治疗剂是另一种抗癌剂，例如微管破坏物，抗代谢物，拓扑异构酶抑制剂，DNA嵌入剂，烷化剂，激素疗法，激酶抑制剂，受体拮抗剂，肿瘤细胞凋亡的激活剂，或抗血管发生剂。在某些方面，另外的治疗剂是免疫调控剂，细胞抑制剂，细胞粘附抑制剂，细胞毒剂或细胞抑制剂，细胞凋亡的激活剂，或提高细胞对凋亡诱导剂的敏感性的药剂。

[0620] 此类其他药剂以对预期目的有效的量适当地组合存在。此类其他药剂的有效量取决于所使用的融合蛋白的量、紊乱或治疗的类型、以及以上讨论的其他因素。通常以与本文中所述相同的剂量和给药途径，或本文中所述剂量的约1％至99％，或以在经验/临床上确定为适当的任何剂量并通过任何途径使用本发明的双特异性抗原结合分子或抗体。

[0621] 上述此类联合疗法涵盖联合给药(其中两种或更多种治疗剂包括在同一个或分开的组合物中)和分开给药，在分开给药的情况下，本发明的双特异性抗原结合分子或抗体的给药可以发生在给予另外的治疗剂和/或佐剂之前、同时和/或之后。

[0622] 制品

[0623] 在本发明的另一个方面，提供了含有用于治疗、预防和/或诊断上述紊乱的物质的制品。制品包括容器和标签或在容器上或与容器相关联的包装说明书。适合的容器包括例如瓶、小瓶、注射器、IV溶液袋等。可以由各种材料如玻璃或塑料形成容器。容器容纳组合物本身或连同另一种有效治疗、预防和/或诊断病症的组合物，并且可以具有无菌进入口(例如，该容器可以是具有可被皮下注射针刺穿的塞子的小瓶或静脉溶液袋)。组合物中至少一种活性剂是本发明的双特异性抗原结合分子或抗体。

[0624] 标签或包装说明书指示该组合物用于治疗选择的病症。而且，制品可以包括(a)其中含有组合物的第一容器，其中该组合物包含本发明的双特异性抗原结合分子；和(b)其中含有组合物的第二容器，其中该组合物包含另外的细胞毒性治疗剂或其他治疗剂。在本发明的这个实施方案中的制品可以进一步包括指示组合物可用于治疗特定病症的包装说明书。

[0625] 替代地或另外，制品可以进一步包括第二(或第三)容器，其包含药学上可接受的缓冲剂，例如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液和右旋糖溶液。它还可以包括立足于商业和用户立场所需的其他物品，包括其他缓冲剂、稀释剂、过滤器、针头和注射器。

[0626] 表C(序列)：

[0627]

SEQ ID NO:	名称	序列
1	人OX40 ECD	Uniprot No. P43489, aa 29-214
2	OX40(8H9,49B4,1G4, 20B7) CDR-H1	SYAIS
3	OX40(CLC-563, CLC-564, 17A9) CDR-H1	SYAMS
4	OX40(8H9,49B4,1G4, 20B7) CDR-H2	GIIPIFGTANYAQKFQG
5	OX40(CLC-563, CLC-564, 17A9) CDR-H2	AISGSGGSTYYADSVKG
6	OX40(8H9) CDR-H3	EYGWMDY
7	OX40(49B4) CDR-H3	EYYRGPYDY
8	OX40(1G4) CDR-H3	EYGSMDY
9	OX40(20B7) CDR-H3	VNYPYSYWGDFDY
10	OX40(CLC-563) CDR-H3	DVGAFDY
11	OX40(CLC-564) CDR-H3	DVGPFDY
12	OX40(17A9)-CDR-H3	VFYRGGVSMDY
13	OX40(8H9,49B4,1G4, 20B7) CDR-L1	RASQSISSWLA
14	OX40(CLC-563, CLC564) CDR-L1	RASQSVSSSYLA
15	OX40(17A9) CDR-L1	QGDSLRSYYAS
16	OX40(8H9,49B4,1G4, 20B7) CDR-L2	DASSLES
17	OX40(CLC-563,	GASSRAT

[0628]

	CLC564) CDR-L2	
18	OX40(17A9) CDR-L2	GKNNRPS
19	OX40(8H9) CDR-L3	QQYLTYSRFT
20	OX40(49B4) CDR-L3	QQYSSQPYT
21	OX40(1G4) CDR-L3	QQYISYSMLT
22	OX40(20B7) CDR-L3	QQYQAFSLT
23	OX40(CLC-563, CLC-164) CDR-L3	QQYGSSPLT
24	OX40(17A9) CDR-L3	NSRVMPHNRV
25	OX40(8H9) VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQ GLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCAREYGWMDYWGQGTTVTVSS
26	OX40(8H9) VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQ YLTYSRFTFGQGTKVEIK
27	OX40(49B4) VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQ GLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCAREYYRGPYDYWGQGTTVTVSS
28	OX40(49B4) VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQ YSSQPYTFGQGTKVEIK
29	OX40(1G4) VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQ GLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCAREYGSMDYWGQGTTVTVSS
30	OX40(1G4) VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQ YISYSMLTFGQGTKVEIK
31	OX40(20B7) VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQ GLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARVNYPYSYWGDFDYWGQGTTVTVSS
32	OX40(20B7) VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQ YQAFSLTFGQGTKVEIK
33	OX40(CLC-563) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCALDVGAFDYWGQGALVTVSS
34	OX40(CLC-563) VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQ YGSSPLTFGQGTKVEIK
35	OX40(CLC-564) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAFDVGPFDYWGQGTLVTVSS
36	OX40(CLC-564) VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQ YGSSPLTFGQGTKVEIK
37	OX40(17A9) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARVFYRGGVSMDYWGQGTLVTVSS
38	OX40(17A9) VL	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAP VLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCN SRVMPHNRVFGGGTKLTV
39	人4-1BB ECD	Uniprot No. Q07011, aa 24-186
40	4-1BB(12B3,11D5, 9B11, 20G2) CDR-H1	SYAIS
41	4-1BB(25G7) CDR-H1	SYAMS
42	4-1BB(12B3,11D5, 9B11, 20G2) CDR-H2	GIIPIFGTANYAQKFQG
43	4-1BB(25G7) CDR-H2	AISGSGGSTYYADSVKG
44	4-1BB(12B3) CDR-H3	SEFRFYADFDY

[0629]

45	4-1BB(25G7) CDR-H3	DDPWPPFDY
46	4-1BB(11D5) CDR-H3	STLIYGYFDY
47	4-1BB(9B11) CDR-H3	SSGAYPGYFDY
48	4-1BB(20G2) CDR-H3	SYYWESYPFDY
49	4-1BB(12B3,11D5, 9B11, 20G2) CDR-L1	RASQSISSWLA
50	4-1BB(25G7) CDR-L1	QGDSLRSYYAS
51	4-1BB(12B3,11D5, 9B11, 20G2) CDR-L2	DASSLES
52	4-1BB(25G7) CDR-L2	GKNNRPS
53	4-1BB(12B3) CDR-L3	QQYHSYPQT
54	4-1BB(25G7) CDR-L3	NSLDRRGMWV
55	4-1BB(11D5) CDR-L3	QQLNSYPQT
56	4-1BB(9B11) CDR-L3	QQVNSYPQT
57	4-1BB(20G2) CDR-L3	QQQHSYYT
58	4-1BB(12B3) VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQ GLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARSEFRFYADFDYWGQGTTVTVSS
59	4-1BB(12B3) VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQ YHSYPQTFGQGTKVEIK
60	4-1BB(25G7) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARDDPWPPFDYWGQGTLVTVSS
61	4-1BB(25G7) VL	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAP VLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCN SLDRRGMWVFGGGTKLTV
62	4-1BB(11D5) VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQ GLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARSTLIYGYFDYWGQGTTVTVSS
63	4-1BB(11D5) VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQ LNSYPQTFGQGTKVEIK
64	4-1BB(9B11) VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQ GLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARSSGAYPGYFDYWGQGTTVTVSS
65	4-1BB(9B11) VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQ VNSYPQTFGQGTKVEIK
66	4-1BB(20G2) VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQ GLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARSYYWESYPFDYWGQGTTVTVSS
67	4-1BB(20G2) VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQ QHSYYTFGQGTKVEIK
68	FAP(28H1) CDR-H1	SHAMS
69	FAP(4B9) CDR-H1	SYAMS
70	FAP(28H1) CDR-H2	AIWASGEQYYADSVKG
71	FAP(4B9) CDR-H2	AIIGSGASTYYADSVKG
72	FAP(28H1) CDR-H3	GWLGNFDY
73	FAP(4B9) CDR-H3	GWFGGFNY
74	FAP(28H1) CDR-L1	RASQSVSRSYLA
75	FAP(4B9) CDR-L1	RASQSVTSSYLA
76	FAP(28H1) CDR-L2	GASTRAT
77	FAP(4B9) CDR-L2	VGSRRAT
78	FAP(28H1) CDR-L3	QQGQVIPPT
79	FAP(4B9) CDR-L3	QQGIMLPPT
80	FAP(28H1) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAPGK GLEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR

		AEDTAVYYCAKGWLGNFDYWGQGTLVTVSS
81	FAP(28H1) VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSRSYLAWYQQKPGQAP RLLIIGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQ GQVIPPTFGQGTKVEIK
82	FAP(4B9) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSS
83	FAP(4B9) VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQKPGQAP RLLINVGSRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQ GIMLPPTFGQGTKVEIK
84	人(hu) FAP	UniProt no. Q12884
85	人FAP外域+聚lys标签 +his_6标签	RPSRVHNSEENTMRALTLKDILNGTFSYKTFFPNWISGQEYLHQ SADNNIVLYNIETGQSYTILSNRTMKSVNASNYGLSPDRQFVYL ESDYSKLWRYSYTATYYIYDLSNGEFVRGNELPRPIQYLCWSPV GSKLAYVYQNNIYLKQRPGDPPFQITFNGRENKIFNGIPDWVYE EEMLATKYALWWSPNGKFLAYAEFNDTDIPVIAYSYYGDEQYP RTINIPYPKAGAKNPVVRIFIIDTTYPAYVGPQEVPVPAMIASSDY YFSWLTWVTDERVCLQWLKRVQNVSVLSICDFREDWQTWDCP KTQEHIEESRTGWAGGFFVSTPVFSYDAISYYKIFSDKDGYKHIH YIKDTVENAIQITSGKWEAINIFRVTQDSLFYSSNEFEEYPGRRNI YRISIGSYPPSKKCVTCHLRKERCQYYTASFSDYAKYYALVCYG PGIPISTLHDGRTDQEIKILEENKELENALKNIQLPKEEIKKLEVDE ITLWYKMILPPQFDRSKKYPLLIQVYGGPCSQSVRSVFAVNWISY LASKEGMVIALVDGRGTAFQGDKLLYAVYRKLGVYEVEDQITA VRKFIEMGFIDEKRIAIWGWSYGGYVSSLALASGTGLFKCGIAV APVSSWEYYASVYTERFMGLPTKDDNLEHYKNSTVMARAEYF RNVDYLLIHGTADDNVHFQNSAQIAKALVNAQVDFQAMWYSD QNHGLSGLSTNHLYTHMTHFLKQCFSLSDGKKKKKKGHHHHH H
86	核苷酸序列 人FAP外域+聚lys标签 +his_6标签	CGCCCTTCAAGAGTTCATAACTCTGAAGAAAATACAATGAGA GCACTCACACTGAAGGATATTTTAAATG GAACATTTTCTTATAAAACATTTTTTCCAAACTGGATTTCAGG ACAAGAATATCTTCATCAATCTGCAGATAACAATATAGTACT TTATAATATTGAAACAGGACAATCATATACCATTTTGAGTAA TAGAACCATGAAAAGTGTGAATGCTTCAAATTACGGCTTATC ACCTGATCGGCAATTTGTATATCTAGAAAGTGATTATTCAAA GCTTTGGAGATACTCTTACACAGCAACATATTACATCTATGA CCTTAGCAATGGAGAATTTGTAAGAGGAAATGAGCTTCCTCG TCCAATTCAGTATTTATGCTGGTCGCCTGTTGGGAGTAAATTA GCATATGTCTATCAAAACAATATCTATTTGAAACAAAGACCA GGAGATCCACCTTTTCAAATAACATTTAATGGAAGAGAAAAT AAAATATTTAATGGAATCCCAGACTGGGTTTATGAAGAGGAA ATGCTTGCTACAAAATATGCTCTCTGGTGGTCTCCTAATGGAA AATTTTTGGCATATGCGGAATTTAATGATACGGATATACCAG TTATTGCCTATTCCTATTATGGCGATGAACAATATCCTAGAAC AATAAATATTCCATACCCAAAGGCTGGAGCTAAGAATCCCGT TGTTCGGATATTTATTATCGATACCACTTACCCTGCGTATGTA GGTCCCCAGGAAGTGCCTGTTCCAGCAATGATAGCCTCAAGT GATTATTATTTCAGTTGGCTCACGTGGGTTACTGATGAACGA GTATGTTTGCAGTGGCTAAAAAGAGTCCAGAATGTTTCGGTC CTGTCTATATGTGACTTCAGGGAAGACTGGCAGACATGGGAT TGTCCAAAGACCCAGGAGCATATAGAAGAAAGCAGAACTGG ATGGGCTGGTGGATTCTTTGTTTCAACACCAGTTTTCAGCTAT GATGCCATTTCGTACTACAAAATATTTAGTGACAAGGATGGC TACAAACATATTCACTATATCAAAGACACTGTGGAAAATGCT ATTCAAATTACAAGTGGCAAGTGGGAGGCCATAAATATATTC AGAGTAACACAGGATTCACTGTTTTATTCTAGCAATGAATTT GAAGAATACCCTGGAAGAAGAAACATCTACAGAATTAGCAT TGGAAGCTATCCTCCAAGCAAGAAGTGTGTTACTTGCCATCT AAGGAAAGAAAGGTGCCAATATTACACAGCAAGTTTCAGCG

[0630]

[0631]

		ACTACGCCAAGTACTATGCACTTGTCTGCTACGGCCCAGGCA TCCCCATTTCCACCCTTCATGATGGACGCACTGATCAAGAAA TTAAAATCCTGGAAGAAAACAAGGAATTGGAAAATGCTTTGA AAAATATCCAGCTGCCTAAAGAGGAAATTAAGAAACTTGAA GTAGATGAAATTACTTTATGGTACAAGATGATTCTTCCTCCTC AATTTGACAGATCAAAGAAGTATCCCTTGCTAATTCAAGTGT ATGGTGGTCCCTGCAGTCAGAGTGTAAGGTCTGTATTTGCTGT TAATTGGATATCTTATCTTGCAAGTAAGGAAGGGATGGTCAT TGCCTTGGTGGATGGTCGAGGAACAGCTTTCCAAGGTGACAA ACTCCTCTATGCAGTGTATCGAAAGCTGGGTGTTTATGAAGTT GAAGACCAGATTACAGCTGTCAGAAAATTCATAGAAATGGGT TTCATTGATGAAAAAAGAATAGCCATATGGGGCTGGTCCTAT GGAGGATACGTTTCATCACTGGCCCTTGCATCTGGAACTGGT CTTTTCAAATGTGGTATAGCAGTGGCTCCAGTCTCCAGCTGG GAATATTACGCGTCTGTCTACACAGAGAGATTCATGGGTCTC CCAACAAAGGATGATAATCTTGAGCACTATAAGAATTCAACT GTGATGGCAAGAGCAGAATATTTCAGAAATGTAGACTATCTT CTCATCCACGGAACAGCAGATGATAATGTGCACTTTCAAAAC TCAGCACAGATTGCTAAAGCTCTGGTTAATGCACAAGTGGAT TTCCAGGCAATGTGGTACTCTGACCAGAACCACGGCTTATCC GGCCTGTCCACGAACCACTTATACACCCACATGACCCACTTC CTAAAGCAGTGTTTCTCTTTGTCAGACGGCAAAAAGAAAAAG AAAAAGGGCCACCACCATCACCATCAC
87	小鼠FAP	UniProt no. P97321
88	鼠FAP外域+聚lys标签+his_6标签	RPSRVYKPEGNTKRALTLKDILNGTFSYKTYFPNWISEQEYLHQ SEDDNIVFYNIETRESYIILSNSTMKSVNATDYGLSPDRQFVYLES DYSKLWRYSYTATYYIYDLQNGEFVRGYELPRPIQYLCWSPVGS KLAYVYQNNIYLKQRPGDPPFQITYTGRENRIFNGIPDWVYEEE MLATKYALWWSPDGKFLAYVEFNDSDIPIIAYSYYGDGQYPRTI NIPYPKAGAKNPVVRVFIVDTTYPHHVGPMEVPVPEMIASSDYY FSWLTWVSSERVCLQWLKRVQNVSVLSICDFREDWHAWECPK NQEHVEESRTGWAGGFFVSTPAFSQDATSYYKIFSDKDGYKHIH YIKDTVENAIQITSGKWEAIYIFRVTQDSLFYSSNEFEGYPGRRNI YRISIGNSPPSKKCVTCHLRKERCQYYTASFSYKAKYYALVCYG PGLPISTLHDGRTDQEIQVLEENKELENSLRNIQLPKVEIKKLKD GGLTFWYKMILPPQFDRSKKYPLLIQVYGGPCSQSVKSVFAVN WITYLASKEGIVIALVDGRGTAFQGDKFLHAVYRKLGVYEVED QLTAVRKFIEMGFIDEERIAIWGWSYGGYVSSLALASGTGLFKC GIAVAPVSSWEYYASIYSERFMGLPTKDDNLEHYKNSTVMARA EYFRNVDYLLIHGTADDNVHFQNSAQIAKALVNAQVDFQAMW YSDQNHGILSGRSQNHLYTHMTHFLKQCFSLSDGKKKKKKGHH HHHH
89	核苷酸序列 鼠FAP外域+聚lys标签+his_6标签	CGTCCCTCAAGAGTTTACAAACCTGAAGGAAACACAAAGAG AGCTCTTACCTTGAAGGATATTTTAAATG GAACATTCTCATATAAAACATATTTTCCCAACTGGATTTCAGA ACAAGAATATCTTCATCAATCTGAGGATGATAACATAGTATT TTATAATATTGAAACAAGAGAATCATATATCATTTTGAGTAA TAGCACCATGAAAAGTGTGAATGCTACAGATTATGGTTTGTC ACCTGATCGGCAATTTGTGTATCTAGAAAGTGATTATTCAAA GCTCTGGCGATATTCATACACAGCGACATACTACATCTACGA CCTTCAGAATGGGGAATTTGTAAGAGG ATACGAGCTCCCTCGTCCAATTCAGTATCTATGCTGGTCGCCT GTTGGGAGTAAATTAGCATATGTATATCAAAACAATATTTAT TTGAAACAAAGACCAGGAGATCCACCTTTTCAAATAACTTAT ACTGGAAGAGAAAATAGAATATTTAATGGAATACCAGACTG GGTTTATGAAGAGGAAATGCTTGCCACAAAATATGCTCTTTG GTGGTCTCCAGATGGAAAATTTTTGGCATATGTAGAATTTAA TGATTCAGATATACCAATTATTGCCTATTCTTATTATGGTGAT GGACAGTATCCTAGAACTATAAATATTCCATATCCAAAGGCT GGGGCTAAGAATCCGGTTGTTCGTGTTTTTATTGTTGACACCA

[0632]

		CCTACCCTCACCACGTGGGCCCAATGGAAGTGCCAGTTCCAG AAATGATAGCCTCAAGTGACTATTATTTCAGCTGGCTCACAT GGGTGTCCAGTGAACGAGTATGCTTGCAGTGGCTAAAAAGAG TGCAGAATGTCTCAGTCCTGTCTATATGTGATTTCAGGGAAG ACTGGCATGCATGGGAATGTCCAAAGAACCAGGAGCATGTA GAAGAAAGCAGAACAGGATGGGCTGGTGGATTCTTTGTTTCG ACACCAGCTTTTAGCCAGGATGCCACTTCTTACTACAAAATA TTTAGCGACAAGGATGGTTACAAACATATTCACTACATCAAA GACACTGTGGAAAATGCTATTCAAATTACAAGTGGCAAGTGG GAGGCCATATATATATTCCGCGTAACACAGGATTCACTGTTTT ATTCTAGCAATGAATTTGAAGGTTACCCTGGAAGAAGAAACA TCTACAGAATTAGCATTGGAAACTCTCCTCCGAGCAAGAAGT GTGTTACTTGCCATCTAAGGAAAGAAAGGTGCCAATATTACA CAGCAAGTTTCAGCTACAAAGCCAAGTACTATGCACTCGTCT GCTATGGCCCTGGCCTCCCCATTTCCACCCTCCATGATGGCCG CACAGACCAAGAAATACAAGTATTAGAAGAAAACAAAGAAC TGGAAAATTCTCTGAGAAATATCCAGCTGCCTAAAGTGGAGA TTAAGAAGCTCAAAGACGGGGGACTGACTTTCTGGTACAAGA TGATTCTGCCTCCTCAGTTTGACAGATCAAAGAAGTACCCTTT GCTAATTCAAGTGTATGGTGGTCCTTGTAGCCAGAGTGTTAA GTCTGTGTTTGCTGTTAATTGGATAACTTATCTCGCAAGTAAG GAGGGGATAGTCATTGCCCTGGTAGATGGTCGGGGCACTGCT TTCCAAGGTGACAAATTCCTGCATGCCGTGTATCGAAAACTG GGTGTATATGAAGTTGAGGACCAGCTCACAGCTGTCAGAAAA TTCATAGAAATGGGTTTCATTGATGAAGAAAGAATAGCCATA TGGGGCTGGTCCTACGGAGGTTATGTTTCATCCCTGGCCCTTG CATCTGGAACTGGTCTTTTCAAATGTGGCATAGCAGTGGCTC CAGTCTCCAGCTGGGAATATTACGCATCTATCTACTCAGAGA GATTCATGGGCCTCCCAACAAAGGACGACAATCTCGAACACT ATAAAAATTCAACTGTGATGGCAAGAGCAGAATATTTCAGAA ATGTAGACTATCTTCTCATCCACGGAACAGCAGATGATAATG TGCACTTTCAGAACTCAGCACAGATTGCTAAAGCTTTGGTTA ATGCACAAGTGGATTTCCAGGCGATGTGGTACTCTGACCAGA ACCATGGTATATTATCTGGGCGCTCCCAGAATCATTTATATAC CCACATGACGCACTTCCTCAAGCAATGCTTTTCTTTATCAGAC GGCAAAAAGAAAAAGAAAAAGGGCCACCACCATCACCATCA C
90	食蟹猴FAP外域+聚lys标签+his_6标签	RPPRVHNSEENTMRALTLKDILNGTFSYKTFFPNWISGQEYLHQ SADNNIVLYNIETGQSYTILSNRTMKSVNASNYGLSPDRQFVYL ESDYSKLWRYSYTATYYIYDLSNGEFVRGNELPRPIQYLCWSPV GSKLAYVYQNNIYLKQRPGDPPFQITFNGRENKIFNGIPDWVYE EEMLATKYALWWSPNGKFLAYAEFNDTDIPVIAYSYYGDEQYP RTINIPYPKAGAKNPFVRIFIIDTTYPAYVGPQEVPVPAMIASSDY YFSWLTWVTDERVCLQWLKRVQNVSVLSICDFREDWQTWDCP KTQEHIEESRTGWAGGFFVSTPVFSYDAISYYKIFSDKDGYKHIH YIKDTVENAIQITSGKWEAINIFRVTQDSLFYSSNEFEDYPGRRNI YRISIGSYPPSKKCVTCHLRKERCQYYTASFSDYAKYYALVCYG PGIPISTLHDGRTDQEIKILEENKELENALKNIQLPKEEIKKLEVDE ITLWYKMILPPQFDRSKKYPLLIQVYGGPCSQSVRSVFAVNWISY LASKEGMVIALVDGRGTAFQGDKLLYAVYRKLGVYEVEDQITA VRKFIEMGFIDEKRIAIWGWSYGGYVSSLALASGTGLFKCGIAV APVSSWEYYASVYTERFMGLPTKDDNLEHYKNSTVMARAEYF RNVDYLLIHGTADDNVHFQNSAQIAKALVNAQVDFQAMWYSD QNHGLSGLSTNHLYTHMTHFLKQCFSLSDGKKKKKKGHHHHH H
91	核苷酸序列 食蟹猴FAP外域+聚lys标签+his_6标签	CGCCCTCCAAGAGTTCATAACTCTGAAGAAAATACAATGAGA GCACTCACACTGAAGGATATTTTAAATG GGACATTTTCTTATAAAACATTTTTTCCAAACTGGATTTCAGG ACAAGAATATCTTCATCAATCTGCAGATAACAATATAGTACT TTATAATATTGAAACAGGACAATCATATACCATTTTGAGTAA

[0633]

		CAGAACCATGAAAAGTGTGAATGCTTCAAATTATGGCTTATC ACCTGATCGGCAATTTGTATATCTAGAAAGTGATTATTCAAA GCTTTGGAGATACTCTTACACAGCAACATATTACATCTATGA CCTTAGCAATGGAGAATTTGTAAGAGGAAATGAGCTTCCTCG TCCAATTCAGTATTTATGCTGGTCGCCTGTTGGGAGTAAATTA GCATATGTCTATCAAAACAATATCTATTTGAAACAAAGACCA GGAGATCCACCTTTTCAAATAACATTTAATGGAAGAGAAAAT AAAATATTTAATGGAATCCCAGACTGGGTTTATGAAGAGGAA ATGCTTGCTACAAAATATGCTCTCTGGTGGTCTCCTAATGGAA AATTTTTGGCATATGCGGAATTTAATGATACAGATATACCAG TTATTGCCTATTCCTATTATGGCGATGAACAATATCCCAGAAC AATAAATATTCCATACCCAAAGGCCGGAGCTAAGAATCCTTT TGTTCGGATATTTATTATCGATACCACTTACCCTGCGTATGTA GGTCCCCAGGAAGTGCCTGTTCCAGCAATGATAGCCTCAAGT GATTATTATTTCAGTTGGCTCACGTGGGTTACTGATGAACGA GTATGTTTGCAGTGGCTAAAAAGAGTCCAGAATGTTTCGGTC TTGTCTATATGTGATTTCAGGGAAGACTGGCAGACATGGGAT TGTCCAAAGACCCAGGAGCATATAGAAGAAAGCAGAACTGG ATGGGCTGGTGGATTCTTTGTTTCAACACCAGTTTTCAGCTAT GATGCCATTTCATACTACAAAATATTTAGTGACAAGGATGGC TACAAACATATTCACTATATCAAAGACACTGTGGAAAATGCT ATTCAAATTACAAGTGGCAAGTGGGAGGCCATAAATATATTC AGAGTAACACAGGATTCACTGTTTTATTCTAGCAATGAATTT GAAGATTACCCTGGAAGAAGAAACATCTACAGAATTAGCATT GGAAGCTATCCTCCAAGCAAGAAGTGTGTTACTTGCCATCTA AGGAAAGAAAGGTGCCAATATTACACAGCAAGTTTCAGCGA CTACGCCAAGTACTATGCACTTGTCTGCTATGGCCCAGGCAT CCCCATTTCCACCCTTCATGACGGACGCACTGATCAAGAAAT TAAAATCCTGGAAGAAAACAAGGAATTGGAAAATGCTTTGA AAAATATCCAGCTGCCTAAAGAGGAAATTAAGAAACTTGAA GTAGATGAAATTACTTTATGGTACAAGATGATTCTTCCTCCTC AATTTGACAGATCAAAGAAGTATCCCTTGCTAATTCAAGTGT ATGGTGGTCCCTGCAGTCAGAGTGTAAGGTCTGTATTTGCTGT TAATTGGATATCTTATCTTGCAAGTAAGGAAGGGATGGTCAT TGCCTTGGTGGATGGTCGGGGAACAGCTTTCCAAGGTGACAA ACTCCTGTATGCAGTGTATCGAAAGCTGGGTGTTTATGAAGT TGAAGACCAGATTACAGCTGTCAGAAAATTCATAGAAATGGG TTTCATTGATGAAAAAAGAATAGCCATATGGGGCTGGTCCTA TGGAGGATATGTTTCATCACTGGCCCTTGCATCTGGAACTGGT CTTTTCAAATGTGGGATAGCAGTGGCTCCAGTCTCCAGCTGG GAATATTACGCGTCTGTCTACACAGAGAGATTCATGGGTCTC CCAACAAAGGATGATAATCTTGAGCACTATAAGAATTCAACT GTGATGGCAAGAGCAGAATATTTCAGAAATGTAGACTATCTT CTCATCCACGGAACAGCAGATGATAATGTGCACTTTCAAAAC TCAGCACAGATTGCTAAAGCTCTGGTTAATGCACAAGTGGAT TTCCAGGCAATGTGGTACTCTGACCAGAACCACGGCTTATCC GGCCTGTCCACGAACCACTTATACACCCACATGACCCACTTC CTAAAGCAGTGTTTCTCTTTGTCAGACGGCAAAAAGAAAAAG AAAAAGGGCCACCACCATCACCATCAC
92	人CEA	UniProt no. P06731
93	人MCSP	UniProt no. Q6UVK1
94	人EGFR	UniProt no. P00533
95	人CD19	UniProt no. P15391
96	人CD20	Uniprot no. P11836
97	人CD33	UniProt no. P20138
98	人OX40	UniProt no. P43489
99	人4-1BB	UniProt no. Q07011
100	人CD27	UniProt no. P26842

[0634]

101	人HVEM	UniProt no. Q92956
102	人CD30	UniProt no. P28908
103	人GITR	UniProt no. Q9Y5U5
104	鼠OX40	UniProt no. P47741
105	鼠4-1BB	UniProt no. P20334
106	食蟹猴4-1BB	Uniprot no. F6W5G6
107	肽接头(G4S)	GGGGS
108	肽接头$(G4S)_2$	GGGGSGGGGS
109	肽接头$(SG4)_2$	SGGGGSGGGG
110	肽接头$G4(SG4)_2$	GGGGSGGGGSGGGG
111	肽接头	GSPGSSSSGS
112	肽接头$(G4S)_3$	GGGGSGGGGSGGGGS
113	肽接头$(G4S)_4$	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
114	肽接头	GSGSGSGS
115	肽接头	GSGSGNGS
116	肽接头	GGSGSGSG
117	肽接头	GGSGSG
118	肽接头	GGSG
119	肽接头	GGSGNGSG
120	肽接头	GGNGSGSG
121	肽接头	GGNGSG
122	食蟹猴Ox40 ECD	aa 29-214
123	鼠OX40 ECD	aa 10-211
124	核苷酸序列 Fc穴链	见表2
125	核苷酸序列 人OX40抗原Fc节链	见表2
126	核苷酸序列 食蟹猴OX40抗原Fc节链	见表2
127	核苷酸序列 鼠OX40抗原Fc节链	见表2
128	Fc穴链	见表2
129	人OX40抗原Fc节链	见表2
130	食蟹猴OX40抗原Fc节链	见表2
131	鼠OX40抗原Fc节链	见表2
132	文库DP88-4 的核苷酸序列	见表3
133	Fab轻链Vk1_5 的核苷酸序列	见表4
134	Fab轻链Vk1_5	见表4
135	Fab重链VH1_69 的核苷酸序列	见表4
136	Fab重链VH1_69	见表4
137	LMB3	见表5
138	Vk1_5_L3r_S	见表5
139	Vk1_5_L3r_SY	见表5
140	Vk1_5_L3r_SPY	见表5
141	RJH31	见表5
142	RJH32	见表5
143	DP88-v4-4	见表5
144	DP88-v4-6	见表5
145	DP88-v4-8	见表5

[0635]

146	fdseqlong	见表5
147	(Vk3_20/VH3_23)模板	见表6
148	Fab轻链Vk3_20的核苷酸序列	见表7
149	Fab轻链Vk3_20	见表7
150	Fab重链VH3_23的核苷酸序列	见表7
151	Fab重链VH3_23 (DP47)	见表7
152	MS64	见表8
153	DP47CDR3_ba (mod.)	见表8
154	DP47-v4-4	见表8
155	DP47-v4-6	见表8
156	DP47-v4-8	见表8
157	fdseqlong	见表8
158	Vl3_19/VH3_23 文 库 模板	见表9
159	Fab轻链Vl3_19的核苷酸序列	见表10
160	Fab轻链Vl3_19	见表10
161	LMB3	见表11
162	Vl_3_19_L3r_V	见表11
163	Vl_3_19_L3r_HV	见表11
164	Vl_3_19_L3r_HLV	见表11
165	RJH80	见表11
166	核苷酸序列 OX40(8H9) VL	见表12
167	核苷酸序列 OX40(8H9) VH	见表12
168	核苷酸序列 OX40(49B4) VL	见表12
169	核苷酸序列 OX40(49B4) VH	见表12
170	核苷酸序列 OX40(1G4) VL	见表12
171	核苷酸序列 OX40(1G4) VH	见表12
172	核苷酸序列 OX40(20B7) VL	见表12
173	核苷酸序列 OX40(20B7) VH	见表12
174	核苷酸序列 OX40(CLC-563) VL	见表12
175	核苷酸序列 OX40(CLC-563) VH	见表12
176	核苷酸序列 OX40(CLC-564) VL	见表12
177	核苷酸序列 OX40(CLC-564) VH	见表12
178	核苷酸序列 OX40(17A9) VL	见表12
179	核苷酸序列 OX40(17A9) VH	见表12
180	8H9 P329GLALA IgG1 (轻链)	核苷酸序列，见表13

[0636]

181	8H9 P329GLALA IgG1 (重链)	核苷酸序列，见表13
182	8H9 P329GLALA IgG1 (轻链)	见表13
183	8H9 P329GLALA IgG1 (重链)	见表13
184	49B4 P329GLALA IgG1 (轻链)	核苷酸序列，见表13
185	49B4 P329GLALA IgG1 (重链)	核苷酸序列，见表13
186	49B4 P329GLALA IgG1 (轻链)	见表13
187	49B4 P329GLALA IgG1 (重链)	见表13
188	1G4 P329GLALA IgG1 (轻链)	核苷酸序列，见表13
189	1G4 P329GLALA IgG1 (重链)	核苷酸序列，见表13
190	1G4 P329GLALA IgG1 (轻链)	见表13
191	1G4 P329GLALA IgG1 (重链)	见表13
192	20B7 P329GLALA IgG1 (轻链)	核苷酸序列，见表13
193	20B7 P329GLALA IgG1 (重链)	核苷酸序列，见表13
194	20B7 P329GLALA IgG1 (轻链)	见表13
195	20B7 P329GLALA IgG1 (重链)	见表13
196	CLC-563 P329GLALA IgG1 (轻链)	核苷酸序列，见表13
197	CLC-563 P329GLALA IgG1 (重链)	核苷酸序列，见表13
198	CLC-563 P329GLALA IgG1 (轻链)	见表13
199	CLC-563 P329GLALA IgG1 (重链)	见表13
200	CLC-564 P329GLALA IgG1 (轻链)	核苷酸序列，见表13
201	CLC-564 P329GLALA IgG1 (重链)	核苷酸序列，见表13
202	CLC-564 P329GLALA IgG1 (轻链)	见表13
203	CLC-564 P329GLALA IgG1 (重链)	见表13
204	17A9 P329GLALA IgG1 (轻链)	核苷酸序列，见表13

[0637]

205	17A9 P329GLALA IgG1 (重链)	核苷酸序列，见表13
206	17A9 P329GLALA IgG1 (轻链)	见表13
207	17A9 P329GLALA IgG1 (重链)	见表13
208	人OX40 His	核苷酸序列
209	人OX40 His	见表15
210	鼠OX40 His	核苷酸序列
211	鼠OX40 His	见表15
212	二聚体人OX40抗原Fc的核苷酸序列	见表21
213	二聚体人OX40抗原Fc	见表21
214	(8B9) VHCH1-重链-(28H1) VHCL	核苷酸序列，见表25
215	VLCH1-轻链2 (28H1)	核苷酸序列，见表25
216	(8B9) VHCH1-重链-(28H1) VHCL	见表25
217	VLCH1-轻链2 (28H1)	见表25
218	(49B4) VHCH1-重链-(28H1) VHCL	核苷酸序列，见表25
219	(49B4) VHCH1-重链-(28H1) VHCL	见表25
220	(1G4) VHCH1-重链-(28H1) VHCL	核苷酸序列，见表25
221	(1G4) VHCH1-重链-(28H1) VHCL	见表25
222	(20B7) VHCH1-重链-(28H1) VHCL	核苷酸序列，见表25
223	(20B7) VHCH1-重链-(28H1) VHCL	见表25
224	(CLC-563) VHCH1-重链-(28H1) VHCL	核苷酸序列，见表25
225	(CLC-563) VHCH1-重链-(28H1) VHCL	见表25
226	(CLC-564) VHCH1-重链-(28H1) VHCL	核苷酸序列，见表25
227	(CLC-564) VHCH1-重链-(28H1) VHCL	见表25
228	(28H1) VHCL-重链穴	核苷酸序列，见表27
229	(28H1) VHCL-重链穴	见表27
230	(49B4) VHCH1-重链节	核苷酸序列，见表27
231	(49B4) VHCH1-重链节	见表27
232	(1G4) VHCH1-重链节	核苷酸序列，见表27
233	(1G4) VHCH1-重链节	见表27
234	(20B7) VHCH1-重链节	核苷酸序列，见表27
235	(20B7) VHCH1-重链节	见表27
236	(CLC-563) VHCH1-重链节	核苷酸序列，见表27
237	(CLC-563) VHCH1-重链节	见表27
238	(CLC-564) VHCH1-重链节	核苷酸序列，见表27
239	(CLC-564) VHCH1-重链	见表27

[0638]

	节	
240	食蟹猴4-1BB ECD	aa 24-186
241	鼠4-1BB ECD	P20334, aa 24-187
242	人4-1BB抗原Fc节链	核苷酸序列，见表37
243	食蟹猴4-1BB抗原Fc节链	核苷酸序列，见表37
244	鼠4-1BB抗原Fc节链	核苷酸序列，见表37
245	人4-1BB抗原Fc节链	见表37
246	食蟹猴4-1BB抗原Fc节链	见表37
247	鼠4-1BB抗原Fc节链	见表37
248	引物MS63	见表43
249	核苷酸序列 4-1BB(12B3) VL	见表44
250	核苷酸序列 4-1BB(12B3) VH	见表44
251	核苷酸序列 4-1BB(25G7) VL	见表44
252	核苷酸序列 4-1BB(25G7) VH	见表44
253	核苷酸序列 4-1BB(11D5) VL	见表44
254	核苷酸序列 4-1BB(11D5) VH	见表44
255	核苷酸序列 4-1BB(9B11) VL	见表44
256	核苷酸序列 4-1BB(9B11) VH	见表44
257	核苷酸序列 4-1BB(20G2) VL	见表44
258	核苷酸序列 4-1BB(20G2) VH	见表44
259	12B3 P329GLALA IgG1 (轻链)	核苷酸序列，见表45
260	12B3 P329GLALA IgG1 (重链)	核苷酸序列，见表45
261	12B3 P329GLALA IgG1 (轻链)	见表45
262	12B3 P329GLALA IgG1 (重链)	见表45
263	25G7 P329GLALA IgG1 (轻链)	核苷酸序列，见表45
264	25G7 P329GLALA IgG1 (重链)	核苷酸序列，见表45
265	25G7 P329GLALA IgG1 (轻链)	见表45
266	25G7 P329GLALA IgG1 (重链)	见表45
267	11D5 P329GLALA IgG1 (轻链)	核苷酸序列，见表45
268	11D5 P329GLALA IgG1 (重链)	核苷酸序列，见表45
269	11D5 P329GLALA IgG1 (轻链)	见表45
270	11D5 P329GLALA IgG1	见表45

[0639]

	(重链)	
271	9B11 P329GLALA IgG1 (轻链)	核苷酸序列，见表45
272	9B11 P329GLALA IgG1 (重链)	核苷酸序列，见表45
273	9B11 P329GLALA IgG1 (轻链)	见表45
274	9B11 P329GLALA IgG1 (重链)	见表45
275	20G2 P329GLALA IgG1 (轻链)	核苷酸序列，见表45
276	20G2 P329GLALA IgG1 (重链)	核苷酸序列，见表45
277	20G2 P329GLALA IgG1 (轻链)	见表45
278	20G2 P329GLALA IgG1 (重链)	见表45
279	mu4-1BB D1 / hu4-1BB D2 Fc节	见表56
280	hu4-1BB D1 / mu4-1BB D2 Fc节	见表56
281	hu4-1BB D1 Fc节	见表56
282	鼠4-1BB域D1 (N端)	见表57
283	人4-1BB域D2 (C端)	见表57
284	人4-1BB域D1 (N端)	见表57
285	鼠4-1BB域D2 (C端)	见表52
286	(12B3) VHCH1-重链-(28H1) VHCL	核苷酸序列，见表60
287	(12B3) VHCH1-重链-(28H1) VHCL	见表60
288	(25G7) VHCH1-重链-(28H1) VHCL	核苷酸序列，见表60
289	(25G7) VHCH1-重链-(28H1) VHCL	见表60
290	(11D5) VHCH1-重链-(28H1) VHCL	核苷酸序列，见表60
291	(11D5) VHCH1-重链-(28H1) VHCL	见表60
292	(9B11) VHCH1-重链-(28H1) VHCL	核苷酸序列，见表60
293	(9B11) VHCH1-重链-(28H1) VHCL	见表60
294	(12B3) VHCH1-重链节	核苷酸序列，见表65
295	(12B3) VHCH1-重链节	见表65
296	(25G7) VHCH1-重链节	核苷酸序列，见表65
297	(25G7) VHCH1-重链节	见表65
298	(11D5) VHCH1-重链节	核苷酸序列，见表65
299	(11D5) VHCH1-重链节	见表65
300	(9B11) VHCH1-重链节	核苷酸序列，见表65
301	(9B11) VHCH1-重链节	见表65
302	(8H9) VHCH1-重链节	核苷酸序列，见表27
303	(8H9) VHCH1-重链节	见表27
304	(49B4) VHCH1 Fc节VH (4B9) (重链1的核苷酸序	见表30

[0640]

	列)	
305	(49B4) VHCH1 Fc穴VL (4B9) (重链2的核苷酸序列)	见表30
306	(49B4) VHCH1 Fc节VH (4B9) (重链1)	见表30
307	(49B4) VHCH1 Fc穴VL (4B9) (重链2)	见表30
308	(49B4) VHCH1 Fc节VH (28H1) (核苷酸序列，重链1)	见表30
309	(49B4) VHCH1 Fc穴VL (28H1) (核苷酸序列，重链2)	见表30
310	(49B4) VHCH1 Fc节VH (28H1) (重链1)	见表30
311	(49B4) VHCH1 Fc穴VL (28H1) (重链2)	见表30
312	(49B4) VHCH1 Fc节VH (DP47) (核苷酸序列，重链1)	见表30
313	(49B4) VHCH1 Fc穴VL (DP47) (核苷酸序列，重链2)	见表30
314	(49B4) VHCH1 Fc节VH (DP47) (重链1)	见表30
315	(49B4) VHCH1 Fc穴VL (DP47) (重链2)	见表30
316	(12B3) VHCH1 Fc节VH (4B9) (HC 1的核苷酸序列)	见表70
317	(12B3) VHCH1 Fc穴VL (4B9) (HC2的核苷酸序列)	见表70
318	(12B3) VHCH1 Fc节VH (4B9) (重链1)	见表70
319	(12B3) VHCH1 Fc穴VL (4B9) (重链2)	见表70
320	(25G7) VHCH1 Fc节VH (4B9) (核苷酸序列，重链1)	见表70
321	(25G7) VHCH1 Fc穴VL (4B9) (核苷酸序列，重链2)	见表70
322	(25G7) VHCH1 Fc节VH (4B9) (重链1)	见表70
323	(25G7) VHCH1 Fc穴VL	见表70

	(4B9) (重链2)	
324	(11D5) VHCH1 Fc节VH (4B9) (核苷酸序列，重链1)	见表70
325	(11D5) VHCH1 Fc穴VL (4B9) (核苷酸序列，重链2)	见表70
326	(11D5) VHCH1 Fc节VH (4B9) (重链1)	见表70
327	(11D5) VHCH1 Fc穴VL (4B9) (重链2)	见表70
328	(9B11) VHCH1 Fc节VH (4B9) (核苷酸序列，重链1)	见表70
329	(9B11) VHCH1 Fc穴VL (4B9) (核苷酸序列，重链2)	见表70
330	(9B11) VHCH1 Fc节VH (4B9) (重链1)	见表70
331	(9B11) VHCH1 Fc穴VL (4B9) (重链2)	见表70
332	(12B3) VHCH1 Fc节VL (4B9) (HC 1的核苷酸序列)	见表71
333	(12B3) VHCH1 Fc穴VH (4B9) (HC2的核苷酸序列)	见表71
334	(12B3) VHCH1 Fc节VL (4B9) (重链1)	见表71
335	(12B3) VHCH1 Fc穴VH (4B9) (重链2)	见表71
336	(25G7) VHCH1 Fc节VL (4B9) (核苷酸序列，重链1)	见表71
337	(25G7) VHCH1 Fc穴VH (4B9) (核苷酸序列，重链2)	见表71
338	(25G7) VHCH1 Fc节VL (4B9) (重链1)	见表71
339	(25G7) VHCH1 Fc穴VH (4B9) (重链2)	见表71
340	(11D5) VHCH1 Fc节VL (4B9) (核苷酸序列，重链1)	见表71
341	(11D5) VHCH1 Fc穴VH (4B9) (核苷酸序列，重链2)	见表71
342	(11D5) VHCH1 Fc节VL (4B9) (重链1)	见表71
343	(11D5) VHCH1 Fc穴VH (4B9) (重链2)	见表71

[0641]

[0642]

344	(9B11) VHCH1 Fc节VL (4B9) (核苷酸序列，重链1)	见表71
345	(9B11) VHCH1 Fc穴VH (4B9) (核苷酸序列，重链2)	见表71
346	(9B11) VHCH1 Fc节VL (4B9) (重链1)	见表71
347	(9B11) VHCH1 Fc穴VH (4B9) (重链2)	见表71

[0643] 所有核苷酸序列在没有相应终止密码子序列的情况下呈现。

[0644] 下面列出了本发明的具体实施方案：

[0645] 1.一种双特异性抗原结合分子，其包含

[0646] (a)至少一个能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的模块，

[0647] (b)至少一个能够特异性结合靶细胞抗原的模块，和

[0648] (c)由能够稳定联合的第一和第二亚基构成的Fc域。

[0649] 2.权利要求1的双特异性抗原结合分子，其中该共刺激性TNF受体家族成员选自由OX40和4-1BB组成的组。

[0650] 3.权利要求1或2的双特异性抗原结合分子，其中该共刺激性TNF受体家族成员是OX40。

[0651] 4.权利要求1至3任一项的双特异性抗原结合分子，其中该能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的模块结合包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽。

[0652] 5.权利要求1至4任一项的双特异性抗原结合分子，其包含至少一个能够特异性结合OX40的模块，其中所述模块包含

[0653] VH域，其包含

[0654] (i)包含选自由SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3组成的组的氨基酸序列的 CDR-H1，

[0655] (ii)包含选自由SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5组成的组的氨基酸序列的 CDR-H2，和

[0656] (iii)包含选自由SEQ ID NO:6，SEQ ID NO:7，SEQ ID NO:8，SEQ ID NO:9，SEQ ID NO:10，SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12组成的组的氨基酸序列的CDR-H3，

[0657] 和VL域，其包含

[0658] (iv)包含选自由SEQ ID NO:13，SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15组成的组的氨基酸序列的CDR-L1，

[0659] (v)包含选自由SEQ ID NO:16，SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18组成的组的氨基酸序列的CDR-L2，和

[0660] (vi)包含选自由SEQ ID NO:19，SEQ ID NO:20，SEQ ID NO:21，SEQ ID NO:22，SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24组成的组的氨基酸序列的 CDR-L3。

[0661] 6.权利要求1至5任一项的双特异性抗原结合分子，其中该能够特异性结合OX40的模块包含包含与选自由SEQ ID NO:25，SEQ ID NO:27，SEQ ID NO:29，SEQ ID NO:31，SEQ ID NO:33，SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:37 组成的组的氨基酸序列至少约95％，96％，97％，98％，99％或100％同一的氨基酸序列的重链可变区VH和包含与SEQ ID NO:26，SEQ ID NO:28，SEQ ID NO:30，SEQ ID NO:30，SEQ ID NO:32，SEQ ID NO:34，SEQ ID NO:36 和SEQ ID

NO:38的氨基酸序列至少约95％,96％,97％,98％,99％或100％同一的氨基酸序列的轻链可变区VL。

[0662] 7.权利要求1至5任一项的双特异性抗原结合分子,其中该能够特异性结合OX40的模块包含

[0663] (i)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:26 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0664] (ii)包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:28 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0665] (iii)包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:30 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0666] (iv)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:32 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0667] (v)包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:34 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0668] (vi)包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:36 的氨基酸序列的轻链可变区VL,或

[0669] (vii)包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:38 的氨基酸序列的轻链可变区VL。

[0670] 8.权利要求1或2的双特异性抗原结合分子,其中该共刺激性TNF受体家族成员是4-1BB。

[0671] 9.权利要求1,2或8任一项的双特异性抗原结合分子,其中该能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的模块结合包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的多肽。

[0672] 10.权利要求1,2,8或9任一项的双特异性抗原结合分子,其包含至少一个能够特异性结合4-1BB的模块,其中所述模块包含

[0673] VH域,其包含

[0674] (i)包含选自由SEQ ID NO:40和SEQ ID NO:41组成的组的氨基酸序列的 CDR-H1,

[0675] (ii)包含选自由SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:43组成的组的氨基酸序列的 CDR-H2,和

[0676] (iii)包含选自由SEQ ID NO:44,SEQ ID NO:45,SEQ ID NO:46,SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48组成的组的氨基酸序列的CDR-H3,和VL域,其包含

[0677] (iv)包含选自由SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:50组成的组的氨基酸序列的 CDR-L1,

[0678] (v)包含选自由SEQ ID NO:51和SEQ ID NO:52组成的组的氨基酸序列的 CDR-L2,和

[0679] (vi)包含选自由SEQ ID NO:53,SEQ ID NO:54,SEQ ID NO:55,SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57组成的组的氨基酸序列的CDR-L3。

[0680] 11.权利要求1,2,8,9或10任一项的双特异性抗原结合分子,其中该能够特异性结合4-1BB的模块包含包含与选自由SEQ ID NO:58,SEQ ID NO:60,SEQ ID NO:62,SEQ ID NO:64和SEQ ID NO:66组成的组的氨基酸序列至少约95％,96％,97％,98％,99％或100％

同一的氨基酸序列的重链可变区VH和包含与选自由SEQ ID NO:59,SEQ ID NO:61,SEQ ID NO:63,SEQ ID NO:65和SEQ ID NO:67组成的组的氨基酸序列至少约 95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的轻链可变区。

[0681] 12.权利要求1,2和8至11任一项的双特异性抗原结合分子,其中该能够特异性结合4-1BB的模块包含

[0682] (i)包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:59 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0683] (ii)包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:61 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0684] (iii)包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:63 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0685] (iv)包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:65 的氨基酸序列的轻链可变区VL,或

[0686] (v)包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:67 的氨基酸序列的轻链可变区VL。

[0687] 13.权利要求1至12任一项的双特异性抗原结合分子,其中该靶细胞抗原选自由成纤维细胞激活蛋白(FAP),黑素瘤相关硫酸软骨素蛋白聚糖 (MCSP),表皮生长因子受体(EGFR),癌胚抗原(CEA),CD19,CD20和 CD33组成的组。

[0688] 14.权利要求1至13任一项的双特异性抗原结合分子,其中该靶细胞抗原是成纤维细胞激活蛋白(FAP)。

[0689] 15.权利要求1至13任一项的双特异性抗原结合分子,其中该能够特异性结合FAP的模块包含

[0690] VH域,其包含

[0691] (i)包含选自由SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69组成的组的氨基酸序列的 CDR-H1,

[0692] (ii)包含选自由SEQ ID NO:70和SEQ ID NO:71组成的组的氨基酸序列的 CDR-H2,和

[0693] (iii)包含选自由SEQ ID NO:72和SEQ ID NO:73组成的组的氨基酸序列的 CDR-H3,

[0694] 和VL域,其包含

[0695] (iv)包含选自由SEQ ID NO:74和SEQ ID NO:75组成的组的氨基酸序列的 CDR-L1,

[0696] (v)包含选自由SEQ ID NO:76和SEQ ID NO:77组成的组的氨基酸序列的 CDR-L2,和

[0697] (vi)包含选自由SEQ ID NO:78和SEQ ID NO:79组成的组的氨基酸序列的 CDR-L3。

[0698] 16.权利要求1至7任一项的双特异性抗原结合分子,其中

[0699] (i)该能够特异性结合OX40的模块包含包含与SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:29,SEQ ID NO:31,SEQ ID NO:33,SEQ ID NO:35 或SEQ ID NO:37的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或 100%同一的氨基酸序列的重链可变区VH,和包含与

SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:30,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:34,SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:38的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的轻链可变区且

[0700] (ii)该能够特异性结合FAP的模块包含包含与SEQ ID NO:80或SEQ ID NO:82的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的重链可变区VH和包含与SEQ ID NO:81或SEQ ID NO:83的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的轻链可变区。

[0701] 17.权利要求1,2或8至12任一项的双特异性抗原结合分子,其中

[0702] (i)该能够特异性结合4-1BB的模块包含包含与SEQ ID NO:58,SEQ ID NO:60,SEQ ID NO:62,SEQ ID NO:64或SEQ ID NO:66的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的重链可变区VH和包含与SEQ ID NO:59,SEQ ID NO:61,SEQ ID NO:63,SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:67的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%, 99%或100%同一的氨基酸序列的轻链可变区且

[0703] (ii)该能够特异性结合FAP的模块包含包含与SEQ ID NO:80或SEQ ID NO:82的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的重链可变区VH和包含与SEQ ID NO:81或SEQ ID NO:83的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的轻链可变区。

[0704] 18.权利要求1至17任一项的双特异性抗原结合分子,其中所述分子包含

[0705] (a)能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的第一Fab片段,

[0706] (b)能够特异性结合靶细胞抗原的第二Fab片段,和

[0707] (c)由能够稳定联合的第一和第二亚基构成的Fc域。

[0708] 19.权利要求1至18任一项的双特异性抗原结合分子,其中该Fc域是 IgG,特别是IgG1 Fc域或IgG4 Fc域。

[0709] 20.权利要求1至19任一项的双特异性抗原结合分子,其中该Fc域包含一处或多处降低抗体对Fc受体的结合亲和力和/或效应器功能的氨基酸替代。

[0710] 21.权利要求1至20任一项的双特异性抗原结合分子,其中该Fc域是人IgG1亚类的,具有氨基酸突变L234A,L235A和P329G(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0711] 22.权利要求1至21任一项的双特异性抗原结合分子,其中该Fc域包含促进Fc域的第一和第二亚基联合的修饰。

[0712] 23.权利要求1至22任一项的双特异性抗原结合分子,其中依照该节入穴方法,该Fc域的第一亚基包含节且该Fc域的第二亚基包含穴。

[0713] 24.权利要求1至23任一项的双特异性抗体,其中该Fc域的第一亚基包含氨基酸替代S354C和T366W(编号方式依照Kabat EU索引)且该Fc域的第二亚基包含氨基酸替代Y349C,T366S和Y407V(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0714] 25.权利要求1至24任一项的双特异性抗原结合分子,其包含

[0715] (a)两个能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的模块,

[0716] (b)两个能够特异性结合靶细胞抗原的模块,和

[0717] (c)由能够稳定联合的第一和第二亚基构成的Fc域。

[0718] 26.权利要求25的双特异性抗原结合分子,其中该双特异性抗原结合分子对于该

共刺激性TNF受体家族成员和该靶细胞抗原二者是二价的。

[0719] 27.权利要求1至24任一项的双特异性抗原结合分子,其包含

[0720] (a)包含两个能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的Fab片段和Fc域的抗体的两条轻链和两条重链,和

[0721] (b)两个另外的能够特异性结合靶细胞抗原的Fab片段,其中所述另外的Fab 片段各自经肽接头连接至(a)的重链的C端。

[0722] 28.权利要求27的双特异性抗原结合分子,其中该两个另外的能够特异性结合靶细胞抗原的Fab片段是交换Fab片段,其中可变域VL和VH彼此替换且VL-CH链各自经肽接头连接至(a)的重链的C端。

[0723] 29.权利要求27或28的双特异性抗原结合分子,其中该两个能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的Fab片段是两个能够特异性结合OX40 或4-1BB的Fab片段且该两个另外的能够特异性结合靶细胞抗原的Fab片段是能够特异性结合FAP的交换Fab片段。

[0724] 30.前述权利要求任一项的双特异性抗原结合分子,其包含

[0725] (a)两个能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的模块,

[0726] (b)一个能够特异性结合靶细胞抗原的模块,和

[0727] (c)由能够稳定联合的第一和第二亚基构成的Fc域。

[0728] 31.权利要求30的双特异性抗原结合分子,其中该双特异性抗原结合分子对于该共刺激性TNF受体家族成员是二价的且对于该靶细胞抗原是单价的。

[0729] 32.前述权利要求任一项的双特异性抗原结合分子,其包含

[0730] (a)包含两个能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的Fab片段和Fc域的抗体的两条轻链和两条重链,和

[0731] (b)能够特异性结合靶细胞抗原的VH和VL域,其中该VH域经肽接头连接至该重链之一的C端且其中该VL域经肽接头连接至第二重链的C端。

[0732] 33.一种多核苷酸,其编码权利要求1至32任一项的双特异性抗原结合分子。

[0733] 34.一种特异性结合OX40的抗体,其中所述抗体包含

[0734] (i)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:26 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0735] (ii)包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:28 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0736] (iii)包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:30 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0737] (iv)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:32 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0738] (v)包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:34 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0739] (vi)包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:36 的氨基酸序列的轻链可变区VL,或

[0740] (vii)包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:38 的氨基酸序列的轻链可变区VL。

[0741] 35.一种特异性结合4-1BB的抗体,其中所述抗体包含

[0742] (i)包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:59 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0743] (ii)包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:61 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0744] (iii)包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:63 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[0745] (iv)包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:65 的氨基酸序列的轻链可变区VL,或

[0746] (v)包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:67 的氨基酸序列的轻链可变区VL。

[0747] 36.一种多核苷酸,其编码权利要求34或35的抗体。

[0748] 37.一种药物组合物,其包含权利要求1至32任一项的双特异性抗原结合分子或权利要求34或35的抗体和至少一种药学可接受赋形剂。

[0749] 38.权利要求1至32任一项的双特异性抗原结合分子,或权利要求34或 35的抗体,或权利要求37的药物组合物,其用作药物。

[0750] 39.权利要求1至32的任一项的双特异性抗原结合分子,或权利要求34 或35的该抗体,或权利要求37的药物组合物,其用于

[0751] (i)刺激T细胞应答,

[0752] (ii)支持激活的T细胞的存活,

[0753] (iii)治疗感染,

[0754] (iv)治疗癌症,

[0755] (v)延迟癌症进展,或

[0756] (vi)延长罹患癌症的患者的存活。

[0757] 40.权利要求1至32的任一项的双特异性抗原结合分子,或权利要求34 或35的该抗体,或权利要求37的药物组合物,其用于治疗癌症。

[0758] 41.权利要求1至32的任一项的双特异性抗原结合分子,或权利要求34 或35的该抗体,或权利要求37的药物组合物,其用于治疗癌症,其中与化疗剂,放射和/或其它用于癌症免疫疗法的药剂组合施用该双特异性抗原结合分子。

[0759] 42.一种在个体中抑制肿瘤细胞生长的方法,其包括对该个体施用有效量的权利要求1至32的任一项的双特异性抗原结合分子,或权利要求34或35的该抗体,或权利要求37的药物组合物,以抑制肿瘤细胞生长。

实施例

[0760] 以下是本发明的方法和组合物的实施例。应当理解,根据上面提供的一般描述,可以实践各种其他实施方案。

[0761] 重组DNA技术

[0762] 使用标准方法操作DNA,如Sambrook等人在Molecular cloning:A laboratory manual;Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor, New York,1989

中所述。按照制造商的说明使用分子生物试剂。关于人免疫球蛋白轻链和重链的核苷酸序列的一般信息见:Kabat,E.A.等人,(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest,Fifth Ed.,NIH公开号 91-3242。

[0763] DNA测序

[0764] 通过双链测序确定DNA序列。

[0765] 基因合成

[0766] 使用适当的模板通过PCR生成或由Geneart AG(Regensburg,Germany)从合成的寡核苷酸和PCR产物通过自动基因合成来合成期望的基因区段。在没有可用的确切基因序列的情况下,基于来自最近同源物的序列设计寡核苷酸引物,并且通过RT-PCR从源自适当组织的RNA分离基因。将侧翼为单个限制性核酸内切酶切割位点的基因区段克隆到标准克隆/测序载体中。从转化的细菌中纯化质粒DNA,并通过紫外光谱法测定浓度。通过DNA测序证实亚克隆基因片段的DNA序列。设计具有适合的限制性位点的基因区段,以允许亚克隆到对应的表达载体中。所有构建体均被设计为具有编码前导肽的5'端DNA序列,所述前导肽靶向在真核细胞中分泌的蛋白质。

[0767] 蛋白质纯化

[0768] 参考标准方案,从过滤的细胞培养物上清液中纯化蛋白质。简言之,将抗体施加到蛋白A琼脂糖凝胶柱(GE Healthcare)上并用PBS洗涤。在pH 2.8实现抗体的洗脱,然后立即中和样品。通过尺寸排阻色谱法(Superdex 200,GE Healthcare)在PBS或在20mM组氨酸、150mM NaCl(pH 6.0)中从单体抗体分离聚集的蛋白质。合并单体抗体级分,使用例如MILLIPORE Amicon Ultra(30MWCO)离心浓缩机进行浓缩(如果需要的话),在-20℃或-80℃冷冻并储存。提供部分样品用于随后例如通过SDS-PAGE、尺寸排阻色谱法(SEC)或质谱法进行蛋白质分析和分析表征。

[0769] SDS-PAGE

[0770] 根据制造商的说明使用NuPAGE® Pre-Cast凝胶系统(Invitrogen)。具体地说,使用10%或4-12%的NuPAGE® Novex® Bis-TRIS Pre-Cast凝胶(pH 6.4) 和NuPAGE® MES(还原凝胶,具有NuPAGE®抗氧化剂运行缓冲液添加剂) 或MOPS(非还原凝胶)运行缓冲液。

[0771] 分析尺寸排阻色谱法

[0772] 通过HPLC色谱法进行尺寸排阻色谱法(SEC),用于测定抗体的聚集和寡聚状态。简言之,将蛋白A纯化的抗体施加到在Agilent HPLC 1100系统上的300mM NaCl、50mM KH_2PO_4/K_2HPO_4(pH 7.5)中的Tosoh TSKgel G3000SW柱上,或者在Dionex HPLC系统上的2x PBS中的Superdex 200柱 (GE Healthcare)上。通过UV吸光度和峰面积的积分将洗脱的蛋白质定量。以BioRad凝胶过滤标准151-1901作为标准。

[0773] 质谱法

[0774] 本节描述了具有VH/VL或CH/CL交换(CrossMabs)的多特异性抗体的表征,重点在于它们的正确装配。通过去糖基化的完整CrossMabs和去糖基化的/纤溶酶消化的或替代地去糖基化的/限制性LysC消化的CrossMabs的电喷雾电离质谱法(ESI-MS)分析预期的一级结构。

[0775] 在37℃下以1mg/ml的蛋白质浓度将CrossMabs用磷酸盐或Tris缓冲液中的N-糖苷

酶F进行去糖基化达17个小时。用Tris缓冲液(pH 8)中的100μg去糖基化的VH/VL CrossMabs,分别在室温下进行120小时和在37℃下进行40分钟的纤溶酶或限制性LysC(Roche)消化。在进行质谱分析之前,将样品通过 HPLC在Sephadex G25柱(GE Healthcare)上脱盐。在装备有TriVersa NanoMate来源(Advion)的maXis 4G UHR-QTOF MS系统(Bruker Daltonik) 上,通过ESI-MS测定总质量。

[0776] 实施例1

[0777] Ox40抗体和工具结合物的生成

[0778] 1.1用于通过噬菌体展示生成新颖的OX40结合物的抗原和筛选工具的制备,纯化和表征

[0779] 在节(Merchant et al.,1998)上与人IgG1重链CH2和CH3域同框亚克隆编码人,小鼠或食蟹猴OX40的外域的DNA序列(表1)。在抗原外域和人IgG1 的Fc之间引入AcTEV蛋白酶切割位点。在抗原-Fc节的C端处引入用于定向生物素化的Avi标签。含有S354C/T366W突变的抗原-Fc节链与含有 Y349C/T366S/L368A/Y407V突变的Fc穴链的组合容许生成包括一个拷贝的含有OX40外域的链的异二聚体,从而创建单体形式的连接有Fc的抗原(图 1A)。表1显示多种OX40外域的氨基酸序列。表2显示如图1A中所绘的单体抗原Fc(kih)融合分子的cDNA和氨基酸序列。

[0780] 表1:抗原外域(ECD)的氨基酸编号方式及其起源

[0781]

SEQ ID NO:	构建物	起源	ECD
1	人OX40 ECD	依照P43489合成	aa 29-214
122	食蟹猴OX40 ECD	自食蟹猴血液分离	aa 29-214
123	鼠OX40 ECD	依照P47741合成	aa 10-211

[0782] 表2:单体抗原Fc(kih)融合分子(通过组合一条Fc穴链与一条抗原Fc节链而生成的)的cDNA和氨基酸序列

[0783]

SEQ ID NO:	抗原	序列
124	核苷酸序列 Fc穴链	GACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGG GGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGA GCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAA CAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACT GGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCT CCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCC CGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGA CCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC AACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT CCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA CACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
125	核苷酸序列 人OX40抗原 Fc节链	CTGCACTGCGTGGGCGACACCTACCCCAGCAACGACCGGTGCTGCC ACGAGTGCAGACCCGGCAACGGCATGGTGTCCCGGTGCAGCCGGTC CCAGAACACCGTGTGCAGACCTTGCGGCCCTGGCTTCTACAACGAC GTGGTGTCCAGCAAGCCCTGCAAGCCTTGTACCTGGTGCAACCTGCG GAGCGGCAGCGAGCGGAAGCAGCTGTGTACCGCCACCCAGGATACC GTGTGCCGGTGTAGAGCCGGCACCCAGCCCCTGGACAGCTACAAAC CCGGCGTGGACTGCGCCCCTTGCCCTCCTGGCCACTTCAGCCCTGGC GACAACCAGGCCTGCAAGCCTTGGACCAACTGCACCCTGGCCGGCA AGCACACCCTGCAGCCCGCCAGCAATAGCAGCGACGCCATCTGCGA GGACCGGGATCCTCCTGCCACCCAGCCTCAGGAAACCCAGGGCCCT CCCGCCAGACCCATCACCGTGCAGCCTACAGAGGCCTGGCCCAGAA CCAGCCAGGGGCCTAGCACCAGACCCGTGGAAGTGCCTGGCGGCAG AGCCGTCGACGAACAGTTATATTTTCAGGGCGGCTCACCCAAATCTG CAGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCT GGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACC CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGT

[0784]

		GAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGC CCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAG CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGC TGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT CTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA CTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATCCGGAGGC CTGAACGACATCTTCGAGGCCCAGAAGATTGAATGGCACGAG
126	核苷酸序列 食蟹猴OX40 抗原 Fc节链	CTCCACTGTGTCGGGGACACCTACCCCAGCAACGACCGGTGCTGTC AGGAGTGCAGGCCAGGCAACGGGATGGTGAGCCGCTGCAACCGCTC CCAGAACACGGTGTGCCGTCCGTGCGGGCCCGGCTTCTACAACGAC GTGGTCAGCGCCAAGCCCTGCAAGGCCTGCACATGGTGCAACCTCA GAAGTGGGAGTGAGCGGAAACAGCCGTGCACGGCCACACAGGACA CAGTCTGCCGCTGCCGGGCGGGCACCCAGCCCCTGGACAGCTACAA GCCTGGAGTTGACTGTGCCCCCTGCCCTCCAGGGCACTTCTCCCCGG GCGACAACCAGGCCTGCAAGCCCTGGACCAACTGCACCTTGGCCGG GAAGCACACCCTGCAGCCAGCCAGCAATAGCTCGGACGCCATCTGT GAGGACAGGGACCCCCCACCCACACAGCCCCAGGAGACCCAGGGC CCCCCGGCCAGGCCCACCACTGTCCAGCCCACTGAAGCCTGGCCCA GAACCTCACAGAGACCCTCCACCCGGCCCGTGGAGGTCCCCAGGGG CCCTGCGGTCGACGAACAGTTATATTTTCAGGGCGGCTCACCCAAAT CTGCAGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACT CCTGGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACA CCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGAC GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA GCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGC AGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGGATGA GCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTC TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG AGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTC CTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAA CCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATCCGGA GGCCTGAACGACATCTTCGAGGCCCAGAAGATTGAATGGCACGAG
127	核苷酸序列 鼠OX40抗原 Fc节链	GTGACCGCCAGACGGCTGAACTGCGTGAAGCACACCTACCCCAGCG GCCACAAGTGCTGCAGAGAGTGCCAGCCCGGCCACGGCATGGTGTC CAGATGCGACCACACACGGGACACCCTGTGCCACCCTTGCGAGACA GGCTTCTACAACGAGGCCGTGAACTACGATACCTGCAAGCAGTGCA CCCAGTGCAACCACAGAAGCGGCAGCGAGCTGAAGCAGAACTGCA CCCCCACCCAGGATACCGTGTGCAGATGCAGACCCGGCACCCAGCC CAGACAGGACAGCGGCTACAAGCTGGGCGTGGACTGCGTGCCCTGC CCTCCTGGCCACTTCAGCCCCGGCAACAACCAGGCCTGCAAGCCCT GGACCAACTGCACCCTGAGCGGCAAGCAGACCAGACACCCCGCCAG CGACAGCCTGGATGCCGTGTGCGAGGACAGAAGCCTGCTGGCCACC CTGCTGTGGGAGACACAGCGGCCCACCTTCAGACCCACCACCGTGC AGAGCACCACCGTGTGGCCCAGAACCAGCGAGCTGCCCAGTCCTCC TACCCTCGTGACACCTGAGGGCCCCGTCGACGAACAGTTATATTTTC AGGGCGGCTCACCCAAATCTGCAGACAAAACTCACACATGCCCACC GTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCC CCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAG TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA

[0785]

		AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA TCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCT GCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGG TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGT GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGG ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGAT GCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTG TCTCCGGGTAAATCCGGAGGCCTGAACGACATCTTCGAGGCCCAGA AGATTGAATGGCACGAG
128	Fc穴链	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSL SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
129	人OX40抗原 Fc节链	LHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNGMVSRCSRSQNTVCRPCGPGFYNDV VSSKPCKPCTWCNLRSGSERKQLCTATQDTVCRCRAGTQPLDSYKPGV DCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQPASNSSDAICEDRDP PATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPRTSQGPSTRPVEVPGGRAVDEQLY FQGGSPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGL NDIFEAQKIEWHE
130	食蟹猴OX40抗原 Fc节链	LHCVGDTYPSNDRCCQECRPGNGMVSRCNRSQNTVCRPCGPGFYNDV VSAKPCKACTWCNLRSGSERKQPCTATQDTVCRCRAGTQPLDSYKPG VDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQPASNSSDAICEDRD PPPTQPQETQGPPARPTTVQPTEAWPRTSQRPSTRPVEVPRGPAVDEQL YFQGGSPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGL NDIFEAQKIEWHE
131	鼠OX40抗原 Fc节链	VTARRLNCVKHTYPSGHKCCRECQPGHGMVSRCDHTRDTLCHPCETG FYNEAVNYDTCKQCTQCNHRSGSELKQNCTPTQDTVCRCRPGTQPRQ DSGYKLGVDCVPCPPGHFSPGNNQACKPWTNCTLSGKQTRHPASDSLD AVCEDRSLLATLLWETQRPTFRPTTVQSTTVWPRTSELPSPPTLVTPEGP VDEQLYFQGGSPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG KSGGLNDIFEAQKIEWHE

[0786] 将所有OX40-Fc融合物编码序列克隆入自MPSV启动子驱动插入物表达且含有位于CDS的3’端的合成的polyA信号序列的质粒载体。另外，载体含有用于质粒的附加体维持的EBV OriP序列。

[0787] 为了制备生物素化的单体抗原/Fc融合分子，用编码融合蛋白的两种成分(节和穴链)以及BirA (生物素化反应必需的一种酶)的三种载体共转染指数式生长中的悬浮HEK293 EBNA细胞。以2:1:0.05比率(“抗原ECD-AcTEV-Fc 节”:“Fc穴”:“BirA”)使用相应载体。

[0788] 为了在500ml摇瓶中生成蛋白质，在转染前24小时接种400x10^6个 HEK293 EBNA细胞。为了转染，将细胞以210g离心5分钟并用预温热的CD CHO培养基替换上清液。将表达载体在含有200μg载体DNA的20mL CD CHO培养基中重悬浮。添加540μL聚乙烯亚胺(PEI)后，将

溶液漩涡震荡15 秒并于室温温育10分钟。之后，将细胞与DNA/PEI溶液混合，转移至500 mL摇瓶并在具有5％CO_2气氛的温箱中于37℃温育3小时。温育后，添加160 mL F17培养基并将细胞培养24小时。转染后1天，对培养物添加1mM丙戊酸和7％补料。培养7天后，通过以210g 15分钟旋转下细胞来收集细胞上清液。将溶液无菌过滤(0.22μm滤器)，补充叠氮化钠至终浓度0.01％(w/v)，并于4℃保持。

[0789] 通过使用蛋白A的亲和层析，继以大小排阻层析自细胞培养物上清液纯化分泌的蛋白质。为了亲和层析，在用40mL 20mM磷酸钠，20mM柠檬酸钠pH 7.5平衡的HiTrap蛋白A HP柱(CV＝5mL，GE Healthcare)上加载上清液。通过用至少10个柱体积的含有20mM磷酸钠，20mM柠檬酸钠和0.5M 氯化钠(pH 7.5)的缓冲液清洗来去除未结合的蛋白质。使用在20个柱体积的 20mM柠檬酸钠，0.01％(v/v)Tween-20，pH 3.0上创建的氯化钠的线性pH 梯度(0至500mM)洗脱结合的蛋白质。然后用10个柱体积的含有20mM柠檬酸钠，500mM氯化钠和0.01％(v/v)Tween-20，pH 3.0的溶液清洗柱。

[0790] 通过添加1/40(v/v)2M Tris，pH 8.0来调节收集的级分的pH。浓缩并过滤蛋白质，之后在用pH 7.4的2mM MOPS，150mM氯化钠，0.02％(w/v)叠氮化钠溶液平衡的HiLoad Superdex 200柱(GE Healthcare)上加载。

[0791] 1.2来自一般Fab和共同轻链文库的Ox40特异性8H9，20B7，49B4，1G4， CLC-563，CLC-564和17A9抗体的选择

[0792] 自三种不同的一般噬菌体展示文库选择抗OX40抗体：DP88-4(克隆 20B7，8H9 1G4和49B4)，共同轻链文库Vk3_20/VH3_23(克隆CLC-563和 CLC-564)和λ-DP47(克隆17A9)。

[0793] DP88-4文库是使用包含轻链CDR3(L3，3种不同长度)和重链CDR3 (H3，3种不同长度)中的随机化序列间隙的V域配对Vk1_5(κ轻链)和VH1_69 (重链)基于人种系基因构建的。文库生成是通过交叠延伸(SOE)PCR应用剪接，通过装配3种PCR扩增片段而实施的。片段1包含抗体基因的5’端，包括随机化L3，片段2是中央恒定片段，跨越L3至H3，而片段3包含随机化H3和抗体基因的3’部分。分别使用下面的引物组合来生成用于DP88-4文库的这些文库片段：片段1(正向引物LMB3与反向引物Vk1_5_L3r_S或 Vk1_5_L3r_SY或Vk1_5_L3r_SPY组合)，片段2(正向引物RJH31与反向引物 RJH32组合)和片段3(正向引物DP88-v4-4或DP88-v4-6或DP88-v4-8与反向引物fdseqlong组合)。用于生成文库片段的PCR参数是初始变性5分钟94℃，25 个循环的1分钟94℃，1分钟58℃，1分钟72℃和终末延长10分钟72℃。为了装配PCR，使用等摩尔比率的凝胶纯化的单一片段作为模板，参数是初始变性3分钟94℃和5个循环的30秒94℃，1分钟58℃，2分钟72℃。在这个阶段，添加外部引物(LMB3和fdseqlong)并实施另外20个循环，之后是终末延长10分钟72℃。装配足够量的全长随机化Fab构建物后，将它们用NcoI/ NheI消化并连接入类似处理的受体噬菌粒载体。将经过纯化的连接体系用于约60次电感受态大肠杆菌TG1的转化。挽救展示Fab文库的噬菌粒颗粒并通过PEG/NaCl纯化来纯化，待用于选择。将这些文库构建步骤重复三次以获得最终文库容量4.4×10^9。通过点印迹中的C端标签检测测定的功能性克隆的百分比分别是轻链的92.6％和重链的93.7％。

[0794] 共同轻链文库Vk3_20/VH3_23是使用包含恒定非随机化共同轻链 Vk3_20和重链CDR3(H3，3种不同长度)中的随机化序列间隙的V域配对 Vk3_20(κ轻链)和VH3_23(重链)基于人种系基因构建的。文库生成是通过交叠延伸(SOE)PCR应用剪接，通过装配2种PCR扩增

片段而实施的。片段1 是恒定片段，跨越L3至H3，而片段2包含随机化H3和抗体基因的3’部分。分别使用下面的引物组合来生成用于Vk3_20/VH3_23共同轻链文库的这些文库片段：片段1(正向引物MS64与反向引物DP47CDR3_ba(mod.)组合)和片段2(正向引物DP47-v4-4，DP47-v4-6，DP47-v4-8与反向引物fdseqlong组合)。用于生成文库片段的PCR参数是初始变性5分钟94℃，25个循环的1分钟94℃，1分钟58℃，1分钟72℃和终末延长10分钟72℃。为了装配PCR，使用等摩尔比率的凝胶纯化的单一片段作为模板，参数是初始变性3分钟 94℃和5个循环的30秒94℃，1分钟58℃，2分钟72℃。在这个阶段，添加外部引物(MS64和fdseqlong)并实施另外18个循环，之后是终末延长10分钟 72℃。装配足够量的全长随机化VH构建物后，将它们用MunI/NotI消化并连接入类似处理的受体噬菌粒载体。将经过纯化的连接体系用于约60次电感受态大肠杆菌TG1的转化。挽救展示Fab文库的噬菌粒颗粒并通过PEG/NaCl纯化来纯化，待用于选择。获得了最终文库容量3.75×10^{9}。通过点印迹中的C端标签检测测定的功能性克隆的百分比分别是轻链的98.9％和重链的89.5％。

[0795] λ-DP47文库是使用下面的V域配对基于人种系基因构建的：Vl3_19λ轻链与VH3_23重链。文库在轻链CDR3(L3)和重链CDR3(H3)中随机化并通过“交叠延伸剪接”(SOE)PCR自3种片段装配。片段1包含抗体基因的5’端，包括随机化L3，片段2是中央恒定片段，跨越L3的结束至H3的开始，而片段3 包含随机化H3和Fab片段的3’部分。分别使用下面的引物组合来生成用于文库的文库片段：片段1(LMB3-Vl_3_19_L3r_V/Vl_3_19_L3r_HV/ Vl_3_19_L3r_HLV)，片段2(RJH80-DP47CDR3_ba(mod))和片段3 (DP47-v4-4/DP47-v4-6/DP47-v4-8-fdseqlong)。用于生成文库片段的PCR 参数是初始变性5分钟94℃，25个循环的60秒94℃，60秒55℃，60秒72℃和终末延长10分钟72℃。为了装配PCR，使用等摩尔比率的3种片段作为模板，参数是初始变性3分钟94℃和5个循环的60秒94℃，60秒55℃，120秒 72℃。在这个阶段，添加外部引物并实施另外20个循环，之后是终末延长 10分钟72℃。装配足够量的全长随机化Fab片段后，将它们用NcoI/NheI消化，伴随类似处理受体噬菌粒载体。连接15μg Fab文库插入物与13.3μg噬菌粒载体。将经过纯化的连接体系用于60次转化，产生1.5×10^{9}个转化子。挽救展示Fab文库的噬菌粒颗粒并通过PEG/NaCl纯化来纯化，待用于选择。

[0796] 作为抗原用于噬菌体展示选择的人OX40(CD134)在HEK EBNA细胞中作为N端单体Fc融合物瞬时表达并在位于携带受体链的Fc部分(Fc节链)C端的avi标签识别序列处经由共表达BirA生物素连接酶而体内位点特异性生物素化。

[0797] 依照下面的样式在溶液中实施选择轮次(生物淘选)：

[0798] 1.在用10μg/ml无关人IgG包被的Maxisorp板上预清洁约10^{12}个噬菌粒颗粒以对文库消减识别抗原的Fc部分的抗体，

[0799] 2.在总体积1ml中在100nM无关非生物素化Fc节入穴构建物存在下将非结合性噬菌粒颗粒与100nM生物素化人OX40一起温育0.5小时以进一步消减Fc结合物，

[0800] 3.通过转移至中性亲合素预包被微量滴定板的4个孔达10分钟来捕捉生物素化huOX40和附着的特异性结合性噬菌体(在第1和3轮中)，

[0801] 4.使用5x PBS/Tween20和5x PBS清洗相应孔，

[0802] 5.通过添加250μl 100mM TEA(三乙胺)每孔达10分钟来洗脱噬菌体颗粒并通过对来自4个孔的合并洗出液添加500μl 1M Tris/HCl pH 7.4来中和，

[0803] 6.通过与100nM生物素捕捉的Fc节入穴构建物一起在中性亲合素预包被微量滴定

板上温育来后清洁经过中和的洗出液以最终去除Fc结合物，

[0804] 7.用洗脱的噬菌体颗粒的上清液再感染对数期大肠杆菌TG1细胞，用辅助噬菌体VCSM13感染，在摇床上于30℃温育过夜，随后用PEG/NaCl沉淀噬菌粒颗粒，待用于下一个选择轮次。

[0805] 使用恒定抗原浓度100nM进行3或4轮选择。为了提高不仅对食蟹猴 OX40而且对鼠OX40交叉反应性的结合物的可能性，在一些选择轮次中，使用鼠靶物代替人OX40。在第2和4轮中，为了避免富集针对中性亲合素的结合物，通过添加5.4×10^7个链霉亲合素包被的磁珠来实施抗原:噬菌体复合物的捕捉。如下通过ELISA鉴定特异性结合物:分别在中性亲合素板和 Maxisorp板上包被100μl 25nM生物素化人OX40和10μg/ml人IgG。添加含有Fab的细菌上清液并使用抗Flag/HRP二抗经由它们的Flag标签检测结合性 Fab。对人OX40展现信号且对人IgG呈现阴性的克隆通过初审用于进一步分析并还以类似方式针对食蟹猴和鼠OX40测试。它们在0.5升培养体积中由细菌表达，亲和纯化并使用BioRad的ProteOn XPR36生物传感器通过SPR分析进一步表征。

[0806] 表3显示一般噬菌体展示抗体文库(DP88-4)的序列，表4提供文库 DP88-4种系模板的cDNA和氨基酸序列，而表5显示用于生成DP88-4种系模板的引物序列。

[0807] 表3:一般噬菌体展示抗体文库(DP88-4)的序列

[0808]

SEQ ID NO:	描述	序列
132	核苷酸序列 pRJH33 文库模板 DP88-4 文库；完整 Fab编码区，包含 PelB 前导序列 + Vk1_5 κ V域 + 用于轻链的CL恒定域和 PelB + VH1_69 V域 + 用于重链	TGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGC GGCCCAGCCGGCCATGGCCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTC CACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCATCACTTGCCGT GCCAGTCAGAGTATTAGTAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAA CCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGG AAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGCGGCAGTGGATCCGGGACAG AATTCACTCTCACCATCAGCAGCTTGCAGCCTGATGATTTTGCAAC TTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTATTCTACGTTTGGCCAGGGC ACCAAAGTCGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTC ATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTG TTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTAC AGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGA GTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC AGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT

[0809]

	的CH1恒定域，包括标签	CTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAC AAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGGAGCCGCAGAACAAAAAC TCATCTCAGAAGAGGATCTGAATGGAGCCGCAGACTACAAGGACG ACGACGACAAGGGTGCCGCATAATAAGGCGCGCCAATTCTATTTC AAGGAGACAGTCATATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTG GTCTGCTGCTCCTCGCTGCCCAGCCGGCGATGGCCCAGGTGCAATT GGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAA GGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGCAGCTACGCTAT AAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGG GAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCACAGAAGT TCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCCACGAGCACAG CCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCCGTGT ATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTACTATGTTATGGATGC CTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAA AGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCT GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC GAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGC GTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCC TCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGA CCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAAGTGG ACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACGCGGCCGCAAGCACTA GTGCCCATCACCATCACCATCACGCCGCGGCA

[0810] 表4：文库DP88-4种系模板的cDNA和氨基酸序列

[0811]

SEQ ID NO:	描述	序列
133	核苷酸序列 Fab 轻链 Vk1_5	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAG GAGACCGTGTCACCATCACTTGCCGTGCCAGTCAGAGTATTAGTAG CTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCT CCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCACGT TTCAGCGGCAGTGGATCCGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGC AGCTTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATA ATAGTTATTCTACGTTTGGCCAGGGCACCAAAGTCGAGATCAAGC GTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGA GCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC TTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCC CTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGC AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAA GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCAT CAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG TGTGGAGCCGCAGAACAAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAAT GGAGCCGCAGACTACAAGGACGACGACGACAAGGGTGCCGCA
134	Fab 轻链 Vk1_5	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YDASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYNSYSTF GQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGAAEQKLISEEDLNGAADYKDDDDK GAA
135	核苷酸序列 Fab 重链 VH1_69	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG TCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGC AGCTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTC GAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTAC GCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCC ACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTACTATG TTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCAG CTAGCACCAAAGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAA GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTG ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGAC

		TCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACAC CAAAGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACGCGGCCGC AAGCACTAGTGCCCATCACCATCACCATCACGCCGCGGCA
136	Fab 重 链 VH1_69	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCARLSPGGYYVMDAWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDAAASTSAHHHH HHAAA

[0812]

[0813] 表5:用于生成DP88-4文库的引物序列

SEQ ID NO:	引物名称	引物序列5'－3'
137	LMB3	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC
138	Vk1_5_L3r_S	CTCGACTTTGGTGCCCTGGCCAAACGTS***BA***A***TA*** C***GA***A***TT***A***TA***CTGTTGGCAGTAATAAGTTGCAAAATCAT 下划线：60%原始碱基和40%随机化为M 粗体且斜体：60%原始碱基和40%随机化为N
139	Vk1_5_L3r_SY	CTCGACTTTGGTGCCCTGGCCAAACGTM***HR***S***GR***A***TA***C***GA***A***TT***A ***TA***CTGTTGGCAGTAATAAGTTGCAAAATCAT 下划线：60%原始碱基和40%随机化为M 粗体且斜体：60%原始碱基和40%随机化为N
140	Vk1_5_L3r_SPY	CTCGACTTTGGTGCCCTGGCCAAACGTM***HH***M***SS***S***GR***A***TA***C***GA*** A***TT***A***TA***CTGTTGGCAGTAATAAGTTGCAAAATCAT 下划线：60%原始碱基和40%随机化为M 粗体且斜体：60%原始碱基和40%随机化为N
141	RJH31	ACGTTTGGCCAGGGCACCAAAGTCGAG
142	RJH32	TCTCGCACAGTAATACACGGCGGTGTCC
143	DP88-v4-4	GGACACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGA-1-2-2-3-4-GAC-TAC-T GGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCC 1: G/D = 20%, E/V/S = 10%, A/P/R/L/T/Y=5%; 2: G/Y/S=15%, A/D/T/R/P/L/V/N/W/F/I/E = 4,6%; 3: G/A/Y = 20%, P/W/S/D/T = 8%; 4: F = 46%, L/M = 15%, G/I/Y = 8%。
144	DP88-v4-6	GGACACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGA-1-2-2-2-2-3-4-GAC-TA C-TGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCC 1: G/D = 20%, E/V/S = 10%, A/P/R/L/T/Y=5%; 2: G/Y/S=15%, A/D/T/R/P/L/V/N/W/F/I/E = 4,6%; 3: G/A/Y = 20%, P/W/S/D/T = 8%; 4: F = 46%, L/M = 15%, G/I/Y = 8%。
145	DP88-v4-8	GGACACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGA-1-2-2-2-2-2-2-3-4-GAC -TAC-TGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCC 1: G/D = 20%, E/V/S = 10%, A/P/R/L/T/Y=5%; 2: G/Y/S=15%, A/D/T/R/P/L/V/N/W/F/I/E = 4,6%; 3: G/A/Y = 20%, P/W/S/D/T = 8%; 4: F = 46%, L/M = 15%, G/I/Y = 8%。
146	fdseqlong	GACGTTAGTAAATGAATTTTCTGTATGAGG

[0814]

[0815] 表6显示一般噬菌体展示抗体共同轻链文库(Vk3_20/VH3_23)的序列。表7提供共同轻链文库(Vk3_20/VH3_23)种系模板的cDNA和氨基酸序列,而表8显示用于生成共同轻链文库(Vk3_20/VH3_23)的引物序列。

[0816] 表6:用于PCR的一般噬菌体展示抗体共同轻链文库(Vk3_20/VH3_23)模板的序列

[0817]

SEQ ID NO:	描述	序列

[0818]

147	共同轻链文库**Vk3_20/VH3_23的**pRJH110文库模板；完整Fab编码区，包含PelB前导序列 + Vk3_20 κ V域 + 用于轻链的CL恒定域和PelB + VH3_23 V域 + 用于重链的CH1恒定域，包括标签	ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACT CGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCGAAATCGTGTTAACGCAGTCT CCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CTTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTG GTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT GGAGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTG GCAGTGGATCCGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACT GGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGT AGCTCACCGCTGACGTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAAATCA AACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCT GATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCT GAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTG GATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAG AGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCC TGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAA GAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGGAGCCGCACATCACCATCAC CATCACGGAGCCGCAGACTACAAGGACGACGACGACAAGGGT GCCGCATAATAAGGCGCGCCAATTCTATTTCAAGGAGACAGTC ATATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTC CTCGCTGCCCAGCCGGCGATGGCCGAGGTGCAATTGCTGGAGT CTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTC CTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCT GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGC TATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTG AAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGC TGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGT ATATTACTGTGCGAAACCGTTTCCGTATTTTGACTACTGGGGCC AAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCTAGCACCAAAGGCCC ATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGG GCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA ACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGC GTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTC CCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCA AAGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACGCGGCCGC AGAACAAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATGCCGCGGC A

[0819] 表7:共同轻链文库(Vk3_20/VH3_23)种系模板的cDNA和氨基酸序列

[0820]

SEQ ID NO:	描述	序列
148	核苷酸序列 Fab 轻链 Vk3_20	GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAG GGGAAAGAGCCACCCTCTCTTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCA GCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA GGCTCCTCATCTATGGAGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAG ACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCCGGGACAGACTTCACTCTCACCA TCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCA GTATGGTAGCTCACCGCTGACGTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGA AATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCA TCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGC TGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGG ATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGC AGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGC TGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAG TCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACA GGGGAGAGTGTGGAGCCGCACATCACCATCACCATCACGGAGCCG CAGACTACAAGGACGACGACGACAAGGGTGCCGCA
149	Fab 轻链 Vk3_20	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLI YGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLT

[0821]

		FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGAAHHHHHHGAADYKDDDDKGA A
150	核苷酸序列 Fab 重链 VH3_23	GAGGTGCAATTGCTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGG GGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAGCA GTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG AGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGC AGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAA GAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACAC GGCCGTATATTACTGTGCGAAACCGTTTCCGTATTTTGACTACTGG GGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCTAGCACCAAAGGC CCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGG GCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAAC CGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGC ACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAG CAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTA CATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAAGTGGACAA GAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACGCGGCCGCAGAACAAAAACT CATCTCAGAAGAGGATCTGAATGCCGCGGCA
151	Fab 重链 VH3_23 (DP47)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAKPFPYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDAAAEQKLISEEDLNAA A

[0822] 表8:用于生成DP88-4文库的引物序列

[0823]

SEQ ID NO:	引物名称	引物序列5’–3’
152	MS64	ACGTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGG
153	DP47CDR3_ba (mod.)	CGCACAGTAATATACGGCCGTGTCC
154	DP47-v4-4	CGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCG-5-1–2-2-3-4-GAC-TAC-TGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCG
155	DP47-v4-6	CGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCG-5-1–2-2-2-2-3-4-GAC-TAC- TGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCG
156	DP47-v4-8	CGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCG-5-1–2-2-2-2-2-2-3-4-GAC-TAC- TGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCG
157	fdseqlong	GACGTTAGTAAATGAATTTTCTGTATGAGG

[0824] 1:G/D＝20％,E/V/S＝10％,A/P/R/L/T/Y＝5％;2:G/Y/S＝15％,A/D/T/R/P/L/V/N/W/F/I/E＝4.6％; 3:G/A/Y＝20％,P/W/S/D/T＝8％;4:F＝46％,L/M＝15％,G/I/Y＝8％;5:K＝70％,R＝30％。

[0825] 表9显示用于PCR的一般噬菌体展示λ-DP47文库(V13_19/VH3_23)模板的序列。表10提供λ-DP47文库(V13_19/VH3_23)种系模板的cDNA和氨基酸序列,而表11显示用于生成λ-DP47文库(V13_19/VH3_23)的引物序列。

[0826] 表9:用于PCR的一般噬菌体展示λ-DP47文库(V13_19/VH3_23)模板的序列

[0827]

SEQ ID NO:	描述	序列
158	**λ-DP47 文库 Vl3_19/VH3_23** 的 pRJH53 文库模板; 完整Fab编码区, 包含PelB前导序列 + Vl3_19 λ V域 + 用于轻链的CL	ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACT CGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCTCGTCTGAGCTGACTCAGGAC CCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTCAGGATCACAT GCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGTTATTATGCAAGCTGGTACCA GCAGAAGCCAGGACAGGCCCCTGTACTTGTCATCTATGGTAAA AACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCA GCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGC GGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAACTCCCGTGATAGTAGC GGTAATCATGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCC

[0828]

	恒定域和PelB + VH3_23 V域 + 用于重链的CH1恒定域，包括标签	TAGGACAACCCAAGGCTGCCCCCAGCGTGACCCTGTTCCCCCC CAGCAGCGAGGAATTGCAGGCCAACAAGGCCACCCTGGTCTGC CTGATCAGCGACTTCTACCCAGGCGCCGTGACCGTGGCCTGGA AGGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGGCGTGGAGACCACCA CCCCCAGCAAGCAGAGCAACAACAAGTACGCCGCCAGCAGCT ACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTGGAAGAGCCACAGGTCCTA CAGCTGCCAGGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAGAAAAC CGTGGCCCCCACCGAGTGCAGCGGAGCCGCAGAACAAAAACT CATCTCAGAAGAGGATCTGAATGGAGCCGCAGACTACAAGGA CGACGACGACAAGGGTGCCGCATAATAAGGCGCGCCAATTCTA TTTCAAGGAGACAGTCATATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTG CTGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCTGCCCAGCCGGCGATGGCCGA GGTGCAATTGCTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGG GGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAG CAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGG CTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACAT ACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGA CAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGA GCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAACCGTTTCCGT ATTTTGACTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAG TGCTAGCACCAAAGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCT CCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGT CAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCA GGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTAC AGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCC CTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAAT CACAAGCCCAGCAACACCAAAGTGGACAAGAAAGTTGAGCCC AAATCTTGTGACGCGGCCGCAAGCACTAGTGCCCATCACCATC ACCATCACGCCGCGGCA

[0829] 表10:λ-DP47文库(Vl3_19/VH3_23)种系模板的cDNA和氨基酸序列

[0830]

SEQ ID NO:	描述	序列
159	核苷酸序列 Fab 轻链 Vl3_19	TCGTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGAC AGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGTTATT ATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCCTGTACTTG TCATCTATGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGAT TCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATCACTGG GGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAACTCCCGTGA TAGTAGCGGTAATCATGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGAC CGTCCTAGGACAACCCAAGGCTGCCCCCAGCGTGACCCTGTTCCCC CCCAGCAGCGAGGAATTGCAGGCCAACAAGGCCACCCTGGTCTGC CTGATCAGCGACTTCTACCCAGGCGCCGTGACCGTGGCCTGGAAG GCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGGCGTGGAGACCACCACCCCC AGCAAGCAGAGCAACAACAAGTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGC CTGACCCCCGAGCAGTGGAAGAGCCACAGGTCCTACAGCTGCCAG GTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAGAAAACCGTGGCCCCCACC GAGTGCAGCGGAGCCGCAGAACAAAAACTCATCTCAGAAGAGGA TCTGAATGGAGCCGCAGACTACAAGGACGACGACGACAAGGGTGC CGCA
160	Fab 轻链 Vl3_19	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVI YGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGN HVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP GAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECSGAAEQKLISEEDLNGAADYKDD DDKGAA
150	核苷酸序列 Fab 重链 VH3_23	见表7
151	Fab 重链	见表7

[0831]

	VH3_23 (DP47)	

[0832] 表11:用于生成λ-DP47文库(Vl3_19/VH3_23)的引物序列

[0833]

SEQ ID NO:	引物名称	引物序列5'–3'
161	LMB3	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC
162	Vl_3_19_L3r_V	GGACGGTCAGCTTGGTCCCTCCGCCGAATAC VHV ATT ACC GCT ACT ATC ACG GGAGTTACAGTAATAGTCAGCCTCATCTTCCGC 下划线:60%原始碱基和40%随机化为M 粗体且斜体:60%原始碱基和40%随机化为N
163	Vl_3_19_L3r_HV	GGACGGTCAGCTTGGTCCCTCCGCCGAATAC CMM ATG ATT ACC GCT ACT ATC ACG GGAGTTACAGTAATAGTCAGCCTCATCTTCCGC 下划线:60%原始碱基和40%随机化为M 粗体且斜体:60%原始碱基和40%随机化为N
164	Vl_3_19_L3r_HLV	GGACGGTCAGCTTGGTCCCTCCGCCGAATAC RHM VWG ATG ATT ACC GCT ACT ATC ACG GGAGTTACAGTAATAGTCAGCCTCATCTTC CGC 下划线:60%原始碱基和40%随机化为M 粗体且斜体:60%原始碱基和40%随机化为N
165	RJH80	TTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCC

[0834] 另外的用于构建λ-DP47文库的引物(即DP47CDR3_ba(mod.), DP47-v4-4,DP47-v4-6,DP47-v4-8和fdseqlong)与用于构建共同轻链文库 (Vk3_20/VH3_23)的引物相同且已经在表8中列出。

[0835] 克隆8H9,20B7,49B4,1G4,CLC-563,CLC-564和17A9经由上文描述的规程鉴定为人Ox40特异性结合物。它们的可变区的cDNA序列在下文表12中显示,相应的氨基酸序列可以在表C中找到。

[0836] 表12:噬菌体衍生的抗Ox40抗体的可变区碱基对序列。下划线是互补决定区(CDR)。

[0837]

克隆	SEQ ID NO:	序列
8H9	166 (VL)	TCGTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACA GACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGTTATTAT GCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCCTGTACTTGTCA TCTATGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCT GGCTCCAGCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTC AGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAACTCCCGTGTTATGCCT CATAATCGCGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTC
	167 (VH)	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGG GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAGCAGT TATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGT GGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGA CTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAAC ACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCG TATATTACTGTGCGCGTGTTTTCTACCGTGGTGGTGTTTCTATGGACT ACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT

[0838]

49B4	168 (VL)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGG AGACCGTGTCACCATCACTTGCCGTGCCAGTCAGAGTATTAGTAGCT GGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCT GATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCA GCGGCAGTGGATCCGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGCAGCTT GCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAGTTCGC AGCCGTATACGTTTGGCCAGGGCACCAAAGTCGAGATCAAG
	169 (VH)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGT CCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGCAG CTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCAC AGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCCACGAG CACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCC GTGTATTACTGTGCGAGAGAATACTACCGTGGTCCGTACGACTACTG GGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCA
1G4	170 (VL)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGG AGACCGTGTCACCATCACTTGCCGTGCCAGTCAGAGTATTAGTAGCT GGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCT GATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCA GCGGCAGTGGATCCGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGCAGCTT GCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATATTTCGT ATTCCATGTTGACGTTTGGCCAGGGCACCAAAGTCGAGATCAAG
	171 (VH)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGT CCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGCAG CTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCAC AGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCCACGAG CACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCC GTGTATTACTGTGCGAGAGAATACGGTTCTATGGACTACTGGGGCC AAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCA
20B7	172 (VL)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGG AGACCGTGTCACCATCACTTGCCGTGCCAGTCAGAGTATTAGTAGCT GGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCT GATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCA GCGGCAGTGGATCCGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGCAGCTT GCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATCAGGCTT TTTCGCTTACGTTTGGCCAGGGCACCAAAGTCGAGATCAAG
	173 (VH)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGT CCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGCAG CTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCAC AGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCCACGAG CACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCC GTGTATTACTGTGCGAGAGTTAACTACCCGTACTCTTACTGGGGTGA CTTCGACTACTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCA
CLC-563	174 (VL)	GAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCCGGCACACTCTCCCTGTCTCCTGG GGAAAGGGCCACCCTTTCATGCAGAGCCAGCCAGTCCGTCTCTAGT AGCTACCTGGCATGGTATCAGCAGAAGCCAGGACAAGCCCCCCGCC TCCTGATTTACGGCGCTTCCTCTCGGGCAACTGGTATCCCTGACAGG TTCTCAGGGAGCGGAAGCGGAACAGATTTTACCTTGACTATTTCTAG ACTGGAGCCAGAGGACTTCGCCGTGTATTACTGTCAGCAGTACGGT AGTAGCCCCCTCACCTTTGGCCAGGGGACAAAAGTCGAAATCAAG
	175 (VH)	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGG GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAGCAGT TATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGT GGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGA CTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAAC ACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCG TATATTACTGTGCGCTTGACGTTGGTGCTTTCGACTACTGGGGCCAA GGAGCCCTGGTCACCGTCTCGAGT

[0839]

CLC-564	176 (VL)	GAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCCGGCACACTCTCCCTGTCTCCTGG GGAAAGGGCCACCCTTTCATGCAGAGCCAGCCAGTCCGTCTCTAGT AGCTACCTGGCATGGTATCAGCAGAAGCCAGGACAAGCCCCCCGCC TCCTGATTTACGGCGCTTCCTCTCGGGCAACTGGTATCCCTGACAGG TTCTCAGGGAGCGGAAGCGGAACAGATTTTACCTTGACTATTTCTAG ACTGGAGCCAGAGGACTTCGCCGTGTATTACTGTCAGCAGTACGGT AGTAGCCCCCTCACCTTTGGCCAGGGGACAAAAGTCGAAATCAAG
	177 (VH)	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGG GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAGCAGT TATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGT GGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGA CTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAAC ACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCG TATATTACTGTGCGTTCGACGTTGGTCCGTTCGACTACTGGGGCCAA GGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT
17A9	178 (VL)	TCGTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACA GACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGTTATTAT GCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCCTGTACTTGTCA TCTATGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCT GGCTCCAGCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTC AGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAACTCCCGTGTTATGCCT CATAATCGCGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTC
	179 (VH)	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGG GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAGCAGT TATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGT GGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGA CTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAAC ACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCG TATATTACTGTGCGCGTGTTTTCTACCGTGGTGGTGTTTCTATGGACT ACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT

[0840] 1.3抗Ox40 IgG1 P329G LALA抗体的制备,纯化和表征

[0841] 与人IgG1的恒定重链或恒定轻链任一同框亚克隆选定抗Ox40结合物的重和轻链可变区DNA序列。依照公开号WO 2012/130831 A1的国际专利申请中描述的方法在节和穴重链的恒定区中引入Pro329Gly,Leu234Ala和 Leu235Ala突变以消除对Fcγ受体的结合。

[0842] 抗Ox40克隆的cDNA和氨基酸序列在表13中显示。将所有抗Ox40-Fc融合物编码序列克隆入自MPSV启动子驱动插入物表达且含有位于CDS的3'端的合成的polyA信号序列的质粒载体。另外,载体含有用于质粒的附加体维持的EBV OriP序列。

[0843] 表13:P329GLALA人IgG1格式的抗Ox40克隆的序列

[0844]

克隆	SEQ ID No.	序列
8B9	180 (核苷酸序列 轻链)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGA GACCGTGTCACCATCACTTGCCGTGCCAGTCAGAGTATTAGTAGCTGG TTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGAT CTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGCGG CAGTGGATCCGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGCAGCTTGCAGC CTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATTTGACGTATTCGC GGTTTACGTTTGGCCAGGGCACCAAAGTCGAGATCAAGCGTACGGTG GCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA TCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGA GAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAA

[0845]

		CTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA GCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAC AAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGT CACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
	181 (核苷酸序列 重链)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTC CTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGCAGCT ACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGG ATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCACAGAA GTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCCACGAGCACAG CCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCCGTGTAT TACTGTGCGAGAGAATACGGTTGGATGGACTACTGGGGCCAAGGGAC CACCGTGACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCC CCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGG GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGG AACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTA CAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCC AGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCC CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACA AAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGA CCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATC TCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTA CCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCA TCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGT CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACG CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTC ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT CCCTGTCTCCGGGTAAA
	182 (轻链)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYD ASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYLTYSRFTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
	183 (重链)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWM GGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARE YGWMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
49B4	184 (核苷酸序列 轻链)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGA GACCGTGTCACCATCACTTGCCGTGCCAGTCAGAGTATTAGTAGCTGG TTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGAT CTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGCGG CAGTGGATCCGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGCAGCTTGCAGC CTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAGTTCGCAGCCGT ATACGTTTGGCCAGGGCACCAAAGTCGAGATCAAGCGTACGGTGGCT GCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT GGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAG GCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTC CCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGC CTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAA

[0846]

		AGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAC AAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
	185 (核苷酸序列 重链)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTC CTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGCAGCT ACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGG ATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCACAGAA GTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCCACGAGCACAG CCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCCGTGTAT TACTGTGCGAGAGAATACTACCGTGGTCCGTACGACTACTGGGGCCA AGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGG TCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGG CCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT CGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCT GTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG CCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTG TGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAG GGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCA TGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTG AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGC CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC CACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAAC CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGA CCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCA AGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
	186 (轻链)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYD ASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYSSQPYTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
	187 (重链)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWM GGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARE YYRGPYDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
1G4	188 (核苷酸序列 轻链)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGA GACCGTGTCACCATCACTTGCCGTGCCAGTCAGAGTATTAGTAGCTGG TTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGAT CTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGCGG CAGTGGATCCGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGCAGCTTGCAGC CTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATATTTCGTATTCCAT GTTGACGTTTGGCCAGGGCACCAAAGTCGAGATCAAGCGTACGGTGG CTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAAT CTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG AGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAC TCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA GCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAC AAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGT CACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

[0847]

	189 (核苷酸序列 重链)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTC CTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGCAGCT ACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGG ATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCACAGAA GTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCCACGAGCACAG CCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCCGTGTAT TACTGTGCGAGAGAATACGGTTCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGAC CACCGTGACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCC CCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGG GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGG AACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTA CAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCC AGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCC CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACA AAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGA CCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATC TCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTA CCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCA TCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGT CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACG CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTC ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT CCCTGTCTCCGGGTAAA
	190 (轻链)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYD ASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYISYSMLTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
	191 (重链)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWM GGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARE YGSMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
20B7	192 (核苷酸序列 轻链)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGA GACCGTGTCACCATCACTTGCCGTGCCAGTCAGAGTATTAGTAGCTGG TTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGAT CTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGCGG CAGTGGATCCGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGCAGCTTGCAGC CTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATCAGGCTTTTTCGCT TACGTTTGGCCAGGGCACCAAAGTCGAGATCAAGCGTACGGTGGCTG CACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTG GAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGG CCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC CAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCC TCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAA GTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACA AAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
	193 (核苷酸序列	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTC CTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGCAGCT

[0848]

	重链)	ACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGG ATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCACAGAA GTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCCACGAGCACAG CCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCCGTGTAT TACTGTGCGAGAGTTAACTACCCGTACTCTTACTGGGGTGACTTCGAC TACTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAA GGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAAC CGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTG AGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCA CCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCC AAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGT GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGA GCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCA CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACA AAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGA GCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCT ATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA CACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
	194 (轻链)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYD ASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYQAFSLTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
	195 (重链)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWM GGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR VNYPYSYWGDFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
CLC-563	196 (核苷酸序列 轻链)	GAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCCGGCACACTCTCCCTGTCTCCTGGG GAAAGGGCCACCCTTTCATGCAGAGCCAGCCAGTCCGTCTCTAGTAG CTACCTGGCATGGTATCAGCAGAAGCCAGGACAAGCCCCCCGCCTCC TGATTTACGGCGCTTCCTCTCGGGCAACTGGTATCCCTGACAGGTTCT CAGGGAGCGGAAGCGGAACAGATTTTACCTTGACTATTTCTAGACTG GAGCCAGAGGACTTCGCCGTGTATTACTGTCAGCAGTACGGTAGTAG CCCCCTCACCTTTGGCCAGGGGACAAAAGTCGAAATCAAGCGTACGG TGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGA AATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCA GAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGT AACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCT ACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAA CACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCC CGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
	197 (核苷酸序列 重链)	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGG GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAGCAGTTA TGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGG TCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCG

[0849]

		TGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTG TATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTA CTGTGCGCTTGACGTTGGTGCTTTCGACTACTGGGGCCAAGGAGCCCT GGTCACCGTCTCGAGTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCT GGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAAC TCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAG TCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGC AGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAG CAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAA CTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCG TCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATA ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG TGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAA GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCG AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT GTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCA GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCC TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCAC CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC CTGTCTCCGGGTAAA
	198 (轻链)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
	199 (重链)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAL DVGAFDYWGQGALVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
CLC-564	200 (核苷酸序列 轻链)	GAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCCGGCACACTCTCCCTGTCTCCTGGG GAAAGGGCCACCCTTTCATGCAGAGCCAGCCAGTCCGTCTCTAGTAG CTACCTGGCATGGTATCAGCAGAAGCCAGGACAAGCCCCCCGCCTCC TGATTTACGGCGCTTCCTCTCGGGCAACTGGTATCCCTGACAGGTTCT CAGGGAGCGGAAGCGGAACAGATTTTACCTTGACTATTTCTAGACTG GAGCCAGAGGACTTCGCCGTGTATTACTGTCAGCAGTACGGTAGTAG CCCCCTCACCTTTGGCCAGGGGACAAAAGTCGAAATCAAGCGTACGG TGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGA AATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCA GAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGT AACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCT ACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAA CACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCC CGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
	201 (核苷酸序列 重链)	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGG GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAGCAGTTA TGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGG TCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCG TGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTG TATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTA

[0850]

		CTGTGCGTTCGACGTTGGTCCGTTCGACTACTGGGGCCAAGGAACCCT GGTCACCGTCTCGAGTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCT GGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAAC TCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAG TCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGC AGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAG CAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAA CTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCG TCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATA ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG TGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAA GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCG AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT GTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCA GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCC TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCAC CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC CTGTCTCCGGGTAAA
	202 (轻链)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
	203 (重链)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAF DVGPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
17A9	204 (核苷酸序列 轻链)	TCGTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAG ACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGTTATTATGC AAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCCTGTACTTGTCATCT ATGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGC TCCAGCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGC GGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAACTCCCGTGTTATGCCTCATAA TCGCGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTCAACCCA AGGCTGCCCCCAGCGTGACCCTGTTCCCCCCCAGCAGCGAGGAACTG CAGGCCAACAAGGCCACCCTGGTCTGCCTGATCAGCGACTTCTACCCA GGCGCCGTGACCGTGGCCTGGAAGGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGC CGGCGTGGAGACCACCACCCCCAGCAAGCAGAGCAACAACAAGTAC GCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTGGAAGAGCCA CAGGTCCTACAGCTGCCAGGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAGA AAACCGTGGCCCCCACCGAGTGCAGC
	205 (核苷酸序列 重链)	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGG GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAGCAGTTA TGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGG TCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCG TGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTG TATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTA CTGTGCGCGTGTTTTCTACCGTGGTGGTGTTTCTATGGACTACTGGGG CCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCTAGCACCAAGGGCCCAT

[0851]

		CGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAG CGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACG GTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCC GGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAC CGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGA ATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAA ATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAG CTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACA CCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACG TGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACA ACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACT GGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC GGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG AGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCA AGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACT ACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCT ACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
	206 (轻链)	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYG KNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRVMPHNRVFG GGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAW KADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTH EGSTVEKTVAPTECS
	207 (重链)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR VFYRGGVSMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK

[0852] 通过使用聚乙烯亚胺用哺乳动物表达载体共转染HEK293-EBNA细胞来生成抗0x40抗体。以1:1比率(“载体重链”:“载体轻链”)用相应表达载体转染细胞。

[0853] 为了500mL摇瓶中的生成,在转染前24小时接种400x10^6个HEK293 EBNA细胞。为了转染,将细胞以210g离心5分钟,并用预温热的CD CHO 培养基替换上清液。在20mL CD CHO培养基中混合表达载体(200μg总 DNA)。添加540μL PEI后,将溶液漩涡震荡15秒并于室温温育10分钟。之后,将细胞与DNA/PEI溶液混合,转移至500mL摇瓶并在具有5%CO_2气氛的温箱中于37℃温育3小时。温育后,添加160mL F17培养基并将细胞培养 24小时。转染后1天,添加1mM丙戊酸和7%补料及补充物。培养7天后,通过以210x g离心15分钟来收集上清液。将溶液无菌过滤(0.22μm滤器),补充叠氮化钠至终浓度0.01%(w/v),并于4℃保持。

[0854] 如上文关于抗原-Fc融合物的纯化描述的,通过使用蛋白A的亲和层析来进行自细胞培养物上清液纯化抗体分子。

[0855] 浓缩并过滤蛋白质,之后在用pH 6.0的20mM组氨酸,140mM NaCl溶液平衡的HiLoad Superdex 200柱(GE Healthcare)上加载。

[0856] 使用基于氨基酸序列计算的摩尔消光系数,通过以280nm测量OD来测定经过纯化的抗体的蛋白质浓度。使用LabChipGXII(Caliper)通过还原剂 (Invitrogen,USA)存在和缺失下的CE-SDS来分析抗体的纯度和分子量。于 25℃使用在25mM K_2HPO_4,125mM NaCl,200mM单盐酸L-精氨酸, 0.02%(w/v)NaN_3,pH 6.7运行缓冲液中平衡的TSKgel G3000 SW

XL分析性大小排阻柱(Tosoh)分析抗体样品的聚集体含量。

[0857] 表14汇总抗Ox40 P329G LALA IgG1抗体的产率和最终含量。

[0858] 表14:抗Ox40 P329G LALA IgG1克隆的生化分析

[0859]

克隆	产率 [mg/l]	单体 [%]	CE-SDS (非还原的)	CE-SDS (还原的)
8H9 P329GLALA IgG1	7	100	1.2% (176kDa) 96.1% (158kDa) 1.3% (142kDa)	66.9% (54kDa) 28.9% (25kDa)
49B4 P329GLALA IgG1	7.5	100	99% (163kDa) 1% (149kDa)	81% (61.7kDa) 18% (28.9kDa)
1G4 P329GLALA IgG1	1	100	98.9% (167.4kDa) 1.1% (151kDa)	80% (63.4kDa) 19% (28.9kDa)
20B7 P329GLALA IgG1	17	93	97.9% (174kDa)	79.8% (65.4kDa) 19.9% (29.5kDa)
CLC-563 P329GLALA IgG1	6.2	100	97.7% (160kDa)	77.7% (60kDa) 19.8% (26.4kDa)
CLC-564 P329GLALA IgG1	13.5	100	98.4% (155kDa)	79.3% (60.1kDa) 19.8% (26.5kDa)
17A9 P329GLALA IgG1	7.5	100	98.6% (175kDa) 1.4% (153kDa)	74.1% (61kDa) 25.5% (38kDa)

[0860] 实施例2

[0861] 抗OX40抗体的表征

[0862] 2.1人OX40上的结合

[0863] 2.1.1表面等离振子共振(亲合力+亲和力)

[0864] 通过表面等离振子共振(SPR)评估噬菌体衍生的OX40特异性抗体对重组OX40 Fc(kih)的结合。所有SPR实验是用HBS-EP作为运行缓冲液(0.01M HEPES pH 7.4,0.15M NaCl,3mM EDTA,0.005％表面活性剂P20,Biacore,Freiburg/Germany)于25℃在Biacore T200上实施的。

[0865] 在相同的实验中,测定噬菌体展示衍生的抗OX40克隆8H9,49B4, 1G4,20B7,CLC-563,CLC-564和17A9(都是人IgG1 P329GLALA)和重组 OX40(人,食蟹猴和鼠)之间的相互作用的物种选择性和亲合力。将生物素化人,食蟹猴和鼠OX40 Fc(kih)直接偶联至链霉亲合素(SA)传感器芯片的不同流动室。使用高至600个共振单位(RU)的固定化水平。

[0866] 在120秒里以30μL/min的流以2至500nM的浓度范围(3倍稀释)使噬菌体展示衍生的抗OX40人IgG1 P329GLALA抗体流经流动室。对复合物解离监测210秒。通过减去在没有固定化蛋白质的参照流动室中获得的响应来修正本体(bulk)折射率差异。

[0867] 动力学常数使用Biacore T200评估软件(vAA,Biacore AB, Uppsala/Sweden)推导,通过数值积分来为1:1朗格缪尔(Langmuir)结合拟合速率方程并用于定性评估亲合力(表16)。

[0868] 在相同的实验中,测定噬菌体展示衍生的抗体8H9,49B4,1G4, 20B7,CLC-563和CLC-564(人IgG1 P329GLALA)与重组OX40之间的相互作用的亲和力。为此目的,人或鼠Ox40的外域还与avi (GLNDIFEAQKIEWHE)和六组氨酸标签(序列见表15)同框亚克隆或通过用AcTEV蛋白酶切割并通过层析方法去除Fc来获得。

[0869] 表15:单体人和鼠Ox40 His标签的核苷酸和氨基酸序列

[0870]

SEQ ID NO:	抗原	序列
208	人 OX40 His	核苷酸序列
209	人OX40 His	LHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNGMVSRCSRSQNTVCRPCGPGFYND VVSSKPCKPCTWCNLRSGSERKQLCTATQDTVCRCRAGTQPLDSYKP GVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQPASNSSDAICED RDPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPRTSQGPSTRPVEVPGGRAVD EQLYFQGGSGLNDIFEAQKIEWHEARAHHHHHH
210	鼠OX40 His	核苷酸序列
211	鼠OX40 His	TARRLNCVKHTYPSGHKCCRECQPGHGMVSRCDHTRDTLCHPCETG FYNEAVNYDTCKQCTQCNHRSGSELKQNCTPTQDTVCRCRPGTQPR QDSGYKLGVDCVPCPPGHFSPGNNQACKPWTNCTLSGKQTRHPASDS LDAVCEDRSLLATLLWETQRPTFRPTTVQSTTVWPRTSELPSPPTLVTP EGPVDEQLYFQGGSGLNDIFEAQKIEWHEARAHHHHHH

[0871] 如上文关于Fc融合蛋白描述实施蛋白质生成。通过螯合层析,继以大小排阻层析自细胞培养物上清液纯化分泌的蛋白质。

[0872] 在用20mM磷酸钠,500nM氯化钠,pH 7.4平衡的NiNTA Superflow筒 (5ml,Qiagen)上实施第一个层析步骤。通过应用12个柱体积上5%至45%洗脱缓冲液(20mM磷酸钠,500nM氯化钠,500mM咪唑,pH 7.4)的梯度来实施洗脱。

[0873] 浓缩并过滤蛋白质,之后在用pH 7.4的2mM MOPS,150mM氯化钠, 0.02%(w/v)叠氮化钠溶液平衡的HiLoad Superdex 75柱(GE Healthcare)上加载。

[0874] 亲和力测定是使用两种设置实施的。

[0875] 设置1)使用标准胺偶联试剂盒(Biacore,Freiburg/Germany)于pH 5.0在 CM5芯片上直接偶联抗人Fab抗体(Biacore,Freiburg/Germany)。固定化水平是大约9000RU。以25至50nM的浓度对噬菌体展示衍生的针对OX40的抗体捕捉60秒。在120秒里以30μL/min的流以4至1000nM的浓度范围使重组人 OX40 Fc(kih)流经流动室。对解离监测120秒。通过减去在参照流动室中获得的响应来修正本体折射率差异。在这里,使抗原流过具有固定化的抗人 Fab抗体但上面已经注射HBS-EP而非抗体的表面。

[0876] 设置2)使用标准胺偶联试剂盒(Biacore,Freiburg/Germany)于pH 5.0在CM5芯片上直接偶联抗人Fc抗体(Biacore,Freiburg/Germany)。固定化水平是大约8000RU。以20nM的浓度对噬菌体展示衍生的针对Ox40的抗体捕捉 60秒。在120秒里以30μL/min的流以2.3至600nM的浓度范围使重组人Ox40 avi His流经流动室。对解离监测120秒。通过减去在参照流动室中获得的响应来修正本体折射率差异。在这里,使抗原流过具有固定化的抗人Fab抗体但上面已经注射HBS-EP而非抗体的表面。

[0877] 动力学常数使用Biacore T200评估软件(vAA,Biacore AB, Uppsala/Sweden)来推导,通过数值积分来为1:1朗格缪尔结合拟合速率方程。

[0878] 克隆49B4,1G4和CLC-564以比克隆8H9,20B7和CLC-563要低的亲和力结合人Ox40 Fc(kih)。

[0879] 通过拟合1:1朗格缪尔结合来确定抗OX40 P329GLALA IgG1和人OX40 Fc(kih)之间的相互作用的亲和常数。

[0880] 表16:抗OX40抗体对重组人OX40的结合

[0881]

克隆	重组人OX40 (亲合力格式)	重组人OX40 Fc(kih) (亲和力格式)			重组人OX40 His (亲和力格式)		
		ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
8H9	++++	1.6E+05	4.5E-03	2.8E-08	6.5E+04	2.0E-03	3.1E-08
49B4	++	2.5E+05	1.3E-01	5.1E-07	1.4E+06	6.7E-01	4.6E-07
1G4	++	3.0E+05	8.4E-08	2.8E-07	2.3E+06	5.7E-01	2.5E-07
20B7	+++	3.2E+04	1.3E-03	4.2E-08	1.2E+05	6.6E-04	5.6E-09

[0882]

CLC-563	++	3.6E+04	3.2E-03	8.9E-08	4.0E+04	3.6E-03	8.9E-08
CLC-564	++++	3.2E+04	4.2E-03	1.3E-07	3.8E+05	5.3E-03	1.4E-08

[0883] 2.1.2对表达人Ox40的细胞:幼稚的和激活的人外周血单个核白细胞(PBMC) 的结合

[0884] 自苏黎世献血中心获得血沉棕黄层。为了分离新鲜的外周血单个核细胞(PBMC),用相同体积的DPBS(Gibco by Life Technologies,目录号14190 326)稀释血沉棕黄层。对50mL聚丙烯离心管(TPP,目录号91050)供应15 mL Histopaque 1077(SIGMA Life Science,目录号10771,聚蔗糖和泛影酸钠(sodium diatrizoate),调节至1.077g/mL的密度)并将血沉棕黄层溶液在 Histopaque 1077上面分层。将管以400x g,室温及以低加速度和无中断离心30分钟。之后,自界面收集PBMC,用DPBS清洗三次并在由供应有10%胎牛血清(FBS,Gibco by Life Technology,目录号16000-044,批次 941273,经伽马照射,无支原体且于56℃热灭活35分钟的),1%(v/v) GlutaMAX I(GIBCO by Life Technologies,目录号35050 038),1mM丙酮酸钠(SIGMA,目录号S8636),1%(v/v)MEM非必需氨基酸(SIGMA,目录号 M7145)和50μMβ-巯基乙醇(SIGMA,M3148)的RPMI 1640培养基(Gibco by Life Technology,目录号42401-042)组成的T细胞培养基中重悬浮。

[0885] 在分离后直接使用PBMC(幼稚的人PBMC上的结合)或刺激它们以接受 T细胞的细胞表面上的强人Ox40表达(激活的人PBMC上的结合)。因此,将幼稚的PBMC在6孔组织培养板中在供应有200U/mL Proleukin和2μg/mL PHA-L的T细胞培养基中培养5天,然后在供应有200U/mL Proleukin的T细胞培养基中在预包被的6孔组织培养板[2μg/mL抗人CD3(克隆OKT3)和2 μg/mL抗人CD28(克隆CD28.2)]中于37℃和5%CO_2培养1天。

[0886] 为了检测Ox40,混合幼稚的人PBMC和激活的人PBMC。为了能够区分幼稚的与激活的人PBMC,在结合测定法之前使用eFluor670细胞增殖染料 (eBioscience,目录号65-0840-85)标记静息的细胞。

[0887] 为了标记,收获细胞,用预温热的(37℃)DPBS清洗并调节至1x10^7个细胞/mL DPBS的细胞密度。将eFluor670细胞增殖染料(eBioscience,目录号 65-0840-85)添加至幼稚的人PBMC的悬浮液,终浓度为2.5mM且最终的细胞密度为0.5x10^7个细胞/mL DPBS。然后将细胞在黑暗中于室温温育10分钟。为了终止标记反应,添加2mL FBS并将细胞用T细胞培养基清洗三次。然后将1x10^5个幼稚的,eFluor670标记的人PBMC和未标记的激活的人PBMC的一比一混合物添加至圆底悬浮细胞96孔板(Greiner bio-one, cellstar,目录号650185)的每个孔。

[0888] 于4℃将板以400x g离心4分钟并弹去上清液。将细胞用200μL 4℃冷的 FACS缓冲液(供应有2%FBS,5mM EDTA pH 8(Amresco,目录号E177)和 7.5mM叠氮化钠(Sigma-Aldrich S2002)的DPBS)清洗一次。将细胞在50μL/ 孔4℃冷的含有所滴定的抗Ox40抗体构

建物的FACS缓冲液中于4℃温育120 分钟。将板用200μL/孔4℃FACS缓冲液清洗四次以去除未结合的构建物。

[0889] 将细胞在25μL/孔4℃冷的含有荧光标记的抗人CD4(克隆RPA-T4,小鼠IgG1κ,BioLegend,目录号300532),抗人CD8(克隆RPa-T8,小鼠 IgG1κ,BioLegend,目录号3010441),抗人CD45(克隆HI30,小鼠IgG1κ, BioLegend,目录号304028),和异硫氰酸荧光素(FITC)缀合的AffiniPure抗人IgG Fcγ片段特异性山羊IgG F(ab')$_2$片段(Jackson ImmunoResearch,目录号 109-096-098)的FACS缓冲液中在黑暗中于4℃染色30分钟。

[0890] 将板用200μL/孔4℃FACS缓冲液清洗两次,最终在80μL/孔含有0.2 μg/mL DAPI(Santa Cruz Biotec,目录号Sc-3598)的FACS缓冲液中重悬浮并在同一天使用5激光LSR-Fortessa(BD Bioscience,带有DIVA软件)获取读数。

[0891] 如图2A-2D中显示的,对OX40特异性的抗体构建物无一结合不表达 OX40的静息人CD4$^+$T细胞或CD8$^+$T细胞。与之对比,所有构建物结合表达 OX40的激活的CD8$^+$或CD4$^+$T细胞。对CD4$^+$T细胞的结合比对CD8$^+$T细胞的结合要强得多。激活的人CD8$^+$T细胞确实仅仅表达在激活的CD4$^+$T细胞上检测到的OX40水平的一部分。差异是供体以及时间依赖性的。所分析的抗OX40克隆在它们的结合强度方面不同。EC_{50}值在表17中显示。为了进一步评估二价和单价FAP靶向构建物,选择具有高(8H9)和低(49B4/1G4)结合能力的克隆。

[0892] 表17:对激活的人CD4 T细胞的结合的EC_{50}值

[0893]

克隆	EC_{50} [nM]
8H9	0.59
CLC563	1.59
20B7	1.64
49B4	4.19

[0894]

CLC-564	4.63
1G4	n.a.

[0895] 2.2鼠OX40上的结合

[0896] 2.2.1表面等离振子共振(亲合力+亲和力)

[0897] 如上文关于人OX40 Fc(kih)描述的(见实施例2.1.1),通过表面等离振子共振评估噬菌体衍生的OX40特异性抗体20B7对重组鼠OX40 Fc(kih)的结合。动力学常数使用Biacore T200评估软件(vAA,Biacore AB, Uppsala/Sweden)来推导,通过数值积分来为1:1朗格缪尔结合拟合速率方程并用于定性评估亲合力(表18)。

[0898] 为了测定亲和力,由于Fc融合蛋白与参照流动室的非特异性相互作用,使用经AcTEV蛋白酶切割的鼠Ox40 His(见实施例2.1.2)或Ox40 Fc(kih)。使用标准胺偶联试剂盒(Biacore,Freiburg/Germany)于pH 5.0在 CM5芯片上直接偶联抗人Fc抗体(Biacore,Freiburg/Germany)。固定化水平是大约8000RU。以25nM的浓度对噬菌体展示衍生的针对OX40的抗体捕捉 60秒。在120秒里以30μL/min的流以4.1至1000nM的浓度范围使重组鼠OX40(遵循分销商的说明书经AcTEV消化而切割的)流经流动室。对解离监测120秒。通过减去在参照流动室中获得的响应来修正本体折射率差异。在这里,使抗原流过具有固定化的

抗人Fab抗体但上面已经注射HBS-EP而非抗体的表面。

[0899] 动力学常数使用Biacore T200评估软件(vAA,Biacore AB, Uppsala/Sweden)来推导,通过数值积分来为1:1朗格缪尔结合拟合速率方程。显示了克隆20B7结合鼠OX40(表18)。

[0900] 抗OX40 P329GLALA IgG1分子和鼠OX40之间的相互作用的亲和常数使用Biacore T200评估软件(vAA,Biacore AB,Uppsala/Sweden)来推导,通过数值积分来为1:1朗格缪尔结合拟合速率方程。

[0901] 表18:抗Ox40抗体20B7对鼠OX40的结合

[0902]

克隆	起源	重组鼠OX40 (亲合力格式)	重组鼠OX40 (亲和力格式)		
			ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
20B7	噬菌体展示	++	4.9E+04	1.8E-02	3.6E-07

[0903] 2.2.2对表达小鼠OX40的细胞:幼稚的和激活的小鼠脾细胞的结合(选定的克隆)

[0904] 在3mL PBS中收集小鼠脾并使用温和MACS管(Miltenyi Biotec,目录号130-096-334)和温和MACS Octo Dissociator(Miltenyi Biotec)生成单细胞悬浮液。之后,使脾细胞过滤穿过30μm分离前滤器(Miltenyi Biotec,目录号 130-041-407)并以350x g和4℃离心7分钟。吸出上清液并在供应有10%(v/v) FBS,1%(v/v)GlutaMAX I,1mM丙酮酸钠,1%(v/v)MEM非必需氨基酸,50μMβ-巯基乙醇和10%青霉素-链霉素(SIGMA,目录号P4333)的RPMI 1640培养基中重悬浮细胞。将10^6个细胞/mL在用10μg/mL抗小鼠 CD3ε亚美尼亚仓鼠IgG(克隆145-2C11,BioLegend,目录号100331)和2 μg/mL抗小鼠CD28叙利亚仓鼠IgG(克隆37.51,BioLegend,目录号102102) 包被的6孔组织培养板中培养3天。收获激活的或新鲜的小鼠脾细胞,在 DPBS中清洗,计数并将0.1x10^6个细胞转移至经非组织培养物处理的96孔U底板的每个孔。用DPBS清洗细胞并在50μl含有不同浓度的抗OX40人IgG1 P329GLALA抗体(仅选定的结合物)的FACS缓冲液中染色。将细胞于4℃温育120分钟。然后将细胞用FACS缓冲液清洗两次并在25μL/孔含有抗小鼠 CD8b大鼠IgG2bκ-APC-Cy7(BioLegend,目录号100714,克隆53-6.7),抗小鼠CD4大鼠IgG2bκ-PE-Cy7(BioLegend,目录号100422,克隆GK1.5)和FITC 缀合的AffiniPure抗人IgG Fcγ片段特异性山羊IgG F(ab')$_2$片段(Jackson ImmunoResearch,目录号109 096 098)的FACS缓冲液中于4℃染色30分钟。将板用200μL/孔4℃ FACS缓冲液清洗两次,最终在80μL/孔含有0.2μg/mL DAPI(Santa Cruz Biotec,目录号Sc-3598)的FACS缓冲液中重悬浮并在同一天使用5激光LSR-Fortessa(BD Bioscience,带有DIVA软件)获取读数。

[0905] 如图3A-3D中显示的,只有克隆20B7和充分表征的小鼠特异性基准抗体OX86显示对激活的小鼠$CD4^+$和$CD8^+$T细胞的结合。在静息小鼠脾细胞上没有观察到结合。

[0906] 2.3食蟹猴OX40上的结合

[0907] 为了测试选定的抗OX40结合物与食蟹猴细胞的反应性,如关于人细胞描述的及微小变更,使用密度梯度离心自肝素化血液分离健康的食蟹猴 (Macaca fascicularis)的PBMC。使用用DPBS稀释的Lymphoprep培养基(90% v/v,Axon Lab,目录号1114545)用密度梯度离心自肝素化新鲜血液分离食蟹猴PBMC。于室温以520x g无中断实施离心30分钟。紧接着于室温以150 x g实施离心15分钟以降低血小板计数,接着是数个室温10分钟400x g

离心步骤,用无菌DPBS清洗PBMC。刺激PBMC以接受T细胞的细胞表面上的强 Ox40表达(激活的食蟹猴PBMC上的结合)。因此,将幼稚的PBMC在供应有 200U/mL Proleukin的T细胞培养基中在预包被的12孔组织培养板[10μg/mL 食蟹猴交叉反应性抗人CD3(克隆克隆SP34)]和2μg/mL食蟹猴交叉反应性抗人CD28(克隆CD28.2)]上于37℃和5%CO_2培养72小时。

[0908] 然后将0.5x10^5个激活的食蟹猴PBMC添加至圆底悬浮细胞96孔板 (greiner bio-one,cellstar,目录号650185)的每个孔。将细胞用200μL 4℃冷的FACS缓冲液清洗一次并在50μL/孔4℃冷的含有所滴定的抗Ox40抗体构建物的FACS中于4℃温育120分钟。然后,将板用200μL/孔4℃FACS缓冲液清洗四次。将细胞在25μL/孔4℃冷的含有荧光标记的,食蟹猴交叉反应性抗人CD4(克隆OKT-4,小鼠IgG1κ,BD,目录号317428),抗人CD8(克隆HIT8a,小鼠IgG1κ,BD,目录号555369)和FITC缀合的AffiniPure抗人 IgG Fcγ片段特异性山羊IgG F(ab')$_2$片段(Jackson ImmunoResearch,目录号 109 096 098)的FACS缓冲液中重悬浮并在黑暗中于4℃温育30分钟。将板用 200μL/孔4℃FACS缓冲液清洗两次,最终在80μL/孔含有0.2μg/mL DAPI (Santa Cruz Biotec,目录号Sc-3598)的FACS缓冲液中重悬浮并在同一天使用 5激光LSR-Fortessa(BD Bioscience,带有DIVA软件)获取读数。

[0909] 如图4A和4B中显示的,大多数构建物结合激活的$CD4^+$食蟹猴T细胞。对$CD4^+$T细胞的结合比对$CD8^+$T细胞的结合要强得多。OX40的表达水平依赖于刺激的动力学和强度且对于$CD4^+$食蟹猴T细胞而非对于$CD8^+$食蟹猴T细胞是优化的,因而在$CD8^+$T细胞上诱导仅仅很少的OX40表达。所分析的抗 OX40克隆在它们的结合强度方面不同。EC_{50}值在表19中显示。由于非典型的曲线拟合,对克隆8H9,49B4,21H4无法计算EC_{50}值。

[0910] 表19:对激活的食蟹猴CD4 T细胞的结合的EC_{50}值

[0911]

克隆	EC_{50}[nM]
8H9	n.d.
CLC563	1.41
20B7	1.52
49B4	n.d.
CLC-564	3.50
1G4	48.20

[0912] 2.3.1表面等离振子共振(亲合力+亲和力)

[0913] 通过表面等离振子共振(SPR)评估噬菌体衍生的OX40特异性抗体(都是人IgG1 P329GLALA)对重组食蟹猴OX40 Fc(kih)的结合。所有SPR实验是用HBS-EP作为运行缓冲液(0.01M HEPES pH 7.4,0.15M NaCl,3mM EDTA,0.005%表面活性剂P20,Biacore,Freiburg/Germany)于25℃在 Biacore T200上实施的。

[0914] 将生物素化食蟹猴OX40 Fc(kih)直接偶联至链霉亲合素(SA)传感器芯片的不同流动室。使用高至800个共振单位(RU)的固定化水平。

[0915] 在120秒里以30μL/min的流以2至500nM的浓度范围(3倍稀释)使噬菌体展示衍生的抗OX40人IgG1 P329GLALA抗体流经流动室。对复合物解离监测210秒。通过减去在没有固定化蛋白质的参照流动室中获得的响应来修正本体折射率差异。

[0916] 动力学常数使用Biacore T200评估软件(vAA,Biacore AB, Uppsala/Sweden)来推导,通过数值积分来为1:1朗格缪尔结合拟合速率方程并用于定性评估亲合力(表20)。

[0917] 在相同的实验中,测定噬菌体展示衍生的抗体(人IgG1 P329GLALA)与重组食蟹猴OX40 Fc(kih)之间的相互作用的亲和力。使用标准胺偶联试剂盒 (Biacore,Freiburg/Germany)于pH 5.0在CM5芯片中直接偶联抗人Fab抗体 (Biacore,Freiburg/Germany)。固定化水平是大约9000RU。以25至50nM的浓度对噬菌体展示衍生的针对Ox40的抗体捕捉60秒。在120秒里以30 μL/min的流以4至1000nM的浓度范围使重组食蟹猴Ox40 Fc(kih)流经流动室。对解离监测120秒。通过减去在参照流动室中获得的响应来修正本体折射率差异。在这里,使抗原流过具有固定化的抗人Fab抗体但上面已经注射 HBS-EP而非抗体的表面。

[0918] 动力学常数使用Biacore T200评估软件(vAA,Biacore AB, Uppsala/Sweden)来推导,通过数值积分来为1:1朗格缪尔结合拟合速率方程 (表20)。

[0919] 克隆49B4,1G4和CLC-564以比克隆8H9,20B7和CLC-563要低的亲和力结合食蟹猴OX40 Fc(kih)。

[0920] 抗OX40 P329GLALA IgG1和食蟹猴OX40 Fc(kih)之间的相互作用的亲和常数使用Biacore T100评估软件(vAA,Biacore AB,Uppsala/Sweden)来推导,通过数值积分来为1:1朗格缪尔结合拟合速率方程。

[0921] 表20:抗OX40抗体对重组食蟹猴OX40 Fc(kih)的结合

[0922]

克隆	起源	重组食蟹猴OX40(亲合力格式)	重组食蟹猴OX40(亲和力格式)		
			ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
8H9	噬菌体展示	++++	1.4E+05	9.6E-02	6.7E-07
20B7	噬菌体展示	+++	1.57E+04	1.66E-02	1.1E-06
49B4	噬菌体展示	++	1.1E+05	3.8E-02	3.5E-07
1G4	噬菌体展示	+	太低以至于没有检测到		
CLC-563	噬菌体展示	+++	2.8E+04	6.9E-04	2.5E-08
CLC-564	噬菌体展示	+++	2.1E+04	7.2E-04	3.4E-08

[0923] 2.3.2表达食蟹猴OX40的细胞:激活的食蟹猴外周血单个核白细胞(PBMC) 上的结合

[0924] 对OX40阴性肿瘤细胞的结合

[0925] 使用WM266-4细胞(ATCC CRL-1676)和U-87MG(ATCC HTB-14)肿瘤细胞测试对OX40阴性肿瘤细胞的结合的缺乏。为了容许分离这两种肿瘤细胞,用PKH-26红荧光细胞接头试剂盒(Sigma,目录号PKH26GL)预标记 WM266-4细胞。收获细胞并用RPMI 1640培养基清洗三次。将团粒在新鲜制备的PKH26红染色溶液(所提供的稀释液C中终浓度[1nM])中以$1x10^7$个细胞的最终细胞密度在黑暗中于室温染色5分钟。添加过量的FBS以终止标记反应并将细胞用补充有10%(v/v)FBS,1%(v/v)GlutaMAX-I的RPMI 1640 培养基清洗四次以去除过量的染料。

[0926] 将DPBS中$5x10^4$个PKH26标记的WM266-4细胞和未标记的U-87MG细胞的混合物添加至圆底悬浮细胞96孔板的每个孔。于4℃将板以400x g离心 4分钟并弹去上清液。将细胞用200μL DPBS清洗一次并通过短暂且温和的漩涡震荡来重悬浮团粒。于4℃将所有样品在50μL/孔4℃冷的含有滴定浓度的抗Ox40人IgG1 P329GLALA抗体构建物的FACS缓冲液中重悬浮

120分钟。将板用200μL/孔4℃ FACS缓冲液清洗四次。在25μL/孔4℃冷的含有 FITC缀合的AffiniPure抗人IgG Fcγ片段特异性山羊IgG F(ab')$_2$片段(Jackson ImmunoResearch,目录号109-096-098)的FACS缓冲液中重悬浮细胞并在黑暗中于4℃温育30分钟。将板用200μL/孔4℃ FACS缓冲液清洗两次,最终在80μL/孔含有0.2μg/mL DAPI(Santa Cruz Biotec,目录号Sc-3598)的FACS 缓冲液中重悬浮并在同一天使用5激光LSR-Fortessa(BD Bioscience,带有 DIVA软件)获取读数。

[0927] 如图5A和5B中显示的,对OX40特异性的抗体构建物无一结合OX40阴性人肿瘤细胞WM266-4和U-78MG。

[0928] 2.4配体阻断特性

[0929] 为了测定OX40特异性人IgG1 P329GLALA抗体分子干扰OX40/OX40配体相互作用的能力,使用人OX40配体(R&D systems)。由于OX40和OX40配体之间的相互作用的低亲和力,制备具有C端Ha标签的二聚体人OX40-Fc融合物(图1B)。这种二聚体人Ox40-Fc融合分子的核苷酸和氨基酸序列在表21 中显示。如实施例1.1中关于单体OX40 Fc(kih)描述的实施生成和纯化。

[0930] 表21:二聚体人OX40-Fc融合分子(由2条Fc链构成)的cDNA和氨基酸序列

[0931]

SEQ ID NO:	抗原	序列
212	核苷酸序列二聚体人OX40抗原Fc	CTGCACTGCGTGGGCGACACCTACCCCAGCAACGACCGGTGCTGC CACGAGTGCAGACCCGGCAACGGCATGGTGTCCCGGTGCAGCCGG TCCCAGAACACCGTGTGCAGACCTTGCGGCCCTGGCTTCTACAACG ACGTGGTGTCCAGCAAGCCCTGCAAGCCTTGTACCTGGTGCAACCT GCGGAGCGGCAGCGAGCGGAAGCAGCTGTGTACCGCCACCCAGG ATACCGTGTGCCGGTGTAGAGCCGGCACCCAGCCCCTGGACAGCT ACAAACCCGGCGTGGACTGCGCCCCTTGCCCTCCTGGCCACTTCAG CCCTGGCGACAACCAGGCCTGCAAGCCTTGGACCAACTGCACCCT GGCCGGCAAGCACACCCTGCAGCCCGCCAGCAATAGCAGCGACGC CATCTGCGAGGACCGGGATCCTCCTGCCACCCAGCCTCAGGAAAC CCAGGGCCCTCCCGCCAGACCCATCACCGTGCAGCCTACAGAGGC CTGGCCCAGAACCAGCCAGGGGCCTAGCACCAGACCCGTGGAAGT GCCTGGCGGCAGAGCCGTCGACGAACAGTTATATTTTCAGGGCGG CTCACCCAAATCTGCAGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCC AGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCA AAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACA TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC CTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACC ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTG ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCT CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCA CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCT CCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC TCTCCCTGTCTCCGGGTAAATCCGGCTACCCATACGATGTTCCAGA TTACGCT
213	二聚体人OX40抗原Fc	LHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNGMVSRCSRSQNTVCRPCGPGFYND VVSSKPCKPCTWCNLRSGSERKQLCTATQDTVCRCRAGTQPLDSYKP GVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQPASNSSDAICED RDPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPRTSQGPSTRPVEVPGGRAVD EQLYFQGGSPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVY

[0932]

		TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGKSGYPYDVPDYA

[0933] 使用标准胺偶联试剂盒(Biacore,Freiburg/Germany)于pH 5.0以大约 2500RU将人OX40配体(R&D systems)直接偶联CM5芯片的两个流动室。在 90秒里以30μL/min的流以200nM的浓度使重组人Ox40-Fc流经第二流动室。省略解离并在90秒里以30μL/min的流以500nM的浓度使噬菌体衍生的抗Ox40人IgG1P329LALA流经这两个流动室。对解离监测60秒。通过减去在参照流动室中获得的响应来修正本体折射率差异。在这里,使抗体流经具有固定化的人OX40配体但上面已经注射HBS-EP代替重组人OX40-Fc的表面。图1C显示实验的设计。

[0934] 噬菌体衍生的克隆20B7结合人OX40与它的OX40配体的复合物(表22,图6B)。如此,这种抗体不与配体竞争对人OX40的结合且因此称作“非配体阻断性的”。正相反,克隆8H9,1G4,49B4,CLC-563和CLC-564不结合与它的配体复合的人OX40且因此称作“配体阻断性的”。

[0935] 表22:抗OX40克隆的配体结合特性,通过表面等离振子共振测定

[0936]

克隆	起源	第一次注射	第二次注射(抗Ox40克隆)	配体阻断
8H9	噬菌体展示	人OX40 Fc	不结合	是
20B7	噬菌体展示	人OX40 Fc	结合	否
1G4	噬菌体展示	人OX40 Fc	不结合	是
49B4	噬菌体展示	人OX40 Fc	不结合	是
CLC-564	噬菌体展示	人OX40 Fc	不结合	是
CLC-564	噬菌体展示	人OX40 Fc	不结合	是

[0937] 实施例3

[0938] 抗人OX40结合性克隆的功能特性

[0939] 3.1表达人OX40和报告基因NF-κB-萤光素酶的HeLa细胞

[0940] OX40对它的配体的激动性结合经由激活核因子卡帕B(NFκB)而诱导下游信号传导(A.D.Weinberg et al.,J.Leukoc.Biol.2004,75(6),962-972)。生成重组报告细胞系HeLa_hOx40_NFκB_Luc1以在它的表面上表达人Ox40。另外,它包含含有在NFκB敏感性增强子区段控制下的萤光素酶基因的报告质粒。Ox40触发诱导NFκB的剂量依赖性激活,NFκB在核中易位,在那里它在报告质粒的NFκB敏感性增强子上结合以提高萤光素酶蛋白质的表达。萤光素酶催化萤光素氧化,产生发光的氧合萤光素。这可以用发光计来量化。一项实验的范围是测试P329GLALA huIgG1格式的多种抗Ox40结合物在HeLa_hOx40_NFκB_Luc1报告细胞中诱导NFκB激活的能力。

[0941] 于37℃使用细胞解离缓冲液(Invitrogen,目录号13151-014)10分钟来收获贴壁的HeLa_hOx40_NFκB_Luc1细胞。将细胞用DPBS清洗一次并在由 MEM(Invitrogen,目录号22561-021),10%(v/v)热灭活的FBS,1mM丙酮酸钠和1%(v/v)非必需氨基酸构成的测定培养基中调节至$2x10^5$个的细胞密度。在无菌白色96孔平底带盖组织培养板(greiner bio one,目录号655083)中以$0.3*10^5$个细胞每孔的密度接种细胞并在温箱(Hera Cell 150)中于37℃和5% CO_2保持过夜。

[0942] 次日,通过添加含有多种所滴定的P329GLALA huIgG1格式的抗OX40 结合物的测定培养基将HeLa_hOX40_NFκB_Luc1刺激6小时。为了测试高交联对抗OX40抗体的影响,以1:2比率(二抗比一抗单一抗OX40 P329GLALA huIgG1多2倍)添加50μL/孔含有二抗抗人IgG Fcγ片段特异性山羊IgG F(ab')$_2$片段(Jackson ImmunoResearch,109-006-098)的培养基。温育后,吸出上清液并将板用DPBS清洗两次。依照制造商的说明书使用萤光素酶1000测定系统和报告物裂解缓冲液(都是Promega,目录号E4550和目录号E3971)进行发光的量化。简言之,通过添加30μl每孔1x裂解缓冲液,将细胞于-20℃裂解 10分钟。将细胞于37℃融化20分钟,之后添加90μl每孔所提供的萤光素酶测定试剂。立即用SpectraMax M5/M5^{e}微量板读数仪(Molecular Devices, USA)量化发光,使用500ms积分时间,没有任何滤器来收集所有波长。所发出的相对光单位(URL)通过HeLa_hOX40_NFκB_Luc1细胞的基础发光来修正并使用Prism4(GraphPad Software,USA)针对对数一抗浓度绘图。使用内置的S型(sigmoidal)剂量响应拟合曲线。

[0943] 如图7A和7B中显示的,早就通过对报告细胞系添加抗OX40 P329GLALA huIgG1抗体(左侧)而诱导有限的,剂量依赖性的NFκB激活。抗OX40抗体通过抗人IgG特异性二抗的高交联以浓度依赖性方式强烈提高对NFκB介导的萤光素酶激活的诱导(右侧)。激活的EC_{50}值在表23中汇总。

[0944] 表23:与抗Ox40结合物(huIgG1 P329GLALA格式)和抗人IgG Fcγ特异性二抗一起共温育的HeLa_hOx40_NFκB_luc1报告细胞系中NFκB激活的EC_{50}值

[0945]

克隆	EC_{50} [nM]
8H9	0.66

[0946]

CLC563	1.69
20B7	2.27
49B4	2.42
CLC-564	3.23
1G4	3.59

[0947] 3.2 OX40介导亚最佳TCR触发的预激活的人CD4 T细胞的共刺激

[0948] OX40的连接提供协同的共刺激性信号,在亚最佳的T细胞受体(TCR)刺激后促进T细胞的分裂和存活(M.Croft et al.,Immunol.Rev.2009,229(1), 173-191)。另外,数种细胞因子的生成和T细胞激活标志物的表面表达升高 (I.Gramaglia et al., J.Immunol.1998,161(12),6510-6517;S.M.Jensen et al., Seminars in Oncology 2010,37(5),524-532)。

[0949] 为了测试多种抗OX40结合物的激动性特性,将预激活的Ox40阳性CD4 T细胞在抗OX40抗体(或是在溶液中或是在板表面上固定化)存在下用亚最佳浓度的板固定化的抗CD3抗体刺激72小时。经由通过流式细胞术监测总细胞计数和活细胞中的CFSE稀释来分析对T细胞存活和增殖的影响。另外,将细胞用荧光标记的针对T细胞激活和分化标志物,例如CD127, CD45RA,Tim-3,CD62L和OX40自身的抗体共染色。

[0950] 如实施例2.1.2下描述的经由Ficoll密度离心分离人PBMC并用PHA-L[2 μg/mL]和

Proleukin[200U/mL]刺激3天。然后用CFSE标记细胞，以1x10^{6}个细胞/mL的细胞密度用CFDA-SE(Sigma-Aldrich，目录号2188)以[50nM]的终浓度于37℃标记10分钟。之后，将细胞用过量的含有FBS(10％v/v)的 DPBS清洗两次。让标记的细胞在T细胞培养基中于37℃休息30分钟。之后，通过两个另外的DPBS清洗步骤去除未转变的CFDA-SE。依照制造商的说明书使用MACS阴性CD4 T细胞分离试剂盒(Miltenyi Biotec)实施自预激活的CFSE标记的人PBMC分离CD4 T细胞。

[0951] Morris等人显示常规抗Ox40抗体的激动性共刺激依赖于表面固定化(N.P.Morris et al.,Mol.Immunol.2007,44(12),3112-3121)。如此，在山羊抗人 Fcγ特异性抗体(Jackson ImmunoResearch，目录号109-006-098)存在(表面固定化的抗OX40)或缺失(溶液中的抗OX40)下于4℃在PBS中以[2μg/mL]的浓度将山羊抗小鼠Fcγ特异性抗体(Jackson ImmunoResearch，目录号 111-500-5008)包被至96孔U底细胞培养板(Greiner Bio One)的表面过夜。之后，用含有BSA(1％v/w)的DPBS封闭板表面。所有T细胞后面的(following) 温育步骤在含有BSA(1％v/w)的PBS中于37℃进行90分钟。在温育步骤之间，用DPBS清洗板。

[0952] 经由表面包被的抗小鼠Fcγ特异性抗体在后续温育步骤中捕捉小鼠抗人 CD3抗体(克隆OKT3，eBioscience，目录号16-0037-85，固定浓度[3 ng/mL])。在一项实验中，然后通过另外的DPBS中的温育步骤在板上固定化所滴定的人抗OX40抗体(人IgG1 P329G LALA)。在第二项实验中，对没有用抗人IgG Fc特异性抗体预包被的板在激活测定法期间直接将抗OX40抗体添加至培养基。

[0953] 在200μL T细胞培养基中以0.6*10^{5}个细胞每孔的细胞密度将CFSE标记的预激活的CD4$^+$T细胞添加至预包被的板并培养96小时。将细胞用荧光染料标记的小鼠抗人Ox40(克隆BerACT35，Bioledgend，目录号35008)， TIM-3(克隆F38-2E2，Biolegend，目录号345008)，CD127(克隆A019D5， Biolegend，目录号351234)，CD62L(克隆DREG 56，Biolegend，目录号 304834)和CD45RA (克隆HI100，BD Biosciences，目录号555489)的组合在黑暗中于4℃染色20分钟。将板用200μL/孔4℃ FACS缓冲液清洗两次，最终在80μL/孔含有0.2μg/mL DAPI(Santa Cruz Biotec，目录号Sc-3598)的 FACS缓冲液中重悬浮并在同一天使用5激光LSR-Fortessa(BD Bioscience，带有DIVA软件)获取读数。

[0954] 对DAPI阴性活细胞分析中值CFSE荧光的降低，作为增殖的标志物。监测OX40阳性，CD62L^{低}和TIM-3阳性T细胞的百分比，作为T细胞激活的标志物。分析CD45RA和CD127的表达以确定T细胞成熟状态的变化，由此将 CD45RA^{低}CD127^{低}细胞归类为效应T细胞。

[0955] 板固定化的抗体的共刺激以剂量依赖性方式强烈增强板固定化的抗人 CD3对预激活的人CD4 T细胞的亚最佳刺激(图8A-8F)。T细胞增殖更强，以更高百分比的效应T细胞显示更加成熟的表型且具有更高百分比的CD62L ^{低}，Tim-3^{阳性}和OX40^{阳性}激活的细胞。一些克隆(8H9，20B7)在结合细胞OX40 方面竞争胜过(out-compete)商品化检测抗体。对于它们，不可能计算EC_{50}值且因此自总体EC_{50}值计算排除OX40诱导的所有EC_{50}值。T细胞激活的所有其它参数中的半最大变化以范围为3至700pM的浓度实现并在图9和表24中汇总。当在表面固定化缺失下在溶液中添加抗Ox40抗体时没有看到亚最佳TCR刺激的增强(图10A-10F)。这再次证明Ox40轴激活对OX40受体高交联的强依赖性。

[0956] 抗OX40抗体(hu IgG1 P329GLALA格式)的结合强度和激动活性(生物活性)之间的

关联在图11中显示。对于大多数克隆，有直接关联，然而，令人惊讶地，两种克隆(49B4，1G4)显示比根据它们的结合强度所预测的要强得多的生物活性。

[0957] 表24：用板固定化的抗OX40结合物(huIgG1 P329GLALA格式)挽救亚最佳 TCR刺激的EC_{50}值

[0958]

克隆	EC_{50}[nM]	SEM(+/-)
8H9	0.003	0.001
20B7	0.090	0.015
CLC-563	0.114	0.018
CLC-564	0.202	0.053
49B4	0.591	0.237
1G4	0.697	0.278

[0959] 实施例4

[0960] 靶向Ox40和成纤维细胞激活蛋白(FAP)的双特异性构建物的生成 4.1靶向Ox40和成纤维细胞激活蛋白(FAP)的双特异性二价抗原结合分子 (2+2格式)的生成

[0961] 制备具有针对Ox40和针对FAP的二价结合的双特异性激动性Ox40抗体。应用依照国际专利申请号WO 2010/145792 A1的crossmab技术来减少错误配对的轻链的形成。

[0962] FAP结合物的生成和制备在WO 2012/020006 A2中描述，通过援引将其收入本文。

[0963] 在这个实施例中，使用$(G_4S)_4$连接头序列将FAP结合物28H1的交叉Fab 单元(VHCL)以C端融合至抗OX40 huIgG1的重链。将这种重链融合物与抗 OX40的轻链和相应FAP交叉轻链(VLCH1)共表达。依照公开号WO 2012/130831A1的国际专利申请中描述的方法在重链的恒定区中引入 Pro329Gly，Leu234Ala和Leu235Ala突变以消除对Fc伽马受体的结合。所得双特异性二价构建物在图12A中描绘。

[0964] 表25分别显示成熟双特异性，二价抗OX40/抗FAP人IgG1 P329GLALA 抗体的核苷酸和氨基酸序列。

[0965] 表25：双特异性，二价抗OX40/抗FAP人IgG1 P329GLALA抗原结合分子的序列

[0966]

SEQ ID NO:	描述	序列
214	(8B9) VHCH1-重链-(28H1) VHCL (核苷酸序列)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG TCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGC AGCTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTC GAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTAC GCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCC ACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAATACGGTTGGATGGACTAC TGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAG GGCCCATCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTCCAGCAAGTCTACCTCTG GCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCG AGCCTGTGACAGTGTCCTGGAACTCTGGCGCCCTGACATCCGGCGT GCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCCCTG TCCTCCGTCGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCT ACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACA AGAAGGTGGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCC CTTGTCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTAGCGTGTTCCTGTT CCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGA AGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGT GAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAATGCCAA GACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACTCCACCTACCGGGTGGT GTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGA GTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGGGAGCCCCCATCGA AAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGCGAGCCTCAGGT GTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGT GTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCC GTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGAC CACCCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACTCT AAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC TCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAG AAGTCCCTGTCCCTGTCTCCCGGGGGAGGCGGAGGATCTGGCGGA GGCGGATCCGGTGGTGGCGGATCTGGGGGCGGTGGATCTGAGGTG CAGCTGCTGGAATCTGGGGGAGGACTGGTGCAGCCAGGCGGATCT CTGAGGCTGTCCTGCGCTGCTTCCGGCTTTACCTTCTCCAGCCACG CCATGAGTTGGGTGCGCCAGGCACCCGGAAAAGGACTGGAATGGG TGTCAGCCATCTGGGCCTCCGGCGAGCAGTACTACGCCGATAGCG TGAAGGGCCGGTTCACCATCTCTCGGGATAACAGCAAGAATACTC TGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGCGCTGAAGATACCGCTGTGTA TTACTGCGCCAAGGGCTGGCTGGGCAACTTCGATTACTGGGGCCA GGGAACCCTCGTGACTGTCTCGAGCGCTTCTGTGGCCGCTCCCTCC GTGTTCATCTTCCCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACTG CCTCTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCTCGGGAAGCCAA GGTGCAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCA GGAATCCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCT GAGCAGCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAA GGTGTACGCCTGTGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGT GACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGC
180	VLCL-轻链1 (8B9) (核苷酸序列)	见表13
215	VLCH1-轻链2 (28H1) (核苷酸序列)	GAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCCGGCACCCTGAGCCTGAGCCCTG GCGAGAGAGCCACCCTGAGCTGCAGAGCCAGCCAGAGCGTGAGCC GGAGCTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCCCA

			GACTGCTGATCATCGGCGCCAGCACCCGGGCCACCGGCATCCCCG ATAGATTCAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCA TCAGCCGGCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGC AGGGCCAGGTGATCCCCCCCCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGG AAATCAAGAGCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTTCCTCT GGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCTCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGG CTGCCTGGTGAAAGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGG AACTCTGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGC TGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGC CCTCCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACC ACAAGCCCAGCAACACCAAAGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAG AGCTGCGAC
	216	(8B9) VHCH1-重链 -(28H1) VHCL	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCAREYGWMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALG APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLL ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAPGKGLEWVSAI WASGEQYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK GWLGNFDYWGQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	182	VLCL-轻链1 (8B9)	见表13
[0967]	217	VLCH1-轻链 2 (28H1)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSRSYLAWYQQKPGQAPRLLI IGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGQVIPPTF GQGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCD
	218	(49B4) VHCH1-重链 -(28H1) VHCL (核苷酸序列)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG TCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGC AGCTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTC GAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTAC GCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCC ACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAATACTACCGTGGTCCGTACG ACTACTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCAGCTAGCA CCAAGGGCCCATCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTCCAGCAAGTCTAC CTCTGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTC CCCGAGCCTGTGACAGTGTCCTGGAACTCTGGCGCCCTGACATCCG GCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTC CCTGTCCTCCGTCGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGCACCCAG ACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTG GACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGT CCCCCTTGTCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTAGCGTGTTCC TGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCC CGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGA AGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAATGC CAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACTCCACCTACCGGGT GGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAA AGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGGGAGCCCCCAT CGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGCGAGCCTCA GGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCA GGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATC GCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAA

[0968]

		GACCACCCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTAC TCTAAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTG TTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCC AGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCCCGGGGGAGGCGGAGGATCTGGCG GAGGCGGATCCGGTGGTGGCGGATCTGGGGGCGGTGGATCTGAGG TGCAGCTGCTGGAATCTGGGGGAGGACTGGTGCAGCCAGGCGGAT CTCTGAGGCTGTCCTGCGCTGCTTCCGGCTTTACCTTCTCCAGCCAC GCCATGAGTTGGGTGCGCCAGGCACCCGGAAAAGGACTGGAATGG GTGTCAGCCATCTGGGCCTCCGGCGAGCAGTACTACGCCGATAGC GTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCTCGGGATAACAGCAAGAATACT CTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGCGCTGAAGATACCGCTGTGT ATTACTGCGCCAAGGGCTGGCTGGGCAACTTCGATTACTGGGGCC AGGGAACCCTCGTGACTGTCTCGAGCGCTTCTGTGGCCGCTCCCTC CGTGTTCATCTTCCCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACT GCCTCTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCTCGGGAAGCCA AGGTGCAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCC AGGAATCCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCC TGAGCAGCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACA AGGTGTACGCCTGTGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCG TGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGC
184	VLCL-轻链1 (49B4) (核苷酸序列)	见表13
215	VLCH1-轻链 2 (28H1) (核苷酸序列)	见上文
219	(49B4) VHCH1-重链 -(28H1) VHCL	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCAREYYRGPYDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQ LLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAPGKGLEWVS AIWASGEQYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKGWLGNFDYWGQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
186	VLCL-轻链1 (49B4)	见表13
217	VLCH1-轻链 2 (28H1)	见上文
220	(1G4) VHCH1-重链 -(28H1) VHCL (核苷酸序列)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG TCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGC AGCTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTC GAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTAC GCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCC ACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAATACGGTTCTATGGACTACT GGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGG GCCCATCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTCCAGCAAGTCTACCTCTGG CGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGA GCCTGTGACAGTGTCCTGGAACTCTGGCGCCCTGACATCCGGCGTG CACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCCCTGT CCTCCGTCGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTA CATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAA

[0969]

		GAAGGTGGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCC TTGTCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTC CCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAA GTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTG AAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAATGCCAAG ACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACTCCACCTACCGGGTGGTG TCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAG TACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGGGAGCCCCCATCGAA AAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGCGAGCCTCAGGTG TACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTG TCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCG TGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACC ACCCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACTCTA AGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCT CCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGA AGTCCCTGTCCCTGTCTCCCGGGGGAGGCGGAGGATCTGGCGGAG GCGGATCCGGTGGTGGCGGATCTGGGGGCGGTGGATCTGAGGTGC AGCTGCTGGAATCTGGGGGAGGACTGGTGCAGCCAGGCGGATCTC TGAGGCTGTCCTGCGCTGCTTCCGGCTTTACCTTCTCCAGCCACGC CATGAGTTGGGTGCGCCAGGCACCCGGAAAAGGACTGGAATGGGT GTCAGCCATCTGGGCCTCCGGCGAGCAGTACTACGCCGATAGCGT GAAGGGCCGGTTCACCATCTCTCGGGATAACAGCAAGAATACTCT GTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGCGCTGAAGATACCGCTGTGTAT TACTGCGCCAAGGGCTGGCTGGGCAACTTCGATTACTGGGGCCAG GGAACCCTCGTGACTGTCTCGAGCGCTTCTGTGGCCGCTCCCTCCG TGTTCATCTTCCCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACTGC CTCTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCTCGGGAAGCCAAG GTGCAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAG GAATCCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTG AGCAGCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAG GTGTACGCCTGTGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTG ACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGC
188	VLCL-轻链1 (1G4) (核苷酸序列)	见表13
215	VLCH1-轻链2 (28H1) (核苷酸序列)	见上文
221	(1G4) VHCH1-重链-(28H1) VHCL	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCAREYGSMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAPGKGLEWVSAIWA SGEQYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGW LGNFDYWGQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
190	VLCL-轻链1 (1G4)	见表13
217	VLCH1-轻链2 (28H1)	见上文
222	(20B7) VHCH1-重链	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG TCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGC

[0970]

	-(28H1) VHCL (核苷酸序列)	AGCTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTC GAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTAC GCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCC ACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGTTAACTACCCGTACTCTTACT GGGGTGACTTCGACTACTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCT CCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTC CAGCAAGTCTACCTCTGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTCGTG AAGGACTACTTCCCCGAGCCTGTGACAGTGTCCTGGAACTCTGGCG CCCTGACATCCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCTC CGGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTCGTGACAGTGCCCTCCAGCTCT CTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCC AACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCCTGCGACAA GACCCACACCTGTCCCCCTTGTCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGCGGC CCTAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGA TCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCA CGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGA AGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACTC CACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGG CTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTG GGAGCCCCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCT CGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTG ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACC CCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGA ACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATT CTTCCTGTACTCTAAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCA GGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAAC CACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCCCGGGGGAGGCGGA GGATCTGGCGGAGGCGGATCCGGTGGTGGCGGATCTGGGGGCGGT GGATCTGAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGGGGAGGACTGGTGCAG CCAGGCGGATCTCTGAGGCTGTCCTGCGCTGCTTCCGGCTTTACCT TCTCCAGCCACGCCATGAGTTGGGTGCGCCAGGCACCCGGAAAAG GACTGGAATGGGTGTCAGCCATCTGGGCCTCCGGCGAGCAGTACT ACGCCGATAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCTCGGGATAACA GCAAGAATACTCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGCGCTGAAG ATACCGCTGTGTATTACTGCGCCAAGGGCTGGCTGGGCAACTTCGA TTACTGGGGCCAGGGAACCCTCGTGACTGTCTCGAGCGCTTCTGTG GCCGCTCCCTCCGTGTTCATCTTCCCACCTTCCGACGAGCAGCTGA AGTCCGGCACTGCCTCTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCC TCGGGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTGCAGTC CGGCAACTCCCAGGAATCCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAG CACCTACTCCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTAC GAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAAGTGACCCACCAGGGCCTG TCCAGCCCCGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGC
192	VLCL-轻链1 (20B7) (核苷酸序列)	见表13
215	VLCH1-轻链2 (28H1) (核苷酸序列)	见上文
223	(20B7) VHCH1-重链-(28H1) VHCL	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCARVNYPYSYWGDFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ

[0971]

		QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAPGKGL EWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAKGWLGNFDYWGQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
194	VLCL-轻链1 (20B7)	见表13
217	VLCH1-轻链 2 (28H1)	见上文
224	(CLC-563) VHCH1-重链 -(28H1) VHCL (核苷酸序列)	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGG GGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAGCA GTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG AGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGC AGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAA GAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACAC GGCCGTATATTACTGTGCGCTTGACGTTGGTGCTTTCGACTACTGG GGCCAAGGAGCCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCTAGCACCAAGGGC CCATCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTCCAGCAAGTCTACCTCTGGCG GCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCC TGTGACAGTGTCCTGGAACTCTGGCGCCCTGACATCCGGCGTGCAC ACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCCTC CGTCGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATC TGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAG GTGGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGTC CTGCCCCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTCCCCCC AAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGAC CTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTT CAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAATGCCAAGACCAA GCCTAGAGAGGAACAGTACAACTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGT GCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAA GTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGGGAGCCCCCATCGAAAAGAC CATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGCGAGCCTCAGGTGTACAC CCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCT GACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAA TGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCC CCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACTCTAAGCTGA CAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCT CCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCC TGTCCCTGTCTCCCGGGGGAGGCGGAGGATCTGGCGGAGGCGGAT CCGGTGGTGGCGGATCTGGGGGCGGTGGATCTGAGGTGCAGCTGC TGGAATCTGGGGGAGGACTGGTGCAGCCAGGCGGATCTCTGAGGC TGTCCTGCGCTGCTTCCGGCTTTACCTTCTCCAGCCACGCCATGAG TTGGGTGCGCCAGGCACCCGGAAAAGGACTGGAATGGGTGTCAGC CATCTGGGCCTCCGGCGAGCAGTACTACGCCGATAGCGTGAAGGG CCGGTTCACCATCTCTCGGGATAACAGCAAGAATACTCTGTACCTG CAGATGAACTCCCTGCGCGCTGAAGATACCGCTGTGTATTACTGCG CCAAGGGCTGGCTGGGCAACTTCGATTACTGGGGCCAGGGAACCC TCGTGACTGTCTCGAGCGCTTCTGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTCATC TTCCCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACTGCCTCTGTCG TGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCTCGGGAAGCCAAGGTGCAGT GGAAAGTGGATAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCCG TGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGAGCAGCA CCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACG CCTGTGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGT CCTTCAACCGGGGCGAGTGC
196	VLCL-轻链1 (CLC-563) (核苷酸序列)	见表13

	215	VLCH1-轻链2 (28H1) (核苷酸序列)	见上文
	225	(CLC-563) VHCH1-重链-(28H1) VHCL	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCALDVGAFDYWGQGALVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALG APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLL ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAPGKGLEWVSAI WASGEQYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK GWLGNFDYWGQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	198	VLCL-轻链1 (CLC-563)	见表13
	217	VLCH1-轻链2 (28H1)	见上文
[0972]	226	(CLC-564) VHCH1-重链-(28H1) VHCL (核苷酸序列)	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGG GGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAGCA GTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG AGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGC AGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAA GAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACAC GGCCGTATATTACTGTGCGTTCGACGTTGGTCCGTTCGACTACTGG GGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCTAGCACCAAGGGC CCATCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTCCAGCAAGTCTACCTCTGGCG GCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCC TGTGACAGTGTCCTGGAACTCTGGCGCCCTGACATCCGGCGTGCAC ACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCCTC CGTCGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATC TGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAG GTGGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGTC CTGCCCCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTCCCCCC AAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGAC CTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTT CAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAATGCCAAGACCAA GCCTAGAGAGGAACAGTACAACTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGT GCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAA GTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGGGAGCCCCCATCGAAAAGAC CATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGCGAGCCTCAGGTGTACAC CCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCT GACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAA TGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCC CCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACTCTAAGCTGA CAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCT CCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCC TGTCCCTGTCTCCCGGGGGAGGCGGAGGATCTGGCGGAGGCGGAT CCGGTGGTGGCGGATCTGGGGGCGGTGGATCTGAGGTGCAGCTGC TGGAATCTGGGGGAGGACTGGTGCAGCCAGGCGGATCTCTGAGGC TGTCCTGCGCTGCTTCCGGCTTTACCTTCTCCAGCCACGCCATGAG TTGGGTGCGCCAGGCACCCGGAAAAGGACTGGAATGGGTGTCAGC CATCTGGGCCTCCGGCGAGCAGTACTACGCCGATAGCGTGAAGGG CCGGTTCACCATCTCTCGGGATAACAGCAAGAATACTCTGTACCTG CAGATGAACTCCCTGCGCGCTGAAGATACCGCTGTGTATTACTGCG

[0973]

		CCAAGGGCTGGCTGGGCAACTTCGATTACTGGGGCCAGGGAACCC TCGTGACTGTCTCGAGCGCTTCTGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTCATC TTCCCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACTGCCTCTGTCG TGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCTCGGGAAGCCAAGGTGCAGT GGAAAGTGGATAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCCG TGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGAGCAGCA CCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACG CCTGTGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGT CCTTCAACCGGGGCGAGTGC
200	VLCL-轻链1 (CLC-564) (核苷酸序列)	见表13
215	VLCH1-轻链 2 (28H1) (核苷酸序列)	见上文
227	(CLC-564) VHCH1-重链 -(28H1) VHCL	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAFDVGPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALG APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLL ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAPGKGLEWVSAI WASGEQYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK GWLGNFDYWGQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
202	VLCL-轻链1 (CLC-564)	见表13
217	VLCH1-轻链 2 (28H1)	见上文

[0974] 所有基因在由MPSV核心启动子与CMV启动子增强子片段组合组成的嵌合MPSV启动子控制下瞬时表达。表达载体还含有用于含有EBNA(埃巴病毒核抗原)的宿主细胞中的附加体复制的oriP区。

[0975] 通过使用聚乙烯亚胺用哺乳动物表达载体共转染HEK293-EBNA细胞来生成双特异性抗Ox40,抗FAP构建物。以1:1:1比率(“载体重链”:“载体轻链 1”:“载体轻链2”)用相应表达载体转染细胞。

[0976] 为了在500mL摇瓶中生成,在转染前24小时接种400x10^6个HEK293 EBNA细胞。为了转染,将细胞以210x g离心5分钟,并用预温热的CD CHO培养基替换上清液。在20mL CD CHO培养基中混合表达载体至200μg DNA的最终量。添加540μL PEI后,将溶液漩涡震荡15秒并于室温温育10分钟。之后,将细胞与DNA/PEI溶液混合,转移至500mL摇瓶并在具有5% CO_2气氛的温箱中于37℃温育3小时。温育后,添加160mL F17培养基并将细胞培养24小时。转染后1天,添加1mM丙戊酸和7%补料。培养7天后,通过以210x g离心15分钟来收集细胞上清液。将溶液无菌过滤(0.22μm滤器),补充叠氮化钠至终浓度0.01%(w/v),并于4℃保持。

[0977] 如上文关于抗原-Fc融合物和抗体的纯化描述的,使用蛋白A通过亲和层析进行自细胞培养物上清液纯化双特异性构建物。

[0978] 浓缩并过滤蛋白质,之后在用pH 6.0的20mM组氨酸,140mM NaCl溶液平衡的HiLoad Superdex 200柱(GE Healthcare)上加载。

[0979] 使用基于氨基酸序列计算的摩尔消光系数,通过以280nm测量OD来测定经过纯化的双特异性构建物的蛋白质浓度。使用LabChipGXII(Caliper)通过还原剂(Invitrogen,USA)存在和缺失下的CE-SDS来分析双特异性构建物的纯度和分子量。于25℃使用在25mM K_2HPO_4,125mM NaCl,200mM单盐酸L-精氨酸,0.02%(w/v)NaN_3,pH 6.7运行缓冲液中平衡的TSKgel G3000 SW XL分析性大小排阻柱(Tosoh)分析双特异性构建物的聚集体含量 (表26)。

[0980] 表26:例示性双特异性,二价抗Ox40/抗FAP IgG1 P329G LALA抗原结合分子的生化分析

[0981]

克隆	产率 [mg/l]	单体 [%]	CE-SDS (非还原的)	CE-SDS (还原的)
8H9/FAP P329GLALA IgG1 2+2	58	100	95.3% (254kDa) 3% (237kDa)	3.2% (114kDa) 71.3% (90.7kDa) 13.3% (28.9kDa) 11.9% (26.2kDa)
49B4/FAP P329GLALA IgG1 2+2	17	99	98.9% (253kDa)	3.% (116kDa) 71.4% (92kDa) 12.9% (28.9kDa) 12.1% (25.7kDa)
1G4/FAP P329GLALA IgG1 2+2	0.5	99.1	93.9% (234kDa) 3.2% (242kDa) 1.2% (244kDa)	55.5% (90.6kDa) 20.7% (27kDa) 21.6% (25kDa)
20B7/FAP P329GLALA IgG1 2+2	14	97.2	91.5% (244kDa) 2.3% (227kDa) 1.4% (218kDa) 1.5% (202kDa)	54.1% (89kDa) 19% (27kDa) 25% (24kDa)

[0982] 4.2靶向Ox40和成纤维细胞激活蛋白(FAP)的双特异性单价抗原结合分子 (1+1格式)的生成

[0983] 制备具有针对Ox40和针对FAP的单价结合的双特异性激动性Ox40抗体,通过应用依照国际专利申请号WO 2010/145792 A1的crossmab技术来减少错误配对的轻链的形成。

[0984] 在这个实施例中,将FAP结合物28H1的交叉Fab单元(VHCL)融合至 huIgG1的穴重链。将针对抗Ox40的Fab融合至节重链。靶向性抗FAP-Fc穴与抗Ox40-Fc节链的组合容许生成包括FAP结合性Fab和Ox40结合性Fab的异二聚体(图12B)。

[0985] 依照公开号WO 2012/130831 A1的国际专利申请中描述的方法在重链的恒定区中引入Pro329Gly,Leu234Ala和Leu235Ala突变以消除对Fc伽马受体的结合。

[0986] 所得双特异性,单价构建物在图12B中描绘且核苷酸和氨基酸序列可在表27中找到。

[0987] 表27:成熟双特异性单价抗Ox40/抗FAP huIgG1 P329GLALA kih抗体的 cDNA和氨基酸序列

[0988]

SEQ ID NO:	描述	序列
228	(28H1) VHCL-重链穴 (核苷酸序列)	GAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCTGGC GGATCTCTGAGACTGTCCTGCGCCGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCT CCCACGCCATGTCCTGGGTCCGACAGGCTCCTGGCAAAGGCCTGG AATGGGTGTCCGCCATCTGGGCCTCCGGCGAGCAGTACTACGCCG ACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGGACAACTCCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCG CCGTGTACTACTGTGCCAAGGGCTGGCTGGGCAACTTCGACTACTG GGGACAGGGCACCCTGGTCACCGTGTCCAGCGCTAGCGTGGCCGC TCCCAGCGTGTTCATCTTCCCACCCAGCGACGAGCAGCTGAAGTCC GGCACAGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGC GAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGG CAACAGCCAGGAATCCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCAC CTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGA GAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTC CAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCGACAAGAC CCACACCTGTCCCCCTTGCCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGTGGCCCT TCCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCA GCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTCGATGTGTCCCACG AGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAG TGCACAATGCCAAGACCAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCG GCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCC GAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGA CCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCC CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGA ACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT CTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
215	(28H1) VLCH1-轻链2 (核苷酸序列)	见表25
229	(28H1)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAPGKGLE

[0989]

	VHCL-重链穴	WVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAKGWLGNFDYWGQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
217	(28H1) VLCH1-轻链2	见表25
302	(8H9) VHCH1-重链节 (核苷酸序列)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG TCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGC AGCTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTC GAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTAC GCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCC ACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAATACGGTTGGATGGACTAC TGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCA GCTAGCACCAAGGGCCCTAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCTAGCAGCA AGAGCACAAGTGGAGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG ACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAATTCTGGCGCCCT GACAAGCGGCGTGCACACATTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACCGTGCCCTCTAGCTCTCTG GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAAC ACCAAAGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGAC CCACACCTGTCCCCCTTGCCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGTGGCCCT TCCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCA GCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTCGATGTGTCCCACG AGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAG TGCACAATGCCAAGACCAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCG GCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCC GAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGA CCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGA ACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT CTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
180	(8H9) VLCL-轻链1 (核苷酸序列)	见表13
303	(8H9) VHCH1-重链节	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCAREYGWMDYWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
182	(8H9) VLCL-轻链1	见表13
230	(49B4) VHCH1-重链	AGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGT CCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGCA

[0990]

	节 (核苷酸序列)	GCTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCG AGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACG CACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCCA CGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACA CCGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAATACTACCGTGGTCCGTACGA CTACTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCA GCTAGCACCAAGGGCCCTAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCTAGCAGCA AGAGCACAAGTGGAGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG ACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAATTCTGGCGCCCT GACAAGCGGCGTGCACACATTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACCGTGCCCTCTAGCTCTCTG GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAAC ACCAAAGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGAC CCACACCTGTCCCCCTTGCCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGTGGCCCT TCCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCA GCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTCGATGTGTCCCACG AGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAG TGCACAATGCCAAGACCAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCG GCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCC GAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGA CCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGA ACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT CTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
184	(49B4) VLCL-轻链1 (核苷酸序列)	见表13
231	(49B4) VHCH1-重链节	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCAREYYRGPYDYWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
186	(49B4) VLCL-轻链1	见表13
232	(1G4) VHCH1-重链节 (核苷酸序列)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG TCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGC AGCTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTC GAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTAC GCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCC ACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAATACGGTTCTATGGACTACT GGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCA GCTAGCACCAAGGGCCCTAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCTAGCAGCA AGAGCACAAGTGGAGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG ACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAATTCTGGCGCCCT GACAAGCGGCGTGCACACATTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACCGTGCCCTCTAGCTCTCTG GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAAC ACCAAAGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGAC CCACACCTGTCCCCCTTGCCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGTGGCCCT

[0991]

		TCCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCA GCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTCGATGTGTCCCACG AGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAG TGCACAATGCCAAGACCAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCG GCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCC GAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGA CCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGA ACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT CTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
188	(1G4) VLCL-轻链1 (核苷酸序列)	见表13
233	(1G4) VHCH1-重链节	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCAREYGSMDYWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
190	(1G4) VLCL-轻链1	见表13
234	(20B7) VHCH1-重链节 (核苷酸序列)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG TCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGC AGCTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTC GAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTAC GCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCC ACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGTTAACTACCCGTACTCTTACT GGGGTGACTTCGACTACTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCT CCTCA GCTAGCACCAAGGGCCCTAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCTAGCAGCA AGAGCACAAGTGGAGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG ACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAATTCTGGCGCCCT GACAAGCGGCGTGCACACATTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACCGTGCCCTCTAGCTCTCTG GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAAC ACCAAAGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGAC CCACACCTGTCCCCCTTGCCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGTGGCCCT TCCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCA GCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTCGATGTGTCCCACG AGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAG TGCACAATGCCAAGACCAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCG GCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCC GAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGA CCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGA ACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT CTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC

[0992]

		CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
192	(20B7) VLCL-轻链1 (核苷酸序列)	见表13
235	(20B7) VHCH1-重链节	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCARVNYPYSYWGDFDYWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
194	(20B7) VLCL-轻链1	见表13
236	(CLC-563) VHCH1-重链节 (核苷酸序列)	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGG GGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAGCA GTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG AGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGC AGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAA GAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACAC GGCCGTATATTACTGTGCGCTTGACGTTGGTGCTTTCGACTACTGG GGCCAAGGAGCCCTGGTCACCGTCTCGAGT GCTAGCACCAAGGGCCCTAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCTAGCAGCA AGAGCACAAGTGGAGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG ACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAATTCTGGCGCCCT GACAAGCGGCGTGCACACATTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACCGTGCCCTCTAGCTCTCTG GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAAC ACCAAAGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGAC CCACACCTGTCCCCCTTGCCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGTGGCCCT TCCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCA GCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTCGATGTGTCCCACG AGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAG TGCACAATGCCAAGACCAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCG GCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCC GAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGA CCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGA ACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT CTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
196	(CLC-563) VLCL-轻链1 (核苷酸序列)	见表13
237	(CLC-563) VHCH1-重链节	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCALDVGAFDYWGQGALVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0993]

198	(CLC-563) VLCL-轻链1	见表13
238	(CLC-564) VHCH1-重链节 (核苷酸序列)	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGG GGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAGCA GTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG AGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGC AGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAA GAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACAC GGCCGTATATTACTGTGCGTTCGACGTTGGTCCGTTCGACTACTGG GGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT GCTAGCACCAAGGGCCCTAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCTAGCAGCA AGAGCACAAGTGGAGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG ACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAATTCTGGCGCCCT GACAAGCGGCGTGCACACATTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACCGTGCCCTCTAGCTCTCTG GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAAC ACCAAAGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGAC CCACACCTGTCCCCCTTGCCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGTGGCCCT TCCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCA GCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTCGATGTGTCCCACG AGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAG TGCACAATGCCAAGACCAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCG GCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCC GAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGA CCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGA ACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT CTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
200	(CLC-564) VLCL-轻链1 (核苷酸序列)	见表13
239	(CLC-564) VHCH1-重链节	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAFDVGPFDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
202	(CLC-564) VLCL-轻链1	见表13

[0994] 所有基因在由MPSV核心启动子与CMV启动子增强子片段组合组成的嵌合MPSV启动子控制下瞬时表达。表达载体还含有用于含有EBNA(埃巴病毒核抗原)的宿主细胞中的附加体复制的oriP区。

[0995] 通过使用聚乙烯亚胺用哺乳动物表达载体共转染HEK293-EBNA细胞来生成双特异性抗0x40,抗FAP构建物。以1:1:1:1比率(“载体重链穴”:“载体重链节”:“载体轻链1”:“载体轻链2”)用相应表达载体转染细胞。

[0996] 为了在500mL摇瓶中生成,在转染前24小时接种400x10^6个HEK293 EBNA细胞。为了转染,将细胞以210x g离心5分钟,并用预温热的CD CHO培养基替换上清液。在20mL CD CHO培养基中混合表达载体至200μg DNA的最终量。添加540μL PEI后,将溶液漩涡震荡15秒并

于室温温育10分钟。之后，将细胞与DNA/PEI溶液混合，转移至500mL摇瓶并在具有5% CO_2 气氛的温箱中于37℃温育3小时。温育后，添加160mL F17培养基并将细胞培养24小时。转染后1天，添加1mM丙戊酸和7％补料。培养7天后，通过以210x g离心15分钟来收集细胞上清液。将溶液无菌过滤(0.22μm滤器)，补充叠氮化钠至终浓度0.01％(w/v)，并于4℃保持。

[0997] 如上文关于抗原-Fc融合物和抗体的纯化描述的，使用蛋白A通过亲和层析进行自细胞培养物上清液纯化双特异性抗原结合分子。

[0998] 浓缩并过滤蛋白质，之后在用pH 6.0的20mM组氨酸，140mM NaCl溶液平衡的HiLoad Superdex 200柱(GE Healthcare)上加载。

[0999] 使用基于氨基酸序列计算的摩尔消光系数，通过以280nm测量OD来测定经过纯化的双特异性构建物的蛋白质浓度。使用LabChipGXII(Caliper)通过还原剂(Invitrogen，USA)存在和缺失下的CE-SDS来分析双特异性构建物的纯度和分子量。于25℃使用在25mM K_2HPO_4，125mM NaCl，200mM单盐酸L-精氨酸，0.02％(w/v)NaN_3，pH 6.7运行缓冲液中平衡的TSKgel G3000 SW XL分析性大小排阻柱(Tosoh)分析双特异性构建物的聚集体含量。

[1000] 表28汇总双特异性，单价抗Ox40/抗FAP IgG1 P329G LALA kih抗原结合分子的生化分析。

[1001] 表28:双特异性单价抗Ox40/抗FAP IgG1 P329G LALA kih抗原结合分子的生化分析

[1002]

克隆	产率 [mg/l]	单体 [%]	CE-SDS (非还原的)	CE-SDS (还原的)
8H9/FAP P329GLALA IgG1 1+1	16.5	100	92.1% (164kDa) 1.9% (145kDa) 3.6% (120.1kDa)	67.7% (63.6kDa) 13.3% (28.5kDa) 16.5% (25.7kDa)
1G4/FAP P329GLALA IgG1 1+1	12.5	98.5	85.2% (157kDa) 7.4% (151kDa) 2.8% (139.5kDa)	69.5% (64.2kDa) 13.1% (28.8kDa) 16.7% (26.2kDa)
49B4/FAP P329GLALA IgG1 1+1	2.3	97.9	80% (153kDa) 11.9% (141kDa)	70.4% (63.5kDa) 14.7% (28kDa)

[1003]

			4.3% (120kDa)	13.7% (25kDa)
20B7/FAP P329GLALA IgG1 1+1	22	100	97.5% (166kDa) 1.3% (149kDa)	82.7% (56.2kDa) 8.2% (27.2kDa) 8.1% (24.3kDa)

[1004] 4.3靶向Ox40和FAP的双特异性构建物的表征

[1005] 4.3.1表面等离振子共振(同时结合)

[1006] 通过表面等离振子共振(SPR)评估同时结合人Ox40 Fc(kih)和人FAP的能力。所有SPR实验是用HBS-EP作为运行缓冲液(0.01M HEPES pH 7.4，0.15 M NaCl，3mM EDTA，0.005％表面活性剂P20，Biacore，Freiburg/Germany) 于25℃在Biacore T200上实施的。将生物素化人Ox40 Fc(kih)直接偶联至链霉亲合素(SA)传感器芯片的流动室。使用高至1000个共振单位(RU)的固定化水平。

[1007] 在90秒里以30μL/min的流以250nM的浓度范围使靶向Ox40和FAP的双特异性构建物流经流动室并将解离设为零秒。以250nM的浓度在90秒里以 30μL/min的流注射作为第二分析物的人FAP经过流动室(图12C)。对解离监测120秒。通过减去在没有固定化蛋白质的参

照流动室中获得的响应来修正本体折射率差异。

[1008] 正如在图13A-13H的图中能看到的,所有双特异性构建物均能同时结合人Ox40和人FAP。

[1009] 4.3.2细胞上的结合

[1010] 4.3.2.1 FAP靶向性抗Ox40抗体对幼稚的较之激活的人PBMC的结合

[1011] 如实施例2.1.2中描述的通过ficoll密度梯度离心来分离人PBMC。在分离后直接使用PBMC(静息人PBMC上的结合)或刺激它们以接受T细胞的细胞表面上的强人Ox40表达(激活的人PBMC上的结合)。因此,将幼稚的 PBMCs在6孔组织培养板中在供应有200U/mL Proleukin和2μg/mL PHA-L的 T细胞培养基中培养4至7天,然后在供应有200U/mL Proleukin的T细胞培养基中在预包被的6孔组织培养板[10μg/mL抗人CD3(克隆OKT3)和2μg/mL抗人CD28(克隆CD28.2)]上于37℃和5%CO_2培养1天。

[1012] 为了检测Ox40,混合幼稚的人PBMC和激活的人PBMC。为了能够区分幼稚的与激活的人PBMC,在结合测定法之前使用eFluor670细胞增殖染料 (eBioscience,目录号65-0840-85)标记幼稚的细胞。然后将1x10^5个幼稚的,eFluor670标记的人PBMC和未标记的激活的人PBMC的一比一混合物添加至圆底悬浮细胞96孔板(Greiner bio-one,cellstar,目录号650185)的每个孔并如实施例2.1.2中描述的实施结合测定法。然后将1x10^5个幼稚的,eFluor670标记的人PBMC和未标记的激活的人PBMC的一比一混合物添加至圆底悬浮细胞96孔板(Greiner bio-one,cellstar,目录号650185)的每个孔并如2.1.2节中描述的实施结合测定法。

[1013] 一抗是所滴定的抗Ox40抗体构建物,于4℃温育120分钟。二抗溶液是荧光标记的抗人CD4(克隆RPA-T4,小鼠IgG1κ,BioLegend,目录号 300532),抗人CD8(克隆RPa-T8,小鼠IgG1κ,BioLegend,目录号3010441) 和异硫氰酸荧光素(FITC)缀合的AffiniPure抗人IgG Fcγ片段特异性山羊IgG F(ab')$_2$片段(Jackson ImmunoResearch,目录号109-096-098)的混合物,在黑暗中于4℃温育30分钟。将板最终在80μL/孔含有0.2μg/mL DAPI(Santa Cruz Biotec,目录号Sc-3598)的FACS缓冲液中重悬浮和在同一天使用5激光 LSR-Fortessa(BD Bioscience,带有DIVA软件)获取读数。

[1014] 如图14A-14H和14J-14Q中显示的,对OX40特异性的抗原结合分子无一结合静息人$CD4^+$T细胞或$CD8^+$T细胞。与之对比,所有抗原结合分子结合激活的$CD8^+$或$CD4^+$T细胞。对$CD4^+$T细胞的结合比对$CD8^+$T细胞的结合要强得多,与实施例2.1.2中早就描述的类似。如图14A-14H和14J-14Q中显示的,二价FAP靶向性Ox40构建物显示与常规IgG抗体格式的相应克隆相似的对Ox40阳性和阴性细胞的结合特征,而单价抗体由于亲合力的损失而具有明显降低的结合Ox40阳性细胞的能力。

[1015] 4.3.2.2对表达人FAP的肿瘤细胞的结合

[1016] 使用表达人成纤维细胞激活蛋白(huFAP)的细胞NIH/3T3-huFAP克隆39 或WM266-4细胞(ATCC CRL-1676)测试对细胞表面FAP的结合。NIH/3T3-huFAP克隆39是通过用表达载体pETR4921转染小鼠胚胎成纤维细胞NIH/3T3细胞系(ATCC CRL-1658)以在1.5μg/mL Puromycin选择下表达 huFAP而生成的。在一些测定法中,如实施例2.3.2中描述的用PKH-26红荧光细胞接头试剂盒(Sigma,目录号PKH26GL)预标记WM266-4细胞以容许将这些肿瘤细胞与存在的其它细胞(例如人PBMC)分开。

[1017] 然后将0.5x10^{5}个NIH/3T3-huFAP克隆39或WM266-4细胞添加至圆底悬浮细胞96孔板(Greiner bio-one,cellstar,目录号650185)的每个孔并以如实施例2.3.2中描述的相似的方式实施结合测定法。于4℃将板以400x g离心4 分钟并弹去上清液。将细胞用200μL DPBS清洗一次并通过短暂且温和的漩涡震荡来重悬浮团粒。将所有样品在50μL/孔4℃冷的含有所示浓度范围(滴定的)的双特异性抗原结合分子(一抗)的FACS缓冲液中重悬浮并于4℃温育 120分钟。之后,将细胞用200μL 4℃ FACS缓冲液清洗四次并通过短暂的漩涡震荡来重悬浮。将细胞用25μL/孔4℃冷的含有异硫氰酸荧光素(FITC) 缀合的AffiniPure抗人IgG Fcγ片段特异性山羊IgG F(ab')$_2$片段(Jackson ImmunoResearch,目录号109-096-098)的二抗溶液进一步染色并在黑暗中于 4℃温育30分钟。将板最终在80μL/孔含有0.2μg/mL DAPI(Santa Cruz Biotec,目录号Sc-3598)的FACS缓冲液中重悬浮并在同一天使用5激光 LSR-Fortessa(BD Bioscience,带有DIVA软件)获取读数。

[1018] 如图15A和15B中显示的,FAP靶向性单和二价抗Ox40抗原结合分子而非huIgG1 P329GLALA格式的相同克隆有效结合表达人FAP的靶细胞。因此,只有FAP靶向性单和二价抗Ox40抗原结合分子显示直接肿瘤靶向特性。二价构建物(实心正方形)显示比单价构建物要更强对FAP的结合,这可以通过二价相对于单价格式获取亲合力来解释。这在高FAP表达性NIH/3T3-huFAP克隆39细胞中(图15A)比在较低FAP表达性WM266-4细胞中 (图15B)要更加突出。WM266-4细胞上更低密度的表面FAP可能不提供对 FAP分子的紧密接近以总是容许抗OX40构建物的二价结合。对激活的人 CD4 T细胞和FAP阳性肿瘤细胞的结合的EC$_{50}$值在表29中汇总。

[1019] 表29:FAP靶向性单或二价格式的选定aOx40结合物(克隆8H9,1G4)对细胞表面人FAP和人Ox40的结合的EC$_{50}$值

[1020]

克隆	格式	FAP$^+$细胞 EC$_{50}$ [nM]	OX40$^+$细胞 EC$_{50}$ [nM]
8H9 (WM266-4)	hu IgG1	n.a.	0.59
	FAP 1+1	5.99	8.20
	FAP 2+2	2.88	0.93
1G4 (NIH/3T3 huFAP克隆39)	hu IgG1	n.a.	n.a.
	FAP 1+1	3.55	49.07
	FAP 2+2	0.77	9.37

[1021] 4.4对于OX40为二价且对于FAP为单价(2+1格式)的靶向OX40和成纤维细胞激活蛋白(FAP)的双特异性抗原结合分子的生成

[1022] 制备具有针对Ox40的二价结合和针对FAP的单价结合的双特异性激动性Ox40抗体,通过应用节入穴技术来容许装配两种不同重链。

[1023] 在这个实施例中,第一重链(HC1)由抗OX40结合物49B4的一个Fab单元 (VHCH1),接着是通过(G$_4$S)接头融合至抗FAP结合物28H1或4B9的VH域的 Fc节链构成。构建物的第二重链(HC2)由抗OX40结合物49B4的一个Fab单元 (VHCH1),接着是通过(G$_4$S)接头融合至抗FAP结合物28H1或4B9的VL域的 Fc穴链构成。

[1024] FAP结合物的生成和制备在WO 2012/020006 A2中描述,通过援引将其收入本文。

[1025] 依照国际专利申请公开号WO 2012/130831 A1中描述的方法在重链的恒定区中引入Pro329Gly,Leu234Ala和Leu235Ala突变以消除对Fcγ受体的结合。共表达重链融合蛋白与抗OX40结合物49B4的轻链(CLVL)。所得对 OX40的结合为二价的双特异性构建物在图12D中描绘且核苷酸和氨基酸序列可在表30中找到。

[1026] 另外,制备"非靶向性"2+1构建物,其中抗FAP结合物的VH和VL域用称作DP47,不结合抗原的种系对照替换。

[1027] 表30:成熟双特异性二价抗Ox40/单价抗FAP huIgG1 P329GLALA kih抗体 (2+1格式)和非靶向性(DP47)2+1构建物的cDNA和氨基酸序列

SEQ ID NO:	描述	序列
184	(49B4) VLCL-轻链 (核苷酸序列)	见表13
304	(49B4) VHCH1 Fc节 VH (4B9) (核苷酸序列, 重链1)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG TCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGC AGCTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTC GAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTAC GCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCC ACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAATACTACCGTGGTCCGTACG ACTACTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCAGCTAGCA CCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCAC CTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTT CCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAG CGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTAC TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCC AGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG TGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACAT GCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCT TCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACC GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCC

[1028]

		CATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC ACAGGTGTACACCCTGCCCCCCTGCAGAGATGAGCTGACCAAGAA CCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCAGCGAT ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTAC AAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGT ACTCCAAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACG TGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA CCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGGAGGCGGCGGAAGCG GAGGAGGAGGATCTGGGGGCGGAGGTTCCGGAGGCGGAGGATCC GAGGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGC GGCAGCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCA GCTACGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCCTGGCAAGGGACTGG AATGGGTGTCCGCCATCATCGGCTCTGGCGCCAGCACCTACTACGC CGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAA GAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACAC CGCCGTGTACTACTGCGCCAAGGGATGGTTCGGCGGCTTCAACTAC TGGGGACAGGGCACCCTGGTCACCGTGTCCAGC
305	(49B4) VHCH1 Fc穴 VL (4B9) (核苷酸序列, 重链2)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG TCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGC AGCTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTC GAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTAC GCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCC ACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAATAC TACCGTGGTCCGTACGACTACTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACC GTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC CCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCC TGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACT CAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACA GTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCC AGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAG CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT GACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCA GGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCC TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGT GAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT ACAACAGCACG TACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCG CCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG AACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCA AGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCA GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC AACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCT TCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA CTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCGG AAGCGGAGGAGGAGGATCCGGCGGCGGAGGTTCCGGAGGCGGTG GATCTGAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCCGGCACCCTGTCTCTGAG CCCTGGCGAGAGAGCCACCCTGTCCTGCAGAGCCTCCCAGTCCGT GACCTCCTCCTACCTCGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCC CCTCGGCTGCTGATCAACGTGGGCAGTCGGAGAGCCACCGGCATC CCTGACCGGTTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGA CCATCTCCCGGCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCA GCAGGGCATCATGCTGCCCCCCACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGT GGAAATCAAG
186	(49B4) VLCL-轻链	见表13
306	(49B4)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE

	VHCH1 Fc节 VH (4B9) (重链1)	WMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCAREYYRGPYDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKGWFGGFNYWGQGTLVTVSS
307	(49B4) VHCH1 Fc穴 VL (4B9) (重链2)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCAREYYRGPYDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVL TQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQKPGQAPRLLINVG SRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQ GTKVEIK
184	(49B4) VLCL-轻链 (核苷酸序列)	见表13
308	(49B4) VHCH1 Fc节 VH (28H1) (核苷酸序列, 重链1)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG TCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGC AGCTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTC GAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTAC GCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCC ACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAATACTACCGTGGTCCGTACG ACTACTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCAGCTAGCA CCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCAC CTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTT CCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAG CGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTAC TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCC AGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG TGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACAT GCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCT TCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACC GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCC CATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC ACAGGTGTACACCCTGCCCCCCTGCAGAGATGAGCTGACCAAGAA CCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCAGCGAT ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTAC AAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGT ACTCCAAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACG TGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA CCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGGAGGCGGCGGAAGCG GAGGAGGAGGATCCGGAGGAGGGGGAAGTGGCGGCGGAGGATCT GAGGTGCAGCTGCTGGAATCCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCTGGC

[1029]

[1030]

		GGATCTCTGAGACTGTCCTGCGCCGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCT CCCACGCCATGTCCTGGGTCCGACAGGCTCCTGGCAAAGGCCTGG AATGGGTGTCCGCCATCTGGGCCTCCGGCGAGCAGTACTACGCCG ACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGGACAACTCCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCG CCGTGTACTACTGTGCCAAGGGCTGGCTGGGCAACTTCGACTACTG GGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTGTCCAGC
309	(49B4) VHCH1 Fc穴 VL (28H1) (核苷酸序列, 重链2)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG TCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGC AGCTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTC GAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTAC GCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCC ACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAATACTACCGTGGTCCGTACG ACTACTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCAGCTAGCA CCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCAC CTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTT CCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAG CGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTAC TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCC AGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG TGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACAT GCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCT TCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACC GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCC CATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC ACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAA CCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTA CAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC GTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCGGAAGC GGAGGAGGAGGATCCGGTGGTGGCGGATCTGGGGGCGGTGGATCT GAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCCGGCACCCTGAGCCTGAGCCCTG GCGAGAGAGCCACCCTGAGCTGCAGAGCCAGCCAGAGCGTGAGCC GGAGCTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCCCA GACTGCTGATCATCGGCGCCAGCACCCGGGCCACCGGCATCCCCG ATAGATTCAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCA TCAGCCGGCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGC AGGGCCAGGTGATCCCCCCCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGG AAATCAAG
186	(49B4) VLCL-轻链	见表13
310	(49B4) VHCH1 Fc节 VH (28H1) (重链1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCAREYYRGPYDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAPGKGLEWV SAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC

[1031]

		AKGWLGNFDYWGQGTLVTVSS
311	(49B4) VHCH1 Fc穴 VL (28H1) (重链2)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCAREYYRGPYDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVL TQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSRSYLAWYQQKPGQAPRLLIIGAS TRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGQVIPPTFGQG TKVEIK
184	(49B4) VLCL-轻链 (核苷酸序列)	见表13
312	(49B4) VHCH1 Fc节 VH (DP47) (核苷酸序列, 重链1)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG TCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGC AGCTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTC GAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTAC GCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCC ACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAATACTACCGTGGTCCGTACG ACTACTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCAGCTAGCA CCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCAC CTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTT CCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAG CGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTAC TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCC AGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG TGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACAT GCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCT TCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACC GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCC CATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC ACAGGTGTACACCCTGCCCCCCTGCAGAGATGAGCTGACCAAGAA CCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCAGCGAT ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTAC AAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGT ACTCCAAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACG TGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA CCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGGAGGCGGCGGAAGCG GAGGAGGAGGATCCGGAGGAGGGGGAAGTGGCGGCGGAGGATCT GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGG GGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCAGCGGATTCACCTTTAGCA GTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG AGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGC AGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAA GAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACAC GGCCGTATATTACTGTGCGAAAGGCAGCGGATTTGACTACTGGGG CCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC
313	(49B4) VHCH1 Fc穴 VL (DP47)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG TCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGC AGCTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTC GAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTAC

[1032]

	(核苷酸序列，重链2)	GCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCC ACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAATACTACCGTGGTCCGTACG ACTACTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCAGCTAGCA CCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCAC CTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTT CCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAG CGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTAC TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCC AGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG TGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACAT GCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCT TCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACC GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCC CATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC ACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAA CCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTA CAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC GTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCGGAAGC GGAGGAGGAGGATCCGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGGGGAGGCTC TGAAATTGTGCTGACCCAGAGCCCCGGCACCCTGTCACTGTCTCCA GGCGAAAGAGCCACCCTGAGCTGCAGAGCCAGCCAGAGCGTGTCC AGCTCTTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGACAGGCCCCC AGACTGCTGATCTACGGCGCCTCTTCTAGAGCCACCGGCATCCCCG ATAGATTCAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACAA TCAGCAGACTGGAACCCGAGGACTTTGCCGTGTATTACTGCCAGC AGTACGGCAGCAGCCCCCTGACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGG AAATCAAA
186	(49B4) VLCL-轻链	见表13
314	(49B4) VHCH1 Fc节 VH (DP47) (重链1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCAREYYRGPYDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKGSGFDYWGQGTLVTVSS
315	(49B4) VHCH1 Fc穴 VL (DP47) (重链2)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCAREYYRGPYDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVL

[1033]

		TQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGA SSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGQ GTKVEIK

[1034] 所有基因在由MPSV核心启动子与CMV启动子增强子片段组合组成的嵌合MPSV启动子控制下瞬时表达。表达载体还含有用于在含有EBNA(埃巴病毒核抗原)的宿主细胞中的附加体复制的oriP区。

[1035] 通过使用聚乙烯亚胺(PEI;Polysciences Inc.)用哺乳动物表达载体共转染HEK293-EBNA细胞来生成双特异性抗Ox40/抗FAP 2+1构建物。以1:1:2比率(“载体HC1”:“载体HC2”:“载体LC”)用相应表达载体转染细胞。

[1036] 为了500mL摇瓶中的200mL生成,在转染前24小时在具有补充物的 Excell培养基(Sigma)中接种250x10^6个HEK293 EBNA细胞。为了转染,将细胞以210x g离心5分钟,并用预温热的CD-CHO培养基(Gibco)替换上清液。在20mL CD-CHO培养基中混合表达载体至200μg DNA的最终量。添加540μL PEI(1mg/mL)(Polysciences Inc.)后,将溶液漩涡震荡15秒并于室温温育10分钟。之后,将细胞与DNA/PEI溶液混合,转移至500mL摇瓶并在具有5%CO_2气氛且以165rpm摇动的温箱中于37℃温育3小时。温育后,添加160mL具有补充物(1mM丙戊酸,5g/l PepSoy,6mM L-谷氨酰胺)的 Excell培养基并将细胞培养24小时。转染后24小时,以12%终体积(24mL)和 3g/L葡萄糖(来自500g/L储液的1.2mL)对细胞补充氨基酸和葡萄糖补料。培养7天后,通过以2000-3000x g离心45分钟来收集细胞上清液。将溶液无菌过滤(0.22μm滤器),补充叠氮化钠至终浓度0.01%(w/v),并于4℃保持。

[1037] 使用MabSelectSure通过亲和层析进行自细胞培养物上清液纯化双特异性构建物。浓缩并过滤蛋白质,之后在用pH 6.0的20mM组氨酸,140mM NaCl,0.01%Tween-20溶液平衡的HiLoad Superdex 200柱(GE Healthcare)上加载。

[1038] 为了亲和层析,在用30mL 20mM柠檬酸钠,20mM磷酸钠,pH 7.5平衡的ProtA MabSelect Sure柱(CV=5mL,GE Healthcare)上加载上清液。通过用6-10个柱体积的含有20mM磷酸钠,20mM柠檬酸钠(pH 7.5)的缓冲液清洗来去除未结合的蛋白质。使用20个CV的20mM柠檬酸钠,100mM氯化钠,100mM甘氨酸,0.01%(v/v)Tween-20,pH 3.0的步骤或线性pH梯度(0 至100%)任一洗脱结合的蛋白质。然后用10个柱体积的含有20mM柠檬酸钠,100mM氯化钠,100mM甘氨酸,0.01%(v/v)Tween-20,pH 3.0的溶液清洗柱,接着是再平衡步骤。

[1039] 通过添加1/10(v/v)0.5M磷酸钠,pH8.0来调节收集的级分的pH。浓缩并过滤蛋白质,之后在用20mM组氨酸,140mM氯化钠,pH 6.0,0.01% Tween20平衡的HiLoad Superdex 200柱(GE Healthcare)上加载。

[1040] 使用基于氨基酸序列计算的摩尔消光系数,通过以280nm测量OD来测定经过纯化的双特异性构建物的蛋白质浓度。使用LabChipGXII(Caliper)通过还原剂(Invitrogen)存在和缺失下的CE-SDS来分析双特异性构建物的纯度和分子量。于25℃使用在25mM磷酸钾,125mM氯化钠,200mM单盐酸L- 精氨酸,0.02%(w/v)NaN_3,pH 6.7运行缓冲液中平衡的TSKgel G3000 SW XL分析性大小排阻柱(Tosoh)分析双特异性构建物的聚集体含量(表31)。表31:例示性双特异性,四价抗Ox40/抗FAP IgG1 P329G LALA抗原结合分子(2+1构建物)的生化分析

[1041]

克隆	产率 [mg/l]	单体 [%]	CE-SDS (非还原的)	CE-SDS (还原的)
OX40(49B4) /FAP(28H1) P329GLALA IgG1 2+1	8.3	97.25 (0.75 HMW)	100	73.7% (81.6 kDa) 0.13% (30.9 kDa) 26.8% (29.5 kDa)
OX40(49B4) /FAP(4B9) P329GLALA IgG1 2+1	7.85	99.25 (0.75 HMW)	100	58.71% (80.44 kDa) 41.29% (28.91 kDa)
OX40(49B4) / DP47 P329GLALA IgG1 2+1	5.76	97.63 (1.33 HMW)	100	73.47% (81.39 kDa) 0.11% (30.67 kDa) 26.42% (29.42 kDa)

[1042] 4.5靶向Ox40和FAP的双特异性2+1构建物的表征

[1043] 4.5.1对FAP的结合(表面等离振子共振)

[1044] 通过表面等离振子共振(SPR)评估双特异性构建物结合人,鼠和食蟹猴 FAP的能力。所有SPR实验是用HBS-EP作为运行缓冲液(0.01M HEPES pH 7.4,0.15M NaCl,3mM EDTA,0.005%表面活性剂P20,Biacore)于25℃在Biacore T200(Biacore)上实施的。

[1045] 通过以10μl/min的流速注射500nM huFAP达60秒,以20μl/min的流速注射10nM muFAP达20秒和以20μl/min的流速注射10nM cynoFAP达20秒,在固定化有抗His抗体(Qiagen,目录号34660)的CM5芯片(GE Healthcare)上捕捉带His标签的人,鼠或食蟹猴二聚体FAP。对于抗His抗体使用高至 18000个共振单位(RU)的固定化水平。测定法的设置在图12E中显示。

[1046] 在捕捉步骤后,立即以30μL/分钟的流速以范围为0.78-100nM的浓度使双特异性构建物以及对照分子通过芯片表面达280秒和180秒的解离期。通过减去在没有固定化FAP的参照流动室中获得的响应来修正本体折射率差异。使用朗格缪尔1:1曲线拟合来确定亲和力。对于二价结合,使用相同的 1:1拟合产生表观KD值。

[1047] 表32:例示性双特异性抗Ox40/抗FAP抗原结合分子对重组人FAP,鼠FAP和食蟹猴FAP的结合

[1048]

构建物	hu FAP K_D (M)	mu FAP K_D (M)	cyno FAP K_D (M)
OX40(49B4) /FAP(28H1) P329GLALA IgG1 2+1	1.9E-08	3.3E-10	3.1E-08
OX40(49B4) /FAP(4B9) P329GLALA IgG1 2+1	1.0E-09	1.1E-07	8.5E-10
OX40(49B4) / DP47 P329GLALA IgG1 2+1	n.d.	n.d.	n.d.

[1049] 注意:所有K_D依赖于具体的实验条件。

[1050] 4.5.2对人OX40的结合-二价Ox40结合的竞争结合

[1051] 为了确认两个抗OX40 Fab域均与IgG相当地结合huOX40的能力,应用基于细胞的FRET测定法(TagLite)。因此,10000个/孔用huOX40-SNAP融合物转染且用FRET供体铽

(Cisbio)标记的Hek293 EBNA细胞与0.2nM用FRET 受体d2(Cisbio)标记的(49B4)IgG混合。另外,添加来自(49B4)IgG或双特异性构建物49B4/28H1(2+1)任一的范围为0.004-750nM的浓度稀释并于RT 温育2-4小时。以用于荧光供体(铽)的620nm和以用于荧光受体染料(M100 Pro,Tecan)的665nm测量荧光信号。计算比率665/620*1000,并减去参照 (仅细胞)(图13M)。为了确定EC_{50},在Graph Pad Prism5中分析结果。观察 EC_{50}值在表33中显示。所有2+1构建物在这些实验条件下显示与二价IgG相似的EC_{50}。

[1052] 表33:IgG较之二价2+1 OX40抗原结合分子的竞争结合的EC_{50}值;t=2h

[1053]

构建物	EC_{50} (nM)
49B4 IgG1	0.87 (0.64-1.2)
OX40(49B4) /FAP(28H1) P329GLALA IgG1 2+1	1.96 (1.22-3.14)
OX40(49B4) /FAP(4B9) P329GLALA IgG1 2+1	0.93 (0.7-1.22)

[1054]

OX40(49B4) /FAP(DP47) P329GLALA IgG1 2+1	1.28 (0.95-1.72)

[1055] 4.5.3对OX40和FAP的同时结合

[1056] 通过表面等离振子共振(SPR)评估同时结合人OX40 Fc(kih)和人FAP的能力。所有SPR实验是用HBS-EP作为运行缓冲液(0.01M HEPES pH 7.4, 0.15M NaCl,3mM EDTA, 0.005%表面活性剂P20,Biacore)于25℃在 Biacore T200(Biacore)上实施的。

[1057] 将生物素化的人OX40 Fc(kih)直接偶联至链霉亲合素(SA)传感器芯片的流动室。使用高至1000个共振单位(RU)的固定化水平。

[1058] 以30μL/分钟的流速以250nM的浓度使靶向OX40和FAP的双特异性抗体流过芯片表面达90秒并将解离设为零秒。以250nM的浓度以30μL/分钟的流速注射作为第二分析物的人FAP达90秒(见图12F)。对解离监测120秒。通过减去在没有固定化蛋白质的参照流动室中获得的响应来修正本体折射率差异。

[1059] 所有双特异性构建物能同时结合人OX40和人FAP(图13J-13L)。

[1060] 4.5.4细胞上的结合

[1061] 4.5.4.1靶向OX40和FAP的双特异性抗体对幼稚的较之激活的人PBMC的结合

[1062] 如实施例2.1.2中描述的通过Ficoll密度梯度离心分离人PBMC。分离后直接使用PBMC(静息人PBMC上的结合)或刺激它们以接受T细胞的细胞表面上的强人Ox40表达(激活的人PBMC上的结合)。因此,将幼稚的PBMC在 6孔组织培养板中在供应有200U/mL Proleukin和2μg/mL PHA-L的T细胞培养基中培养4天,然后在供应有200U/mL Proleukin的T细胞培养基中在预包被的6孔组织培养板[4μg/mL抗人CD3(克隆OKT3)和2μg/mL抗人CD28(克隆CD28.2)]上于37℃和5%CO_2培养1天。

[1063] 为了检测OX40,混合幼稚的人PBMC和激活的人PBMC。为了能够区分幼稚的与激活的人PBMC,在结合测定法之前使用eFluor670细胞增殖染料(eBioscience,目录号65-0840-85)标记幼稚的细胞。然后将$1x10^5$个幼稚的,eFluor670标记的人PBMC和未标记的激活的人PBMC的一比一混合物添加至圆底悬浮细胞96孔板(greiner bio-one,cellstar,目录号650185)的每个孔并如实施例2.1.2中描述的实施结合测定法。然后将$1x10^5$个幼稚的,eFluor670标记的人PBMC和未标记的激活的人PBMC的一比一混合物添加至圆底悬浮细胞96

孔板(greiner bio-one,cellstar,目录号650185)的每个孔并如 2.1.2节中描述的实施结合测定法。

[1064] 一抗是所滴定的抗Ox40抗体构建物,于4℃温育120分钟。二抗溶液是荧光标记的抗人CD4(克隆RPA-T4,小鼠IgG1κ,BioLegend,目录号 300532),抗人CD8(克隆RPa-T8,小鼠IgG1κ,BioLegend,目录号3010441) 和异硫氰酸荧光素(FITC)缀合的AffiniPure抗人IgG Fcγ片段特异性山羊IgG F(ab')$_2$片段(Jackson ImmunoResearch,目录号109 096 098)的混合物,在黑暗中于4℃温育60分钟。将板最终在含有0.2μg/mL DAPI(Santa Cruz Biotec,目录号Sc-3598)的90μL/孔FACS缓冲液中重悬浮并在同一天使用5 激光LSR-Fortessa(BD Bioscience,带有DIVA软件)获取读数。

[1065] 如图14J和14Q中显示的,对OX40特异性的抗原结合分子无一结合静息人CD4$^+$T细胞或CD8$^+$T细胞。与之对比,所有抗原结合分子结合激活的 CD8$^+$或CD4$^+$T细胞。对CD4$^+$T细胞的结合比对CD8$^+$T细胞的结合要强得多,与实施例4.3.2.1中早就描述的相似。如图14K和14M中显示的,二价 FAP靶向性OX40构建物由于亲合力的获取而显示比单价抗体格式的相应克隆要强的对OX40阳性细胞的结合特征。2+1设计的所有格式以相似强度结合OX40阳性细胞,不依赖于第二特异性的结合模块(图140和14Q)。

[1066] 4.5.4.2对表达人FAP的肿瘤细胞的结合

[1067] 使用表达人成纤维细胞激活蛋白(huFAP)的WM266-4细胞(ATCC CRL-1676)测试对细胞表面FAP的结合。使用限于核表达NucLight红色荧光蛋白以容许与未标记的人FAP阳性WM266-4细胞分开的A549 NucLight™ Red细胞(Essenbioscience,目录号4491)测试对OX40阴性FAP阴性肿瘤细胞的结合的缺乏。遵循标准Essen方案在8μg/ml polybrene存在下以3(TU/细胞) 的MOI用Essen CellPlayer NucLight Red慢病毒(Essenbioscience,目录号4476;EF1α,嘌呤霉素)转导亲本A549(ATCC CCL-185)。这导致≥70%转导效率。

[1068] 将FACS缓冲液中5x10^{4}个未标记的WM266-4细胞和未标记的A549 NucLight™ Red细胞的混合物添加至圆底悬浮细胞96孔板(Greiner bio-one, cellstar,目录号650185)的每个孔并以如实施例4.3.2.2中描述的相似的方式实施结合测定法。于4℃将板以400x g离心4分钟并弹去上清液。将细胞用 200μL DPBS清洗一次并通过短暂且温和的漩涡震荡来重悬浮团粒。将所有样品在50μL/孔4℃冷的含有所示浓度范围(滴定的)的双特异性抗原结合分子(一抗)的FACS缓冲液中重悬浮并于4℃温育120分钟。之后,将细胞用200 μL/孔4℃FACS缓冲液清洗四次并通过短暂的漩涡震荡来重悬浮。将细胞用 25μL/孔4℃冷的含有异硫氰酸荧光素(FITC)缀合的AffiniPure抗人IgG Fcγ片段特异性山羊IgG F(ab')$_2$片段(Jackson ImmunoResearch,目录号109-096-098) 的二抗溶液进一步染色并在黑暗中于4℃温育60分钟。将板最终在90μL/孔含有0.2μg/mL DAPI(Santa Cruz Biotec,目录号Sc-3598)的FACS缓冲液中重悬浮并在同一天使用5激光LSR-Fortessa(BD Bioscience,带有DIVA软件)获取读数。

[1069] 如图15C和15E中显示的,FAP靶向性单和二价抗OX40抗原结合分子有效结合表达人FAP的靶细胞。因此,只有FAP靶向性单和二价抗OX40抗原结合分子显示直接肿瘤靶向特性。高亲和力FAP结合性克隆4B9以单价构建物显示比相同单价格式的相应FAP结合性克隆28H1要强的对人FAP的结合 (图15E)。对缺乏FAP结合域的2+1构建物没有检测到FAP(空心圆圈,图 15F)。对激活的人CD4$^+$T细胞和FAP阳性肿瘤细胞的结合的EC$_{50}$值在表34中汇总。

[1070] 表34:FAP靶向性单或二价格式的aOx40结合物(克隆49B4)对细胞表面人FAP 和人Ox40的结合的EC_{50}值

[1071]

克隆	格式	FAP^+细胞 EC_{50} [nM]	$OX40^+$细胞 EC_{50} [nM]
49B4，28H1	FAP 1+1	1.0	123.1
	FAP 2+1	70.8	6.5
	FAP 2+2	1.2	6.1
49B4，4B9	FAP 2+1	4.1	9.0
49B4，DP47	FAP 2+1	5.99	9.0

[1072] 实施例5

[1073] 双特异性抗人OX40结合分子的功能特性

[1074] 5.1表达人OX40和报告基因NFκB-萤光素酶的HeLa细胞

[1075] 如实施例3.1中显示的,通过对HeLa_hOX40_NFκB_Luc1报告细胞系添加抗OX40 P329GLALA huIgG1抗体而诱导有限的,剂量依赖性的NFκB激活。抗人IgG特异性二抗对抗OX40抗体的高交联以浓度依赖性方式强烈提高对NFκB介导的萤光素酶激活的诱导。因而,我们测试单价和二价FAP靶向性格式的选定的抗OX40结合物(8H9,1G4,49B9)单独和与通过二抗或 FAP^+肿瘤细胞系任一而实现的构建物高交联一起的NFκB激活能力。

[1076] 如实施例3.1中描述的,以$0.3x10^5$个细胞每孔的细胞密度将贴壁 HeLa_hOX40_NFκB_Luc1细胞培养过夜并用含有所滴定的FAP靶向性单价 (FAP 1+1)和二价(FAP 2+2)格式的和作为P329GLALA hu IgG1构建物的抗 OX40结合物(克隆8H9和1G4)的测定培养基刺激5至6小时。为了测试通过二抗所致高交联的影响,以1:2比率(一抗对二抗)添加25μL/孔含有二抗抗人 IgG Fcγ片段特异性山羊IgG $F(ab')_2$片段(Jackson ImmunoResearch，109-006-098)的培养基。为了测试通过细胞表面FAP结合所致高交联的影响,以2:1比率(FAP^+肿瘤细胞是报告细胞的2倍每孔)共培养25μL/孔含有 FAP^+肿瘤细胞(WM266-4和/或NIH/3T3-huFAP克隆39)的培养基。如实施例 3.1中描述的使用萤光素酶1000测定系统和报告物裂解缓冲液(都是 Promega,目录号E4550和目录号E3971)通过测量发光来量化激活的NFκB。

[1077] 如图16A-16G中显示的,对于huIgG1 P329GLALA以及FAP靶向性单/二价格式的结合物二者,所有抗OX40构建物的存在诱导有限的NFκB激活。经由抗huIgG Fcγ特异性二抗的高交联提高这种NFκB激活。对OX40的单价结合由此效率比对OX40的二价结合要低,这显示OX40受体寡聚化对于完全激活OX40信号传导轴的必要性。当使用FAP靶向性分子(实心正方形和三角形)时表达FAP的肿瘤细胞以浓度依赖性方式强烈提高对NFκB介导的萤光素酶激活的诱导。当使用非靶向性huIgG1 P329GLALA格式的相同克隆时没有看到此类效果,因为构建物不能通过FAP^+肿瘤细胞而进一步高交联。再次,二价分子优于单价分子。FAP的高表达确保FAP靶向性构建物更高的交联和因此更好的激动效果(比较FAP高NIH/3T3-huFAP克隆39和FAP阳性 WM266-4细胞的实心菱形)。二价FAP靶向性构建物以约0.1至1nM的浓度在 FAP^+肿瘤细胞存在下显示峰活性。进一步提高化合物浓度实际降低它诱导 NFκB的能力。最有可能的是,只结合一种靶物(FAP或OX40)的二价构建物以更高浓度存在,竞争胜过

同时结合FAP和OX40的构建物。这种交联损失继而降低激动性OX40信号传导。

[1078] 在又一项实验中，以0.2x10^{5}个细胞每孔的细胞密度将贴壁 HeLa_hOX40_NFκB_Luc1细胞培养过夜并用含有所滴定的FAP靶向性单价(FAP 1+1)和二价(FAP 2+1和FAP 2+2)格式的和作为P329GLALAhu IgG1构建物的抗OX40结合物(克隆49B9)的测定培养基刺激5小时。FAP以2+1用两种不同FAP结合性克隆实现靶向，具有针对FAP的低亲和力的28H1和具有针对FAP的高亲和力的4B9。为了测试通过二抗所致高交联的影响，以1:2比率 (一抗对二抗)添加25μL/孔含有二抗抗人IgG Fcγ片段特异性山羊IgG F(ab')$_2$片段(Jackson ImmunoResearch，109-006-098)的培养基。为了测试通过细胞表面FAP结合所致高交联的影响，以4:1比率(FAP$^+$肿瘤细胞是报告细胞的4 倍每孔)共培养25μL/孔含有FAP$^+$肿瘤细胞(NIH/3T3-huFAP克隆19)的培养基。如实施例3.1中描述的使用萤光素酶1000测定系统和报告物裂解缓冲液 (都是Promega，目录号E4550和目录号E3971)通过测量发光来量化激活的NFκB。

[1079] 如图16H和16J-16N中，还有这个实验中显示的，所有抗OX40构建物的存在诱导有限的NFκB激活。对于FAP靶向性单/二价格式的所有结合物，经由抗huIgG Fcγ特异性二抗的高交联提高这种NFκB激活。对OX40的单价结合由此效率比对OX40的二价结合要低，这显示OX40受体寡聚化对于完全激活OX40信号传导轴的必要性(图16J，比较EC$_{50}$值)。当使用FAP靶向性分子(实心正方形，三角形，半实心圆圈)时表达FAP的肿瘤细胞以浓度依赖性方式强烈提高对NFκB介导的萤光素酶激活的诱导。当2+1格式的FAP结合模块用非结合性DP47单元替换时没有看到此类效果(空心圆圈)，因为构建物不能通过FAP$^+$肿瘤细胞而进一步高交联。再次，二价分子优于单价分子 (比较EC$_{50}$值)。单价FAP靶向性和二价OX40靶向性构建物(2+1)在FAP$^+$肿瘤细胞存在下显示最高的高台活性。与单价OX40结合性1+1构建物形成对比，2+1格式对OX40的二价结合通过OX40的寡聚化而提高激动能力(对EC$_{50}$值的影响)。然而，由于2+1构建物对FAP的单价结合，看来能交联与二价 FAP结合性2+2格式相比两倍的分子，这可以解释更高的高台OX40激活(图 16K，更高的高台)。

[1080] 5.2 OX40介导亚最佳TCR触发的预激活的人CD4 T细胞的共刺激

[1081] 还对FAP靶向性单价或二价格式的选定结合物(克隆8H9和1G4)测试当它们表面固定化时它们共激活T细胞的能力。

[1082] 如实施例3.2中描述的，将预激活的CFSE标记的OX40阳性CD4 T细胞在板表面上固定化的所滴定的抗Ox40抗体存在下用亚最佳浓度的板固定化的抗CD3抗体刺激72小时。经由通过流式细胞术监测总细胞计数和活细胞中的CFSE稀释来分析对T细胞存活和增殖的影响。另外，将细胞用荧光标记的针对T细胞激活和分化标志物，例如CD127，CD45RA，Tim-3，CD62L 和OX40自身的抗体共染色。

[1083] 板固定化的双特异性抗OX40抗原结合分子的共刺激以剂量依赖性方式强烈增强板固定化的抗人CD3对预激活的人CD4 T细胞的亚最佳刺激(图17A 和17B)。T细胞增殖更强，以更高百分比的CD127^{低}T细胞，Tim-3^{阳性}和OX40 ^{阳性}激活的细胞显示更加成熟的表型(对于克隆8H9，只显示粒性(SSC)的升高)。对OX40的单价结合(三角形符号)由此效率比对OX40的二价结合(正方形符号)要低，这显示OX40受体寡聚化对于完全激活Ox40信号传导轴的必要性。所分析的T细胞激活的所有参数的半最大变化以范围为3至2300pM的浓度实现且对于克隆1G4在图18A-18D和表35中汇总。

[1084] 表35:用板固定化的FAP靶向性单和二价抗Ox40(克隆1G4)构建物挽救亚最佳TCR刺激的EC_{50}值

[1085]

克隆	格式	EC_{50} [nM]	+/- SEM
1G4	hu IgG1	0.37	0.03
	FAP 1+1	2.23	0.05
	FAP 2+2	0.75	0.16

[1086] 5.3 Ox40介导亚最佳TCR触发的静息人PBMC的共刺激和细胞表面FAP所致高交联

[1087] 实施例5.1中显示添加FAP^+肿瘤细胞能通过提供OX40受体的强寡聚化而强烈提高人OX40阳性报告细胞系中由FAP靶向性单和二价抗OX40构建物诱导的NFκB活性。同样,我们在NIH/3T3-huFAP克隆39细胞存在下对FAP 靶向性单(1+1)和二价(2+1,2+2)抗OX40构建物测试它们挽救静息人PBMC 细胞的亚最佳TCR刺激的能力。

[1088] 人PBMC制备物含有(1)静息OX40阴性$CD4^+$和$CD8^+$T细胞和(2)在它们的细胞表面上具有各种Fcγ受体分子的抗原呈递细胞,例如B细胞和单核细胞。在静息的Ox40阴性$CD4^+$和$CD8^+$T细胞上,人IgG1同种型的抗人CD3抗体能以它的Fc部分结合存在的Fcγ受体分子并介导延长的TCR激活。然后这些细胞在数小时内开始表达OX40。针对OX40的功能性激动性化合物能经由激活的$CD8^+$和$CD4^+$T细胞上存在的OX40受体而发信号并支持TCR介导的刺激。

[1089] 将静息的CFSE标记的人PBMC在经过照射的FAP^+NIH/3T3-huFAP克隆 39细胞和所滴定的抗Ox40构建物存在下用亚最佳浓度的抗CD3抗体刺激4至 5天。经由通过流式细胞术监测总细胞计数和活细胞中的CFSE稀释来分析对T细胞存活和增殖的影响。另外,将细胞用荧光标记的针对T细胞激活和成熟标志物CD25,粒酶B,CD62L和CD127的抗体共染色。在第二项实验中,将细胞用荧光标记的针对T细胞激活和成熟标志物CD25,和Tim-3的抗体共染色。

[1090] 于37℃使用细胞解离缓冲液(Invitrogen,目录号13151-014)10分钟来收获小鼠胚胎成纤维细胞NIH/3T3-huFAP克隆39细胞(实施例4.3.2.2)。将细胞用DPBS清洗一次。以$0.2x10^5$个细胞每孔的密度将NIH/3T3-huFAP克隆39细胞在温箱(Hera Cell 150)中在无菌96孔圆底贴壁组织培养板(TPP,目录号 92097)中在T细胞培养基中于37℃和5%CO_2培养过夜。次日,使用4500拉德的剂量在X射线照射器中照射它们以防止稍后肿瘤细胞系对人PBMC的过度生长(overgrowth)。

[1091] 如实施例2.1.2中描述的通过Ficoll密度离心来分离人PBMC并用CFSE标记。以$0.75x10^5$个细胞每孔(第一项实验)或$0.5x10^5$个细胞每孔(第二项实验) 的密度将细胞添加至每个孔。添加终浓度[10nM]的抗人CD3抗体(克隆V9,人IgG1)和所示浓度的FAP靶向性单和二价抗OX40抗原结合分子。将细胞在温箱(Hera Cell 150)中于37℃和5%CO_2激活4至5天。然后,于4℃将细胞用荧光染料缀合的抗人CD4(克隆RPA-T4,BioLegend,目录号300532),CD8 (克隆RPa-T8,BioLegend,目录号3010441),CD25(克隆M-A251, BioLegend,目录号356112),CD127(克隆A019D5,Biolegend,目录号 351234)和CD62L(克隆DREG 56,Biolegend,目录号304834)或Tim-3(克隆 F38-E2E,Biolegend,目录号345012)抗体表面染色30分钟。为了使细胞膜透化,将细胞团粒用FACS缓冲液清洗两次,然后在黑暗中于室温在50μL/ 孔新鲜制备的FoxP3固定/透化缓冲液(eBioscience,目录号00-5123和 00-5223)中重悬浮45分钟。用透化-清洗缓冲液(eBioscience,目录号 00-8333-56)清洗三次后,将细

胞在黑暗中于室温用25μL/孔含有抗人粒酶B 抗体(克隆GB-11,BD Bioscience,目录号561142)的透化-清洗缓冲液细胞内染色1小时。在85μL/孔FACS缓冲液中重悬浮细胞并使用5激光Fortessa流式细胞仪(BD Bioscience,带有DIVA软件)获取读数。

[1092] 如图20A-20H中显示的,用非靶向性抗Ox40(8H9)huIgG1 P329GLALA (空心正方形)进行共刺激并不挽救亚最佳TCR刺激的CD4和CD8 T细胞。FAP靶向性单(实心三角形)和二价(实心正方形)抗OX40构建物通过存在的 NIH/3T3-huFAP克隆39细胞的高交联在人CD4和CD8 T细胞中强烈促进增殖,存活并诱导增强的激活表型。对于高亲和力克隆8H9(图20A-20H),单价和二价双特异性抗原结合分子具有相当的挽救亚最佳TCR刺激的能力。再次,两种构建物均显示约0.1-1nM处的峰活性和更高浓度处降低的响应。与NFκB报告细胞系(图16A-16H和16J-16M)中的发现相似,这可能是只结合FAP或OX40的构建物和同时结合两种靶物并由此提供必要的交联的构建物之间靶物结合的竞争的后果。当在FAP靶向性单价较之二价抗OX40构建物中测试低亲和力克隆1G4时,这种作用不太突出(图21A-21C)。在这里,单价抗体明显劣于二价构建物。这在以曲线下面积量化每种构建物的激动能力并针对彼此绘图时能最好地领会(图21A-21C)。

[1093] 在第二项实验中获得的数据分别在图21D-21H和图21J-21N中显示。如图21D-21H中显示的,用非靶向性抗Ox40(49B4)2+1DP47格式进行的共刺激(空心圆圈)并不挽救亚最佳TCR刺激的CD4和CD8 T细胞。在人CD4和 CD8 T细胞中,FAP靶向性单(实心三角形)和二价(实心正方形,半实心圆圈) 抗OX40构建物通过存在的NIH/3T3-huFAP克隆39细胞的高交联强烈促进存活并诱导增强的激活表型。单价抗OX40构建物(1+1;实心三角形)比二价抗OX40靶向构建物(半实心圆圈,实心正方形)不太能够挽救TCR刺激。二价 FAP结合性2+2构建物早就能够在与单价FAP结合性2+1构建物相比要低的浓度挽救亚最佳TCR刺激。在2+1格式中,高亲和力FAP结合性克隆4B9明显优于低亲和力克隆28H1(图21J-21N)。这提示观察到的生物活性的EC_{50}值是由对FAP的结合驱动的(2+2>2+1(4B9)>2+1(28H1))。这在以曲线下面积针对所分析的标志物量化每种构建物的激动能力并针对彼此绘图时能最好地领会(图21P)。

[1094] 5.4通过使用人IgG1 P329GLALA格式来防止ADCC

[1095] 人IgG1类的抗体能通过结合ADCC胜任性细胞,例如NK细胞上的Fcγ受体(FcγR)来诱导抗原阳性靶细胞的抗体依赖性细胞死亡(ADCC)。如此, ADCC胜任性Ox40抗体能介导最近激活的,$Ox40^{+}$T细胞的裂解并减少肿瘤反应性T细胞的集合。在抗体的Fc部分中引入IgG1P329GLALA突变防止对 FcγR的结合(国际专利申请公开号WO 2012/130831 A1)和因此在NK细胞存在下的ADCC。然而,并不改变对FcN受体的结合以确保抗体的IgG样药动学。

[1096] 将选定的克隆转变成常规人IgG1格式以测试它们诱导ADCC的能力。为了测试ADCC能力,在抗OX40抗体(人IgG1或人IgG1-P329GLALA格式)的系列稀释行存在下以3:1的E:T比率共培养PKh26标记的OX40阳性肿瘤细胞 (HeLa_hOX40_NFκB_Luc1报告细胞系)和新鲜分离的NK细胞。使用乳酸脱氢酶(LDH)的释放和DAPI阳性肿瘤细胞的量来量化NK细胞介导的ADCC。

[1097] 简言之,如实施例2.3.2中描述的使用PKH-26红荧光细胞接头试剂盒 (Sigma,目录号PKH26GL)标记HeLa_hOX40_NFκB_Luc1细胞(实施例3.1)。以$0.5x10^{5}$个细胞每孔的密度将PKH-26标记的HeLa_hOx40_NFκB_luc1细胞在温箱(Hera Cell 150)中在无菌96孔圆底贴

壁组织培养板(TPP,目录号 92097)中在AIM V培养基(Gibco,目录号12055-09)中于37℃和5%CO_2接种过夜。次日,如实施例2.1.2中描述的通过Ficoll密度梯度离心来分离人 PBMC。依照制造商的说明书使用MACS阴性NK细胞分离试剂盒,人 (Miltenyi Biotec,产品目录130-092-657)实施NK细胞分离。在AIM V培养基中以1.5x10^5个细胞每孔的密度添加NK细胞,产生3:1的E:T比率。以所示浓度添加抗OX40抗体(人IgG1或人IgG1 P329GLALA)并将板在温箱(Hera Cell 150)中于37℃和5%CO_2温育过夜。4小时后,取样100μL上清液用于LDH分析并用新鲜的AIM-V培养基替换培养基。在SpectraMax M5/M5^e(Molecular Devices)微量板读数仪(滤光器490nm-650nM,1ms积分时间)上依照制造商是说明书使用细胞毒性检测试剂盒-LDH(Roche,目录号11644793001)量化LDH活性。

[1098] 24小时后,使用胰蛋白酶使细胞解离。将细胞用荧光标记的抗人CD56 (克隆NCAM16.2,小鼠IgG1κ,BioLegend,目录号562751),抗人CD25(克隆MA251,小鼠IgG1κ,BioLegend,目录号356116)和抗人CD69(克隆 FN50,小鼠IgG1κ,BioLegend,目录号356116)染色,在黑暗中于4℃温育 20分钟。将板最终在80μL/孔含有0.2μg/mL DAPI(Santa Cruz Biotec,目录号Sc-3598)的FACS缓冲液中重悬浮并在同一天使用5激光LSR-Fortessa(BD Bioscience,带有DIVA软件)获取读数。

[1099] ADCC胜任性人IgG1格式的所有Ox40抗体能够以与针对EGFR的ADCC 胜任性参照抗体(GA201)相似的程度诱导Ox40阳性细胞的裂解。IgGP329GLALA格式的克隆并不介导ADCC(见图22A和22B)。

[1100] 在我们的靶向性格式的Fc部分中引入IgG1 P329GLALA突变防止对 FcγR的结合(国际专利申请公开号WO 2012/130831 A1)和因此在NK细胞存在下的ADCC。然而,并不改变对FcN受体的结合以确保抗体的IgG样药动学。与早就存在的OX40抗体形成对比,本发明的双特异性抗体通过结合 FAP阳性肿瘤细胞或成纤维细胞而提供最佳激动性OX40信号传导必须的高交联。对许多肿瘤适应症报告了与成纤维细胞相关的肿瘤上或肿瘤细胞自身上的FAP阳性。如此,双特异性格式具有在系统性激活缺失下在肿瘤微环境中强烈的OX40介导的激动作用的潜力,这可能防止免疫相关毒性。与常规抗OX40抗体相反,本发明的双特异性抗原结合分子并不诱导最近激活的 OX40阳性效应T细胞的ADCC。如此,双特异性抗体可具有再激活先前存在但受到阻抑的针对肿瘤细胞的获得性免疫应答的潜力且能有效用于癌症患者的治疗。

[1101] 实施例6

[1102] 4-1BB抗体和工具结合物的生成

[1103] 6.1用于通过噬菌体展示生成新颖的4-1BB结合物的抗原和筛选工具的制备,纯化和表征

[1104] 在节(Merchant et al.,1998)上与人IgG1重链CH2和CH3域同框亚克隆编码人,小鼠或食蟹猴4-1BB的外域的DNA序列(表36)。在抗原外域和人IgG1 的Fc之间引入AcTEV蛋白酶切割位点。在抗原-Fc节的C端处引入用于定向生物素化的Avi标签。含有S354C/T366W突变的抗原-Fc节链与含有 Y349C/T366S/L368A/Y407V突变的Fc穴链的组合容许生成包括一个拷贝的含有4-1BB外域的链的异二聚体,从而创建单体形式的连接有Fc的抗原(图 1A)。表37显示抗原Fc融合构建物的cDNA和氨基酸序列。

[1105] 表36:抗原外域(ECD)的氨基酸编号方式及其起源

[1106]

SEQ ID NO:	构建物	起源	ECD
39	人4-1BB ECD	依照Q07011合成	aa 24-186
240	食蟹猴4-1BB ECD	自食蟹猴血液分离	aa 24-186
241	鼠4-1BB ECD	依照P20334合成	aa 24-187

[1107] 表37:单体抗原Fc(kih)融合分子(通过组合一条Fc穴链与一条抗原Fc节链而生成的)的cDNA和氨基酸序列

[1108]

SEQ ID NO:	抗原	序列
124	核苷酸序列 Fc穴链	见表2
242	核苷酸序列 人4-1BB抗原 Fc节链	CTGCAGGACCCCTGCAGCAACTGCCCTGCCGGCACCTTCTGCGACA ACAACCGGAACCAGATCTGCAGCCCCTGCCCCCCCAACAGCTTCAG CTCTGCCGGCGGACAGCGGACCTGCGACATCTGCAGACAGTGCAAG GGCGTGTTCAGAACCCGGAAAGAGTGCAGCAGCACCAGCAACGCCG AGTGCGACTGCACCCCCGGCTTCCATTGTCTGGGAGCCGGCTGCAGC ATGTGCGAGCAGGACTGCAAGCAGGGCCAGGAACTGACCAAGAAG GGCTGCAAGGACTGCTGCTTCGGCACCTTCAACGACCAGAAGCGGG GCATCTGCCGGCCCTGGACCAACTGTAGCCTGGACGGCAAGAGCGT GCTGGTCAACGGCACCAAAGAACGGGACGTCGTGTGCGGCCCCAGC CCTGCTGATCTGTCTCCTGGGGCCAGCAGCGTGACCCCTCCTGCCCC TGCCAGAGAGCCTGGCCACTCTCCTCAGGTCGACGAACAGTTATATT TTCAGGGCGGCTCACCCAAATCTGCAGACAAAACTCACACATGCCC ACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCT TCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA GGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTC AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACAC CCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTG TGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCC CGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCG TGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC CTGTCTCCGGGTAAATCCGGAGGCCTGAACGACATCTTCGAGGCCC AGAAGATTGAATGGCACGAG
243	核苷酸序列 食蟹猴4-1BB抗原 Fc节链	TTGCAGGATCTGTGTAGTAACTGCCCAGCTGGTACATTCTGTGATAA TAACAGGAGTCAGATTTGCAGTCCCTGTCCTCCAAATAGTTTCTCCA GCGCAGGTGGACAAAGGACCTGTGACATATGCAGGCAGTGTAAAGG TGTTTTCAAGACCAGGAAGGAGTGTTCCTCCACCAGCAATGCAGAG TGTGACTGCATTTCAGGGTATCACTGCCTGGGGGCAGAGTGCAGCA TGTGTGAACAGGATTGTAAACAAGGTCAAGAATTGACAAAAAAAGG TTGTAAAGACTGTTGCTTTGGGACATTTAATGACCAGAAACGTGGCA TCTGTCGCCCCTGGACAAACTGTTCTTTGGATGGAAAGTCTGTGCTT GTGAATGGGACGAAGGAGAGGGACGTGGTCTGCGGACCATCTCCAG CCGACCTCTCTCCAGGAGCATCCTCTGCGACCCCGCCTGCCCCTGCG AGAGAGCCAGGACACTCTCCGCAGGTCGACGAACAGTTATATTTTC AGGGCGGCTCACCCAAATCTGCAGACAAAACTCACACATGCCCACC GTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCC CCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAG TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA TCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCT GCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGG TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGT GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGG

[1109]

		ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGAT GCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTG TCTCCGGGTAAATCCGGAGGCCTGAACGACATCTTCGAGGCCCAGA AGATTGAATGGCACGAG
244	核苷酸序列 鼠4-1BB抗原 Fc节链	GTGCAGAACAGCTGCGACAACTGCCAGCCCGGCACCTTCTGCCGGA AGTACAACCCCGTGTGCAAGAGCTGCCCCCCCAGCACCTTCAGCAG CATCGGCGGCCAGCCCAACTGCAACATCTGCAGAGTGTGCGCCGGC TACTTCCGGTTCAAGAAGTTCTGCAGCAGCACCCACAACGCCGAGT GCGAGTGCATCGAGGGCTTCCACTGCCTGGGCCCCCAGTGCACCAG ATGCGAGAAGGACTGCAGACCCGGCCAGGAACTGACCAAGCAGGG CTGTAAGACCTGCAGCCTGGGCACCTTCAACGACCAGAACGGGACC GGCGTGTGCCGGCCTTGGACCAATTGCAGCCTGGACGGGAGAAGCG TGCTGAAAACCGGCACCACCGAGAAGGACGTCGTGTGCGGCCCTCC CGTGGTGTCCTTCAGCCCTAGCACCACCATCAGCGTGACCCCTGAAG GCGGCCCTGGCGGACACTCTCTGCAGGTCCTGGTCGACGAACAGTT ATATTTTCAGGGCGGCTCACCCAAATCTGCAGACAAAACTCACACA TGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTT CCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG GTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGA GAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT GTACACCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTC AGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAC GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGC TCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATG CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC CTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATCCGGAGGCCTGAACGACATCTTCGA GGCCCAGAAGATTGAATGGCACGAG
128	Fc穴链	见表2
245	人4-1BB抗原 Fc节链	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVF RTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKD CCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSP GASSVTPPAPAREPGHSPQVDEQLYFQGGSPKSADKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE
246	食蟹猴4-1BB 抗原 Fc节链	LQDLCSNCPAGTFCDNNRSQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVF KTRKECSSTSNAECDCISGYHCLGAECSMCEQDCKQGQELTKKGCKDC CFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPG ASSATPPAPAREPGHSPQVDEQLYFQGGSPKSADKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE
247	鼠4-1BB抗原 Fc节链	VQNSCDNCQPGTFCRKYNPVCKSCPPSTFSSIGGQPNCNICRVCAGYFR FKKFCSSTHNAECECIEGFHCLGPQCTRCEKDCRPGQELTKQGCKTCSL GTFNDQNGTGVCRPWTNCSLDGRSVLKTGTTEKDVVCGPPVVSFSPST TISVTPEGGPGGHSLQVLVDEQLYFQGGSPKSADKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE

[1110] 将所有4-1BB-Fc融合分子编码序列克隆入自MPSV启动子驱动插入物表达且含有位于CDS的3’端的合成的polyA信号序列的质粒载体。另外，载体含有用于质粒的附加体维持的EBV OriP序列。

[1111] 为了制备生物素化的单体抗原/Fc融合分子,用编码融合蛋白的两种成分(节和穴链)以及BirA(生物素化反应必需的一种酶)的三种载体共转染指数式生长中的悬浮HEK293 EBNA细胞。以2:1:0.05比率("抗原 ECD-AcTEV-Fc节":"Fc穴":"BirA")使用相应载体。

[1112] 为了在500ml摇瓶中生成蛋白质,在转染前24小时接种400x10^6个 HEK293 EBNA细胞。为了转染,将细胞以210g离心5分钟并用预温热的CD CHO培养基替换上清液。将表达载体在含有200μg载体DNA的20mL CD CHO培养基中重悬浮。添加540μL聚乙烯亚胺(PEI)后,将溶液漩涡震荡15 秒并于室温温育10分钟。之后,将细胞与DNA/PEI溶液混合,转移至500 mL摇瓶并在具有5%CO_2气氛的温箱中于37℃温育3小时。温育后,添加160 mL F17培养基并将细胞培养24小时。生成培养基补充有5μM几夫碱 (kifunensine)。转染后1天,对培养物添加1mM丙戊酸和7%补料。培养7天后,通过以210g 15分钟旋转下细胞来收集细胞上清液。将溶液无菌过滤 (0.22μm滤器),补充叠氮化钠至终浓度0.01%(w/v),并于4℃保持。

[1113] 通过使用蛋白A的亲和层析,继以大小排阻层析自细胞培养物上清液纯化分泌的蛋白质。为了亲和层析,在用40mL 20mM磷酸钠,20mM柠檬酸钠pH 7.5平衡的HiTrap蛋白A HP柱(CV=5mL,GE Healthcare)上加载上清液。通过用至少10个柱体积的含有20mM磷酸钠,20mM柠檬酸钠,0.5M 氯化钠(pH 7.5)的缓冲液清洗来去除未结合的蛋白质。使用在20个柱体积的 20mM柠檬酸钠,0.01%(v/v)Tween-20,pH 3.0上创建的氯化钠的线性pH 梯度(0至500mM)洗脱结合的蛋白质。然后用10个柱体积的含有20mM柠檬酸钠,500mM氯化钠,0.01%(v/v)Tween-20,pH 3.0的溶液清洗柱。通过添加1/40(v/v)2M Tris,pH 8.0来调节收集的级分的pH。浓缩并过滤蛋白质,之后在用pH 7.4的2mM MOPS,150mM氯化钠,0.02%(w/v)叠氮化钠溶液平衡的HiLoad Superdex 200柱(GE Healthcare)上加载。

[1114] 6.2来自一般F(ab)文库的4-1BB特异性12B3,25G7,11D5,9B11和20G2抗体的选择

[1115] 自Fab格式的一般噬菌体展示抗体文库(DP88-4)选择具有针对人和食蟹猴4-1BB的特异性的抗体11D5,9B11,和12B3。自相同的文库还选择另外的具有针对鼠4-1BB的反应性的抗体,克隆20G2。这种文库是使用包含轻链CDR3(L3,3种不同长度)和重链CDR3(H3,3种不同长度)中的随机化序列间隙的V域配对Vk1_5(κ轻链)和VH1_69(重链)基于人种系基因构建的。文库生成是通过交叠延伸(SOE)PCR应用剪接,通过装配3种PCR扩增片段而实施的。片段1包含抗体基因的5'端,包括随机化L3,片段2是中央恒定片段,跨越L3至H3,而片段3包含随机化H3和抗体基因的3'部分。分别使用下面的引物组合来生成用于DP88-4文库的这些文库片段:片段1(正向引物LMB3与反向引物Vk1_5_L3r_S或Vk1_5_L3r_SY或Vk1_5_L3r_SPY组合),片段2(正向引物RJH31与反向引物RJH32组合)和片段3(正向引物 DP88-v4-4或DP88-v4-6或DP88-v4-8与反向引物fdseqlong组合)。用于生成文库片段的PCR参数是初始变性5分钟94℃,25个循环的1分钟94℃,1分钟 58℃,1分钟72℃和终末延长10分钟72℃。为了装配PCR,使用等摩尔比率的凝胶纯化的单一片段作为模板,参数是初始变性3分钟94℃和5个循环的 30秒94℃,1分钟58℃,2分钟72℃。在这个阶段,添加外部引物(LMB3和fdseqlong)并实施另外20个循环,之后是终末延长10分钟72℃。装配足够量的全长随机化Fab构建物后,将它们用NcoI/NheI消化并连接入类似处理的受体噬菌粒载体。将经过纯化的连接体系用于约60次电感受态大肠杆菌 TG1的转化。挽救展示Fab文库的噬菌粒颗粒并通过PEG/NaCl纯化来纯化,待用于选择。将这些文库构建步骤重复三次以获得最终文库容量4.4×10^9。通过点印迹中的C端标签检测测定的功能性克隆的百分比分别是轻链的

92.6％和重链的93.7％。

[1116] 自Fab格式的一般噬菌体展示抗体文库(λ-DP47)选择具有针对人和食蟹猴4-1BB的特异性的抗体25G7。这种文库是使用包含轻链CDR3(L3,3种不同长度)和重链CDR3(H3,3种不同长度)中的随机化序列间隙的V域配对 Vl3_19(λ轻链)和VH3_23(重链)基于人种系基因构建的。文库生成是通过交叠延伸(SOE)PCR应用剪接,通过装配3种PCR扩增片段而实施的。片段1包含抗体基因的5'端,包括随机化L3,片段2是中央恒定片段,跨越L3至H3,而片段3包含随机化H3和抗体基因的3'部分。分别使用下面的引物组合来生成用于λ-DP47文库的这些文库片段:片段1(正向引物LMB3与反向引物 Vl_3_19_L3r_V或Vl_3_19_L3r_HV或Vl_3_19_L3r_HLV组合),片段2(正向引物RJH80与反向引物MS63组合)和片段3(正向引物DP47-v4-4或DP47-v4-6 或DP47-v4-8与反向引物fdseqlong组合)。用于生成文库片段的PCR参数是初始变性5分钟94℃,25个循环的1分钟94℃,1分钟58℃,1分钟72℃和终末延长10分钟72℃。为了装配PCR,使用等摩尔比率的凝胶纯化的单一片段作为模板,参数是初始变性3分钟94℃和5个循环的30秒94℃,1分钟58℃, 2分钟72℃。在这个阶段,添加外部引物(LMB3和fdseqlong)并实施另外20 个循环,之后是终末延长10分钟72℃。装配足够量的全长随机化Fab构建物后,将它们用NcoI/NheI消化并连接入类似处理的受体噬菌粒载体。将经过纯化的连接体系用于约60次电感受态大肠杆菌TG1的转化。挽救展示Fab文库的噬菌粒颗粒并通过PEG/NaCl纯化来纯化,待用于选择。获得了最终文库容量9.5×10^{9}。通过点印迹中的C端标签检测测定的功能性克隆的百分比分别是轻链的81.1％和重链的83.2％。

[1117] 表38显示一般噬菌体展示抗体文库(DP88-4)的序列,表39提供文库 DP88-4种系模板的cDNA和氨基酸序列,而表40显示用于生成DP88-4种系模板的引物序列。

[1118] 表38:一般噬菌体展示抗体文库(DP88-4)的序列

[1119]

SEQ ID NO:	描述	序列
132	核苷酸序列 pRJH33文库模板 DP88-4 文库；完整Fab编码区，包含PelB前导序列+Vk1_5 κ V域+用于轻链的CL恒定域和PelB+VH1_69 V域+用于重链的CH1恒定域，包括标签	TGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCG CGGCCCAGCCGGCCATGGCCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCT TCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCATCACTTGC CGTGCCAGTCAGAGTATTAGTAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCA GAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCA GTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGCGGCAGTGGATCC GGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGCAGCTTGCAGCCTGATGA TTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTATTCTACGTT TGGCCAGGGCACCAAAGTCGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCAC CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTG GAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG AGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGT AACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCA CCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTAC GAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCT GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGGA GCCGCAGAACAAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATGGAG CCGCAGACTACAAGGACGACGACGACAAGGGTGCCGCATAATA AGGCGCGCCAATTCTATTTCAAGGAGACAGTCATATGAAATACC TGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCTGCCCAGC CGGCGATGGCCCAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTG AAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGG AGGCACATTCAGCAGCTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCC CTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTT GGTACAGCAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCAT TACTGCAGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCA GCCTGAGATCTGAGGACACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGACTA TCCCCAGGCGGTTACTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGAC

[1120]

		CACCGTGACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAAGGCCCATCGGTCT TCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCG GCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC GGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCT TCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCG TGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATC TGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAAGTGGACAAGA AAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACGCGGCCGCAAGCACTAGTGCC CATCACCATCACCATCACGCCGCGGCA

[1121] 表39：文库DP88-4种系模板的cDNA和氨基酸序列

[1122]

SEQ ID NO:	描述	序列
133	核苷酸序列 Fab 轻链 Vk1_5	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAG GAGACCGTGTCACCATCACTTGCCGTGCCAGTCAGAGTATTAGTAG CTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCT CCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCACGT TTCAGCGGCAGTGGATCCGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGC AGCTTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATA ATAGTTATTCTACGTTTGGCCAGGGCACCAAAGTCGAGATCAAGC GTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGA GCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC TTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCC CTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGC AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAA GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCAT CAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG TGTGGAGCCGCAGAACAAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAAT GGAGCCGCAGACTACAAGGACGACGACGACAAGGGTGCCGCA
134	Fab 轻链 Vk1_5	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YDASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYNSYSTF GQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGAAEQKLISEEDLNGAADYKDDDDK GAA
135	核苷酸序列 Fab 重链 VH1_69	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG TCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGC AGCTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTC GAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTAC GCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCC ACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTACTATG TTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCAG CTAGCACCAAAGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAA GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTG ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGAC TCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACAC CAAAGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACGCGGCCGC AAGCACTAGTGCCCATCACCATCACCATCACGCCGCGGCA
136	Fab 重链 VH1_69	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCARLSPGGYYVMDAWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDAAASTSAHHHH HHAAA

[1123] 表40:用于生成DP88-4文库的引物序列

[1124]

SEQ	引物名称	引物序列5' – 3'

[1125]

ID NO:		
137	LMB3	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC
138	Vk1_5_L3r_S	CTCGACTTTGGTGCCCTGGCCAAACGTS***BA***A***TA*** C***GA***A***TT***A***TA***CTGTTGGCAGTAATAAGTTGCAAAATCAT 下划线：60%原始碱基和40%随机化为M 粗体且斜体：60%原始碱基和40%随机化为N
139	Vk1_5_L3r_SY	CTCGACTTTGGTGCCCTGGCCAAACGTM***HR***S***GR***A***TA***C***GA***A***TT***A***T A***CTGTTGGCAGTAATAAGTTGCAAAATCAT 下划线：60%原始碱基和40%随机化为M 粗体且斜体：60%原始碱基和40%随机化为N
140	Vk1_5_L3r_SPY	CTCGACTTTGGTGCCCTGGCCAAACGTM***HH***M***SS***S***GR***A***TA***C***GA***A ***TT***A***TA***CTGTTGGCAGTAATAAGTTGCAAAATCAT 下划线：60%原始碱基和40%随机化为M 粗体且斜体：60%原始碱基和40%随机化为N
141	RJH31	ACGTTTGGCCAGGGCACCAAAGTCGAG
142	RJH32	TCTCGCACAGTAATACACGGCGGTGTCC
143	DP88-v4-4	GGACACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGA-1-2-2-3-4-GAC-TAC-TG GGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCC 1: G/D = 20%, E/V/S = 10%, A/P/R/L/T/Y=5%; 2: G/Y/S=15%, A/D/T/R/P/L/V/N/W/F/I/E = 4,6%; 3: G/A/Y = 20%, P/W/S/D/T = 8%; 4: F = 46%, L/M = 15%, G/I/Y = 8%.
144	DP88-v4-6	GGACACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGA-1-2-2-2-2-3-4-GAC-TAC -TGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCC 1: G/D = 20%, E/V/S = 10%, A/P/R/L/T/Y=5%; 2: G/Y/S=15%, A/D/T/R/P/L/V/N/W/F/I/E = 4,6%; 3: G/A/Y = 20%, P/W/S/D/T = 8%; 4: F = 46%, L/M = 15%, G/I/Y = 8%.
145	DP88-v4-8	GGACACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGA-1-2-2-2-2-2-2-3-4-GAC-TAC-TGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCC 1: G/D = 20%, E/V/S = 10%, A/P/R/L/T/Y=5%; 2: G/Y/S=15%, A/D/T/R/P/L/V/N/W/F/I/E = 4,6%; 3: G/A/Y = 20%, P/W/S/D/T = 8%; 4: F = 46%, L/M = 15%, G/I/Y = 8%.
146	fdseqlong	GACGTTAGTAAATGAATTTTCTGTATGAGG

[1126] 表41显示用于PCR的一般噬菌体展示λ-DP47文库(V13_19/VH3_23)模板的序列。表42提供λ-DP47文库(V13_19/VH3_23)种系模板的cDNA和氨基酸序列，而表43显示用于生成λ-DP47文库(V13_19/VH3_23)的引物序列。

[1127] 表41：用于PCR的一般噬菌体展示λ-DP47文库(V13_19/VH3_23)模板的序列

[1128]

SEQ ID NO:	描述	序列
158	**λ-DP47 文 库 Vl3_19/VH3_23** 的pRJH53文库模板；完整Fab编码区，包含PelB前导序列 + Vl3_19 λ V域 + 用于轻链的CL恒定域和PelB + VH3_23 V域 + 用于重链的CH1恒定域，包括标签	ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTAC TCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCTCGTCTGAGCTGACTCAGG ACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTCAGGATCA CATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGTTATTATGCAAGCTGGT ACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCCTGTACTTGTCATCTATG GTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTG GCTCCAGCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATCACTGGGG CTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAACTCCCGTG ATAGTAGCGGTAATCATGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGC TGACCGTCCTAGGACAACCCAAGGCTGCCCCCAGCGTGACCC TGTTCCCCCCCCAGCAGCGAGGAATTGCAGGCCAACAAGGCCA CCCTGGTCTGCCTGATCAGCGACTTCTACCCAGGCGCCGTGAC CGTGGCCTGGAAGGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGGCGT GGAGACCACCACCCCCAGCAAGCAGAGCAACAACAAGTACG CCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTGGAAGA GCCACAGGTCCTACAGCTGCCAGGTGACCCACGAGGGCAGCA

[1129]

		CCGTGGAGAAAACCGTGGCCCCCACCGAGTGCAGCGGAGCC GCAGAACAAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATGGAGC CGCAGACTACAAGGACGACGACGACAAGGGTGCCGCATAAT AAGGCGCGCCAATTCTATTTCAAGGAGACAGTCATATGAAAT ACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCTGC CCAGCCGGCGATGGCCGAGGTGCAATTGCTGGAGTCTGGGGG AGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGC AGCCTCCGGATTCACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTC CGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATT AGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAG GGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTG TATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTA TATTACTGTGCGAAACCGTTTCCGTATTTTGACTACTGGGGCC AAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCTAGCACCAAAGGCC CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC CGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAG CGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTC TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC AACACCAAAGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAC GCGGCCGCAAGCACTAGTGCCCATCACCATCACCATCACGCC GCGGCA

[1130] 表42:λ-DP47文库(Vl3_19/VH3_23)种系模板的cDNA和氨基酸序列

[1131]

SEQ ID NO:	描述	序列
159	核苷酸序列 Fab 轻链 Vl3_19	TCGTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGAC AGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGTTATT ATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCCTGTACTTG TCATCTATGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGAT TCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATCACTGG GGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAACTCCCGTGA TAGTAGCGGTAATCATGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGAC CGTCCTAGGACAACCCAAGGCTGCCCCCAGCGTGACCCTGTTCCCC CCCAGCAGCGAGGAATTGCAGGCCAACAAGGCCACCCTGGTCTGC CTGATCAGCGACTTCTACCCAGGCGCCGTGACCGTGGCCTGGAAG GCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGGCGTGGAGACCACCACCCCC AGCAAGCAGAGCAACAACAAGTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGC CTGACCCCCGAGCAGTGGAAGAGCCACAGGTCCTACAGCTGCCAG GTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAGAAAACCGTGGCCCCCACC GAGTGCAGCGGAGCCGCAGAACAAAAACTCATCTCAGAAGAGGA TCTGAATGGAGCCGCAGACTACAAGGACGACGACGACAAGGGTGC CGCA
160	Fab 轻链 Vl3_19	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVI YGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGN HVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP GAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECSGAAEQKLISEEDLNGAADYKDD DDKGAA
150	核苷酸序列 Fab 重链 VH3_23	见表7
151	Fab 重链 VH3_23 (DP47)	见表7

[1132] 表43:用于生成λ-DP47文库(Vl3_19/VH3_23)的引物序列

[1133]

SEQ ID NO:	引物名称	引物序列5’–3’

[1134]

161	LMB3	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC
162	Vl_3_19_L3r_V	GGACGGTCAGCTTGGTCCCTCCGCCGAATAC VHV ATT ACC GCT ACT ATC ACG GGAGTTACAGTAATAGTCAGCCTCATCTTCCGC 下划线：60%原始碱基和40%随机化为M 粗体且斜体：60%原始碱基和40%随机化为N
163	Vl_3_19_L3r_HV	GGACGGTCAGCTTGGTCCCTCCGCCGAATAC CMM ATG ATT ACC GCT ACT ATC ACG GGAGTTACAGTAATAGTCAGCCTCATCTTCCGC 下划线：60%原始碱基和40%随机化为M 粗体且斜体：60%原始碱基和40%随机化为N
164	Vl_3_19_L3r_HLV	GGACGGTCAGCTTGGTCCCTCCGCCGAATAC RHM VWG ATG ATT ACC GCT ACT ATC ACG GGAGTTACAGTAATAGTCAGCCTCATCTTC CGC 下划线：60%原始碱基和40%随机化为M 粗体且斜体：60%原始碱基和40%随机化为N
165	RJH80	TTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCC
248	MS63	TTTCGCACAGTAATATACGGCCGTGTCC
154	DP47-v4-4	CGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCG-5-1–2-2-3-4-GAC-TAC-TGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCG
155	DP47-v4-6	CGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCG-5-1–2-2-2-2-3-4-GAC-TAC- TGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCG
156	DP47-v4-8	CGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCG-5-1–2-2-2-2-2-2-3-4-GAC-TAC- TGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCG
157	fdseqlong	GACGTTAGTAAATGAATTTTCTGTATGAGG

[1135] 1:G/D＝20％,E/V/S＝10％,A/P/R/L/T/Y＝5％;2:G/Y/S＝15％,A/D/T/R/P/L/V/N/W/F/I/E＝4,6％;3: G/A/Y＝20％,P/W/S/D/T＝8％;4:F＝46％,L/M＝15％,G/I/Y＝8％;5:K＝70％,R＝30％。

[1136] 作为抗原用于噬菌体展示选择和基于ELISA和SPR的筛选的人,鼠和食蟹猴4-1BB(CD137)在HEK EBNA细胞中作为N端单体Fc融合物瞬时表达并在位于携带受体链的Fc部分(Fc节链)C端的avi标签识别序列处经由共表达 BirA生物素连接酶而体内位点特异性生物素化。

[1137] 依照下面的规程在溶液中实施选择轮次(生物淘选)。第一步,在用10 μg/ml无关人IgG包被的Maxisorp板上预清洁约10^{12}个噬菌粒颗粒以对文库消减识别抗原的Fc部分的抗体;第二步,在总体积1ml中在100nM无关非生物素化Fc节入穴构建物存在下将非结合性噬菌粒颗与100nM生物素化人或鼠4-1BB一起温育0.5小时以进一步消减Fc结合物;第三步,通过转移至中性亲合素预包被微量滴定板的4个孔达10分钟来捕捉生物素化hu 4-1BB和附着的特异性结合性噬菌体(在第1和3轮中);第四步,使用5x PBS/Tween20和 5x PBS清洗相应孔;第五步,通过添加250μl 100mM TEA(三乙胺)每孔达 10分钟来洗脱噬菌体颗粒并通过对来自4个孔的合并洗出液添加500μl 1M Tris/HCl pH 7.4来中和;第六步,通过与100nM生物素捕捉的Fc节入穴构建物一起在中性亲合素预包被微量滴定板上温育来后清洁经过中和的洗出液以最终去除Fc结合物;第七步,用洗脱的噬菌体颗粒的上清液再感染对数期大肠杆菌TG1细胞,用辅助噬菌体VCSM13感染,在摇床上于30℃温育过夜,随后用PEG/NaCl沉淀噬菌粒颗粒,待用于下一个选择轮次。使用恒定抗原浓度100nM进行3或4轮选择。在第2和4轮中,为了避免富集针对中性亲合素的结合物,通过添加5.4×10^{7}个链霉亲合素包被的磁珠来实施抗原: 噬菌体复合物的捕捉。如下通过ELISA鉴定特异性结合物:分别在中性亲合素板和Maxisorp板上包被100μl 25nM生物素化人或鼠4-1BB和10μg/ml人 IgG。添加含有Fab的细菌上清液并使用抗Flag/HRP二抗经由它们的Flag标签检测结合性Fab。对人

或鼠4-1BB展现信号且对人IgG为阴性的克隆通过初审用于进一步分析并还以类似方式针对剩余两个物种的4-1BB测试。它们在 0.5升培养体积中由细菌表达，亲和纯化并使用BioRad的ProteOn XPR36生物传感器通过SPR分析进一步表征。

[1138] 克隆12B3，25G7，11D5和9B11经由上文描述的规程鉴定为人4-1BB特异性结合物。克隆20G2经由上文描述的规程鉴定为鼠4-1BB特异性结合物。它们的可变区的cDNA序列在下文表44中显示，相应的氨基酸序列可以在表C中找到。

[1139] 表44：噬菌体衍生的抗4-1BB抗体的可变区碱基对序列。下划线是互补决定区(CDR)。

[1140]

克隆	SEQ ID NO:	序列
12B3	249 (VL)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGG AGACCGTGTCACCATCACTTGCCGTGCCAGTCAGAGTATTAGTAGCT GGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCT GATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCA GCGGCAGTGGATCCGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGCAGCTT GCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATCATTCGT ATCCGCAGACGTTTGGCCAGGGCACCAAAGTCGAGATCAAG
	250 (VH)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGT CCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGCAG CTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCAC AGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCCACGAG CACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCC GTGTATTACTGTGCGAGATCTGAATTCCGTTTCTACGCTGACTTCGA CTACTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCA
25G7	251(VL)	TCGTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACA GACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGTTATTAT GCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCCTGTACTTGTCA TCTATGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCT GGCTCCAGCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTC AGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAACTCCCTTGATAGGCG CGGTATGTGGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTC
	252 (VH)	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGG GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAGCAGT TATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGT GGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGA

[1141]

		CTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAAC ACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCG TATATTACTGTGCGCGTGACGACCCGTGGCCGCCGTTCGACTACTGG GGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT
11D5	253 (VL)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGG AGACCGTGTCACCATCACTTGCCGTGCCAGTCAGAGTATTAGTAGCT GGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCT GATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCA GCGGCAGTGGATCCGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGCAGCTT GCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGCTTAATTCGT ATCCTCAGACGTTTGGCCAGGGCACCAAAGTCGAGATCAAG
	254 (VH)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGT CCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGCAG CTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCAC AGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCCACGAG CACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCC GTGTATTACTGTGCGAGATCTACTCTGATCTACGGTTACTTCGACTA CTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCA
9B11	255 (VL)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGG AGACCGTGTCACCATCACTTGCCGTGCCAGTCAGAGTATTAGTAGCT GGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCT GATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCA GCGGCAGTGGATCCGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGCAGCTT GCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGGTTAATTCTT ATCCGCAGACGTTTGGCCAGGGCACCAAAGTCGAGATCAAG
	256 (VH)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGT CCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGCAG CTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCAC AGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCCACGAG CACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCC GTGTATTACTGTGCGAGATCTTCTGGTGCTTACCCGGGTTACTTCGA CTACTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCA
20G2	257 (VL)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCACCCTGTCTGCATCTGTAGG AGACCGTGTCACCATCACTTGCCGTGCCAGTCAGAGTATTAGTAGCT GGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCT GATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCA GCGGCAGTGGATCCGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGCAGCTT GCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGCAGCACTCGT ATTATACGTTTGGCCAGGGCACCAAAGTCGAGATCAAG
	258 (VH)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGT CCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGCAG CTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCAC AGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCCACGAG CACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCC GTGTATTACTGTGCGAGATCTTACTACTGGGAATCTTACCCGTTCGA CTACTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCAGC

[1142] 6.3抗4-1BB IgG1 P329G LALA抗体的制备,纯化和表征

[1143] 与人IgG1的恒定重链或恒定轻链任一同框亚克隆选定抗4-1BB结合物的重和轻链可变区DNA序列。依照公开号WO 2012/130831 A1的国际专利申请中描述的方法在节和穴重链的恒定区中引入Pro329Gly,Leu234Ala和 Leu235Ala突变以消除对Fcγ受体的结合。

[1144] 抗4-1BB克隆的核苷酸和氨基酸序列在表45中显示。将所有抗4-1BB-Fc 融合物编码序列克隆入自MPSV启动子驱动插入物表达且含有位于CDS的3'端的合成的polyA信号序列的质粒载体。另外,载体含有用于质粒的附加体维持的EBV OriP序列。

[1145] 表45:P329GLALA人IgG1格式的抗4-1BB克隆的序列

[1146]

克隆	SEQ ID No.	序列
12B3	259 (核苷酸序列 轻链)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGA GACCGTGTCACCATCACTTGCCGTGCCAGTCAGAGTATTAGTAGCTGG TTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGAT CTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGCGG CAGTGGATCCGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGCAGCTTGCAGCC TGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATCATTCGTATCCGCA GACGTTTGGCCAGGGCACCAAAGTCGAGATCAAGCGTACGGTGGCTG CACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTG GAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGG CCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC CAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCT CAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAG TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAA AGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
	260 (核苷酸序列 重链)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTC CTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGCAGCTA CGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGA TGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCACAGAAGT TCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCCACGAGCACAGCC TACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCCGTGTATTA CTGTGCGAGATCTGAATTCCGTTTCTACGCTGACTTCGACTACTGGGG CCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCAT CGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAG CGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGG TGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGG CTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCG TGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCT TGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGC AGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCT CATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCG CCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAA CCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAG ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGC AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA GCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
	261 (轻链)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYD ASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYHSYPQTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
	262	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWM

[1147]

	(重链)	GGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARS EFRFYADFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
25G7	263 (核苷酸序列 轻链)	TCGTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAG ACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGTTATTATGC AAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCCTGTACTTGTCATCT ATGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCT CCAGCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCG GAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAACTCCCTTGATAGGCGCGGTATG TGGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTCAACCCAA GGCTGCCCCCAGCGTGACCCTGTTCCCCCCCCAGCAGCGAGGAACTGCA GGCCAACAAGGCCACCCTGGTCTGCCTGATCAGCGACTTCTACCCAGG CGCCGTGACCGTGGCCTGGAAGGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGCCG GCGTGGAGACCACCACCCCCAGCAAGCAGAGCAACAACAAGTACGCC GCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTGGAAGAGCCACAG GTCCTACAGCTGCCAGGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAGAAAA CCGTGGCCCCCACCGAGTGCAGC
	264 (核苷酸序列 重链)	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGG GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAGCAGTTAT GCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGT CTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGT GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGT ATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTAC TGTGCGCGTGACGACCCGTGGCCGCCGTTCGACTACTGGGGCCAAGG AACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTT CCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCT GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTG GAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCT ACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTC CAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAC AAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGG ACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGAT CTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACG AAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTA CCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCA TCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGT CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACG CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTC ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT CCCTGTCTCCGGGTAAA
	265 (轻链)	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYG KNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSLDRRGMWVFG GGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAW KADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTH EGSTVEKTVAPTECS
	266 (重链)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR DDPWPPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK

[1148]

		DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
11D5	267 (核苷酸序列 轻链)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGA GACCGTGTCACCATCACTTGCCGTGCCAGTCAGAGTATTAGTAGCTGG TTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGAT CTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGCGG CAGTGGATCCGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGCAGCTTGCAGCC TGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGCTTAATTCGTATCCTCAG ACGTTTGGCCAGGGCACCAAAGTCGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGC ACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGG AACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGC CAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCC AGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTC AGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT CTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAA GAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
	268 (核苷酸序列 重链)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTC CTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGCAGCTA CGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGA TGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCACAGAAGT TCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCCACGAGCACAGCC TACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCCGTGTATTA CTGTGCGAGATCTACTCTGATCTACGGTTACTTCGACTACTGGGGCCA AGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGG TCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGG CCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT CGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTG TCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGC CCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACA AGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT GACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGG GGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCAT GATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAA TGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCC CCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA CAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAG CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATG CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC TCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
	269 (轻链)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYD ASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQLNSYPQTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
	270 (重链)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWM GGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARS TLIYGYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP

[1149]

		KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
9B11	271 (核苷酸序列 轻链)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGA GACCGTGTCACCATCACTTGCCGTGCCAGTCAGAGTATTAGTAGCTGG TTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGAT CTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGCGG CAGTGGATCCGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGCAGCTTGCAGCC TGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGGTTAATTCTTATCCGCAG ACGTTTGGCCAGGGCACCAAAGTCGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGC ACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGG AACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGC CAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCC AGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTC AGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT CTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAA GAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
	272 (核苷酸序列 重链)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTC CTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGCAGCTA CGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGA TGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCACAGAAGT TCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCCACGAGCACAGCC TACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCCGTGTATTA CTGTGCGAGATCTTCTGGTGCTTACCCGGGTTACTTCGACTACTGGGG CCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCAT CGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAG CGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGG TGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGG CTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCG TGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCT TGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGC AGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCT CATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCG CCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAA CCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAG ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGC AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA GCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
	273 (轻链)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYD ASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQVNSYPQTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
	274 (重链)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWM GGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARS SGAYPGYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR

[1150]

		EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
20G2	275 (核苷酸序列 轻链)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGA GACCGTGTCACCATCACTTGCCGTGCCAGTCAGAGTATTAGTAGCTGG TTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGAT CTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGCGG CAGTGGATCCGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGCAGCTTGCAGCC TGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGCAGCACTCGTATTATAC GTTTGGCCAGGGCACCAAAGTCGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCAC CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCA AAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAG GAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAG CAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCT ACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG AGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
	276 (核苷酸序列 重链)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTC CTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGCAGCTA CGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGA TGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCACAGAAGT TCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCCACGAGCACAGCC TACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCCGTGTATTA CTGTGCGAGATCTTACTACTGGGAATCTTACCCGTTCGACTACTGGGG CCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCCAT CGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAG CGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGG TGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGG CTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCG TGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCT TGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGC AGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCT CATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCG CCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAA CCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAG ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGC AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA GCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
	277 (轻链)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYD ASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQQHSYYTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
	278 (重链)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWM GGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARS YYWESYPFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS

[1151]

		LSPGK

[1152] 通过使用聚乙烯亚胺用哺乳动物表达载体共转染HEK293-EBNA细胞来生成抗4-

1BB抗体。以1:1比率(“载体重链”:“载体轻链”)用相应表达载体转染细胞。

[1153] 为了500mL摇瓶中的生成,在转染前24小时接种400x10^6个HEK293 EBNA细胞。为了转染,将细胞以210g离心5分钟,并用预温热的CD CHO 培养基替换上清液。在20mL CD CHO培养基中混合表达载体(200μg总 DNA)。添加540μL PEI后,将溶液漩涡震荡15秒并于室温温育10分钟。之后,将细胞与DNA/PEI溶液混合,转移至500mL摇瓶并在具有5%CO_2气氛的温箱中于37℃温育3小时。温育后,添加160mL F17培养基并将细胞培养 24小时。转染后1天,添加1mM丙戊酸和7%补料及补充物。培养7天后,通过以210x g离心15分钟来收集上清液。将溶液无菌过滤(0.22μm滤器),补充叠氮化钠至终浓度0.01%(w/v),并于4℃保持。

[1154] 如上文关于抗原-Fc融合物的纯化描述的,通过使用蛋白A的亲和层析来进行自细胞培养物上清液纯化抗体分子。

[1155] 浓缩并过滤蛋白质,之后在用pH 6.0的20mM组氨酸,140mM NaCl溶液平衡的HiLoad Superdex 200柱(GE Healthcare)上加载。

[1156] 使用基于氨基酸序列计算的摩尔消光系数,通过以280nm测量OD来测定经过纯化的抗体的蛋白质浓度。使用LabChipGXII(Caliper)通过还原剂 (Invitrogen,USA)存在和缺失下的CE-SDS来分析抗体的纯度和分子量。于 25℃使用在25mM K_2HPO_4,125mM NaCl,200mM单盐酸L-精氨酸, 0.02%(w/v)NaN_3,pH 6.7运行缓冲液中平衡的TSKgel G3000 SW XL分析性大小排阻柱(Tosoh)分析抗体样品的聚集体含量。

[1157] 表46汇总抗4-1BB P329G LALA IgG1抗体的产率和最终含量。

[1158] 表46:抗4-1BB P329G LALA IgG1克隆的生化分析

[1159]

克隆	产率 [mg/l]	单体 [%]	CE-SDS (非还原的)	CE-SDS (还原的)
12B3 P329GLALA IgG1	4	98	98.6% (173kDa)	22.5% (29kDa) 75.5% (64kDa)
25G7 P329GLALA IgG1	25	100	99.7% (181.6kDa)	76.8% (65kDa) 23% (42kDa)
11D5 P329GLALA IgG1	9.7	98.7	99.6% (176kDa)	tbd.
9B11 P329GLALA IgG1	22	100	100% (153 kDa)	2% (127 kDa) 72.3% (114 kDa) 24.6% (37.1 kDa)
20G2 P329GLALA IgG1	11	100	98.5% (166kDa)	80.2% (62.8kDa)

[1160]

				18% (28.4kDa)

[1161] 实施例7

[1162] 抗4-1BB抗体的表征

[1163] 7.1人4-1BB上的结合

[1164] 7.1.1表面等离振子共振(亲合力+亲和力)

[1165] 通过表面等离振子共振(SPR)评估噬菌体衍生的4-1BB特异性抗体对重组4-1BB Fc(kih)的结合。所有SPR实验是用HBS-EP作为运行缓冲液(0.01M HEPES pH 7.4,0.15M NaCl,3mM EDTA,0.005%表面活性剂P20, Biacore,Freiburg/Germany)于25℃在Biacore T200上实施的。

[1166] 在相同的实验中,测定噬菌体展示衍生的抗4-1BB克隆12B3,25G7, 11D5,9B11和20G2(都是人IgG1 P329GLALA)和重组4-1BB(人,食蟹猴和鼠)之间的相互作用的物种选择性和亲合力。将生物素化人,食蟹猴和鼠 4-1BB Fc(kih)直接偶联至链霉亲合素(SA)传感

器芯片的不同流动室。使用高至100个共振单位(RU)的固定化水平。在120秒里以30μL/min的流以4至 450nM的浓度范围(3倍稀释)使噬菌体展示衍生的抗4-1BB人IgG1 P329GLALA抗体流经流动室。对复合物解离监测220秒。通过减去在没有固定化蛋白质的参照流动室中获得的响应来修正本体(bulk)折射率差异。

[1167] 动力学常数使用Biacore T200评估软件(vAA,Biacore AB, Uppsala/Sweden)推导,通过数值积分来为1:1朗格缪尔(Langmuir)结合拟合速率方程并用于定性评估亲合力(表47)。

[1168] 在相同的实验中,测定噬菌体展示衍生的抗体(人IgG1 P329GLALA)与重组4-1BB(人,食蟹猴和鼠)之间的相互作用的亲和力。使用标准胺偶联试剂盒(Biacore,Freiburg/Germany)于pH 5.0在CM5芯片上直接偶联抗人Fab抗体(Biacore,Freiburg/Germany)。固定化水平是大约7500RU。以范围自25 nM起的浓度对噬菌体展示衍生的针对4-1BB的抗体捕捉60秒。在120秒里以 30μL/min的流以4.1至1000nM的浓度范围使重组人4-1BB Fc(kih)流经流动室。对解离监测120秒。通过减去在参照流动室中获得的响应来修正本体折射率差异。在这里,使抗原流过具有固定化的抗人Fab抗体但上面已经注射 HBS-EP而非抗体的表面。动力学常数使用Biacore T200评估软件(vAA, Biacore AB,Uppsala/Sweden)来推导,通过数值积分来为1:1朗格缪尔结合拟合速率方程。

[1169] 克隆25G7和9B11以比克隆12B3和11D5要低的亲和力结合人4-1BB Fc(kih)。克隆20G2并不结合人4-1BB。通过拟合1:1朗格缪尔结合来确定抗 4-1BB P329GLALA IgG1和人4-1BB Fc(kih)之间的相互作用的亲和常数。

[1170] 表47:抗4-1BB抗体对重组人4-1BB的结合

[1171]

克隆	起源	重组人4-1BB (亲合力格式)	重组人4-1BB (亲和力格式)		
			ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
12B3	噬菌体展示	++++	3.4E+04	1.0E-03	3.0E-08
25G7	噬菌体展示	+	2.9E+04	9.9E-04	3.4E-08
11D5	噬菌体展示	+++	3.2E+04	1.2E-03	3.6E-08
9B11	噬菌体展示	++	2.7E+04	3.9E-03	1.4E-07

[1172] 7.1.2对表达人4-1BB的细胞:静息的和激活的人外周血单个核白细胞 (PBMC)的结合

[1173] 静息和幼稚的人T细胞上缺失人4-1BB的表达(Kienzle G.and von Kempis J (2000),Int.Immunol.12(1),73-82;Wen T.et al.(2002),J.Immunol.168, 4897-4906)。以固定化的抗人CD3激动性抗体激活后,4-1BB在$CD4^+$和$CD8^+$ T细胞上上调。还报告了激活的人NK细胞(Baessler T.et.al.(2010)Blood 115(15),3058-3069),激活的人NKT细胞(Cole S.L.et al.(2014)J.Immunol. 192(8),3898-3907),激活的人B细胞(Zhang et al.(2010) J.Immunol.184(2), 787-795),激活的人嗜曙红细胞(Heinisch et al.2001)上的4-1BB表达,组成性地人嗜中性细胞(Heinisch I.V.(2000)J Allergy Clin Immunol.108(1), 21-28),激活的人单核细胞(Langstein J.et al.(1998)J Immunol.160(5), 2488-2494; Kwajah M.and Schwarz H.(2010)Eur J Immunol.40(7), 1938-1949),组成性地人调节T细胞(Bacher P.et al.(2014)Mucosal Immunol. 7(4),916-928),人滤泡树状细胞(Pauly

S.et al.(2002)J Leukoc Biol.72(1), 35-42),激活的人树状细胞(Zhang L.et al.(2004)Cell Mol Immunol.1(1), 71-76)和恶性人肿瘤的血管(Broll K.et al.(2001)Am J Clin Pathol.115(4), 543-549)上的4-1BB表达。

[1174] 为了测试我们的抗4-1BB克隆对天然细胞表达的人4-1BB的结合,使用新鲜分离的静息外周血单个核细胞(PBMC)或PHA-L/Proleukin预激活的和 CD3/CD28再激活的PBMC。使用Histopaque 1077(SIGMA Life Science,目录号10771,聚蔗糖和泛影酸钠,调节至1.077g/mL的密度),通过Ficoll密度离心自从苏黎世献血中心获得的血沉棕黄层分离PBMC并在由供应有10%胎牛血清(FBS,Gibco by Life Technology,目录号16000-044,批次941273,经伽马照射,无支原体且于56℃热灭活35分钟的),1%(v/v) GlutaMAX-I(GIBCO by Life Technologies,目录号35050 038),1mM丙酮酸钠(SIGMA,目录号S8636),1%(v/v) MEM非必需氨基酸(SIGMA,目录号 M7145)和50μMβ-巯基乙醇(SIGMA,M3148)的RPMI 1640培养基(Gibco by Life Technology,目录号42401-042)组成的T细胞培养基中重悬浮。在分离后直接使用PBMC(静息的细胞)或通过在6孔组织培养板中在补充有200 U/mL Proleukin(Novartis Pharma Schweiz AG,CHCLB-P-476-700-10340)和2 μg/mL PHA-L(SIGMA目录号L2769)的T细胞培养基中培养3至5天,然后在用10μg/mL抗人CD3(克隆OKT3,BioLegend,目录号317315)和2μg/mL抗人CD28(克隆CD28.2,BioLegend,目录号302928)包被的6孔组织培养板中在T细胞培养基中于37℃和5%CO_2培养2天来进行刺激以诱导T细胞的细胞表面处的4-1BB表达。

[1175] 为了测定对由人PBMC表达的人4-1BB的结合,将0.1-0.2x10^6个新鲜分离的或激活的PBMC添加至圆底悬浮细胞96孔板(Greiner bio-one,cellstar,目录号650185)的每个孔。于4℃将板以400x g离心4分钟并丢弃上清液。用 200μL/孔DPBS清洗细胞,然后与100μL/mL含有1:5000稀释的可固定存活力染料eFluor 450(eBioscience,目录号64-0863-18)或可固定存活力染料 eFluor 660(eBioscience,目录号65-0864-18)的DPBS一起于4℃温育30分钟。之后,将细胞用200μL/孔冷的FACS缓冲液(供应有2%(v/v)FBS,5 mM EDTA pH 8(Amresco,目录号E177)和7.5mM叠氮化钠(Sigma-Aldrich S2002)的DPBS)清洗一次。接着,添加50μL/孔4℃冷的含有所滴定的抗人 4-1BB结合物的FACS缓冲液并将细胞于4℃温育120分钟。将细胞用200μL/ 孔4℃ FACS缓冲液清洗四次以去除未结合的分子。之后,将细胞与50μL/ 孔4℃冷的含有2.5μg/mL PE缀合的AffiniPure抗人IgG Fcγ片段特异性山羊 F(ab')$_2$片段(Jackson ImmunoResearch,目录号109-116-098)或30μg/mLFITC 缀合的AffiniPure抗人IgG Fcγ片段特异性山羊F(ab')$_2$片段(Jackson ImmunoResearch,目录号109 096 098),抗人CD45 AF488(克隆HI30, BioLegend,目录号304019),0.67μg/mL APC/Cy7缀合的抗人CD3 moIgG1κ (克隆UCH1,BioLegend,目录号300426)或0.125μg/mL PE缀合的抗人CD3 小鼠IgG1κ(克隆SK7,BioLegend,目录号344806)或0.67μg/mL PerCP/Cy5.5缀合的抗人CD3小鼠IgG1κ(克隆UCHT1,BioLegend,目录号 300430),0.125μg/mL BV421缀合的抗人CD4 moIgG1κ(克隆RPA-T4, BioLegend,目录号300532)或0.23μg/mL BV421缀合的抗人CD4小鼠IgG2bκ (克隆OKT4,BioLegend,目录号317434)或0.08μg/mL PE/Cy7缀合的抗人 CD4小鼠IgG1κ(克隆SK3,BioLegend,目录号344612),0.17μg/mL APC/Cy7缀合的抗人CD8(小鼠IgG1κ,克隆RPA-T8,BioLegend,目录号 301016)或0.125μg/mL PE/Cy7缀合的抗人CD8a(moIgG1κ,克隆RPA-T8, BioLegend,目录号301012)或0.33μg/mL抗人CD8 BV510

(moIgG1κ,克隆 SK1,BioLegend,目录号344732)和0.25μg/mL APC缀合的抗人CD56(小鼠IgG1κ,克隆HCD56,BioLegend,目录号318310)或1μL AF488缀合的抗人 CD56(moIgG1κ,克隆B159,BD Pharmingen,目录号557699)和0.67μg/mL 抗人CD19-PE/Cy7(moIgG1κ,克隆HIB19,BioLegend,目录号302216)的 FACS缓冲液一起进一步温育并于4℃温育30分钟。

[1176] 将细胞用200μL FACS缓冲液/孔清洗两次并通过在50μL/孔含有1%甲醛(Sigma,HT501320-9.5L)的DPBS中重悬浮来固定。同日或次日,使用3激光Canto II(BD Bioscience,带有DIVA软件)或5激光Fortessa(BD Bioscience,带有DIVA软件)或3激光MACSQuant分析仪10(Miltenyi Biotech) 对细胞获取读数。在$CD8^+$和$CD4^+$T细胞上设置门并使用检测二抗的中值荧光强度(MFI)或荧光强度的几何均值来分析一抗的结合。使用Graph Pad Prism(Graph Pad Software Inc.),通过减去空白值(不添加一抗)对数据进行基线校准并使用非线性回归曲线拟合(稳健拟合)计算EC_{50}值。

[1177] 人T细胞在静息状态时缺乏4-1BB表达但在激活后上调4-1BB。人$CD8^+$ T细胞显示比$CD4^+$T要强的上调。如图23A-23D中显示的,所生成的抗人 4-1BB特异性抗体能结合由激活的人T细胞表达的人4-1BB。所显示的抗人 4-1BB克隆可以归类为强结合(克隆12B3和11D5)和低结合物(克隆25G7和 9B11)。不仅通过EC_{50}值而且通过MFI看到差异。对激活的CD8 T细胞的结合的EC_{50}值在表48中显示。抗小鼠4-1BB特异性克隆20G2并不结合人4-1BB 且因此不是人交叉反应性的。

[1178] 表48:对激活的人CD8 T细胞的结合的EC_{50}值

[1179]

克隆	EC_{50} [nM]
25G7	29

[1180]

12B3	0.95
11D5	1.46
9B11	4.485
20G2	n.d.

[1181] 7.2鼠4-1BB上的结合

[1182] 7.2.1表面等离振子共振(亲合力+亲和力)

[1183] 如上文关于人4-1BB Fc(kih)描述的(见实施例7.1.1),通过表面等离振子共振评估噬菌体衍生的4-1BB特异性抗体20G2对重组鼠4-1BB Fc(kih)的结合。动力学常数使用Biacore T200评估软件(vAA,Biacore AB, Uppsala/Sweden)来推导,通过数值积分来为1:1朗格缪尔结合拟合速率方程并用于定性评估亲合力(表44)。

[1184] 为了测定亲和力,由于Fc融合蛋白与参照流动室的非特异性相互作用,用AcTEV蛋白酶切割鼠4-1BB Fc(kih)并通过层析方法去除Fc部分。使用标准胺偶联试剂盒(Biacore,Freiburg/Germany)于pH 5.0在CM5芯片上直接偶联抗人Fc抗体(Biacore,Freiburg/Germany)。固定化水平是约7500 RU。以范围自25nM起的浓度对噬菌体展示衍生的针对4-1BB的抗体捕捉60 秒。在120秒里以30μL/min的流以4.1至1000nM的浓度范围使重组鼠4-1BB AcTEV流经流动室。对解离监测120秒。通过减去在参照流动室中获得的响应来修正本体折射率差异。在这里,使抗原流过具有固定化的抗人Fc抗体但上面已经注射HBS-EP而非

抗体的表面。

[1185] 动力学常数使用Biacore T200评估软件(vAA,Biacore AB, Uppsala/Sweden)来推导,通过数值积分来为1:1朗格缪尔结合拟合速率方程。显示了克隆20G2结合鼠4-1BB(表49)。

[1186] 抗4-1BB P329GLALAIgG1分子和鼠4-1BB之间的相互作用的亲和常数使用Biacore T200评估软件(vAA,Biacore AB,Uppsala/Sweden)来推导,通过数值积分来为1:1朗格缪尔结合拟合速率方程。

[1187] 表49:抗4-1BB抗体20G2对鼠4-1BB的结合

[1188]

克隆	起源	重组鼠4-1BB (亲合力格式)	重组鼠4-1BB (亲和力格式)		
			ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
20G2	噬菌体展示	+++++	2.4E+04	3.4E-04	1.4E-08

[1189] 7.2.2对表达小鼠4-1BB的细胞:静息的和激活的小鼠脾细胞的结合(选定的克隆)

[1190] 与人类似,新鲜分离的静息小鼠T细胞并不表达4-1BB,但是通过经由经肽脉冲的APC的TCR激活(Cannons J.et al.(2001)J.Immunol.167(3): 1313-1324)或固定化的抗小鼠CD3或抗小鼠CD3和抗小鼠CD28抗体的组合 (Pollok K.et al.(1995),European J.Immunol.25(2),488-494)能诱导表达。经由表面固定化的抗CD3抗体激活后,4-1BB表达报告为在$CD8^+$T细胞上更高 (Shuford W,et al.(1997)J.of Experimental Med.186(1),47-55),但是这可能依赖于激活方案。还报告了激活的小鼠NK细胞(Melero et al.(1998) Cell Immunol.190(2),167-172),激活的小鼠NKT细胞(Vinay D,et al.(2004)J Immunol.173(6),4218-4229),激活的小鼠B细胞(Vinay,Kwon(2011)Cell Mol Immunol.8(4),281-284),组成性地小鼠嗜中性细胞(Lee S.et al.(2005) Infect Immun.73(8),5144-5151)和小鼠调节T细胞(Gavin et al.(2002)Nat Immunol.3(1),33-41),小鼠经IgE刺激的肥大细胞(Nishimoto et al.(2005) Blood 106(13):4241-4248),小鼠髓样谱系细胞(Lee et al.(2008)Nat Immunol. 9(8),917-926),小鼠滤泡树状细胞(Middendorp et al.(2009)Blood 114(11), 2280-2289)和激活的小鼠树状细胞(Wilcox,Chapoval et al.(2002)J Immunol. 168(9),4262-4267)上的别的4-1BB表达。

[1191] 直接在自健康雌性C57BL/6小鼠分离脾细胞后以及在用表面固定化的激动性抗小鼠CD3和抗小鼠CD28抗体体外激活72小时后测试抗4-1BB特异性抗体结合。雌性C57BL/6小鼠(7-9周龄)购自法国Charles River。到达后,将动物维持一周以适应新的环境和进行观察。依照提交的指南(GV-Solas; Felasa;TierschG)在无特定病原体条件下维持小鼠,随意获得食物和水,日周期12小时光亮/12小时黑暗。定期进行连续健康监测。通过颈脱位处死小鼠。解剖脾并保存在冰上在补充有10%(v/v)热灭活的FBS和1%(v/v) GlutaMAX-I的RPMI 1640中。为了获得单细胞溶液,将脾穿过70μm细胞筛网(BD Falcon;Germany)匀浆并提交于37℃在ACK裂解缓冲液(0.15M NH_4Cl,10mM $KHCO_3$,0.1mM EDTA,在ddH_2O中,pH 7.2)中红细胞裂解10分钟。两个无菌DPBS的清洗步骤后,在T细胞培养基中重建脾细胞。或是新鲜使用细胞(静息)或是将10^6个细胞/mL脾细胞在用1μg/mL抗小鼠 CD3抗体(大鼠IgG2b,克隆17A2,BioLegend,目录号100223)和2μg/mL抗小鼠CD28抗体(叙利亚仓鼠,克隆37.51,BioLegend,目录号102112)包被的6孔细胞培养板上在由供应有10%FBS,1%(v/v)

GlutaMAX-I,1mM丙酮酸钠,1％(v/v)MEM非必需氨基酸和50μMβ-巯基乙醇的RPMI 1640培养基组成的T细胞培养基中进一步刺激72小时。

[1192] 为了测试对小鼠4-1BB的结合,在DPBS中重悬浮新鲜分离的或激活的小鼠脾细胞并将0.1x10^{6}个/孔脾细胞转移至圆底96孔悬浮细胞板(Greiner bio-one,cellstar,目录号650185)。于4℃将细胞以400x g离心4分钟并去除上清液。在100μl/孔含有1:5000稀释的可固定存活力染料eFluor 450 (eBioscience,目录号65-0863-18)或可固定存活力染料eFluor 660 (eBioscience,目录号65-0864-18)的DPBS中重悬浮后,将细胞于4℃温育30分钟。用FACS缓冲液和50μL/孔含有滴定浓度的抗人4-1BB huIgG1 P329G LALA抗体-克隆12B3,25G7,11D5,9B11和抗小鼠4-1BB特异性克隆20G2 (作为huIgG1 P329G LALA)或小鼠IgG1或小鼠IgG1 DAPG的FACS缓冲液清洗细胞。于4℃温育1小时后,清洗细胞四次以去除过量的抗体。如果测试作为小鼠IgG1和小鼠IgG1 DAPG格式的抗小鼠20G2的结合,那么将细胞在 50μL含有30μg/mL FITC缀合的抗小鼠IgG Fcγ片段特异性AffiniPure山羊 F(ab')γ片段的FACS缓冲液/孔中于4℃温育30分钟并用FACS缓冲液清洗两次。如果测试含有人IgG1 P329G LALA Fc片段的抗4-1BB结合物的结合,那么跳过这个步骤。之后,在50μL含有0.67μg/mL PE缀合的抗小鼠CD3 (大鼠IgG2bκ,克隆17A2,BD Pharmingen,目录号555275)或APC-Cy7缀合的抗小鼠CD3(大鼠IgG2aκ,克隆53-6.7,BioLegend,目录号100708),0.67 μg/mL PE/Cy7缀合的抗小鼠CD4(大鼠IgG2bκ,克隆GK1.5,BioLegend,目录号100422),0.67μg/mL APC/Cy7缀合的抗小鼠CD8(大鼠IgG2aκ,克隆 53-6.7,BioLegend,目录号1007141)或PE缀合的抗小鼠CD8(大鼠IgG2aκ,克隆53-6.7,BioLegend,目录号100708),2μg/mL APC缀合的抗小鼠NK1.1 (小鼠IgG2a,κ,克隆PK136,BioLegend,目录号108710)或PerCP/Cy5.5缀合的抗小鼠NK1.1(小鼠IgG2a,κ,克隆PK136,BioLegend,目录号108728) 和10μg/mL抗小鼠CD16/CD32(小鼠Fc封闭性,大鼠IgG2bκ,克隆2.4G2, BD Bioscience,目录号553142)的FACS缓冲液/孔中温育细胞。如果测试含有人IgG1 P329G LALA Fc片段的抗4-1BB结合物的结合,那么还添加30 μg/mL FITC缀合的AffiniPure抗人IgG Fcγ片段特异性山羊F(ab')$_2$片段 (Jackson ImmunoResearch,目录号109 096 098)。将细胞于4℃温育30分钟,用200μL/孔FACS缓冲液清洗两次并重悬浮,用50μL/孔含有1％(v/v)甲醛的DPBS固定。次日,在200μL/孔FACS缓冲液中重悬浮细胞并使用2激光 CantoII(BD Bioscience,带有DIVA软件)或5激光Fortessa(BD Bioscience,带有DIVA软件)获取读数。在CD8$^+$和CD4$^+$T细胞上设置门并使用检测二抗的中值荧光强度(MFI)来分析一抗的结合。使用Graph Pad Prism(Graph Pad Software Inc.),通过减去空白值(不添加一抗)对数据进行基线校准并使用非线性回归曲线拟合(稳健拟合)计算EC$_{50}$值。

[1193] 如图24B和24D中显示的,只有抗小鼠4-1BB结合性克隆20G2结合激活的小鼠CD8$^+$和CD4$^+$T细胞,而抗人4-1BB结合性克隆9B11,11D5,12B3和 25G7并不结合小鼠4-1BB且因此不是小鼠交叉反应性的。只有来自所测试克隆的克隆20G2能用作小鼠替代物。正如预期的,抗4-1BB结合性克隆无一显示结合新鲜分离的静息小鼠T细胞(图24A和24C)。与激活的人CD4$^+$T细胞相似,激活的小鼠CD4$^+$T细胞也表达比激活的小鼠CD8$^+$T细胞要少的 4-1BB。然而差异不如人T细胞强,这还可能与不同激活方案有关。EC$_{50}$值在表50中显示。

[1194] 表50:对激活的鼠CD8和CD4 T细胞的结合的EC$_{50}$值

[1195]

克隆	EC$_{50}$ CD8[nM]	EC$_{50}$ CD4[nM]

25G7	n.d.	n.d.
12B3	n.d.	n.d.
11D5	n.d.	n.d.
9B11	n.d.	n.d.
20G2	16.36	10.10

[1196] 如图25B和25D中显示的,抗小鼠4-1BB结合性克隆20G2作为moIgG1野生型(wt)或moIgG1 DAPG格式以相似方式结合激活的小鼠$CD8^+$和$CD4^+$T细胞。该结合与图24B和24D中显示的结合相似;因此,改变格式并不影响结合特性。我们将克隆20G2转移至moIgG以防止在免疫胜任性小鼠中触发抗药物抗体(ADA)。DAPG突变等同于人IgG1构建物中的P329G LALA突变,例如,它防止经由FcR^+免疫细胞的交联。EC_{50}值在表51中显示。

[1197] 表51:对激活的鼠CD8和CD4 T细胞的结合的EC_{50}值

[1198]

克隆	EC_{50} CD8 [nM]	EC_{50} CD4 [nM]
20G2 mu IgG1 κ DAPG	17.91	11.22

[1199]

20G2 mu IgG1 κ wt	18.51	9.917

[1200] 7.3食蟹猴4-1BB上的结合

[1201] 7.3.1表面等离振子共振(亲合力+亲和力)

[1202] 如上文关于人4-1BB Fc(kih)描述的(见实施例7.1.1),通过表面等离振子共振(SPR)评估噬菌体衍生的4-1BB特异性抗体12B3,25G7,11D5和9B11 对重组食蟹猴4-1BB Fc(kih)的结合。所有SPR实验是用HBS-EP作为运行缓冲液(0.01M HEPES pH 7.4,0.15M NaCl,3mM EDTA,0.005%表面活性剂P20,Biacore,Freiburg/Germany)于25℃在Biacore T200上实施的。动力学常数使用Biacore T200评估软件(vAA,Biacore AB,Uppsala/Sweden)来推导,通过数值积分来为1:1朗格缪尔结合拟合速率方程并用于定性评估亲合力(表52)。

[1203] 在相同的实验中,测定噬菌体展示衍生的抗体(人IgG1 P329GLALA)与重组食蟹猴4-1BB Fc(kih)之间的相互作用的亲和力。使用标准胺偶联试剂盒(Biacore,Freiburg/Germany)于pH 5.0在CM5芯片中直接偶联抗人Fab抗体 (Biacore,Freiburg/Germany)。固定化水平是大约9000RU。以25至100nM 的浓度捕捉噬菌体展示衍生的针对4-1BB的抗体。如关于人4-1BB Fc(kih)描述的(实施例7.1.1)实施实验。

[1204] 克隆12B3,25G7,11D5和9B11以相似的亲和力结合食蟹猴4-1BB Fc(kih)(表52),但是12B3和11D5以更高的亲合力结合表达食蟹猴4-1BB的细胞。抗4-1BB P329GLALA IgG1和食蟹猴4-1BB Fc(kih)之间的相互作用的亲和常数使用Biacore T100评估软件(vAA,Biacore AB,Uppsala/Sweden)来推导,通过数值积分来为1:1朗格缪尔结合拟合速率方程。

[1205] 表52:抗4-1BB抗体对重组食蟹猴4-1BB Fc(kih)的结合

[1206]

克隆	起源	重组食蟹猴4-1BB (亲合力格式)	重组食蟹猴4-1BB (亲和力格式)		
			ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
12B3	噬菌体展示	+++	3.8E+04	7.8E-04	2.0E-08
25G7	噬菌体展示	++	2.7E+04	4.6E-04	1.7E-08
11D5	噬菌体展示	+++	3.1E+04	7.7E-04	2.4E-08
9B11	噬菌体展示	+	2.6E+04	2.0E-03	7.8E-08

[1207] 7.3.2表达食蟹猴4-1BB的细胞:激活的食蟹猴外周血单个核白细胞 (PBMC)上的结合

[1208] 为了测试抗人4-1BB结合性克隆对食蟹猴细胞的交叉反应性,如关于人 PBMC描述的(7.1.2)伴有微小差异,使用密度梯度离心自肝素化血液分离健康的食蟹猴(Cynomolgus fascicularis)的PBMC。以1.5x10^6个细胞/mL的细胞密度将分离的PBMC在用10μg/mL抗食蟹猴交叉反应性CD3(mo IgG3 λ,抗人CD3,克隆SP34,BD Pharmingen,目录号556610)和2μg/mL抗食蟹猴交叉反应性CD28(moIgG1κ,抗人CD28,克隆CD28.2,BioLegend,目录号140786)抗体包被的6孔细胞培养板(Greiner Bio-One,Germany)中在由供应有10%FBS,1%(v/v) GlutaMAX-I,1mM丙酮酸钠,1%(v/v) MEM非必需氨基酸和50μMβ-巯基乙醇的RPMI 1640培养基组成的T细胞培养基中培养72小时。刺激72小时后,收获细胞并以0.1x10^6个细胞/孔的浓度接种至圆底悬浮细胞96孔板(Greiner bio-one,cellstar,目录号 650185)。将细胞在50μL/孔含有不同浓度的抗人4-1BB特异性huIgG P32G LALA一抗的FACS缓冲液中于4℃温育2小时。之后,将细胞用200μL/孔 FACS缓冲液清洗四次并与50μL/孔含有2μL PE缀合的抗食蟹猴交叉反应性CD4(moIgG2aκ,抗人CD4,克隆M-T477,BD Pharmingen,目录号 556616),1μg/mL PerCP/Cy5.5缀合的抗食蟹猴交叉反应性CD8 (moIgG1κ,抗人CD8,克隆RPA-T8,BioLegend,目录号301032)和30 μg/mL FITC缀合的AffiniPure抗人IgG Fcγ片段特异性山羊F(ab')$_2$片段 (Jackson ImmunoResearch,目录号109 096 098)的FACS缓冲液一起于4℃进一步温育30分钟。将细胞用FACS缓冲液清洗两次并在100μL/孔供应有0.2 μg/mL DAPI(用于区分死与活细胞)的FACS缓冲液中重悬浮。立即对细胞使用5激光Fortessa(BD Bioscience,带有DIVA软件)获取读数。在$CD8^+$和 $CD4^+$T细胞上设置门并使用检测二抗的中值荧光强度(MFI)来分析一抗的结合。使用Graph Pad Prism(Graph Pad Software Inc.),通过减去空白值(不添加一抗)对数据进行基线校准并使用非线性回归曲线拟合(稳健拟合)计算 EC_{50}值。

[1209] 如图26A和26B中显示的,至少三种抗人4-1BB克隆,即12B3,11D5和 25G7对于激活的$CD4^+$和$CD8^+$T细胞上表达的食蟹猴4-1BB也是交叉反应性的。有趣的是,结合曲线看上去与人4-1BB相似,例如,在测试的所有构建物中,12B3和11D5显示最高的MFI和最低的EC_{50}值,而25G7是更弱的结合物,具有更低的MFI和更高的EC_{50}值(表53)。克隆9B11只在最高浓度100nM时结合。这与对人4-1BB的结合相反,其中克隆9B11与克隆25G7相比更优。激活的食蟹猴$CD4^+$和$CD8^+$T细胞上的4-1BB表达水平的进一步差异与激活的人T细胞相似,例如,$CD4^+$T细胞表达比$CD8^+$T细胞少得多的 4-1BB。

[1210] 表53:对激活的食蟹猴CD8和CD4 T细胞的结合的EC_{50}值

[1211]

克隆	EC_{50} CD8[nM]	EC_{50} CD4[nM]
25G7	4.52	6.68
12B3	0.47	0.59
11D5	1.04	0.97
9B11	n.d.	n.d.

[1212] 7.4配体阻断特性

[1213] 为了测定4-1BB特异性人IgG1 P329GLALA抗体分子干扰4-1BB/4-1BB 配体相互作用的能力,使用人4-1BB配体(R&D systems)。类似地,使用鼠 4-1BB配体(R&D systems)来评估抗鼠4-1BB特异性IgG1 P329GLALA抗体20G2的配体阻断特性。

[1214] 使用标准胺偶联试剂盒(Biacore,Freiburg/Germany)于pH 5.0以大约 1500RU将人或鼠4-1BB配体直接偶联CM5芯片的两个流动室。在90秒里以 30μL/min的流以500nM的浓度使重组人或鼠4-1BB-Fc(kih)流经第二流动室。省略解离并在90秒里以30μL/min的流以200nM的浓度使噬菌体衍生的抗4-1BB人IgG1P329GLALA流经这两个流动室。对解离监测60秒。通过减去在参照流动室中获得的响应来修正本体折射率差异。在这里,使抗体流经具有固定化的人或鼠4-1BB配体但上面已经注射HBS-EP代替重组人 4-1BB-Fc(kih)的表面。

[1215] 噬菌体衍生的克隆25G7结合人4-1BB与它的4-1BB配体的复合物(表 54,图27A)。如此,这种抗体不与配体竞争对人4-1BB的结合且因此称作“非配体阻断性的”。正相反,克隆12B3,11D5和9B11不结合与它的配体联合的人4-1BB且因此称作“配体阻断性的”。鼠替代物20G2不结合与它的配体联合的鼠4-1BB且因此称作“配体阻断性的”。

[1216] 表54:抗4-1BB克隆的配体结合特性,通过表面等离振子共振测定

[1217]

克隆	起源	第一次注射	第二次注射(抗4-1BB克隆)	配体阻断
12B3	噬菌体展示	人4-1BB Fc(kih)	不结合	是

[1218]

25G7	噬菌体展示	人4-1BB Fc(kih)	结合	否
11D5	噬菌体展示	人4-1BB Fc(kih)	不结合	是
9B11	噬菌体展示	人4-1BB Fc(kih)	不结合	是
20G2	噬菌体展示	鼠4-1BB Fc(kih)	不结合	是

[1219] 7.5表位表征

[1220] 通过表面等离振子共振来表征受到噬菌体衍生的抗4-1BB抗体识别的表位。首先,通过表面等离振子共振来评估抗体竞争结合人4-1BB的能力。其次,如本文中之前描述的通过SPR来评估抗4-1BB抗体对人和鼠4-1BB的两个不同域的结合。为此目的,设计了杂合4-1BB Fc(kih)融合蛋白。它们含有4-1BB外域,人或鼠任一的域。将杂合4-1BB变体融合至Fc(kih)的节链,与用于噬菌体展示选择和上文描述的抗原-Fc融合物类似。这些实验的目的是定义“表位仓”。竞争相似或交叠表位的抗体没有能力同时结合4-1BB且属于一个“表位仓”。能同时结合4-1BB的抗4-1BB抗体不分享表位或其部分且因此分组入不同表位仓。

[1221] 7.5.1竞争结合(SPR)

[1222] 为了分析抗4-1BB人IgG1 P329GLALA对人或鼠受体的竞争性结合(图 28A-28F),使用标准胺偶联试剂盒(Biacore,Freiburg/Germany)于pH 5.5分别以1400和2200RU将噬

菌体衍生的抗4-1BB克隆9B11和11D5直接偶联至 CM5芯片。在180秒里以30μL/min的流以200nM的浓度注射重组人4-1BB Fc(kih)。省略解离并在90秒里以30μL/min的流以100nM的浓度使抗4-1BB 人IgG1 P329GLALA二抗流过。通过减去在参照流动室中获得的响应来修正本体折射率差异。

[1223] SPR实验是用HBS-EP作为运行缓冲液(0.01M HEPES pH 7.4,0.15M NaCl,3mM EDTA,0.005％表面活性剂P20,Biacore,Freiburg/Germany) 于25℃在Biacore T200上实施的。竞争结合实验显示噬菌体衍生的抗4-1BB 克隆12B3,11D5和9B11与25G7分享不同空间表位,因为两种抗体能同时结合人4-1BB Fc(kih)(表55)。

[1224] 表55:竞争结合实验的汇总

[1225]

芯片上固定化的	第一注射	第二注射			
		25G7	12B3	9B11	11D5
9B11	人4-1BB Fc(kih)	1	0	X	0

[1226]

11D5	人4-1BB Fc(kih)	1	0	0	X

[1227] 0＝不结合;1,结合;X＝未测定,因为第二注射含有与芯片上固定化的抗体相同的抗体

[1228] 7.5.2对受体变体的结合(SPR)

[1229] 使用含有人和鼠域的组合的4-1BB Fc(kih)融合分子的杂合变体或单一域表征受到噬菌体衍生的抗4-1BB克隆12B3,25G7,11D5,9B11和20G2识别的表位(表56)。如实施例6.1中关于4-1BB Fc(kih)抗原描述的将杂合4-1BB 融合至Fc(kih)。表52含有用于制备杂合4-1BB变体的4-1BB域的序列。

[1230] 构建物1由鼠4-1BB的N端部分(称作域1)融合至人4-1BB的C端部分(称作域2)构成(表56)。构建物2由人4-1BB的N端部分(称作域1)融合至鼠4-1BB的 C端部分(称作域2)构成(表57)。制备这些杂合分子,因为域2的表达并不产生功能性分子。还作为Fc(kih)融合分子(构建物3)表达人4-1BB的N端部分 (域1)。如实施例6.1中描述的实施杂合4-1BB Fc(kih)变体的表达和纯化。

[1231] 表56:杂合4-1BB Fc(kih)分子的氨基酸序列

[1232]

	融合的域 (SEQ ID NO:)	氨基酸序列
构建物1	mu4-1BB D1 / hu4-1BB D2 Fc节 (279)	VQNSCDNCQPGTFCRKYNPVCKSCPPSTFSSIGGQPNCNICRVCA GYFRFKKFCSSTHNAECECIEGFHCLGPQCTRCEKDCRPGQELTK QGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVV CGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQVDEQLYFQGGSPKSAD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC RDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE
	Fc穴 (128)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQK SLSLSPGK
构建物2	hu4-1BB D1 / mu4-1BB D2 Fc节 (280)	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQC KGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQE LTKKGCKTCSLGTFNDQNGTGVCRPWTNCSLDGRSVLKTGTTE KDVVCGPPVVSFSPSTTISVTPEGGPGGHSLQVLVDEQLYFQGGS PKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE
	Fc穴 (128)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQK

[1233]

		SLSLSPGK
构建物3	hu4-1BB D1 Fc节 (281)	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQC KGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQE LTKKGCKVDEQLYFQGGSPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGLNDIFEAQKIEW HE
	Fc穴 (128)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQK SLSLSPGK

[1234] 表57:用于制备杂合构建物的人和鼠4-1BB域的氨基酸序列

[1235]

	融合的域 (SEQ ID NO:)	氨基酸序列
构建物1	鼠4-1BB D1 (N端) (282)	VQNSCDNCQPGTFCRKYNPVCKSCPPSTFSSIGGQPNCNI CRVCAGYFRFKKFCSSTHNAECECIEGFHCLGPQCTRCE KDCRPGQELTKQGCK
	人4-1BB D2 (C端) (283)	DCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDV VCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQ
构建物2	人4-1BB D1 (N端) (284)	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCD ICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMC EQDCKQGQELTKKGCK
	鼠4-1BB D2 (C端) (285)	TCSLGTFNDQNGTGVCRPWTNCSLDGRSVLKTGTTEKD VVCGPPVVSFSPSTTISVTPEGGPGGHSLQVL
构建物3	人4-1BB D1 (N端) (284)	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCD ICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMC EQDCKQGQELTKKGCK

[1236] SPR实验是用HBS-EP作为运行缓冲液(0.01M HEPES pH 7.4,0.15M NaCl,3mM EDTA,0.005％表面活性剂P20,Biacore,Freiburg/Germany) 于25℃在Biacore T200上实施的。使用标准胺偶联试剂盒(Biacore, Freiburg/Germany)于pH 5.0在CM5芯片上直接偶联抗人Fab抗体(Biacore, Freiburg/Germany)。固定化水平是大约8,000RU。以100nM对噬菌体展示衍生的抗4-1BB抗体捕捉60秒。在120秒里以30μL/min的流以200nM使重组杂合人/小鼠4-1BB Fc(kih)变体流经流动室。对解离监测120秒(图29A-29D)。

[1237] 以大约1000RU将人4-1BB-D1(构建物3)直接偶联至CM5芯片。以30 μL/分钟使200nM抗4-1BB抗体流过180秒并对解离监测60秒(图30A-30D)。通过减去在参照流动室中获得的响应来修正本体折射率差异。在这里,使抗原流过表面具有固定化的抗人Fab抗体但上面已经注射HBS-EP而非抗体。

[1238] 噬菌体衍生的克隆12B3,11D5和9B11结合两种含有人域1的4-1BB Fc(kih)分子。噬菌体衍生的克隆25G7结合含有人域2的杂合4-1BB Fc(kih)分子。噬菌体衍生的克隆20G2结合含有鼠域1的杂合4-1BB Fc(kih)分子。汇总可以在表58中找到。

[1239] 表58:杂合4-1BB Fc(kih)变体对抗4-1BB抗体的结合

[1240] 1＝结合;0＝不结合。

[1241]

克隆	杂合4-1BB Fc(kih)				
	构建物1		*构建物2*		*构建物3*
	鼠4-1BB D1 (N-)	人4-1BB D2 (C-)	人4-1BB D1 (N-)	鼠4-1BB D2 (C-)	人4-1BB D1 (N-)
12B3	0		1		1
25G7	1		0		0
11D5	0		1		1
9B11	0		1		1
20G2	1		0		0

[1242] 实施例8

[1243] 抗4-1BB结合性克隆的功能特性

[1244] 8.1抗人4-1BB结合性克隆的功能特性

[1245] 4-1BB充当共刺激性受体且以TCR依赖性方式改善T细胞的扩充,细胞因子生成和功能特性。经由表面固定化的抗CD3抗体或经肽脉冲的抗原呈递细胞的TCR激活诱导T细胞上的4-1BB上调(Pollok et al.(1993)J.Immunol. 150(3):771-781)且在卷入后通过强化扩充和细胞因子释放来支持免疫应答(Hurtado et al.(1995)J Immunology 155(7),3360-3367)。为了测试所生成的抗人4-1BB抗体的强化能力,将圆底悬浮96孔板(Greiner bio-one,cellstar,目录号650185)用含有2μg/mL AffiniPure F(ab')2片段山羊抗人IgG,Fcγ片段特异性(Jackson Immunoresearch,目录号109-006-008)和2μg/mL AffiniPure山羊抗小鼠IgG,Fcγ片段特异性(Jackson Immunoresearch,目录号 115-005-008)的DPBS包被过夜。用DPBS清洗板以去除过量的分子并用含有 1%(w/v)BSA(SIGMA-Aldrich,目录号A3059-100G)的DPBS于37℃阻断90 分钟。去除上清液并将板与供应有1%(w/v)BSA且有或无10ng/mL抗人CD3 抗体(BioLegend,目录号317315,克隆OKT3)的DPBS一起于37℃温育90分钟。用DPBS清洗板并与供应有1%(w/v)BSA和不同浓度的所滴定的抗人4-1BB IgG1 P329 G LALA抗体的DPBS一起温育。用DPBS清洗板并吸去上清液。

[1246] 如之前描述的(7.1.2)分离人PBMC并在含有10%(v/v)FBS,1%(v/v) GlutaMAX-I,2μg/mL PHA-L和200U/mL Proleukin的RPMI 1640中激活5 天。以1-2x10^6个细胞/mL的密度将细胞在含有10%(v/v)FBS,1%(v/v) GlutaMAX-I和200U/mL Proleukin的RPMI 1640中进一步培养另外21天。收获长时间培养的PBMC,清洗,并使用人$CD8^+$T细胞分离试剂盒(Miltenyi Biotec,目录号130-096-495)依照制造商的方案分离CD8 T细胞。在200μL/ 孔由供应有10%FBS,1%(v/v)GlutaMAX-I,1mM丙酮酸钠,1%(v/v) MEM非必需氨基酸和50μM β-巯基乙醇的RPMI 1640培养基组成的T细胞培养基中以7x10^4个细胞/孔接种预激活的和分选的$CD8^+$T细胞。将细胞温育 72小时,最后4小时在Golgi-Stop(BD Bioscience,目录号554724)存在下。用DPBS清洗细胞并在100μL/孔含有1:5000稀释的LIVE/DEAD可固定绿色死细胞染料(Molecular Probes,Life Technologies,目录号L-23101)的DPBS中于4℃温育30分钟。之后,清洗细胞并在50μL/孔含有0.5μg/mL PerCP/Cy5.5缀合的抗人CD8(小鼠IgG1κ,克隆RPA-T8,BioLegend,目录号301032),0.5μg/mL PE/Cy7缀合的抗人CD25(小鼠IgG1κ,克隆BC96, BioLegend,目录号302612)和1μg/mL APC/Cy7缀合的抗人PD-1(小鼠 IgG1κ,克隆EH12.2H7,BioLegend,目录号329922)的FACS缓冲液中于4℃温育30分钟。用FACS缓冲液清洗细胞并在50μL/孔新鲜制备的固定/透化溶液(eBioscience,目录号00-5523-00)中重悬浮。于4℃温育30分钟后,用新鲜制备的透化缓冲液(eBioscience,目录号00-5523-00)清洗细胞并与50μL/孔含有2μg/mL APC标记的抗人-IFNγ(mo IgG1κ,克隆B27,BD Pharmingen,目录号554702)和2μg/mL PE缀合的抗人-TNFα(mo IgG1κ,克隆MAb11, BD Pharmingen,目录号554513)的透化缓冲液一起于4℃温育1小时。清洗细胞并用含有1%甲醛的DPBS固定。次日,使用2激光Canto II(BD,DIVA 软件)对细胞获取读数。在$CD8^+$T细胞上设置门并测定分泌TNFα和IFNγ的 $CD8^+$T细胞的频率。使用Graph Pad Prism(Graph Pad Software Inc.),将数据绘图并使用非线性回归曲线拟合(稳健拟合)计算曲线。

[1247] 如之前描述的,在TCR或CD3刺激缺失下4-1BB卷入对$CD8^+$T细胞功能没有影响(Pollok 1995),而在亚最佳CD3激活存在下4-1BB的共刺激提高细胞因子分泌(图31A或31C)。在总$CD8^+$T细胞群体中,经由CD3抗体的亚最佳激活在30%的$CD8^+$T细胞中诱导IFNγ分泌。添加4-1BB共刺激以浓度依赖性方式提高IFNγ+CD8 T细胞群体至55%(图31B)。表59显

示相应的EC_{50}值。TNFα分泌能从总$CD8^+$T细胞群体的23％提高至39％(图31D)。与它们的结合特性相似,克隆12B3和11D5在频率和EC_{50}方面比25G7和9B11更优地提高INFγ表达。因此,我们生成的克隆是功能性且能改善TCR介导的T细胞激活和功能。如果不表面固定化抗4-1BB特异性抗体,那么它们并不改善 $CD8^+$T细胞激活(未显示)。

[1248] 表59:激活的$CD8^+$T细胞中IFNγ分泌的升高的EC_{50}值

[1249]

克隆	EC_{50} CD8[nM]
25G7	0.12
12B3	0.07
11D5	0.06
9B11	0.12

[1250] 8.2抗小鼠4-1BB结合性克隆20G2的体外功能特性

[1251] 为了防止激动性抗4-1BB抗体经由Fc受体交联,在抗体的Fc部分中引入突变。与人IgG1抗体中的P329G LALA突变相似,将DAPG突变引入小鼠 IgG1分子的Fc部分中。为了测试这是否防止FcR交联和因此激活能力,用亚最佳浓度的抗小鼠CD3抗体和不同浓度的作为小鼠IgG1和小鼠IgG1 DAPG 的克隆20G2激活小鼠脾细胞。

[1252] 自健康雌性C57BL/6小鼠(7-9周龄,Charles River,France)获得脾并使用C管(Miltenyi Biotec,目录号130-096-334)和温和MACS Octo Dissociator (Miltenyi Biotec,目录号130-095-937)在3mL MACS缓冲液中匀浆。离心 (400x g,8分钟,室温)后,在7ml ACK裂解缓冲液中重悬浮细胞团粒并于 37℃实施红细胞裂解10分钟。通过添加由供应有10％FBS,1％(v/v) GlutaMAX-I,1mM丙酮酸钠,1％(v/v)MEM非必需氨基酸和50μMβ-巯基乙醇的RPMI 1640培养基组成的T细胞培养基来停止红细胞裂解。用DPBS 清洗脾细胞并过滤穿过70μm细胞筛网(Corning,目录号431751)。于37℃以 $2x10^7$个细胞/mL在DPBS中重悬浮脾细胞并添加细胞增殖染料eFluor 670 (eBioscience,目录号65-0840-90)至终浓度2.5mM。将细胞于37℃温育10分钟,通过添加FBS来停止标记过程并清洗细胞。将200μL/孔含有0.5μg/mL 抗小鼠CD3特异性仓鼠IgG(克隆145-2C11,BD Bioscience,目录号 553057),0.01-50nM所滴定的抗小鼠4-1BB特异性克隆20G2小鼠IgG1或小鼠IgG1 DAPG或同种型对照MOPC-21小鼠IgG1(BD Bioscience,目录号 554121)或同种型对照DP47 moIgG1 DAPG和$1x10^5$个脾细胞的T细胞培养基转移至96孔圆底组织培养板(TPP,目录号92097)的孔。将板温育48小时。清洗细胞,在25μL/孔含有1μg/mL BV711缀合的抗小鼠CD8大鼠IgG2a(克隆53-6.7,BioLegend,目录号100748)和2μg/mL BV421缀合的抗小鼠CD4 大鼠IgG2a(克隆RM4-5,BioLegend,目录号100544)的FACS缓冲液中重悬浮并于4℃温育20分钟。清洗细胞并在100μL/孔新鲜制备的固定/透化溶液 (eBioscience,目录号00-5523-00)中重悬浮。于4℃温育30分钟后,用DPBS 清洗细胞并在100μL/孔新鲜制备的含有10μg/mL Alexa Fluor 488缀合的抗小鼠Eomes大鼠IgG2a(克隆DAN11MAG,eBioscience,目录号53-4875-82) 和2μg/mL PE缀合的抗小鼠粒酶B大鼠IgG2a(克隆NGZB,eBioscience,目录号12-8898-82)的透化缓冲液(eBioscience,目录号00-5523-00)中重悬浮。在黑暗中将细胞于室温温育1小时,用透化缓冲液清洗,在FACS缓冲液中重悬浮并使用5激光Fortessa(BD Bioscience,DIVA软件)获取读数。在$CD8^+$ T细胞上设置门并测定表达Eomes和粒酶B的$CD8^+$T细胞的频率。使用Graph Pad Prism(Graph Pad Software Inc.),将数据绘图并使用非线性回归曲线拟合(稳健拟合)计

算曲线。

[1253] $CD8^+$T细胞的最佳激活诱导Eomesodermin(Eomes)表达,一种调节 $CD8^+$T细胞的细胞裂解性效应器机制的T盒转录因子(Glimcher et al.2004)和细胞裂解酶样粒酶B。如图32中显示的,所使用的0.5μg/mL抗小鼠CD3抗体浓度是亚最佳的且表达粒酶B的$CD8^+$T细胞的频率没有超出30%和表达 eomesodermin(eomes)的$CD8^+$T细胞的频率没有超出18%。只有添加足够量的抗小鼠4-1BB克隆20G2小鼠IgG1,更多地$CD8^+$T细胞才开始表达粒酶B (图32小图(a))和eomesodermin(图32小图(b))。这证明克隆20G2是一种激动性结合物且能够通过卷入小鼠4-1BB来激活T细胞。如果克隆20G2的交联由于DAPG突变而受损的话,没有看到激活改善的效果,这显示了还与小鼠细胞一起,抗4-1BB抗体的交联是诱导4-1BB下游信号传导所需要的。因此, DAPG突变防止抗体经由Fc结合性受体的充分交联和呈递。非小鼠4-1BB特异性同种型对照对T细胞激活没有影响。

[1254] 8.3抗小鼠4-1BB结合性克隆20G2的体内功能特性

[1255] 用激动性抗小鼠4-1BB大鼠IgG2a处理小鼠导致激活的T细胞在无肿瘤的 (Dubrot et al.(2010)Cancer Immunol Immunother.59(8),1223-33;Niu et al. (2007)J Immunol.178(7):4194-213)和携带肿瘤的小鼠(Wang et al.(2010)J Immunol.185(12):7654-62;Kocak et al.(2006)Cancer Res.66(14):7276-84)的肝中积累并诱导肝炎症。类似地,抗4-1BB抗体Urelumab(huIgG4)在IV级黑素瘤患者中的一项临床II期试验由于异常高的4级肝炎发生率不得不终止 (Ascierto P.et al.(2010)Semin Oncol.37(5),508-16)。为了测试抗小鼠4-1BB小鼠IgG1是否能诱导与所报告的激动性抗小鼠4-1BB大鼠IgG2a抗体相似的肝中T细胞累积及进一步测试DAPG突变是否能防止肝中T细胞累积,用抗小鼠4-1BB IgG1和IgG DAPG克隆20G2处理未实验的健康雌性C57BL/6小鼠 (7-9周龄,Charles River,France)。如本文中之前描述的维持和饲养小鼠。持续3周每周一次将150μg抗体静脉内注射入尾静脉中。第二次注射后1天和第三次注射后1天和8天通过颈脱位处死小鼠。解剖脾和肝并保存在冰上在补充有10%(v/v)热灭活的FBS和1%(v/v)GlutaMAX-I的RPMI 1640中。如之前描述的(8.2)分离脾细胞。如下自肝分离白细胞:将每块肝转移至装有5 mL供应有0.3mg/mL分散酶II(Roche Applied Science,目录号 04942078001),1μg/mL DNA酶I(Roche Applied Science,目录号 11284932001)和2mg/mL胶原酶D(Roche Applied Science,目录号11 088 882001)的RPMI 1640的C管(Miltenyi Biotec,目录号130-096-334),使用温和MACS Octo Dissociator使用程序“m_liver_01”(Miltenyi Biotec,目录号130-095-937)破坏组织并将肝于37℃温育30分钟。使用MACS Octo Dissociator使用程序“m_liver_02”第二次破坏经过消化的肝。离心(400x g,8分钟,室温)后,在7ml ACK裂解缓冲液中重悬浮细胞团粒并于37℃实施红细胞裂解10分钟。通过添加供应有10%FBS和1%(v/v)GlutaMAX-I的 RPMI 1640培养基来停止红细胞裂解。将10^6个细胞/孔脾细胞或来自肝的白细胞转移至圆底96孔悬浮细胞板(Greiner bio-one,cellstar,目录号650185) 并用DPBS清洗一次。将细胞在含有1:5000稀释的活/死可固定绿色死细胞染色试剂盒(Live Technologies,目录号L-23101)的100μL/孔中重悬浮并于4℃温育30分钟。之后,清洗细胞并在50μL/孔含有6μg/mL PE缀合的抗小鼠 CD137叙利亚仓鼠IgG(克隆17B5,BioLegend,目录号106106)或叙利亚仓鼠同种型对照(克隆SHG-1,BioLegend,目录号402008),2μg/mL PerCP/Cy5.5缀合的抗小鼠TCR-β亚美尼亚仓鼠IgG(克隆H57-597, BioLegend,目录号

109228),5μg/mL PE/Cy7缀合的抗小鼠CD25大鼠IgG1 (克隆PC61,BD Bioscience,目录号552880)或大鼠IgG1λ同种型对照(克隆 A110-1,BD Bioscience,目录号552869),2μg/mL Alexa Fluor 700标记的抗小鼠CD8a大鼠IgG2aκ(克隆53-6.7,BD Bioscience,目录号557959),0.25 μg/mL BV421缀合的抗小鼠CD4大鼠IgG2bκ(克隆GK1.5,BioLegend,目录号100438),4μg/mL BV605缀合的抗小鼠CD11c亚美尼亚仓鼠IgG(克隆 N418,BioLegend,目录号117333)或亚美尼亚仓鼠同种型对照(克隆 HTK888,BioLegend,目录号400943)的FACS缓冲液中重悬浮并于4℃温育 30分钟。清洗细胞并在100μL/孔新鲜制备的固定/透化溶液(eBioscience,目录号00-5523-00)中重悬浮。于4℃温育30分钟后,用新鲜制备的透化缓冲液 (eBioscience,目录号00-5523-00)清洗细胞并在50μL/孔含有0.2μg/mL eF660 缀合的抗小鼠Ki67大鼠IgG2aκ(克隆SolA15,eBioscience,目录号 50-5698-82)的透化缓冲液中重悬浮。将细胞于4℃温育30分钟,用透化缓冲液清洗两次并用50μL/孔含有1%甲醛的DPBS固定。次日,使用5激光 Fortessa(BD Bioscience,DIVA软件)对细胞获取读数。使用FlowJo(FlowJo,LLC)分析数据,在$CD8^+$或$CD4^+$T细胞上设置门,并测定 $CD137^+$,$CD25^+$,$CD11c^+$和$Ki67^+$T细胞的频率。使用Graph Pad Prism (Graph Pad Software Inc.),将数据绘图。

[1256] 如图33中显示的,只有用抗小鼠4-1BB克隆20G2小鼠IgG1处理小鼠诱导肝中$CD8^+$T细胞上的积累,增殖和升高的4-1BB(CD137)表达,而以 DAPG突变防止经由FcR结合的交联规避$CD8^+$T细胞激活。以DAPG突变防止FcR交联则防止肝中$CD8^+$T细胞激活(图33),尽管两种分子显示相似的对 T细胞上表达的小鼠CD137的结合特性(图25B和25D)且因此特征在于相同的潜在激活特性。

[1257] 实施例9

[1258] 靶向4-1BB和肿瘤相关抗原(TAA)的双特异性二价抗体的制备,纯化和表征 9.1靶向4-1BB和成纤维细胞激活蛋白(FAP)的双特异性二价抗体(2+2格式) 的生成

[1259] 制备具有针对4-1BB和针对FAP的二价结合的双特异性激动性4-1BB抗体。应用如国际专利申请号WO 2010/145792 A1中描述的crossmab技术来减少错误配对的轻链的形成。

[1260] FAP结合物的生成和制备在WO 2012/020006 A2中描述,通过援引将其收入本文。

[1261] 在这个实施例中,使用$(G_4S)_4$连接头序列将FAP结合物28H1的交叉Fab 单元(VHCL)以C端融合至抗4-1BB huIgG1的重链。将这种重链融合物与抗 4-1BB的轻链和相应FAP交叉轻链(VLCH1)共表达。依照公开号WO 2012/130831A1的国际专利申请中描述的方法在重链的恒定区中引入 Pro329Gly,Leu234Ala和Leu235Ala突变以消除对Fc伽马受体的结合。所得双特异性二价构建物与图34A中描绘的双特异性二价构建物类似。

[1262] 表60分别显示成熟双特异性,二价抗4-1BB/抗FAP人IgG1 P329GLALA 抗体的核苷酸和氨基酸序列。

[1263] 表60:双特异性,二价抗4-1BB/抗FAP人IgG1 P329GLALA抗原结合分子的序列

[1264]

SEQ ID NO:	描述	序列
286	(12B3) VHCH1-重链-(28H1) VHCL (核苷酸序列)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG TCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGC AGCTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTC GAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTAC GCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCC ACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGATCTGAATTCCGTTTCTACGCTG ACTTCGACTACTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCAG CTAGCACCAAGGGCCCATCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTCCAGCAA GTCTACCTCTGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGAC TACTTCCCCGAGCCTGTGACAGTGTCCTGGAACTCTGGCGCCCTGA CATCCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCTCCGGCCT GTACTCCCTGTCCTCCGTCGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACC AAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCA CACCTGTCCCCCTTGTCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTAGC GTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCC GGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGG ACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGC ACAATGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACTCCACCT ACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGA ACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGGGA GCCCCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGC GAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACC AAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCCCT CCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACA ACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTT CCTGTACTCTAAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGG CAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCAC TACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCCCGGGGGAGGCGGAGGA TCTGGCGGAGGCGGATCCGGTGGTGGCGGATCTGGGGGCGGTGGA

[1265]

		TCTGAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGGGGAGGACTGGTGCAGCCA GGCGGATCTCTGAGGCTGTCCTGCGCTGCTTCCGGCTTTACCTTCT CCAGCCACGCCATGAGTTGGGTGCGCCAGGCACCCGGAAAAGGAC TGGAATGGGTGTCAGCCATCTGGGCCTCCGGCGAGCAGTACTACG CCGATAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCTCGGGATAACAGCA AGAATACTCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGCGCTGAAGATA CCGCTGTGTATTACTGCGCCAAGGGCTGGCTGGGCAACTTCGATTA CTGGGGCCAGGGAACCCTCGTGACTGTCTCGAGCGCTTCTGTGGCC GCTCCCTCCGTGTTCATCTTCCCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGT CCGGCACTGCCTCTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCTCG GGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTGCAGTCCGG CAACTCCCAGGAATCCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCAC CTACTCCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGA GAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTC CAGCCCCGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGC
259	VLCL-轻链1 (12B3) (核苷酸序列)	见表40
215	VLCH1-轻链 2 (28H1) (核苷酸序列)	GAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCCGGCACCCTGAGCCTGAGCCCTG GCGAGAGAGCCACCCTGAGCTGCAGAGCCAGCCAGAGCGTGAGCC GGAGCTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCCCA GACTGCTGATCATCGGCGCCAGCACCCGGGCCACCGGCATCCCCG ATAGATTCAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCA TCAGCCGGCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGC AGGGCCAGGTGATCCCCCCCCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGG AAATCAAGAGCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTTCCTCT GGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCTCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGG CTGCCTGGTGAAAGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGG AACTCTGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGC TGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGC CCTCCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACC ACAAGCCCAGCAACACCAAAGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAG AGCTGCGAC
287	(12B3) VHCH1-重链 -(28H1) VHCL	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCARSEFRFYADFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAPGKGLEWV SAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKGWLGNFDYWGQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
261	VLCL-轻链1 (12B3)	见表40
217	VLCH1-轻链 2 (28H1)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSRSYLAWYQQKPGQAPRLLI IGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGQVIPPTF GQGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCD
288	(25G7) VHCH1-重链 -(28H1) VHCL	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGG GGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAGCA GTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG AGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGC

[1266]

	(核苷酸序列)	AGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAA GAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACAC GGCCGTATATTACTGTGCGCGTGACGACCCGTGGCCGCCGTTCGAC TACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCTAGCACC AAGGGCCCATCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTCCAGCAAGTCTACCT CTGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCC CGAGCCTGTGACAGTGTCCTGGAACTCTGGCGCCCTGACATCCGGC GTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCCC TGTCCTCCGTCGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGCACCCAGAC CTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGA CAAGAAGGTGGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTCC CCCTTGTCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTAGCGTGTTCCTG TTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCG AAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAG TGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAATGCCA AGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACTCCACCTACCGGGTGG TGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAG AGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGGGAGCCCCCATCG AAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGCGAGCCTCAGG TGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGG TGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGC CGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGA CCACCCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACTCT AAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC TCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAG AAGTCCCTGTCCCTGTCTCCCGGGGGAGGCGGAGGATCTGGCGGA GGCGGATCCGGTGGTGGCGGATCTGGGGGCGGTGGATCTGAGGTG CAGCTGCTGGAATCTGGGGGAGGACTGGTGCAGCCAGGCGGATCT CTGAGGCTGTCCTGCGCTGCTTCCGGCTTTACCTTCTCCAGCCACG CCATGAGTTGGGTGCGCCAGGCACCCGGAAAAGGACTGGAATGGG TGTCAGCCATCTGGGCCTCCGGCGAGCAGTACTACGCCGATAGCG TGAAGGGCCGGTTCACCATCTCTCGGGATAACAGCAAGAATACTC TGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGCGCTGAAGATACCGCTGTGTA TTACTGCGCCAAGGGCTGGCTGGGCAACTTCGATTACTGGGGCCA GGGAACCCTCGTGACTGTCTCGAGCGCTTCTGTGGCCGCTCCCTCC GTGTTCATCTTCCCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACTG CCTCTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCTCGGGAAGCCAA GGTGCAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCA GGAATCCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCT GAGCAGCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAA GGTGTACGCCTGTGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGT GACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGC
263	VLCL-轻链1 (25G7) (核苷酸序列)	见表40
215	VLCH1-轻链2 (28H1) (核苷酸序列)	见上文
289	(25G7) VHCH1-重链-(28H1) VHCL	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDDPWPPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAPGKGLEWV

[1267]

		SAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKGWLGNFDYWGQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
265	VLCL-轻链1 (25G7)	见表40
217	VLCH1-轻链2 (28H1)	见上文
290	(11D5) VHCH1-重链-(28H1) VHCL (核苷酸序列)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG TCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGC AGCTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTC GAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTAC GCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCC ACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGATCTACTCTGATCTACGGTTACT TCGACTACTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCAGCTA GCACCAAGGGCCCATCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTCCAGCAAGTC TACCTCTGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTAC TTCCCCGAGCCTGTGACAGTGTCCTGGAACTCTGGCGCCCTGACAT CCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTA CTCCCTGTCCTCCGTCGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAG GTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACC TGTCCCCCTTGTCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTAGCGTGT TCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGAC CCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACCC TGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAA TGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACTCCACCTACCG GGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGG CAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGGGAGCCCC CATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGCGAGCC TCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAA CCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGAT ATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTAC AAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGT ACTCTAAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACG TGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACAC CCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCCCGGGGGAGGCGGAGGATCTGG CGGAGGCGGATCCGGTGGTGGCGGATCTGGGGGCGGTGGATCTGA GGTGCAGCTGCTGGAATCTGGGGGAGGACTGGTGCAGCCAGGCGG ATCTCTGAGGCTGTCCTGCGCTGCTTCCGGCTTTACCTTCTCCAGCC ACGCCATGAGTTGGGTGCGCCAGGCACCCGGAAAAGGACTGGAAT GGGTGTCAGCCATCTGGGCCTCCGGCGAGCAGTACTACGCCGATA GCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCTCGGGATAACAGCAAGAATA CTCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGCGCTGAAGATACCGCTGT GTATTACTGCGCCAAGGGCTGGCTGGGCAACTTCGATTACTGGGG CCAGGGAACCCTCGTGACTGTCTCGAGCGCTTCTGTGGCCGCTCCC TCCGTGTTCATCTTCCCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCA CTGCCTCTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCTCGGGAAGC CAAGGTGCAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTC CCAGGAATCCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTC CCTGAGCAGCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCA CAAGGTGTACGCCTGTGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCC CGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGC
267	VLCL-轻链1 (11D5) (核苷酸序列)	见表40
215	VLCH1-轻链2 (28H1)	见上文

[1268]

	(核苷酸序列)	
291	(11D5) VHCH1-重链-(28H1) VHCL	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCARSTLIYGYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQ LLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAPGKGLEWVS AIWASGEQYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKGWLGNFDYWGQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
269	VLCL-轻链1 (11D5)	见表40
217	VLCH1-轻链2 (28H1)	见上文
292	(9B11) VHCH1-重链-(28H1) VHCL (核苷酸序列)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG TCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGC AGCTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTC GAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTAC GCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCC ACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGATCTTCTGGTGCTTACCCGGGTT ACTTCGACTACTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCAG CTAGCACCAAGGGCCCATCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTCCAGCAA GTCTACCTCTGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGAC TACTTCCCCGAGCCTGTGACAGTGTCCTGGAACTCTGGCGCCCTGA CATCCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCTCCGGCCT GTACTCCCTGTCCTCCGTCGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACC AAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCA CACCTGTCCCCCTTGTCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTAGC GTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCC GGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGG ACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGC ACAATGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACTCCACCT ACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGA ACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGGGA GCCCCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGC GAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACC AAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCCCT CCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACA ACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTT CCTGTACTCTAAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGG CAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCAC TACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCCCGGGGGAGGCGGAGGA TCTGGCGGAGGCGGATCCGGTGGTGGCGGATCTGGGGGCGGTGGA TCTGAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGGGGAGGACTGGTGCAGCCA GGCGGATCTCTGAGGCTGTCCTGCGCTGCTTCCGGCTTTACCTTCT CCAGCCACGCCATGAGTTGGGTGCGCCAGGCACCCGGAAAAGGAC TGGAATGGGTGTCAGCCATCTGGGCCTCCGGCGAGCAGTACTACG CCGATAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCTCGGGATAACAGCA AGAATACTCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGCGCTGAAGATA CCGCTGTGTATTACTGCGCCAAGGGCTGGCTGGGCAACTTCGATTA CTGGGGCCAGGGAACCCTCGTGACTGTCTCGAGCGCTTCTGTGGCC GCTCCCTCCGTGTTCATCTTCCCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGT

[1269]

		CCGGCACTGCCTCTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCTCG GGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTGCAGTCCGG CAACTCCCAGGAATCCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCAC CTACTCCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGA GAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTC CAGCCCCGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGC
271	VLCL-轻链1 (9B11) (核苷酸序列)	见表40
215	VLCH1-轻链2 (9B11) (核苷酸序列)	见上文
293	(9B11) VHCH1-重链-(28H1) VHCL	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCARSSGAYPGYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAPGKGLEWV SAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKGWLGNFDYWGQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
273	VLCL-轻链1 (9B11)	见表40
217	VLCH1-轻链2 (9B11)	见上文

[1270] 所有基因在由MPSV核心启动子与CMV启动子增强子片段组合组成的嵌合MPSV启动子控制下瞬时表达。表达载体还含有用于含有EBNA(埃巴病毒核抗原)的宿主细胞中的附加体复制的oriP区。

[1271] 通过使用聚乙烯亚胺用哺乳动物表达载体共转染HEK293-EBNA细胞来生成双特异性抗4-1BB抗FAP构建物。以1:1:1比率(“载体重链”:“载体轻链 1”:“载体轻链2”)用相应表达载体转染细胞。

[1272] 为了在500mL摇瓶中生成,在转染前24小时接种400x10^6个HEK293 EBNA细胞。为了转染,将细胞以210x g离心5分钟,并用预温热的CD CHO培养基替换上清液。在20mL CD CHO培养基中混合表达载体至200μg DNA的最终量。添加540μL PEI后,将溶液漩涡震荡15秒并于室温温育10分钟。之后,将细胞与DNA/PEI溶液混合,转移至500mL摇瓶并在具有5% CO_2气氛的温箱中于37℃温育3小时。温育后,添加160mL F17培养基并将细胞培养24小时。转染后1天,添加1mM丙戊酸和7%补料。培养7天后,通过以210x g离心15分钟来收集细胞上清液。将溶液无菌过滤(0.22μm滤器),补充叠氮化钠至终浓度0.01%(w/v),并于4℃保持。

[1273] 如上文关于抗原-Fc融合物和抗体的纯化描述的,使用蛋白A通过亲和层析进行自细胞培养物上清液纯化双特异性构建物。

[1274] 浓缩并过滤蛋白质,之后在用pH 6.0的20mM组氨酸,140mM NaCl溶液平衡的HiLoad Superdex 200柱(GE Healthcare)上加载。

[1275] 使用基于氨基酸序列计算的摩尔消光系数,通过以280nm测量OD来测定经过纯化的双特异性构建物的蛋白质浓度。使用LabChipGXII(Caliper)通过还原剂(Invitrogen,

USA)存在和缺失下的CE-SDS来分析双特异性构建物的纯度和分子量。于25℃使用在25mM K_2HPO_4,125mM NaCl,200mM单盐酸L-精氨酸,0.02%(w/v)NaN_3,pH 6.7运行缓冲液中平衡的TSKgel G3000 SW XL分析性大小排阻柱(Tosoh)分析双特异性构建物的聚集体含量 (表61)。

[1276] 表61:双特异性,二价抗4-1BB/抗FAP IgG1 P329G LALA抗原结合分子的生化分析

[1277]

克隆	单体[%]	产率[mg/l]
12B3/FAP P329GLALA IgG1 2+2	97.6	6.8
25G7/FAP P329GLALA IgG1 2+2	98.4	13
11D5/FAP P329GLALA IgG1 2+2	100	8.7
9B11/FAP P329GLALA IgG1 2+2	99	0.3

[1278] 9.2靶向4-1BB和FAP的双特异性二价抗体的结合

[1279] 9.2.1表面等离振子共振(同时结合)

[1280] 通过表面等离振子共振(SPR)评估同时结合人4-1BB Fc(kih)和人FAP的能力。所有SPR实验是用HBS-EP作为运行缓冲液(0.01M HEPES pH 7.4, 0.15M NaCl,3mM EDTA, 0.005%表面活性剂P20,Biacore, Freiburg/Germany)于25℃在Biacore T200上实施的。

[1281] 将生物素化人4-1BB Fc(kih)直接偶联至链霉亲合素(SA)传感器芯片的流动室。使用高至1000个共振单位(RU)的固定化水平。在90秒里以30 μL/min的流以250nM的浓度范围使靶向4-1BB和FAP的双特异性抗体流经流动室并将解离设为零秒。以250nM的浓度在90秒里以30μL/min的流注射作为第二分析物的人FAP经过流动室(图34B)。对解离监测120秒。通过减去在没有固定化蛋白质的参照流动室中获得的响应来修正本体折射率差异。所有双特异性构建物均能同时结合人4-1BB和人FAP(图35A-35D)。

[1282] 9.2.2细胞上的结合

[1283] 9.2.2.1对表达人4-1BB的细胞:静息的和激活的人外周血单个核白细胞 (PBMC)的结合

[1284] 如实施例7.1.2下早就描述的,分离人PBMC,激活以诱导4-1BB并用于测试抗体对人4-1BB的结合特性。

[1285] 为了显示Fc融合的FAP靶向性并不影响抗4-1BB特异性克隆的结合或经由PE缀合的人IgG Fc特异性山羊IgG F(ab')的检测,我们测试了FAP靶向性或DP47非靶向性2+2构建物对静息的人$CD4^+$和$CD8^+$T细胞(图38A-38F)和激活的人$CD4^+$和$CD8^+$T细胞(图39A-39F)的结合能力,与亲本huIgG P329G LALA格式比较。与图23A-23D相似,FAP靶向性或DP47靶向性2+2人4-1BB 特异性分子也并不结合至静息的T细胞(图38A-38F)但主要结合激活的$CD8^+$ T细胞(图39D,39E和39F)。转变成FAP靶向性或DP47非靶向性2+2格式并不剧烈改变对表达4-1BB的T细胞的结合行为。差异可以通过以Fc特异性多克隆二抗的检测来解释(例如Fc融合可掩蔽表位且降低检测)。EC_{50}值在供体间有变化,取决于激活后表达的4-1BB的量。这解释了与如表48中显示的亲本抗体的EC_{50}值相比表62中列出的EC_{50}值的差异。对激活的$CD8^+$T细胞的结合的曲线下面积在图40中显示。

[1286] 表62:对激活的人CD8 T细胞的结合的EC_{50}值

[1287]

克隆	EC_{50}[nM]
25G7	11.14

25G7/FAP 28H1 2+2	13.21
25G7/DP47 2+2	50.03
12B3	0.43
12B3/FAP 28H1 2+2	1.99
11D5	1.35
11D5/FAP 28H1 2+2	7.91

[1288] 9.2.2.2对表达人FAP的肿瘤细胞的结合

[1289] 对于细胞表面表达的成纤维细胞激活蛋白(FAP)上的结合测定法,使用 NIH/3T3-huFAP克隆19细胞系或人黑素瘤细胞系WM-266-4(ATCC CRL-1676)。NIH/3T3-huFAP克隆19是通过用在CMV启动子下编码人FAP的表达质粒pETR4921转染小鼠胚胎成纤维细胞NIH/3T3细胞系(ATCC CRL-1658)而生成的。在1.5μg/mL嘌呤霉素(InvivoGen,目录号ant-pr-5)存在下维持细胞。将$2x10^5$个表达FAP的肿瘤细胞添加至圆底悬浮细胞96孔板 (Greiner bio-one,cellstar,目录号650185)的每个孔。将细胞用200μL DPBS 清洗一次,在100μL/孔4℃冷的含有1:5000稀释的可固定存活力染料eFluor 450(eBioscience,目录号65 0863 18)或可固定存活力染料eFluor 660 (eBioscience,目录号65-0864-18)的DPBS缓冲液中重悬浮并于4℃温育30分钟。将细胞用200μL 4℃冷的DPBS缓冲液清洗一次,在50μL/孔4℃冷的含有不同滴定浓度的4-1BB特异性FAP靶向性和非靶向性抗体的FACS缓冲液中重悬浮,接着于4℃温育1小时。用200μL/孔清洗四次后,将细胞用50 μL/孔4℃冷的含有2.5μg/mL PE缀合的AffiniPure抗人IgG Fcγ片段特异性山羊F(ab')$_2$片段(Jackson ImmunoResearch,目录号109-116-098)或30μg/mL FITC缀合的AffiniPure抗人IgG Fcγ片段特异性山羊F(ab')$_2$片段(Jackson ImmunoResearch,目录号109 096 098)的FACS缓冲液于4℃染色30分钟。将细胞用200μL 4℃ FACS缓冲液清洗两次并在50μL/孔含有1%甲醛的DPBS 重悬浮细胞进行固定。同日或次日,在100μL FACS缓冲液中重悬浮细胞并使用5激光LSR-Fortessa(BD Bioscience,带有DIVA软件)或MACSQuant分析仪10(Miltenyi Biotec)获取读数。

[1290] 如图41A-41F中显示的,测试的所有2+2FAP靶向性分子有效结合表达人FAP的细胞,但是DP47靶向性或含有4-1BB结合性克隆25G7,11D5和 12B3克隆的亲本huIgG1 P293G LALA格式并非如此。因此,所测试的FAP (28H1)-靶向性2+2构建物能特异性结合表达FAP的细胞。在图42中以 NIH/3T3-huFAP结合曲线的曲线下面积(AUC)显示了汇总。所测试的格式和 FAP结合性克隆在图下方以象形图标示。它显示了测试的所有FAP靶向性 2+2格式显示相似的AUC。

[1291] 表63:对表达FAP的细胞系NIH/3T3-huFAP克隆19和WM-266-4的结合的EC_{50}值

[1292]

克隆	NIH/3T3-huFAP克隆19细胞的EC_{50} [nM]	WM-266-4的EC_{50} [nM]
12B3/ FAP 28H1 2+2	12	n.d.
25G7/ FAP 28H1 2+2	0.4	n.d.
11D5/FAP 28H1 2+2	0.9	0.7

[1293]

25G7/ DP47 2+2	0.4	n.d.

[1294] 9.2.3 NFκB激活

[1295] 9.2.3.1表达人4-1BB和NFκB-萤光素酶的HeLa细胞的生成

[1296] 用含有在CMV启动子控制下的人4-1BB的序列(Uniprot登录号Q07011) 和嘌呤霉素抗性基因的基于表达载体pETR10829的质粒转导宫颈癌细胞系HeLa(ATCC CCL-2)。在补充有10％(v/v)FBS,1％(v/v)GlutaMAX-I和3 μg/mL嘌呤霉素的DMEM培养基中培养细胞。

[1297] 通过流式细胞术对4-1BB转导的HeLa细胞测试4-1BB表达:在100μL含有0.1μg PerCP/Cy5.5缀合的抗人4-1BB小鼠IgG1κ克隆4B4-1(BioLegend,目录号309814)或其同种型对照(PerCP/Cy5.5缀合的小鼠IgG1κ同种型对照抗体克隆MOPC 21,BioLegend,目录号400150)的FACS缓冲液中重悬浮 0.2x10^6个活细胞并于4℃温育30分钟。将细胞用FACS缓冲液清洗两次,在含有0.06μg DAPI(Santa Cruz Biotec,目录号Sc-3598)的300μL FACS缓冲液中重悬浮并使用5激光LSR-Fortessa(BD Bioscience,DIVA软件)获取读数。如描述的实施有限稀释以生成单克隆:将人4-1BB转导的HeLa细胞在培养基中重悬浮至10,5和2.5个细胞/ml的密度并将200μl细胞悬浮液转移至圆底组织培养物处理的96孔板(6块板/细胞浓度,TPP目录号92697)。收获单克隆,扩充并如上文描述的测试4-1BB表达。选择具有最高4-1BB表达的克隆 (克隆5),用于后续用NFκB-萤光素酶表达载体5495p Tranlucent HygB转染。载体赋予转染细胞以对潮霉素B的抗性和在NFκB响应元件(Panomics,目录号LR0051)控制下表达萤光素酶的能力二者。为了转染人4-1BB,将HeLa克隆5细胞培养至70％汇合。将50μg(40μL)线性化的(限制酶AseI和SalI) 5495p Tranlucent HygB表达载体添加至无菌0.4cm Gene Pulser/MicroPulser杯 (Biorad,目录号165-2081)。添加400μl无补充物的DMEM培养基中的 2.5x10^6个人4-1BB HeLa克隆5细胞并与质粒溶液小心混合。以如下设置使用 Gene Pulser Xcell总系统(Biorad,目录号165 2660)实施细胞转染:指数式脉冲,电容500μF,电压160V,电阻∞。脉冲后立即将转染细胞转移至装有 15mL 37℃温的供应有10％(v/v)FBS和1％(v/v)GlutaMAX I的DMEM培养基的75cm^2组织培养瓶(TPP,目录号90075)。次日,添加含有3μg/mL嘌呤霉素和200μg/mL潮霉素B(Roche,目录号10843555001)的培养基。扩充存活细胞并如上文描述的实施有限稀释以生成单克隆。

[1298] 如上文描述的对克隆测试4-1BB表达并如下测试NFκB-萤光素酶活性:在选择培养基中收获克隆并使用细胞计数器Vi-cell xr 2.03(Beckman Coulter,目录号731050)计数。以0.33x10^6个细胞/mL的细胞密度设置细胞并将150μL此细胞悬浮液转移至带盖的无菌白色96孔平底组织培养板(Greiner bio one,目录号655083)的每个孔。将细胞在细胞温箱(Hera cell)中于37℃和 5％CO_2温育过夜。次日,将50μL含有不同浓度的重组人肿瘤坏死因子α (rhTNFα,PeproTech,目录号300 01A)的培养基添加至96孔板的每个孔,产生100,50,25,12.5,6.25和0ng/孔的rhTNFα终浓度。将细胞于37℃和5％ CO_2温育6小时,然后用200μL/孔DPBS清洗三次。将报告物裂解缓冲液 (Promega,目录号E3971)添加至每个孔(40μl)并将板于-20℃保存过夜。次日,将冷冻的细胞和检测缓冲液(萤光素酶1000测定系统,Promega,目录号E4550)融化至室温。将100μl检测缓冲液添加至每个孔并尽可能快地使用SpectraMax M5/M5^{e}微量板读数仪和SoftMax Pro软件(Molecular Devices)测量板。以对照(不添加rhTNFα)以上对500ms/孔测得的所释放的光的单位 (URL)作为萤光素酶活性。HeLa-hu4-1BB-NFκB-luc克隆26展现最高的萤光素酶活性和可观水平的4-1BB表达,选择用于进一步使用。

[1299] 9.2.3.2与表达FAP的肿瘤细胞共培养的报告细胞表达人4-1BB的HeLa细胞中的NFκB激活

[1300] 收获HeLa-hu4-1BB-NFκB-luc克隆26细胞并以0.2x10^{6}个细胞/ml的浓度在供应有10％(v/v)FBS和1％(v/v)GlutaMAX-I的DMEM培养基中重悬浮。将100μl(2x10^{4}个细胞)此细胞悬浮液转移至带盖的无菌白色96孔平底组织培养板(Greiner bio one,目录号655083)的每个孔并将板于37℃和5％CO_2温育过夜。次日,添加50μL含有所滴定的FAP靶向性抗人4-1BB构建物或它们的亲本huIgG1 P329G LALA抗体的培养基。以2x10^{6}个细胞/ml的浓度在供应有10％(v/v)FBS和1％(v/v)GlutaMAX-I的DMEM培养基中重悬浮表达 FAP的NIH/3T3-huFAP克隆19或WM-266-4。

[1301] 将表达FAP的肿瘤细胞的悬浮液(50μl)或作为阴性对照的培养基(无 FAP$^+$肿瘤细胞)添加至每个孔并将板在细胞温箱中于37℃和5％CO_2温育6小时。将细胞用200μL/孔DPBS清洗两次。将40μl新鲜制备的报告物裂解缓冲液(Promega,目录号E3971)添加至每个孔并将板于-20℃保存过夜。次日,于室温融化冷冻的细胞板和检测缓冲液(萤光素酶1000测定系统,Promega,目录号E4550)。将100μL检测缓冲液添加至每个孔并尽可能快地使用SpectraMax M5/M5^{e}微量板读数仪和SoftMax Pro软件(Molecular Devices) 测量萤光素酶活性。

[1302] FAP(28H1)靶向性克隆25G7,11D5或12B3 2+2构建物在 NIH/3T3-huFAP细胞存在下以浓度依赖性方式触发报告细胞系中NFκB信号传导途径的激活(图43C,43F和43I)。与之对比,非靶向性对照分子(4-1BB (25G7)x DP47 2+2)或亲本huIgG1 P329G LALA抗体在测试的任何浓度未能触发此类效果。所测试的FAP靶向性抗人4-1BB 2+2抗体的这种活性严格依赖于所添加的交联细胞的细胞表面处的高FAP表达,因为在表达FAP的肿瘤细胞缺失下(图43A,43D和43G)或在不太表达FAP的肿瘤细胞系(WM-266-4) 存在下(图43B,43E和43H)未能检测到NF-κB激活。因此,激活依赖于FAP 表达强度且不依赖于抗4-1BB结合物的亲和力强度,因为25G7 x FAP 2+2, 11D5 x FAP 2+2和12B3 x FAP 2+2之间的激活效力(图44A和44B和表64)与它们的4-1BB结合亲和力无关(图42)。

[1303] 表64:在表达FAP的NIH/3T3-huFAP克隆19细胞存在下表达4-1BB的报告细胞系中NFκB控制的萤光素酶的激活的EC_{50}值

[1304]

克隆	NIH/3T3-huFAP克隆19的EC_{50}[nM]
12B3/FAP 28H1 2+2	0.2
11D5/FAP 28H1 2+2	0.2
25G7/FAP 28H1 2+2	0.1

[1305] 实施例10

[1306] 靶向4-1BB和肿瘤相关抗原(TAA)的双特异性单价抗体的制备,纯化和表征 10.1单价格式(1+1格式)的靶向4-1BB和成纤维细胞激活蛋白(FAP)的双特异性抗体的生成

[1307] 制备具有针对4-1BB和针对FAP的单价结合的双特异性激动性4-1BB抗体。如国际专利申请号WO 2010/145792 A1中描述的应用crossmab技术来减少错误配对的轻链的形成。

[1308] FAP结合物的生成和制备在WO 2012/020006 A2中描述,通过援引将其收入本文。

[1309] 双特异性构建物单价结合4-1BB和FAP(图34C)。它含有与抗4-1BB huIgG1(含有

S354C/T366W突变)的节重链融合的FAP结合物的交叉Fab单元(VHCL)。Fc穴重链(含有Y349C/T366S/L368A/Y407V突变)与针对4-1BB的 Fab融合。靶向性抗FAP-Fc节与抗4-1BB-Fc穴链的组合容许生成包括特异性结合FAP的Fab和特异性结合4-1BB的Fab的异二聚体。

[1310] 依照国际专利申请公开号WO 2012/130831 A1中描述的方法在节和穴重链的恒定区中引入Pro329Gly,Leu234Ala和Leu235Ala突变以消除对Fcγ受体的结合。

[1311] 通过使用聚乙烯亚胺用哺乳动物表达载体共转染HEK293-EBNA细胞来生成双特异性单价抗4-1BB和抗FAP huIgG1 P329GLALA。以1:1:1:1比率 ("载体节重链":"载体轻链1":"载体穴重链":"载体轻链2")用相应表达载体转染细胞。

[1312] 所得双特异性,单价构建物是如关于双特异性二价抗4-1BB和抗FAP huIgG1 P329GLALA描述的(见实施例9.1)生成和纯化的。核苷酸和氨基酸序列可在表65中找到。

[1313] 表65:成熟双特异性单价抗4-1BB/抗FAP huIgG1 P329GLALA kih抗体的 cDNA和氨基酸序列

[1314]

SEQ ID NO:	描述	序列
228	(28H1) VHCL-重链穴 (核苷酸序列)	GAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCTGGC GGATCTCTGAGACTGTCCTGCGCCGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCT CCCACGCCATGTCCTGGGTCCGACAGGCTCCTGGCAAAGGCCTGG AATGGGTGTCCGCCATCTGGGCCTCCGGCGAGCAGTACTACGCCG ACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGGACAACTCCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCG CCGTGTACTACTGTGCCAAGGGCTGGCTGGGCAACTTCGACTACTG GGGACAGGGCACCCTGGTCACCGTGTCCAGCGCTAGCGTGGCCGC TCCCAGCGTGTTCATCTTCCCACCCAGCGACGAGCAGCTGAAGTCC GGCACAGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGC GAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGG CAACAGCCAGGAATCCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCAC CTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGA GAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTC CAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCGACAAGAC CCACACCTGTCCCCCTTGCCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGTGGCCCT TCCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCA GCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTCGATGTGTCCCACG AGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAG TGCACAATGCCAAGACCAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCG GCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCC GAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGA CCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCC CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGA ACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT CTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC

[1315]

		CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
215	(28H1) VLCH1-轻链2 (核苷酸序列)	GAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCCGGCACCCTGAGCCTGAGCCCTG GCGAGAGAGCCACCCTGAGCTGCAGAGCCAGCCAGAGCGTGAGCC GGAGCTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCCCA GACTGCTGATCATCGGCGCCAGCACCCGGGCCACCGGCATCCCCG ATAGATTCAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCA TCAGCCGGCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGC AGGGCCAGGTGATCCCCCCCCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGG AAATCAAGAGCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTTCCTCT GGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCTCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGG CTGCCTGGTGAAAGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGG AACTCTGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGC TGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGC CCTCCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACC ACAAGCCCAGCAACACCAAAGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAG AGCTGCGAC
229	(28H1) VHCL-重链穴	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAPGKGLE WVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAKGWLGNFDYWGQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
217	(28H1) VLCH1-轻链2	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSRSYLAWYQQKPGQAPRLLI IGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGQVIPPTF GQGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCD
294	(12B3) VHCH1-重链节 (核苷酸序列)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG TCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGC AGCTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTC GAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTAC GCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCC ACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGATCTGAATTCCGTTTCTACGCTG ACTTCGACTACTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCAG CTAGCACCAAGGGCCCTAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCTAGCAGCAA GAGCACAAGTGGAGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAATTCTGGCGCCCTG ACAAGCGGCGTGCACACATTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGC CTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACCGTGCCCTCTAGCTCTCTGG GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACA CCAAAGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACC CACACCTGTCCCCCTTGCCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGTGGCCCTT CCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAG CCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTCGATGTGTCCCACGA GGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGT GCACAATGCCAAGACCAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGG CGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG AGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGAC CAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC

[1316]

		ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
259	(12B3) VLCL-轻链1 (核苷酸序列)	见表40
295	(12B3) VHCH1-重链节	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCARSEFRFYADFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
261	(12B3) VLCL-轻链1	见表40
296	(25G7) VHCH1-重链节 (核苷酸序列)	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGG GGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAGCA GTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG AGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGC AGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAA GAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACAC GGCCGTATATTACTGTGCGCGTGACGACCCGTGGCCGCCGTTCGAC TACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCTAGCACC AAGGGCCCTAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCTAGCAGCAAGAGCACA AGTGGAGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC CCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAATTCTGGCGCCCTGACAAGC GGCGTGCACACATTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTAC TCTCTGAGCAGCGTCGTGACCGTGCCCTCTAGCTCTCTGGGCACCC AGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAAG TGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCT GTCCCCCTTGCCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGTGGCCCTTCCGTGTT CCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGAC CCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTCGATGTGTCCCACGAGGACCC TGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAA TGCCAAGACCAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACC GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCC CATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAA CCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTA CAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
263	(25G7) VLCL-轻链1 (核苷酸序列)	见表40
297	(25G7) VHCH1-重链节	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDDPWPPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1317]

265	(25G7) VLCL-轻链1	见表40
298	(11D5) VHCH1-重链节 (核苷酸序列)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG TCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGC AGCTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTC GAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTAC GCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCC ACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGATCTACTCTGATCTACGGTTACT TCGACTACTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCA GCTAGCACCAAGGGCCCTAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCTAGCAGCA AGAGCACAAGTGGAGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG ACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAATTCTGGCGCCCT GACAAGCGGCGTGCACACATTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACCGTGCCCTCTAGCTCTCTG GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAAC ACCAAAGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGAC CCACACCTGTCCCCCTTGCCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGTGGCCCT TCCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCA GCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTCGATGTGTCCCACG AGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAG TGCACAATGCCAAGACCAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCG GCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCC GAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGA CCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGA ACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT CTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
267	(11D5) VLCL-轻链1 (核苷酸序列)	见表40
299	(11D5) VHCH1-重链节	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCARSTLIYGYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
269	(11D5) VLCL-轻链1	见表40
300	(9B11) VHCH1-重链节 (核苷酸序列)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG TCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGC AGCTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTC GAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTAC GCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCC ACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGATCTTCTGGTGCTTACCCGGGTT ACTTCGACTACTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCAG CTAGCACCAAGGGCCCTAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCTAGCAGCAA GAGCACAAGTGGAGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAATTCTGGCGCCCTG ACAAGCGGCGTGCACACATTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGC

[1318]

		CTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACCGTGCCCTCTAGCTCTCTGG GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACA CCAAAGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACC CACACCTGTCCCCCTTGCCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGTGGCCCTT CCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAG CCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTCGATGTGTCCCACGA GGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGT GCACAATGCCAAGACCAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGG CGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG AGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGAC CAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
271	(9B11) VLCL-轻链1 (核苷酸序列)	见表40
301	(9B11) VHCH1-重链 节	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCARSSGAYPGYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
273	(9B11) VLCL-轻链1	见表40

[1319] 所有基因在由MPSV核心启动子与CMV启动子增强子片段组合组成的嵌合MPSV启动子控制下瞬时表达。表达载体还含有用于在含有EBNA(埃巴病毒核抗原)的宿主细胞中的附加体复制的oriP区。

[1320] 通过使用聚乙烯亚胺用哺乳动物表达载体共转染HEK293-EBNA细胞来生成双特异性抗4-1BB/抗FAP构建物。以1:1:1:1比率(“载体重节链”:“载体重穴链”:“载体轻链1”:“载体轻链2”)用相应表达载体转染细胞。

[1321] 为了500mL摇瓶中的生成,在转染前24小时接种400x10^6个HEK293 EBNA细胞。为了转染,将细胞以210x g离心5分钟,并用预温热的 CD-CHO培养基替换上清液。在20mL CD-CHO培养基中混合表达载体至 200μg DNA的最终量。添加540μL PEI后,将溶液旋涡震荡15秒并于室温温育10分钟。之后,将细胞与DNA/PEI溶液混合,转移至500mL摇瓶并在具有5% CO_2气氛的温箱中于37℃温育3小时。温育后,添加160mL F17培养基并将细胞培养24小时。转染后1天,添加1mM丙戊酸和7%补料。培养7天后,通过以210x g离心15分钟来收集细胞上清液。将溶液无菌过滤(0.22μm 滤器),补充叠氮化钠至终浓度0.01%(w/v),并于4℃保持。

[1322] 如上文关于抗原/Fc融合分子或抗体的纯化描述的使用蛋白A通过亲和层析进行自细胞培养物上清液纯化双特异性构建物。使用基于氨基酸序列计算的摩尔消光系数,通过以280nm测量OD来测定经过纯化的双特异性构建物的蛋白质浓度。使用LabChipGXII(Caliper)通过还原剂(Invitrogen, USA)存在和缺失下的CE-SDS来分析双特异性构建物的纯度和分子量。于 25℃使用在25mM K_2HPO_4,125mM NaCl,200mM单盐酸L-精氨酸, 0.02%

(w/v)NaN_3,pH 6.7运行缓冲液中平衡的TSKgel G3000 SW XL分析性大小排阻柱(Tosoh)分析双特异性构建物的聚集体含量。

[1323] 表66:双特异性,单价抗4-1BB/抗FAP IgG1 P329G LALA抗原结合分子的生化分析

[1324]

克隆	产率[mg/l]	单体[%]
12B3/FAP P329GLALA IgG1 1+1	14	94.8
25G7/FAP P329GLALA IgG1 1+1	33	92.2

[1325] 10.2作为筛选工具的FAP抗原的制备,纯化和的表征

[1326] 为了测试对FAP的结合,在含有由MPSV核心启动子与CMV启动子增强子片段组合组成的嵌合MPSV启动子的表达载体中克隆融合至C端His标签的编码人,小鼠或食蟹猴FAP的外域的DNA序列。表达载体还含有用于在含有EBNA(埃巴病毒核抗原)的宿主细胞中的附加体复制的oriP区。带His标签的人FAP ECD的氨基酸和核苷酸序列分别在SEQ ID NO:85和86中显示。SEQ ID NO:88和89分别显示带His标签的小鼠FAP ECD的氨基酸和核苷酸序列。SEQ ID NO:90和91分别显示带His标签的食蟹猴FAP ECD的氨基酸和核苷酸序列。

[1327] 通过使用聚乙烯亚胺(PEI;Polysciences Inc.)用哺乳动物表达载体共转染HEK293-EBNA细胞来生成FAP抗原。

[1328] 为了500mL摇瓶中的200mL生成,在转染前24小时在100%F17+6 mM谷氨酰胺中接种300x10^6个HEK293 EBNA细胞。为了转染,将400x10^6个细胞以210x g离心5分钟,并用20mL预温热的CD-CHO培养基(Gibco)替换上清液。在20mL CD-CHO培养基中混合表达载体至200μg DNA的最终量。添加540μL PEI(1mg/mL)(Polysciences Inc.)后,将溶液漩涡震荡15秒并于室温温育10分钟。之后,将重悬浮的细胞与DNA/PEI溶液混合,转移至500mL摇瓶并在具有5%CO_2气氛且以165rpm摇动的温箱中于37℃温育3 小时。温育后,添加160mL F17培养基和补充物(1mM丙戊酸,5g/l Pepsoy 和6mM L-谷氨酰胺)并将细胞培养24小时。转染后24小时,然后以12%最终体积(24mL)对细胞补充氨基酸和葡萄糖补料。培养7天后,通过以2000-3000x g离心45分钟来收集细胞上清液。将溶液无菌过滤(0.22μm滤器),补充叠氮化钠至终浓度0.01%(w/v),并于4℃保持。

[1329] 以两步骤纯化进行自细胞培养物上清液纯化抗原,首先是使用5ml IMAC柱(Roche)或5ml NiNTA柱(Qiagen)的亲和层析步骤,接着是使用 HiLoad Superdex 200柱(GE Healthcare)的大小排阻层析,分别用20mM组氨酸,140mM NaCl,pH6.0或2mM MOPS,150mM NaCl,0.02%NaN_3,pH 7.3平衡的。

[1330] 为了使用IMAC柱(Roche)的亲和层析,用8个CV的25mM Tris-HCl, 500mM氯化钠,20mM咪唑,pH8.0实施平衡。加载上清液并通过用10个 CV的25mM Tris-HCl,500mM氯化钠,20mM咪唑,pH 8.0清洗来洗去未结合的蛋白质。使用20个CV(0-100%)的25mM Tris-HCl,500mM氯化钠, 500mM咪唑,pH8.0的线性梯度,接着是8个CV的100%的步骤来洗脱结合的蛋白质。

[1331] 为了使用NiNTA柱(Qiagen)的亲和层析,用8个CV的50mM磷酸钠, 300mM氯化钠,pH8.0实施平衡。加载上清液并通过用10个柱体积的50 mM磷酸钠,300mM氯化钠,pH8.0清洗来去除未结合的蛋白质。使用20个 CV(0至100%)的50mM磷酸钠,300mM氯化钠,500mM咪唑,pH7.4的线性梯度,接着是5个CV的50mM磷酸钠,300mM氯化钠,500mM咪唑, pH7.4的步骤来洗脱结合的蛋白质。然后用8个CV的50mM磷酸钠,300mM 氯化钠,pH8.0再平衡柱。

[1332] 然后对收集的级分补充1/10(v/v)的0.5M EDTA,pH8.0。在Vivaspin柱 (30kD截留,Sartorius)中浓缩蛋白质并过滤,之后在用2mM MOPS,150 mM NaCl,0.02%NaN_3,pH 7.3或20mM组氨酸,140mM NaCl,pH6.0平衡的HiLoad Superdex 200柱(GE Healthcare)上加载。

[1333] 使用基于氨基酸序列计算的摩尔消光系数,通过以280nm测量OD来测定经过纯化的抗原的蛋白质浓度。使用LabChipGXII(Caliper)通过还原剂 (Invitrogen)存在和缺失下的CE-SDS来分析抗原的纯度和分子量。于25℃使用在25mM磷酸钾,125mM氯化钠,200mM单盐酸L-精氨酸,0.02%(w/v) NaN_3,pH 6.7运行缓冲液中平衡的TSKgel G3000 SW XL分析性大小排阻柱 (Tosoh)分析抗原的聚集体含量。

[1334] 10.3靶向4-1BB和FAP的双特异性单价抗体的结合

[1335] 10.3.1表面等离振子共振(同时结合)

[1336] 通过表面等离振子共振(SPR)评估同时结合人4-1BB Fc(kih)和人FAP的能力。所有SPR实验是用HBS-EP作为运行缓冲液(0.01M HEPES pH 7.4,0.15M NaCl,3mM EDTA,0.005%表面活性剂P20,Biacore, Freiburg/Germany)于25℃在Biacore T200上实施的。

[1337] 将生物素化人4-1BB Fc(kih)直接偶联至链霉亲合素(SA)传感器芯片的流动室。使用高至1000个共振单位(RU)的固定化水平。在90秒里以30 μL/min的流以250nM的浓度范围使靶向4-1BB和FAP的双特异性抗体流经流动室并将解离设为零秒。以250nM的浓度在90秒里以30μL/min的流注射作为第二分析物的人FAP经过流动室。对解离监测120秒。通过减去在没有固定化蛋白质的参照流动室中获得的响应来修正本体折射率差异。所有双特异性构建物均能同时结合人4-1BB和人FAP。

[1338] 10.3.2细胞上的结合

[1339] 10.3.2.1对表达人4-1BB的细胞:静息的和激活的人外周血单个核白细胞 (PBMC)的结合

[1340] 如实施例7.1.2下早就描述的,分离人PBMC,新鲜使用(例如静息T细胞) 或激活以诱导4-1BB并用于测试抗体对人4-1BB的结合特性。

[1341] 为了比较4-1BB FAP靶向性1+1构建物的单价4-1BB结合与亲本抗4-1BB 特异性huIgG1 P329G LALA克隆的二价4-1BB结合,将构建物与静息的或激活的表达人4-1BB的PBMC一起温育并如较早描述的用PE缀合的人IgG Fc特异性山羊IgG F(ab')检测。如图39D和39F中显示的,与它们的亲本huIgG1 P329G LALA构建物相比,转变成单价4-1BB FAP靶向性1+1格式提高4-1BB 结合的EC_{50}值(表67)并降低MFI值(图39B/39E和39C/39F)。如图40中显示的,这种EC_{50}升高和MFI降低导致结合曲线的曲线下面积(AUC)的或多或少二分。

[1342] 表67:对激活的人$CD8^+$T细胞的结合的EC_{50}值

[1343]

克隆	EC_{50} [nM]

[1344]

25G7	11.1
25G7/ FAP 28H1 1+1	> 70
25G7/ DP47 1+1	> 70
12B3	0.4
12B3/ FAP 28H1 1+1	8

[1345] 10.3.2.2对表达人FAP的细胞的结合

[1346] 对表达FAP的肿瘤细胞的结合早就在上文9.2.2.2下描述。

[1347] 如图41A-41F中显示的，克隆25G7和12B3的FAP靶向性1+1分子，而非 DP47靶向性1+1或亲本huIgG1 P293G LALA抗体有效结合表达人FAP的细胞 (图41B/41D和41E/41F)。因此，1+1构建物也能特异性结合表达FAP的细胞，尽管由于单价FAP靶向而具有比FAP靶向性2+2格式略微更高的EC_{50}(表 68和图41B/41D和41E/41F)。然而，这对结合曲线的AUC仅仅具有微小影响 (图42)。

[1348] 表68:对表达FAP的细胞系NIH/3T3-huFAP克隆19和WM-266-4的结合的EC_{50}值

[1349]

克隆	NIH/3T3-huFAP克隆19细胞的EC_{50} [nM]	WM-266-4细胞的EC_{50} [nM]
12B3/ FAP 28H1 1+1	2.4	1.7
25G7/ FAP 28H1 1+1	4.4	5
25G7/ DP47 1+1	n.d.	n.d.

[1350] 10.3.3 NFκB激活

[1351] 使用表达人4-1BB的报告细胞系HeLa-hu4-1BB-NFκB-luc分析功能能力的方案早就在实施例9.2.3.2中描述。

[1352] FAP(28H1)靶向性克隆25G7或12B3 1+1构建物在NIH/3T3-huFAP细胞存在下触发报告细胞系中NFκB信号传导途径的激活(图43F和43I)。与之对比，非靶向性对照分子(4-1BB(25G7)x DP47 1+1)或亲本huIgG1 P329G LALA抗体在测试的任何浓度未能触发此类效果。FAP靶向性抗人4-1BB 1+1抗体的这种活性严格依赖于所添加的FAP^{+}细胞的细胞表面处的高FAP表达，因为在表达FAP的肿瘤细胞缺失下(图43D和43G)或在不太表达FAP的肿瘤细胞系(WM-266-4)存在下(图43E和43H)未能检测到NF-κB激活。比较FAP 靶向性1+1与FAP靶向性2+2分子，克隆12B3和25G7表现不同。12B3 FAP靶向性1+1构建物具有比12B3 FAP靶向性2+2构建物更高的EC_{50}但是还有更高的激活高台(图43F)，因此这两种构建物具有相似的AUC(图44A)，而25G7 FAP靶向性1+1构建物具有与25G7 FAP靶向性2+2构建物相比更高的EC_{50}值和相同的激活高台(图43I)和因此更小的AUC(图44A)，例如，25G7 FAP靶向性1+1的表现明显比25G7 FAP靶向性2+2要差。原因可能是强(例如12B3) 和低(例如25G7)4-1BB结合物之间的差异，它在单价4-1BB结合时变得更加突出。

[1353] 表69:在表达FAP的肿瘤细胞存在下NFκB信号传导途径的激活的EC_{50}值

[1354]

克隆	NIH/3T3-huFAP克隆19的EC_{50}[nM]
12B3/FAP 28H1 1+1	0.9

25G7/FAP 28H1 1+1	～2

[1355] 实施例11

[1356] 具有针对4-1BB的二价结合和针对肿瘤相关抗原(TAA)的单价结合的双特异性抗体的制备,纯化和表征

[1357] 11.1具有针对4-1BB的二价结合和针对肿瘤相关抗原(TAA)的单价结合(2+1 格式)的双特异性抗体的生成

[1358] 如图36中所绘制备具有针对4-1BB的二价结合和针对FAP的单价结合,也称作2+1的双特异性激动性4-1BB抗体。

[1359] 在这个实施例中,构建物的第一重链HC1由下述构件构成:抗4-1BB结合物的VHCH1,接着是Fc节,在其C端融合抗FAP结合物的VL或VH。第二重链HC2的构成是抗4-1BB的VHCH1,接着是Fc穴,在其C端分别融合抗 FAP结合物(克隆4B9)的VH或VL。FAP结合物4B9的生成和制备在WO 2012/020006A2中描述,通过援引将其收入本文。针对4-1BB的结合物(12B3,9B11,11D5和25G7)如实施例6中描述的生成。靶向性抗FAP-Fc节与抗4-1BB-Fc穴链的组合容许生成包括一个FAP结合模块和两个4-1BB结合性Fab的异二聚体(图36A和36B)。

[1360] 依照国际专利申请公开号WO 2012/130831 A1中描述的方法在节和穴重链的恒定区中引入Pro329Gly,Leu234Ala和Leu235Ala突变以消除对Fcγ受体的结合。

[1361] 通过使用聚乙烯亚胺用哺乳动物表达载体共转染HEK293-EBNA细胞来生成双特异性2+1抗4-1BB抗FAP huIgG1 P329GLALA抗体。以1:1:1比率(“载体节重链”:“载体轻链”:“载体穴重链”)用相应表达载体转染细胞。如关于双特异性二价抗4-1BB和抗FAP huIgG1 P329GLALA抗体描述的(见实施例 9.1)生成和纯化构建物。

[1362] a-FAP VH融合至节且VL融合至穴链的2+1抗4-1BB,抗FAP构建物的碱基对和氨基酸序列分别可以在表70中找到。

[1363] 表70:成熟双特异性2+1抗4-1BB,抗FAP人IgG1 P329GLALA(a-FAP VL融合至穴且VH融合至节链的构建物,在下文表72中称作穴-VL)的cDNA和氨基酸序列

[1364]

SEQ ID NO:	描述	序列
259	(12B3) VLCL-轻链 (核苷酸序列)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAG GAGACCGTGTCACCATCACTTGCCGTGCCAGTCAGAGTATTAGTAG CTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCT CCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCACGT TTCAGCGGCAGTGGATCCGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGC AGCTTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATC ATTCGTATCCGCAGACGTTTGGCCAGGGCACCAAAGTCGAGATCA AGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGA TGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAAT AACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAAC GCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGAC AGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGC AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACC CATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGA GAGTGT
316	(12B3) VHCH1 Fc节 VH (4B9) (HC1 的核苷酸序列)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG TCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGC AGCTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTG GAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTAC GCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCC ACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGATCTGAATTCCGTTTCTACGCTG ACTTCGACTACTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCGAGTG CTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAA GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTG ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGAC TCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACAC CAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCA CACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTC AGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTG AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGC GCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCCTGCAGAGATGAGCTGACC AAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCA GCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACA ACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTT CCTGTACTCCAAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGG

[1365]

		CAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCA CTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGGAGGCGGCGG AAGCGGAGGAGGAGGATCTGGGGGCGGAGGTTCCGGAGGCGGTG GATCTGAGGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGC CTGGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTT CAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCCTGGCAAGGG ACTGGAATGGGTGTCCGCCATCATCGGCTCTGGCGCCAGCACCTAC TACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACAAC AGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGGGATGGTTCGGCGGCTTC AACTACTGGGGACAGGGCACCCTGGTCACCGTGTCCAGC
317	(12B3) VHCH1 Fc穴 VL (4B9) (HC2 的核苷酸序列)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG TCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGC AGCTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTG GAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTAC GCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCC ACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGATCTGAATTCCGTTTCTACGCTG ACTTCGACTACTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCGAGTG CTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAA GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTG ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGAC TCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACAC CAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCA CACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTC AGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTG AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGC GCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACC AAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC TTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCG GAAGCGGAGGAGGAGGATCCGGCGGCGGAGGTTCCGGAGGCGGA GGATCCGAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCCGGCACCCTGTCTCTGA GCCCTGGCGAGAGAGCCACCCTGTCCTGCAGAGCCTCCCAGTCCG TGACCTCCTCCTACCTCGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGC CCCTCGGCTGCTGATCAACGTGGGCAGTCGGAGAGCCACCGGCAT CCCTGACCGGTTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTG ACCATCTCCCGGCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCC AGCAGGGCATCATGCTGCCCCCCACCTTTGGCCAGGGCACCAAGG TGGAAATCAAG
261	(12B3) VLCL-轻链	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YDASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYHSYPQT FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
318	(12B3) VHCH1 Fc节 VH (4B9) (重链1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCARSEFRFYADFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA

[1366]

		AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSE VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW VSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSS
319	(12B3) VHCH1 Fc穴 VL (4B9) (重链2)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCARSEFRFYADFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIV LTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQKPGQAPRLLINV GSRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFG QGTKVEIK
263	(25G7) VLCL-轻链 (核苷酸序列)	TCGTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGAC AGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGTTATT ATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCCTGTACTTG TCATCTATGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGAT TCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATCACTGG GGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAACTCCCTTGAT AGGCGCGGTATGTGGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTC CTAGGTCAACCCAAGGCTGCCCCCAGCGTGACCCTGTTCCCCCCCA GCAGCGAGGAACTGCAGGCCAACAAGGCCACCCTGGTCTGCCTGA TCAGCGACTTCTACCCAGGCGCCGTGACCGTGGCCTGGAAGGCCG ACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGGCGTGGAGACCACCACCCCCAGCA AGCAGAGCAACAACAAGTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGA CCCCCGAGCAGTGGAAGAGCCACAGGTCCTACAGCTGCCAGGTGA CCCACGAGGGCAGCACCGTGGAGAAAACCGTGGCCCCCACCGAGT GCAGC
320	(25G7) VHCH1 Fc节 VH (4B9) (核苷酸序列, 重链1)	GAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGC GGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCA GCTACGCCATGAGCTGGGTGCGCCAGGCCCCTGGAAAAGGCCTGG AATGGGTGTCCGCCATCTCTGGCAGCGGCGGCAGCACCTACTACG CCGATTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACAACAGCA AGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACA CCGCCGTGTACTATTGCGCCAGGGACGACCCCTGGCCCCCCTTTGA TTATTGGGGACAGGGCACCCTCGTGACCGTGTCCAGCGCTAGCAC CAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACC TCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC CCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGC GGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACT CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCC AGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG TGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACAT GCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCT TCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACC GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCC CATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC ACAGGTGTACACCCTGCCCCCCTGCAGAGATGAGCTGACCAAGAA

[1367]

		CCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCAGCGAT ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTAC AAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGT ACTCCAAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACG TGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA CCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGGAGGCGGCGGAAGCG GAGGAGGAGGATCTGGGGGCGGAGGTTCCGGAGGCGGTGGATCT GAGGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGC GGCAGCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCA GCTACGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCCTGGCAAGGGACTGG AATGGGTGTCCGCCATCATCGGCTCTGGCGCCAGCACCTACTACGC CGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAA GAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACAC CGCCGTGTACTACTGCGCCAAGGGATGGTTCGGCGGCTTCAACTAC TGGGGACAGGGCACCCTGGTCACCGTGTCCAGC
321	(25G7) VHCH1 Fc穴 VL (4B9) (核苷酸序列, 重链2)	GAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGC GGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCA GCTACGCCATGAGCTGGGTGCGCCAGGCCCCTGGAAAAGGCCTGG AATGGGTGTCCGCCATCTCTGGCAGCGGCGGCAGCACCTACTACG CCGATTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACAACAGCA AGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACA CCGCCGTGTACTATTGCGCCAGGGACGACCCCTGGCCCCCCTTTGA TTATTGGGGACAGGGCACCCTCGTGACCGTGTCCAGCGCTAGCAC CAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACC TCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC CCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGC GGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACT CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCC AGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG TGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACAT GCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCT TCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACC GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCC CATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC ACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAA CCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTA CAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC GTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCGGAAGC GGAGGAGGAGGATCCGGCGGCGGAGGTTCCGGAGGCGGAGGATC CGAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCCGGCACCCTGTCTCTGAGCCCT GGCGAGAGAGCCACCCTGTCCTGCAGAGCCTCCCAGTCCGTGACC TCCTCCTACCTCGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCCTC GGCTGCTGATCAACGTGGGCAGTCGGAGAGCCACCGGCATCCCTG ACCGGTTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCAT CTCCCGGCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCA GGGCATCATGCTGCCCCCCACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGA AATCAAG
265	(25G7) VLCL-轻链	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVI YGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSLDRRGM WVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPG AVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSH RSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
322	(25G7)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE

[1368]

	VHCH1 Fc节VH (4B9)(重链1)	WVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDDPWPPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSS
323	(25G7)VHCH1 Fc穴VL (4B9)(重链2)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDDPWPPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQKPGQAPRLLINVGSRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK
267	(11D5)VLCL-轻链(核苷酸序列)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCATCACTTGCCGTGCCAGTCAGAGTATTAGTAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGCGGCAGTGGATCCGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGCAGCTTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGCTTAATTCGTATCCTCAGACGTTTGGCCAGGGCACCAAAGTCGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
324	(11D5)VHCH1 Fc节VH (4B9)(核苷酸序列,重链1)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCCGGCGGCACCTTCAGCAGCTACGCCATTTCTTGGGTGCGCCAGGCCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCGGCATCATCCCCATCTTCGGCACCGCCAACTACGCCCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACAAGAGCACCAGCACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAAGCACCCTGATCTACGGCTACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGTCTAGCGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGT

[1369]

		ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAA TGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGC CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCCTGCAGAGATGAGCTGACCAA GAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCAGC GATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAAC TACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCC TGTACTCCAAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCA ACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACT ACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGGAGGCGGCGGAA GCGGAGGAGGAGGATCTGGGGGCGGAGGTTCCGGAGGCGGTGGA TCTGAGGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCT GGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCA GCAGCTACGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCCTGGCAAGGGAC TGGAATGGGTGTCCGCCATCATCGGCTCTGGCGCCAGCACCTACTA CGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACAACAG CAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGA CACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGGGATGGTTCGGCGGCTTCAA CTACTGGGGACAGGGCACCCTGGTCACCGTGTCCAGC
325	(11D5) VHCH1 Fc穴 VL (4B9) (核苷酸序列, 重链2)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCCGGC AGCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCCGGCGGCACCTTCAGC AGCTACGCCATTTCTTGGGTGCGCCAGGCCCCTGGACAGGGCCTG GAATGGATGGGCGGCATCATCCCCATCTTCGGCACCGCCAACTAC GCCCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACAAGAGC ACCAGCACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGAC ACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAAGCACCCTGATCTACGGCTACT TCGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGTCTAGCGCTA GCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAG CACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTA CTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGAC CAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTC TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCA CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCA AGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACA CATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAG TCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCG GACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGT ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAA TGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGC CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA ACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAA GAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA CTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCGGAA GCGGAGGAGGAGGATCCGGCGGCGGAGGTTCCGGAGGCGGAGGA TCCGAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCCGGCACCCTGTCTCTGAGCC CTGGCGAGAGAGCCACCCTGTCCTGCAGAGCCTCCCAGTCCGTGA CCTCCTCCTACCTCGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCC TCGGCTGCTGATCAACGTGGGCAGTCGGAGAGCCACCGGCATCCC TGACCGGTTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACC ATCTCCCGGCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGC AGGGCATCATGCTGCCCCCCACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGG AAATCAAG
269	(11D5) VLCL-轻链	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YDASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQLNSYPQT

			FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	326	(11D5) VHCH1 Fc节 VH (4B9) (重链1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCARSTLIYGYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKGWFGGFNYWGQGTLVTVSS
	327	(11D5) VHCH1 Fc穴 VL (4B9) (重链2)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCARSTLIYGYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVL TQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQKPGQAPRLLINVG SRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQ GTKVEIK
[1370]	271	(9B11) VLCL-轻链 (核苷酸序列)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAG GAGACCGTGTCACCATCACTTGCCGTGCCAGTCAGAGTATTAGTAG CTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCT CCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCACGT TTCAGCGGCAGTGGATCCGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGC AGCTTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGGTTA ATTCTTATCCGCAGACGTTTGGCCAGGGCACCAAAGTCGAGATCA AGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGA TGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAAT AACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAAC GCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGAC AGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGC AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACC CATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGA GAGTGT
	328	(9B11) VHCH1 Fc节 VH (4B9) (核苷酸序列, 重链1)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG TCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGC AGCTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTC GAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTAC GCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCC ACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGATCTTCTGGTGCTTACCCGGGTT ACTTCGACTACTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCAG CTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAA GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTG ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGAC TCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACAC CAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCA CACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTC

[1371]

		AGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTG AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGC GCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCCTGCAGAGATGAGCTGACC AAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCA GCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACA ACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTT CCTGTACTCCAAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGG CAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCA CTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGGAGGCGGCGG AAGCGGAGGAGGAGGATCTGGGGGCGGAGGTTCCGGAGGCGGTG GATCTGAGGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGC CTGGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTT CAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCCTGGCAAGGG ACTGGAATGGGTGTCCGCCATCATCGGCTCTGGCGCCAGCACCTAC TACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACAAC AGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGGGATGGTTCGGCGGCTTC AACTACTGGGGACAGGGCACCCTGGTCACCGTGTCCAGC
329	(9B11) VHCH1 Fc穴 VL (4B9) (核苷酸序列, 重链2)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG TCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGC AGCTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTC GAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTAC GCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCC ACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGATCTTCTGGTGCTTACCCGGGTT ACTTCGACTACTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCAG CTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAA GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTG ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGAC TCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACAC CAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCA CACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTC AGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTG AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGC GCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACC AAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC TTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCG GAAGCGGAGGAGGAGGATCCGGCGGCGGAGGTTCCGGAGGCGGA GGATCCGAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCCGGCACCCTGTCTCTGA GCCCTGGCGAGAGAGCCACCCTGTCCTGCAGAGCCTCCCAGTCCG TGACCTCCTCCTACCTCGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGC CCCTCGGCTGCTGATCAACGTGGGCAGTCGGAGAGCCACCGGCAT CCCTGACCGGTTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTG ACCATCTCCCGGCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCC

[1372]

		AGCAGGGCATCATGCTGCCCCCCACCTTTGGCCAGGGCACCAAGG TGGAAATCAAG
273	(9B11) VLCL-轻链	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YDASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQVNSYPQT FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
330	(9B11) VHCH1 Fc节 VH (4B9) (重链1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCARSSGAYPGYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSE VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW VSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSS
331	(9B11) VHCH1 Fc穴 VL (4B9) (重链2)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCARSSGAYPGYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIV LTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQKPGQAPRLLINV GSRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFG QGTKVEIK

[1373] 抗FAP VL融合至节且VH融合至穴链的2+1抗4-1BB,抗FAP构建物的碱基对和氨基酸序列分别可以在表71中找到。

[1374] 表71:成熟双特异性2+1抗4-1BB,抗FAP人IgG1 P329GLALA(a-FAP VH融合至穴且VL融合至节链的构建物,下文称作穴-VH)的cDNA和氨基酸序列

SEQ ID NO:	描述	序列
259	(12B3) VLCL-轻链 (核苷酸序列)	见表70
332	(12B3) VHCH1 Fc节 VL (4B9) (HC1的核苷酸序列)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG TCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGC AGCTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTG GAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTAC GCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCC ACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGATCTGAATTCCGTTTCTACGCTG ACTTCGACTACTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCGAGTG CTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAA GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTG ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGAC TCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACAC

[1375]

		CAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCA CACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTC AGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTG AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGC GCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCCTGCAGAGATGAGCTGACC AAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCA GCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACA ACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTT CCTGTACTCCAAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGG CAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCA CTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGGAGGCGGCGG AAGCGGAGGAGGAGGATCTGGGGGCGGAGGTTCCGGAGGCGGTG GATCTGAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCCGGCACCCTGTCTCTGAG CCCTGGCGAGAGAGCCACCCTGTCCTGCAGAGCCTCCCAGTCCGT GACCTCCTCCTACCTCGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCC CCTCGGCTGCTGATCAACGTGGGCAGTCGGAGAGCCACCGGCATC CCTGACCGGTTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGA CCATCTCCCGGCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCA GCAGGGCATCATGCTGCCCCCCACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGT GGAAATCAAG
333	(12B3) VHCH1 Fc穴 VH (4B9) (HC2的核苷酸序列)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG TCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGC AGCTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTG GAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTAC GCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCC ACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGATCTGAATTCCGTTTCTACGCTG ACTTCGACTACTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCGAGTG CTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAA GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTG ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGAC TCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACAC CAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCA CACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTC AGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTG AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGC GCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACC AAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC TTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCG GAAGCGGAGGAGGAGGATCCGGCGGCGGAGGTTCCGGAGGCGGA GGATCCGAGGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCAG CCTGGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCT TCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCCTGGCAAGG GACTGGAATGGGTGTCCGCCATCATCGGCTCTGGCGCCAGCACCT

[1376]

		ACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACA ACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCG AGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGGGATGGTTCGGCGGCT TCAACTACTGGGGACAGGGCACCCTGGTCACCGTGTCCAGC
261	(12B3) VLCL-轻链	见表70
334	(12B3) VHCH1 Fc节 VL (4B9) (重链1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCARSEFRFYADFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEI VLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQKPGQAPRLLIN VGSRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTF GQGTKVEIK
335	(12B3) VHCH1 Fc穴 VH (4B9) (重链2)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCARSEFRFYADFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKGWFGGFNYWGQGTLVTVSS
263	(25G7) VLCL-轻链 (核苷酸序列)	见表70
336	(25G7) VHCH1 Fc节 VL (4B9) (核苷酸序列, 重链1)	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGG GGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAGCA GTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG AGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGC AGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAA GAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACAC GGCCGTATATTACTGTGCGCGTGACGACCCGTGGCCGCCGTTCGAC TACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCTAGCACC AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCT CTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC CCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCG GCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTC CCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT GGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATG CCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTT CCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAT GCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG TGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCC ATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA CAGGTGTACACCCTGCCCCCCTGCAGAGATGAGCTGACCAAGAAC

[1377]

		CAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCAGCGATA TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACA AGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTA CTCCAAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGT GTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACAC CCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGGAGGCGGCGGAAGCGG AGGAGGAGGATCTGGGGGCGGAGGTTCCGGAGGCGGTGGATCTG AGATCGTGCTGACCCAGTCTCCCGGCACCCTGTCTCTGAGCCCTGG CGAGAGAGCCACCCTGTCCTGCAGAGCCTCCCAGTCCGTGACCTCC TCCTACCTCGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCCTCGGC TGCTGATCAACGTGGGCAGTCGGAGAGCCACCGGCATCCCTGACC GGTTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTC CCGGCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGGG CATCATGCTGCCCCCCACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAAT CAAG
337	(25G7) VHCH1 Fc穴 VH (4B9) (核苷酸序列, 重链2)	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGG GGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAGCA GTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG AGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGC AGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAA GAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACAC GGCCGTATATTACTGTGCGCGTGACGACCCGTGGCCGCCGTTCGAC TACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCTAGCACC AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCT CTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC CCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCG GCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTC CCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT GGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATG CCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTT CCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAT GCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG TGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCC ATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA CAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAAC CAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACA TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTAC AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCG TGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCGGAAGCG GAGGAGGAGGATCCGGCGGCGGAGGTTCCGGAGGCGGAGGATCC GAGGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGC GGCAGCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCA GCTACGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCCTGGCAAGGGACTGG AATGGGTGTCCGCCATCATCGGCTCTGGCGCCAGCACCTACTACGC CGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAA GAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACAC CGCCGTGTACTACTGCGCCAAGGGATGGTTCGGCGGCTTCAACTAC TGGGGACAGGGCACCCTGGTCACCGTGTCCAGC
265	(25G7) VLCL-轻链	见表70
338	(25G7) VHCH1 Fc节 VL (4B9) (重链1)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDDPWPPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV

[1378]

		TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEI VLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQKPGQAPRLLIN VGSRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTF GQGTKVEIK
339	(25G7) VHCH1 Fc穴 VH (4B9) (重链2)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDDPWPPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKGWFGGFNYWGQGTLVTVSS
267	(11D5) VLCL-轻链 (核苷酸序列)	见表70
340	(11D5) VHCH1 Fc节 VL (4B9) (核苷酸序列, 重链1)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG TCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGC AGCTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTC GAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTAC GCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCC ACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGATCTACTCTGATCTACGGTTACT TCGACTACTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCAGCTA GCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAG CACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTA CTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGAC CAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTC TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCA CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCA AGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACA CATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAG TCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCG GACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGT ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAA TGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGC CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCCTGCAGAGATGAGCTGACCAA GAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCAGC GATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAAC TACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCC TGTACTCCAAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCA ACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACT ACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGGAGGCGGCGGAA GCGGAGGAGGAGGATCTGGGGGCGGAGGTTCCGGAGGCGGTGGA TCTGAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCCGGCACCCTGTCTCTGAGCC CTGGCGAGAGAGCCACCCTGTCCTGCAGAGCCTCCCAGTCCGTGA CCTCCTCCTACCTCGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCC TCGGCTGCTGATCAACGTGGGCAGTCGGAGAGCCACCGGCATCCC

[1379]

		TGACCGGTTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACC ATCTCCCGGCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGC AGGGCATCATGCTGCCCCCCACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGG AAATCAAG
341	(11D5) VHCH1 Fc穴 VH (4B9) (核苷酸序列, 重链2)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG TCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGC AGCTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTC GAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTAC GCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCC ACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGATCTACTCTGATCTACGGTTACT TCGACTACTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCAGCTA GCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAG CACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTA CTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGAC CAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTC TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCA CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCA AGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACA CATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAG TCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCG GACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGT ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAA TGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGC CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA ACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAA GAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA CTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCGGAA GCGGAGGAGGAGGATCCGGCGGCGGAGGTTCCGGAGGCGGAGGA TCCGAGGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCT GGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCA GCAGCTACGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCCTGGCAAGGGAC TGGAATGGGTGTCCGCCATCATCGGCTCTGGCGCCAGCACCTACTA CGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACAACAG CAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGA CACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGGGATGGTTCGGCGGCTTCAA CTACTGGGGACAGGGCACCCTGGTCACCGTGTCCAGC
269	(11D5) VLCL-轻链	见表70
342	(11D5) VHCH1 Fc节 VL (4B9) (重链1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCARSTLIYGYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIV LTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQKPGQAPRLLINV GSRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFG QGTKVEIK
343	(11D5) VHCH1 Fc穴	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY

[1380]

	VH (4B9) (重链2)	YCARSTLIYGYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQ LLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS AIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKGWFGGFNYWGQGTLVTVSS
271	(9B11) VLCL-轻链 (核苷酸序列)	见表70
344	(9B11) VHCH1 Fc节 VL (4B9) (核苷酸序列, 重链1)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG TCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGC AGCTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTC GAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTAC GCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCC ACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGATCTTCTGGTGCTTACCCGGGTT ACTTCGACTACTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCAG CTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAA GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTG ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGAC TCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACAC CAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCA CACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTC AGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTG AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGC GCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCCTGCAGAGATGAGCTGACC AAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCA GCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACA ACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTT CCTGTACTCCAAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGG CAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCA CTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGGAGGCGGCGG AAGCGGAGGAGGAGGATCTGGGGGCGGAGGTTCCGGAGGCGGTG GATCTGAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCCGGCACCCTGTCTCTGAG CCCTGGCGAGAGAGCCACCCTGTCCTGCAGAGCCTCCCAGTCCGT GACCTCCTCCTACCTCGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCC CCTCGGCTGCTGATCAACGTGGGCAGTCGGAGAGCCACCGGCATC CCTGACCGGTTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGA CCATCTCCCGGCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCA GCAGGGCATCATGCTGCCCCCCACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGT GGAAATCAAG
345	(9B11) VHCH1 Fc穴 VH (4B9) (核苷酸序列, 重链2)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG TCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGC AGCTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTC GAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTAC GCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAAATCC ACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC ACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGATCTTCTGGTGCTTACCCGGGTT

[1381]

		ACTTCGACTACTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCAG CTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAA GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTG ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGAC TCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACAC CAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCA CACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTC AGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTG AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGC GCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACC AAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC TTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCG GAAGCGGAGGAGGAGGATCCGGCGGCGGAGGTTCCGGAGGCGGA GGATCCGAGGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCAG CCTGGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCT TCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCCTGGCAAGG GACTGGAATGGGTGTCCGCCATCATCGGCTCTGGCGCCAGCACCT ACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACA ACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCG AGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGGGATGGTTCGGCGGCT TCAACTACTGGGGACAGGGCACCCTGGTCACCGTGTCCAGC
273	(9B11) VLCL-轻链	见表70
346	(9B11) VHCH1 Fc节 VL (4B9) (重链1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCARSSGAYPGYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEI VLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQKPGQAPRLLIN VGSRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTF GQGTKVEIK
347	(9B11) VHCH1 Fc穴 VH (4B9) (重链2)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCARSSGAYPGYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKGWFGGFNYWGQGTLVTVSS

[1382] 表72:针对4-1BB的二价结合和针对FAP的单价结合的双特异性构建物(2+1 4-1BB/FAP人IgG1 P329GLALA)的生化分析

[1383]

克隆	产率[mg/l]	单体[%]	CE-SDS(非还原的)
2+1 25G7/FAP(穴-VH)	25.6	96.7	95.4
2+1 11D5/FAP(穴-VH)	6.3	97	89.2

[1384] 11.2靶向4-1BB和FAP的双特异性单价抗体的结合

[1385] 11.2.1表面等离振子共振(同时结合)

[1386] 通过表面等离振子共振(SPR)评估同时结合人4-1BB Fc(kih)和人FAP的能力。所有SPR实验是用HBS-EP作为运行缓冲液(0.01M HEPES pH 7.4，0.15M NaCl,3mM EDTA，0.005％表面活性剂P20,Biacore,Freiburg/Germany)于25℃在Biacore T200上实施的。

[1387] 将生物素化人4-1BB Fc(kih)直接偶联至链霉亲合素(SA)传感器芯片的流动室。使用高至400个共振单位(RU)的固定化水平。在90秒里以30μL/min 的流以200nM的浓度范围使靶向4-1BB和FAP的双特异性抗体流经流动室并将解离设为零秒。以500nM的浓度在90秒里以30μL/min的流注射作为第二分析物的人FAP经过流动室。对解离监测120秒。通过减去在没有固定化蛋白质的参照流动室中获得的响应来修正本体折射率差异。

[1388] 如图37B和37C中显示的,所有双特异性构建物均能同时结合人4-1BB 和人FAP。

[1389] 11.2.2 NFκB激活

[1390] NFκB报告细胞系HeLa-huCD137-NFκB-luc克隆26的生成以及激活测定法的设置早就在9.2.3下描述。

[1391] 所测试的含有克隆11D5(图43A-43C)或克隆25G7(图43G-43I)的FAP (4B9)靶向性2+1构建物在表达FAP的肿瘤细胞存在下触发报告细胞系中 NFκB信号传导途径的激活。这种活性严格依赖于肿瘤细胞的细胞表面处的 FAP表达,因为在表达FAP的肿瘤细胞缺失下未能检测到NF-κB激活(图43D 和43G)。与所测试的其它格式(例如2+2,1+1)不同,FAP(4B9)靶向性2+1也能在更低表达FAP的WM-266-4细胞存在下诱导激活(图43E和43H)。在 NIH/3T3-huFAP克隆19结合物存在下,2+1格式也与FAP(28H1)靶向性2+2或 1+1构建物相比更优(图43F和43I,图44B)。这可以用更强FAP结合物 (4B9>28H1)和FAP结合侧和4-1BB结合侧之间的不同比率(1:2对1:1)来解释。

[1392] 表73:在表达FAP的肿瘤细胞存在下NFκB信号传导途径的激活的EC_{50}值

[1393]

克隆	NIH/3T3-huFAP克隆19细胞的EC_{50} [nM]	WM-266-4的EC_{50} [nM]
4-1BB(25G7)/FAP(4B9) 2+1	0.1	0.3
4-1BB(11D5)/FAP(4B9) 2+1	0.3	0.4

[1394] 本公开涉及下述实施方案。

[1395] 1.一种双特异性抗原结合分子,其包含

[1396] (a)至少一个能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的模块,

[1397] (b)至少一个能够特异性结合靶细胞抗原的模块,和

[1398] (c)由能够稳定联合的第一和第二亚基构成的Fc域。

[1399] 2.实施方案1的双特异性抗原结合分子,其中该共刺激性TNF受体家族成员选自由OX40和4-1BB组成的组。

[1400] 3.实施方案1或2的双特异性抗原结合分子,其中该共刺激性TNF受体家族成员是

OX40。

[1401] 4.实施方案1至3任一项的双特异性抗原结合分子,其中该能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的模块结合包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽。

[1402] 5.实施方案1至4任一项的双特异性抗原结合分子,其包含至少一个能够特异性结合OX40的模块,其中所述模块包含

[1403] VH域,其包含

[1404] (i)包含选自由SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3组成的组的氨基酸序列的 CDR-H1,

[1405] (ii)包含选自由SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5组成的组的氨基酸序列的 CDR-H2,和

[1406] (iii)包含选自由SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12组成的组的氨基酸序列的CDR-H3,

[1407] 和VL域,其包含

[1408] (iv)包含选自由SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15组成的组的氨基酸序列的CDR-L1,

[1409] (v)包含选自由SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18组成的组的氨基酸序列的CDR-L2,和

[1410] (vi)包含选自由SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24组成的组的氨基酸序列的 CDR-L3。

[1411] 6.实施方案1至5任一项的双特异性抗原结合分子,其中该能够特异性结合OX40的模块包含包含与选自由SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:29,SEQ ID NO:31,SEQ ID NO:33,SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:37组成的组的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的重链可变区VH和包含与SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:30,SEQ ID NO:30,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:34,SEQ ID NO:36和 SEQ ID NO:38的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的轻链可变区VL。

[1412] 7.实施方案1至5任一项的双特异性抗原结合分子,其中该能够特异性结合OX40的模块包含

[1413] (i)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:26 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[1414] (ii)包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:28 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[1415] (iii)包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:30 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[1416] (iv)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:32 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[1417] (v)包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:34 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[1418] (vi)包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:36 的氨基酸序列的轻链可变区VL,或

[1419] (vii)包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:38 的氨基酸序列的轻链可变区VL。

[1420] 8.实施方案1或2的双特异性抗原结合分子,其中该共刺激性TNF受体家族成员是4-1BB。

[1421] 9.实施方案1,2或8任一项的双特异性抗原结合分子,其中该能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的模块结合包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的多肽。

[1422] 10.实施方案1,2,8或9任一项的双特异性抗原结合分子,其包含至少一个能够特异性结合4-1BB的模块,其中所述模块包含

[1423] VH域,其包含

[1424] (i)包含选自由SEQ ID NO:40和SEQ ID NO:41组成的组的氨基酸序列的 CDR-H1,

[1425] (ii)包含选自由SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:43组成的组的氨基酸序列的 CDR-H2,和

[1426] (iii)包含选自由SEQ ID NO:44,SEQ ID NO:45,SEQ ID NO:46,SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48组成的组的氨基酸序列的CDR-H3

[1427] 和VL域,其包含

[1428] (iv)包含选自由SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:50组成的组的氨基酸序列的 CDR-L1,

[1429] (v)包含选自由SEQ ID NO:51和SEQ ID NO:52组成的组的氨基酸序列的 CDR-L2,和

[1430] (vi)包含选自由SEQ ID NO:53,SEQ ID NO:54,SEQ ID NO:55,SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57组成的组的氨基酸序列的CDR-L3。

[1431] 11.实施方案1,2,8,9或10任一项的双特异性抗原结合分子,其中该能够特异性结合4-1BB的模块包含包含与选自由SEQ ID NO:58,SEQ ID NO:60,SEQ ID NO:62,SEQ ID NO:64和SEQ ID NO:66组成的组的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的重链可变区VH和包含与选自由SEQ ID NO:59,SEQ ID NO:61,SEQ ID NO:63,SEQ ID NO:65和SEQ ID NO:67组成的组的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的轻链可变区。

[1432] 12.实施方案1,2和8至11任一项的双特异性抗原结合分子,其中该能够特异性结合4-1BB的模块包含

[1433] (i)包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:59 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[1434] (ii)包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:61 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[1435] (iii)包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:63 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[1436] (iv)包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:65 的氨基酸序列的轻链可变区VL,或

[1437] (v)包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:67 的氨基酸序列的轻链可变区VL。

[1438] 13.实施方案1至12任一项的双特异性抗原结合分子,其中该能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的模块是Fab片段。

[1439] 14.实施方案1至13任一项的双特异性抗原结合分子,其中该靶细胞抗原选自由成纤维细胞激活蛋白(FAP),黑素瘤相关硫酸软骨素蛋白聚糖 (MCSP),表皮生长因子受体(EGFR),癌胚抗原(CEA),CD19,CD20和CD33 组成的组。

[1440] 15.实施方案1至14任一项的双特异性抗原结合分子,其中该靶细胞抗原是成纤维细胞激活蛋白(FAP)。

[1441] 16.实施方案1至15任一项的双特异性抗原结合分子,其中该能够特异性结合FAP的模块包含

[1442] VH域,其包含

[1443] (i)包含选自由SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69组成的组的氨基酸序列的 CDR-H1,

[1444] (ii)包含选自由SEQ ID NO:70和SEQ ID NO:71组成的组的氨基酸序列的 CDR-H2,和

[1445] (iii)包含选自由SEQ ID NO:72和SEQ ID NO:73组成的组的氨基酸序列的 CDR-H3,

[1446] 和VL域,其包含

[1447] (iv)包含选自由SEQ ID NO:74和SEQ ID NO:75组成的组的氨基酸序列的 CDR-L1,

[1448] (v)包含选自由SEQ ID NO:76和SEQ ID NO:77组成的组的氨基酸序列的 CDR-L2,和

[1449] (vi)包含选自由SEQ ID NO:78和SEQ ID NO:79组成的组的氨基酸序列的 CDR-L3。

[1450] 17.实施方案1至7任一项的双特异性抗原结合分子,其中

[1451] (i)该能够特异性结合OX40的模块包含包含与SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:29,SEQ ID NO:31,SEQ ID NO:33,SEQ ID NO:35 或SEQ ID NO:37的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或 100%同一的氨基酸序列的重链可变区VH和包含与SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:30,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:34,SEQ ID NO:36 或SEQ ID NO:38的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或 100%同一的氨基酸序列的轻链可变区VL且

[1452] (ii)该能够特异性结合FAP的模块包含包含与SEQ ID NO:80或SEQ ID NO:82的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的重链可变区VH和包含与SEQ ID NO:81或SEQ ID NO:83的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的轻链可变区VL。

[1453] 18.实施方案1至7或17任一项的双特异性抗原结合分子,其中

[1454] (i)该能够特异性结合OX40的模块包含包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的轻链可变区且

[1455] (ii)该能够特异性结合FAP的模块包含包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列的轻链可变区。

[1456] 19.实施方案1,2或8至12任一项的双特异性抗原结合分子,其中

[1457] (i)该能够特异性结合4-1BB的模块包含包含与SEQ ID NO:58,SEQ ID NO:60,SEQ ID NO:62,SEQ ID NO:64或SEQ ID NO:66的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的重链可变区VH和包含与SEQ ID NO:59,SEQ ID NO:61,SEQ ID NO:63,SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:67的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%, 99%或100%同一的氨基酸序列的轻链可变区且

[1458] (ii)该能够特异性结合FAP的模块包含包含与SEQ ID NO:80或SEQ ID NO:82的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的重链可变区VH和包含与SEQ ID NO:81或SEQ ID NO:83的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的轻链可变区。

[1459] 20.实施方案1至19任一项的双特异性抗原结合分子,其中所述分子包含

[1460] (a)能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的第一Fab片段,

[1461] (b)能够特异性结合靶细胞抗原的第二Fab片段,和

[1462] (c)由能够稳定联合的第一和第二亚基构成的Fc域。

[1463] 21.实施方案1至20任一项的双特异性抗原结合分子,其中该Fc域是 IgG,特别是IgG1 Fc域或IgG4 Fc域。

[1464] 22.实施方案1至21任一项的双特异性抗原结合分子,其中该Fc域包含一处或多处降低抗体对Fc受体的结合亲和力和/或效应器功能的氨基酸替代。

[1465] 23.实施方案1至22任一项的双特异性抗原结合分子,其中该Fc域是人 IgG1亚类的,具有氨基酸突变L234A,L235A和P329G(编号方式依照Kabat EU索引)。

[1466] 24.实施方案1至23任一项的双特异性抗原结合分子,其中该Fc域包含促进Fc域的第一和第二亚基联合的修饰。

[1467] 25.实施方案1至24任一项的双特异性抗原结合分子,其中依照节入穴方法,该Fc域的第一亚基包含节且该Fc域的第二亚基包含穴。

[1468] 26.实施方案1至25任一项的双特异性抗体,其中该Fc域的第一亚基包含氨基酸替代S354C和T366W(编号方式依照Kabat EU索引)且该Fc域的第二亚基包含氨基酸替代Y349C,T366S和Y407V(编号方式依照Kabat EU索引)。

[1469] 27.实施方案1至26任一项的双特异性抗原结合分子,其包含

[1470] (a)两个能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的模块,

[1471] (b)两个能够特异性结合靶细胞抗原的模块,和

[1472] (c)由能够稳定联合的第一和第二亚基构成的Fc域。

[1473] 28.实施方案27的双特异性抗原结合分子,其中该双特异性抗原结合分子对于该共刺激性TNF受体家族成员和该靶细胞抗原二者是二价的。

[1474] 29.实施方案1至26任一项的双特异性抗原结合分子,其包含

[1475] (a)包含两个能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的Fab片段和Fc域的抗体的两条轻链和两条重链,和

[1476] (b)两个另外的能够特异性结合靶细胞抗原的Fab片段,其中所述另外的Fab 片段各自经肽接头连接至(a)的重链的C端。

[1477] 30.实施方案29的双特异性抗原结合分子,其中该两个另外的能够特异性结合靶细胞抗原的Fab片段是交换Fab片段,其中可变域VL和VH彼此替换且VL-CH链各自经肽接头

连接至(a)的重链的C端。

[1478] 31.实施方案29或30的双特异性抗原结合分子,其中该两个能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的Fab片段是两个能够特异性结合OX40或 4-1BB的Fab片段且该两个另外的能够特异性结合靶细胞抗原的Fab片段是能够特异性结合FAP的交换Fab片段。

[1479] 32.实施方案1至26任一项的双特异性抗原结合分子,其包含

[1480] (a)两个能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的模块,

[1481] (b)一个能够特异性结合靶细胞抗原的模块,和

[1482] (c)由能够稳定联合的第一和第二亚基构成的Fc域。

[1483] 33.实施方案32的双特异性抗原结合分子,其中该双特异性抗原结合分子对于该共刺激性TNF受体家族成员是二价的且对于该靶细胞抗原是单价的。

[1484] 34.实施方案1至26或32或33的双特异性抗原结合分子,其包含

[1485] (a)包含两个能够特异性结合共刺激性TNF受体家族成员的Fab片段和Fc域的抗体的两条轻链和两条重链,和

[1486] (b)能够特异性结合靶细胞抗原的VH和VL域,其中该VH域经肽接头连接至该重链之一的C端且其中该VL域经肽接头连接至第二重链的C端。

[1487] 35.一种多核苷酸,其编码实施方案1至34任一项的双特异性抗原结合分子。

[1488] 36.一种特异性结合OX40的抗体,其中所述抗体包含

[1489] (i)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:26 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[1490] (ii)包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:28 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[1491] (iii)包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:30 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[1492] (iv)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:32 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[1493] (v)包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:34 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[1494] (vi)包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:36 的氨基酸序列的轻链可变区VL,或

[1495] (vii)包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:38 的氨基酸序列的轻链可变区VL。

[1496] 37.一种特异性结合4-1BB的抗体,其中所述抗体包含

[1497] (i)包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:59 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[1498] (ii)包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:61 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[1499] (iii)包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:63 的氨基酸序列的轻链可变区VL,

[1500] (iv)包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:65 的氨

基酸序列的轻链可变区VL,或

[1501] (v)包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的重链可变区VH和包含SEQ ID NO:67 的氨基酸序列的轻链可变区VL。

[1502] 38.一种多核苷酸,其编码实施方案36或37的抗体。

[1503] 39.一种药物组合物,其包含实施方案1至34任一项的双特异性抗原结合分子或实施方案36或37的抗体和至少一种药学可接受赋形剂。

[1504] 40.实施方案1至34任一项的双特异性抗原结合分子,或实施方案36或 37的抗体或实施方案39的药物组合物,其用作药物。

[1505] 41.实施方案1至34任一项的双特异性抗原结合分子,或实施方案36或 37的抗体,或实施方案38的药物组合物,其用于

[1506] (i)刺激T细胞应答,

[1507] (ii)支持激活的T细胞的存活,

[1508] (iii)治疗感染,

[1509] (iv)治疗癌症,

[1510] (v)延迟癌症进展,或

[1511] (vi)延长罹患癌症的患者的存活。

[1512] 42.实施方案1至34任一项的双特异性抗原结合分子,或实施方案36或 37的抗体,或实施方案39的药物组合物,其用于治疗癌症。

[1513] 43.实施方案1至34任一项的双特异性抗原结合分子,或实施方案36或 37的抗体,或实施方案39的药物组合物,其用于治疗癌症,其中与化疗剂,放射和/或其它用于癌症免疫疗法的药剂组合施用该双特异性抗原结合分子。

[1514] 44.一种在个体中抑制肿瘤细胞生长的方法,其包括对该个体施用有效量的实施方案1至34任一项的双特异性抗原结合分子,或实施方案36或37的抗体,或实施方案39的药物组合物以抑制肿瘤细胞生长。

序列表

<110> 豪夫迈·罗氏有限公司(F. Hoffmann-La Roche AG)

<120> 对共刺激性TNF受体特异性的双特异性抗体

<130> P33116-WO

<150> EP15188095.2

<151> 2015-10-02

<150> EP16170363.2

<151> 2016-05-19

<160> 347

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 186

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 1

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

180 185

<210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40(8H9,49B4,1G4, 20B7) CDR-H1
<400> 2
Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5
<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40(CLC-563, CLC-564, 17A9) CDR-H1
<400> 3
Ser Tyr Ala Met Ser
1 5
<210> 4
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40(8H9,49B4,1G4, 20B7) CDR-H2
<400> 4
Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15
Gly
<210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40(CLC-563, CLC-564, 17A9) CDR-H2
<400> 5
Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40(8H9) CDR-H3
<400> 6
Glu Tyr Gly Trp Met Asp Tyr
1 5
<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40(49B4) CDR-H3
<400> 7
Glu Tyr Tyr Arg Gly Pro Tyr Asp Tyr
1 5
<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40(1G4) CDR-H3
<400> 8
Glu Tyr Gly Ser Met Asp Tyr
1 5
<210> 9
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40(20B7) CDR-H3
<400> 9
Val Asn Tyr Pro Tyr Ser Tyr Trp Gly Asp Phe Asp Tyr
1 5 10
<210> 10
<211> 7
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> OX40(CLC-563) CDR-H3
<400> 10
Asp Val Gly Ala Phe Asp Tyr
1 5
<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40(CLC-564) CDR-H3
<400> 11
Asp Val Gly Pro Phe Asp Tyr
1 5
<210> 12
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40(17A9)-CDR-H3
<400> 12
Val Phe Tyr Arg Gly Gly Val Ser Met Asp Tyr
1 5 10
<210> 13
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40(8H9,49B4,1G4, 20B7) CDR-L1
<400> 13
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10
<210> 14
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40(CLC-563, CLC564) CDR-L1

<400> 14
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10
<210> 15
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40(17A9) CDR-L1
<400> 15
Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser
1 5 10
<210> 16
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40(8H9,49B4,1G4, 20B7) CDR-L2
<400> 16
Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5
<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40(CLC-563, CLC564) CDR-L2
<400> 17
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5
<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40(17A9) CDR-L2
<400> 18
Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 19
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40(8H9) CDR-L3
<400> 19
Gln Gln Tyr Leu Thr Tyr Ser Arg Phe Thr
1 5 10
<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40(49B4) CDR-L3
<400> 20
Gln Gln Tyr Ser Ser Gln Pro Tyr Thr
1 5
<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40(1G4) CDR-L3
<400> 21
Gln Gln Tyr Ile Ser Tyr Ser Met Leu Thr
1 5 10
<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40(20B7) CDR-L3
<400> 22
Gln Gln Tyr Gln Ala Phe Ser Leu Thr
1 5
<210> 23
<211> 9
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> OX40(CLC-563, CLC-164) CDR-L3
<400> 23
Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Leu Thr
1 5
<210> 24
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40(17A9) CDR-L3
<400> 24
Asn Ser Arg Val Met Pro His Asn Arg Val
1 5 10
<210> 25
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40(8H9) VH
<400> 25
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Tyr Gly Trp Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115
<210> 26

<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40(8H9) VL
<400> 26

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

<210> 27
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40(49B4) VH
<400> 27

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

Ala Arg Glu Tyr Tyr Arg Gly Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Thr Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 28
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40(49B4) VL
<400> 28
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Gln Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105
<210> 29
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40(1G4) VH
<400> 29
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Tyr Gly Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

<210> 30
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40(1G4) VL
<400> 30
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ile Ser Tyr Ser Met
85 90 95
Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 31
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40(20B7) VH
<400> 31
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

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

<210> 32
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40(20B7) VL
<400> 32

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

<210> 33
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40(CLC-563) VH
<400> 33

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

<210> 34
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40(CLC-563) VL
<400> 34

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

100 105

<210> 35
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40(CLC-564) VH
<400> 35

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

<210> 36
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40(CLC-564) VL
<400> 36

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

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

<210> 37
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40(17A9) VH
<400> 37
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Val Phe Tyr Arg Gly Gly Val Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 38
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> OX40(17A9) VL
<400> 38
Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15
Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala

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

<210> 39
<211> 163
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)
<400> 39
Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
1 5 10 15
Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
20 25 30
Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
35 40 45
Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
50 55 60
Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
65 70 75 80
Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
85 90 95
Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
100 105 110
Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
115 120 125
Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
130 135 140
Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
145 150 155 160
Ser Pro Gln

<210> 40
<211> 5

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4-1BB(12B3,11D5, 9B11, 20G2) CDR-H1
<400> 40
Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5
<210> 41
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4-1BB(25G7) CDR-H1
<400> 41
Ser Tyr Ala Met Ser
1 5
<210> 42
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4-1BB(12B3,11D5, 9B11, 20G2) CDR-H2
<400> 42
Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15
Gly
<210> 43
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4-1BB(25G7) CDR-H2
<400> 43
Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly
<210> 44
<211> 11
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 4-1BB(12B3) CDR-H3
<400> 44
Ser Glu Phe Arg Phe Tyr Ala Asp Phe Asp Tyr
1 5 10
<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4-1BB(25G7) CDR-H3
<400> 45
Asp Asp Pro Trp Pro Pro Phe Asp Tyr
1 5
<210> 46
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4-1BB(11D5) CDR-H3
<400> 46
Ser Thr Leu Ile Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10
<210> 47
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4-1BB(9B11) CDR-H3
<400> 47
Ser Ser Gly Ala Tyr Pro Gly Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10
<210> 48
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4-1BB(20G2) CDR-H3

<400> 48
Ser Tyr Tyr Trp Glu Ser Tyr Pro Phe Asp Tyr
1 5 10
<210> 49
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4-1BB(12B3,11D5, 9B11, 20G2) CDR-L1
<400> 49
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10
<210> 50
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4-1BB(25G7) CDR-L1
<400> 50
Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser
1 5 10
<210> 51
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4-1BB(12B3,11D5, 9B11, 20G2) CDR-L2
<400> 51
Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5
<210> 52
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4-1BB(25G7) CDR-L2
<400> 52
Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4-1BB(12B3) CDR-L3
<400> 53
Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Gln Thr
1 5
<210> 54
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4-1BB(25G7) CDR-L3
<400> 54
Asn Ser Leu Asp Arg Arg Gly Met Trp Val
1 5 10
<210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4-1BB(11D5) CDR-L3
<400> 55
Gln Gln Leu Asn Ser Tyr Pro Gln Thr
1 5
<210> 56
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4-1BB(9B11) CDR-L3
<400> 56
Gln Gln Val Asn Ser Tyr Pro Gln Thr
1 5
<210> 57
<211> 8
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 4-1BB(20G2) CDR-L3
<400> 57
Gln Gln Gln His Ser Tyr Tyr Thr
1 5
<210> 58
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4-1BB(12B3) VH
<400> 58
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Glu Phe Arg Phe Tyr Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 59
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4-1BB(12B3) VL
<400> 59
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp

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

<210> 60
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4-1BB(25G7) VH
<400> 60
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Asp Pro Trp Pro Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 61
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 4-1BB(25G7) VL
<400> 61

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

<210> 62
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4-1BB(11D5) VH
<400> 62

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

<210> 63
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4-1BB(11D5) VL
<400> 63

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

<210> 64
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4-1BB(9B11) VH
<400> 64

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

85 90 95
Ala Arg Ser Ser Gly Ala Tyr Pro Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 65
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4-1BB(9B11) VL
<400> 65
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Asn Ser Tyr Pro Gln
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105
<210> 66
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4-1BB(20G2) VH
<400> 66
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

<210> 67
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 4-1BB(20G2) VL
<400> 67
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gln His Ser Tyr Tyr Thr
85 90 95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 68
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FAP(28H1) CDR-H1
<400> 68
Ser His Ala Met Ser

1 5

<210> 69

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FAP(4B9) CDR-H1

<400> 69

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 70

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FAP(28H1) CDR-H2

<400> 70

Ala Ile Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly

1 5 10 15

<210> 71

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FAP(4B9) CDR-H2

<400> 71

Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 72

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FAP(28H1) CDR-H3

<400> 72

Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr

1 5

<210> 73

<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FAP(4B9) CDR-H3
<400> 73
Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr
1 5
<210> 74
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FAP(28H1) CDR-L1
<400> 74
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser Tyr Leu Ala
1 5 10
<210> 75
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FAP(4B9) CDR-L1
<400> 75
Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10
<210> 76
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FAP(28H1) CDR-L2
<400> 76
Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
1 5
<210> 77
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FAP(4B9) CDR-L2
<400> 77
Val Gly Ser Arg Arg Ala Thr
1 5
<210> 78
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FAP(28H1) CDR-L3
<400> 78
Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro Pro Thr
1 5
<210> 79
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FAP(4B9) CDR-L3
<400> 79
Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro Pro Thr
1 5
<210> 80
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FAP(28H1) VH
<400> 80
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His
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 Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu

65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

<210> 81
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FAP(28H1) VL
<400> 81
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Ile Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro
85 90 95
Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 82
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FAP(4B9) VH
<400> 82
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

<210> 83
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FAP(4B9) VL
<400> 83

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

<210> 84
<211> 760
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)
<400> 84

Met Lys Thr Trp Val Lys Ile Val Phe Gly Val Ala Thr Ser Ala Val

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

Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp Gln Thr Trp Asp Cys Pro Lys Thr Gln
325 330 335
Glu His Ile Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp Ala Gly Gly Phe Phe Val
340 345 350
Ser Thr Pro Val Phe Ser Tyr Asp Ala Ile Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe
355 360 365
Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His Tyr Ile Lys Asp Thr Val
370 375 380
Glu Asn Ala Ile Gln Ile Thr Ser Gly Lys Trp Glu Ala Ile Asn Ile
385 390 395 400
Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr Ser Ser Asn Glu Phe Glu
405 410 415
Glu Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg Ile Ser Ile Gly Ser Tyr
420 425 430
Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His Leu Arg Lys Glu Arg Cys
435 440 445
Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu
450 455 460
Val Cys Tyr Gly Pro Gly Ile Pro Ile Ser Thr Leu His Asp Gly Arg
465 470 475 480
Thr Asp Gln Glu Ile Lys Ile Leu Glu Glu Asn Lys Glu Leu Glu Asn
485 490 495
Ala Leu Lys Asn Ile Gln Leu Pro Lys Glu Glu Ile Lys Lys Leu Glu
500 505 510
Val Asp Glu Ile Thr Leu Trp Tyr Lys Met Ile Leu Pro Pro Gln Phe
515 520 525
Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile Gln Val Tyr Gly Gly Pro
530 535 540
Cys Ser Gln Ser Val Arg Ser Val Phe Ala Val Asn Trp Ile Ser Tyr
545 550 555 560
Leu Ala Ser Lys Glu Gly Met Val Ile Ala Leu Val Asp Gly Arg Gly
565 570 575
Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Leu Leu Tyr Ala Val Tyr Arg Lys Leu
580 585 590
Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Ile Thr Ala Val Arg Lys Phe Ile
595 600 605
Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Lys Arg Ile Ala Ile Trp Gly Trp Ser
610 615 620
Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ser Gly Thr Gly Leu

625 630 635 640
Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr
645 650 655
Ala Ser Val Tyr Thr Glu Arg Phe Met Gly Leu Pro Thr Lys Asp Asp
660 665 670
Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val Met Ala Arg Ala Glu Tyr
675 680 685
Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His Gly Thr Ala Asp Asp Asn
690 695 700
Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala Lys Ala Leu Val Asn Ala
705 710 715 720
Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser Asp Gln Asn His Gly Leu
725 730 735
Ser Gly Leu Ser Thr Asn His Leu Tyr Thr His Met Thr His Phe Leu
740 745 750
Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp
755 760

<210> 85
<211> 748
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人FAP外域+聚lys标签+his6标签
<400> 85
Arg Pro Ser Arg Val His Asn Ser Glu Glu Asn Thr Met Arg Ala Leu
1 5 10 15
Thr Leu Lys Asp Ile Leu Asn Gly Thr Phe Ser Tyr Lys Thr Phe Phe
20 25 30
Pro Asn Trp Ile Ser Gly Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Ala Asp Asn
35 40 45
Asn Ile Val Leu Tyr Asn Ile Glu Thr Gly Gln Ser Tyr Thr Ile Leu
50 55 60
Ser Asn Arg Thr Met Lys Ser Val Asn Ala Ser Asn Tyr Gly Leu Ser
65 70 75 80
Pro Asp Arg Gln Phe Val Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys Leu Trp
85 90 95
Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu Ser Asn Gly
100 105 110
Glu Phe Val Arg Gly Asn Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys

115 120 125

Trp Ser Pro Val Gly Ser Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile

130 135 140

Tyr Leu Lys Gln Arg Pro Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Phe Asn

145 150 155 160

Gly Arg Glu Asn Lys Ile Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu

165 170 175

Glu Glu Met Leu Ala Thr Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asn Gly

180 185 190

Lys Phe Leu Ala Tyr Ala Glu Phe Asn Asp Thr Asp Ile Pro Val Ile

195 200 205

Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly Asp Glu Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile

210 215 220

Pro Tyr Pro Lys Ala Gly Ala Lys Asn Pro Val Val Arg Ile Phe Ile

225 230 235 240

Ile Asp Thr Thr Tyr Pro Ala Tyr Val Gly Pro Gln Glu Val Pro Val

245 250 255

Pro Ala Met Ile Ala Ser Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp

260 265 270

Val Thr Asp Glu Arg Val Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn

275 280 285

Val Ser Val Leu Ser Ile Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp Gln Thr Trp

290 295 300

Asp Cys Pro Lys Thr Gln Glu His Ile Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp

305 310 315 320

Ala Gly Gly Phe Phe Val Ser Thr Pro Val Phe Ser Tyr Asp Ala Ile

325 330 335

Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His

340 345 350

Tyr Ile Lys Asp Thr Val Glu Asn Ala Ile Gln Ile Thr Ser Gly Lys

355 360 365

Trp Glu Ala Ile Asn Ile Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr

370 375 380

Ser Ser Asn Glu Phe Glu Glu Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg

385 390 395 400

Ile Ser Ile Gly Ser Tyr Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His

405 410 415

Leu Arg Lys Glu Arg Cys Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Asp Tyr

420 425 430

Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu Val Cys Tyr Gly Pro Gly Ile Pro Ile Ser
435 440 445
Thr Leu His Asp Gly Arg Thr Asp Gln Glu Ile Lys Ile Leu Glu Glu
450 455 460
Asn Lys Glu Leu Glu Asn Ala Leu Lys Asn Ile Gln Leu Pro Lys Glu
465 470 475 480
Glu Ile Lys Lys Leu Glu Val Asp Glu Ile Thr Leu Trp Tyr Lys Met
485 490 495
Ile Leu Pro Pro Gln Phe Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile
500 505 510
Gln Val Tyr Gly Gly Pro Cys Ser Gln Ser Val Arg Ser Val Phe Ala
515 520 525
Val Asn Trp Ile Ser Tyr Leu Ala Ser Lys Glu Gly Met Val Ile Ala
530 535 540
Leu Val Asp Gly Arg Gly Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Leu Leu Tyr
545 550 555 560
Ala Val Tyr Arg Lys Leu Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Ile Thr
565 570 575
Ala Val Arg Lys Phe Ile Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Lys Arg Ile
580 585 590
Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu
595 600 605
Ala Ser Gly Thr Gly Leu Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val
610 615 620
Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr Ala Ser Val Tyr Thr Glu Arg Phe Met Gly
625 630 635 640
Leu Pro Thr Lys Asp Asp Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val
645 650 655
Met Ala Arg Ala Glu Tyr Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His
660 665 670
Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala
675 680 685
Lys Ala Leu Val Asn Ala Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser
690 695 700
Asp Gln Asn His Gly Leu Ser Gly Leu Ser Thr Asn His Leu Tyr Thr
705 710 715 720
His Met Thr His Phe Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp Gly Lys
725 730 735
Lys Lys Lys Lys Lys Gly His His His His His His

740 745

<210> 86

<211> 2244

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人FAP外域+聚lys标签+his6标签

<400> 86

cgcccttcaa gagttcataa ctctgaagaa aatacaatga gagcactcac actgaaggat 60
attttaaatg gaacattttc ttataaaaca ttttttccaa actggatttc aggacaagaa 120
tatcttcatc aatctgcaga taacaatata gtactttata atattgaaac aggacaatca 180
tataccattt tgagtaatag aaccatgaaa agtgtgaatg cttcaaatta cggcttatca 240
cctgatcggc aatttgtata tctagaaagt gattattcaa agctttggag atactcttac 300
acagcaacat attacatcta tgaccttagc aatggagaat ttgtaagagg aaatgagctt 360
cctcgtccaa ttcagtattt atgctggtcg cctgttggga gtaaattagc atatgtctat 420
caaaacaata tctatttgaa acaaagacca ggagatccac cttttcaaat aacatttaat 480
ggaagagaaa ataaaatatt taatggaatc ccagactggg tttatgaaga ggaaatgctt 540
gctacaaaat atgctctctg gtggtctcct aatggaaaat ttttggcata tgcggaattt 600
aatgatacgg atataccagt tattgcctat tcctattatg gcgatgaaca atatcctaga 660
acaataaata ttccataccc aaaggctgga gctaagaatc ccgttgttcg gatatttatt 720
atcgatacca cttaccctgc gtatgtaggt ccccaggaag tgcctgttcc agcaatgata 780
gcctcaagtg attattattt cagttggctc acgtgggtta ctgatgaacg agtatgtttg 840
cagtggctaa aaagagtcca gaatgtttcg gtcctgtcta tatgtgactt cagggaagac 900
tggcagacat gggattgtcc aaagacccag gagcatatag aagaaagcag aactggatgg 960
gctggtggat tctttgtttc aacaccagtt ttcagctatg atgccatttc gtactacaaa 1020
atatttagtg acaaggatgg ctacaaacat attcactata tcaaagacac tgtggaaaat 1080
gctattcaaa ttacaagtgg caagtgggag gccataaata tattcagagt aacacaggat 1140
tcactgtttt attctagcaa tgaatttgaa gaataccctg gaagaagaaa catctacaga 1200
attagcattg gaagctatcc tccaagcaag aagtgtgtta cttgccatct aaggaaagaa 1260
aggtgccaat attacacagc aagtttcagc gactacgcca agtactatgc acttgtctgc 1320
tacggcccag gcatccccat ttccaccctt catgatggac gcactgatca agaaattaaa 1380
atcctggaag aaaacaagga attggaaaat gctttgaaaa atatccagct gcctaaagag 1440
gaaattaaga aacttgaagt agatgaaatt actttatggt acaagatgat tcttcctcct 1500
caatttgaca gatcaaagaa gtatcccttg ctaattcaag tgtatggtgg tccctgcagt 1560
cagagtgtaa ggtctgtatt tgctgttaat tggatatctt atcttgcaag taaggaaggg 1620
atggtcattg ccttggtgga tggtcgagga acagctttcc aaggtgacaa actcctctat 1680
gcagtgtatc gaaagctggg tgtttatgaa gttgaagacc agattacagc tgtcagaaaa 1740
ttcatagaaa tgggtttcat tgatgaaaaa agaatagcca tatggggctg gtcctatgga 1800
ggatacgttt catcactggc ccttgcatct ggaactggtc ttttcaaatg tggtatagca 1860

gtggctccag tctccagctg ggaatattac gcgtctgtct acacagagag attcatgggt 1920
ctcccaacaa aggatgataa tcttgagcac tataagaatt caactgtgat ggcaagagca 1980
gaatatttca gaaatgtaga ctatcttctc atccacggaa cagcagatga taatgtgcac 2040
tttcaaaact cagcacagat tgctaaagct ctggttaatg cacaagtgga tttccaggca 2100
atgtggtact ctgaccagaa ccacggctta tccggcctgt ccacgaacca cttatacacc 2160
cacatgaccc acttcctaaa gcagtgtttc tctttgtcag acggcaaaaa gaaaaagaaa 2220
aagggccacc accatcacca tcac 2244

<210> 87
<211> 761
<212> PRT
<213> 小鼠(Mus musculus)
<400> 87

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

210 215 220

Glu Phe Asn Asp Ser Asp Ile Pro Ile Ile Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly
225 230 235 240

Asp Gly Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile Pro Tyr Pro Lys Ala Gly
245 250 255

Ala Lys Asn Pro Val Val Arg Val Phe Ile Val Asp Thr Thr Tyr Pro
260 265 270

His His Val Gly Pro Met Glu Val Pro Val Pro Glu Met Ile Ala Ser
275 280 285

Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp Val Ser Ser Glu Arg Val
290 295 300

Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn Val Ser Val Leu Ser Ile
305 310 315 320

Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp His Ala Trp Glu Cys Pro Lys Asn Gln
325 330 335

Glu His Val Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp Ala Gly Gly Phe Phe Val
340 345 350

Ser Thr Pro Ala Phe Ser Gln Asp Ala Thr Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe
355 360 365

Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His Tyr Ile Lys Asp Thr Val
370 375 380

Glu Asn Ala Ile Gln Ile Thr Ser Gly Lys Trp Glu Ala Ile Tyr Ile
385 390 395 400

Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr Ser Ser Asn Glu Phe Glu
405 410 415

Gly Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg Ile Ser Ile Gly Asn Ser
420 425 430

Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His Leu Arg Lys Glu Arg Cys
435 440 445

Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Tyr Lys Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu
450 455 460

Val Cys Tyr Gly Pro Gly Leu Pro Ile Ser Thr Leu His Asp Gly Arg
465 470 475 480

Thr Asp Gln Glu Ile Gln Val Leu Glu Glu Asn Lys Glu Leu Glu Asn
485 490 495

Ser Leu Arg Asn Ile Gln Leu Pro Lys Val Glu Ile Lys Lys Leu Lys
500 505 510

Asp Gly Gly Leu Thr Phe Trp Tyr Lys Met Ile Leu Pro Pro Gln Phe
515 520 525

Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile Gln Val Tyr Gly Gly Pro
530 535 540
Cys Ser Gln Ser Val Lys Ser Val Phe Ala Val Asn Trp Ile Thr Tyr
545 550 555 560
Leu Ala Ser Lys Glu Gly Ile Val Ile Ala Leu Val Asp Gly Arg Gly
565 570 575
Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Phe Leu His Ala Val Tyr Arg Lys Leu
580 585 590
Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Leu Thr Ala Val Arg Lys Phe Ile
595 600 605
Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Glu Arg Ile Ala Ile Trp Gly Trp Ser
610 615 620
Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ser Gly Thr Gly Leu
625 630 635 640
Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr
645 650 655
Ala Ser Ile Tyr Ser Glu Arg Phe Met Gly Leu Pro Thr Lys Asp Asp
660 665 670
Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val Met Ala Arg Ala Glu Tyr
675 680 685
Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His Gly Thr Ala Asp Asp Asn
690 695 700
Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala Lys Ala Leu Val Asn Ala
705 710 715 720
Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser Asp Gln Asn His Gly Ile
725 730 735
Ser Ser Gly Arg Ser Gln Asn His Leu Tyr Thr His Met Thr His Phe
740 745 750
Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp
755 760

<210> 88
<211> 749
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 鼠FAP外域+聚lys标签+his6标签
<400> 88

Arg Pro Ser Arg Val Tyr Lys Pro Glu Gly Asn Thr Lys Arg Ala Leu
1 5 10 15

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

325 330 335
Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His
340 345 350
Tyr Ile Lys Asp Thr Val Glu Asn Ala Ile Gln Ile Thr Ser Gly Lys
355 360 365
Trp Glu Ala Ile Tyr Ile Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr
370 375 380
Ser Ser Asn Glu Phe Glu Gly Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg
385 390 395 400
Ile Ser Ile Gly Asn Ser Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His
405 410 415
Leu Arg Lys Glu Arg Cys Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Tyr Lys
420 425 430
Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu Val Cys Tyr Gly Pro Gly Leu Pro Ile Ser
435 440 445
Thr Leu His Asp Gly Arg Thr Asp Gln Glu Ile Gln Val Leu Glu Glu
450 455 460
Asn Lys Glu Leu Glu Asn Ser Leu Arg Asn Ile Gln Leu Pro Lys Val
465 470 475 480
Glu Ile Lys Lys Leu Lys Asp Gly Gly Leu Thr Phe Trp Tyr Lys Met
485 490 495
Ile Leu Pro Pro Gln Phe Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile
500 505 510
Gln Val Tyr Gly Gly Pro Cys Ser Gln Ser Val Lys Ser Val Phe Ala
515 520 525
Val Asn Trp Ile Thr Tyr Leu Ala Ser Lys Glu Gly Ile Val Ile Ala
530 535 540
Leu Val Asp Gly Arg Gly Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Phe Leu His
545 550 555 560
Ala Val Tyr Arg Lys Leu Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Leu Thr
565 570 575
Ala Val Arg Lys Phe Ile Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Glu Arg Ile
580 585 590
Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu
595 600 605
Ala Ser Gly Thr Gly Leu Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val
610 615 620
Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr Ala Ser Ile Tyr Ser Glu Arg Phe Met Gly
625 630 635 640

Leu Pro Thr Lys Asp Asp Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val
645 650 655
Met Ala Arg Ala Glu Tyr Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His
660 665 670
Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala
675 680 685
Lys Ala Leu Val Asn Ala Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser
690 695 700
Asp Gln Asn His Gly Ile Leu Ser Gly Arg Ser Gln Asn His Leu Tyr
705 710 715 720
Thr His Met Thr His Phe Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp Gly
725 730 735
Lys Lys Lys Lys Lys Lys Gly His His His His His His
740 745

<210> 89
<211> 2247
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 鼠FAP外域+聚lys标签+his6标签
<400> 89

cgtccctcaa gagtttacaa acctgaagga aacacaaaga gagctcttac cttgaaggat 60
attttaaatg gaacattctc atataaaaca tattttccca actggatttc agaacaagaa 120
tatcttcatc aatctgagga tgataacata gtattttata atattgaaac aagagaatca 180
tatatcattt tgagtaatag caccatgaaa agtgtgaatg ctacagatta tggtttgtca 240
cctgatcggc aatttgtgta tctagaaagt gattattcaa agctctggcg atattcatac 300
acagcgacat actacatcta cgaccttcag aatggggaat ttgtaagagg atacgagctc 360
cctcgtccaa ttcagtatct atgctggtcg cctgttggga gtaaattagc atatgtatat 420
caaaacaata tttatttgaa acaaagacca ggagatccac cttttcaaat aacttatact 480
ggaagagaaa atagaatatt taatggaata ccagactggg tttatgaaga ggaaatgctt 540
gccacaaaat atgctctttg gtggtctcca gatggaaaat ttttggcata tgtagaattt 600
aatgattcag atataccaat tattgcctat tcttattatg gtgatggaca gtatcctaga 660
actataaata ttccatatcc aaaggctggg gctaagaatc cggttgttcg tgtttttatt 720
gttgacacca cctaccctca ccacgtgggc ccaatggaag tgccagttcc agaaatgata 780
gcctcaagtg actattattt cagctggctc acatgggtgt ccagtgaacg agtatgcttg 840
cagtggctaa aaagagtgca gaatgtctca gtcctgtcta tatgtgattt cagggaagac 900
tggcatgcat gggaatgtcc aaagaaccag gagcatgtag aagaaagcag aacaggatgg 960
gctggtggat tctttgtttc gacaccagct tttagccagg atgccacttc ttactacaaa 1020
atatttagcg acaaggatgg ttacaaacat attcactaca tcaaagacac tgtggaaaat 1080

gctattcaaa ttacaagtgg caagtgggag gccatatata tattccgcgt aacacaggat 1140
tcactgtttt attctagcaa tgaatttgaa ggttaccctg gaagaagaaa catctacaga 1200
attagcattg gaaactctcc tccgagcaag aagtgtgtta cttgccatct aaggaaagaa 1260
aggtgccaat attacacagc aagtttcagc tacaaagcca agtactatgc actcgtctgc 1320
tatggccctg gcctccccat ttccaccctc catgatggcc gcacagacca agaaatacaa 1380
gtattagaag aaaacaaaga actggaaaat tctctgagaa atatccagct gcctaaagtg 1440
gagattaaga agctcaaaga cgggggactg actttctggt acaagatgat tctgcctcct 1500
cagtttgaca gatcaaagaa gtacccttg ctaattcaag tgtatggtgg tccttgtagc 1560
cagagtgtta agtctgtgtt tgctgttaat tggataactt atctcgcaag taaggagggg 1620
atagtcattg ccctggtaga tggtcggggc actgctttcc aaggtgacaa attcctgcat 1680
gccgtgtatc gaaaactggg tgtatatgaa gttgaggacc agctcacagc tgtcagaaaa 1740
ttcatagaaa tgggtttcat tgatgaagaa agaatagcca tatggggctg gtcctacgga 1800
ggttatgttt catccctggc ccttgcatct ggaactggtc ttttcaaatg tggcatagca 1860
gtggctccag tctccagctg ggaatattac gcatctatct actcagagag attcatgggc 1920
ctcccaacaa aggacgacaa tctcgaacac tataaaaatt caactgtgat ggcaagagca 1980
gaatatttca gaaatgtaga ctatcttctc atccacggaa cagcagatga taatgtgcac 2040
tttcagaact cagcacagat tgctaaagct ttggttaatg cacaagtgga tttccaggcg 2100
atgtggtact ctgaccagaa ccatggtata ttatctgggc gctcccagaa tcatttatat 2160
acccacatga cgcacttcct caagcaatgc ttttctttat cagacggcaa aaagaaaaag 2220
aaaaagggcc accaccatca ccatcac 2247

<210> 90
<211> 748
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 食蟹猴FAP外域+聚-lys标签+his6标签
<400> 90

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

Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu Ser Asn Gly
100 105 110
Glu Phe Val Arg Gly Asn Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys
115 120 125
Trp Ser Pro Val Gly Ser Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile
130 135 140
Tyr Leu Lys Gln Arg Pro Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Phe Asn
145 150 155 160
Gly Arg Glu Asn Lys Ile Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu
165 170 175
Glu Glu Met Leu Ala Thr Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asn Gly
180 185 190
Lys Phe Leu Ala Tyr Ala Glu Phe Asn Asp Thr Asp Ile Pro Val Ile
195 200 205
Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly Asp Glu Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile
210 215 220
Pro Tyr Pro Lys Ala Gly Ala Lys Asn Pro Phe Val Arg Ile Phe Ile
225 230 235 240
Ile Asp Thr Thr Tyr Pro Ala Tyr Val Gly Pro Gln Glu Val Pro Val
245 250 255
Pro Ala Met Ile Ala Ser Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp
260 265 270
Val Thr Asp Glu Arg Val Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn
275 280 285
Val Ser Val Leu Ser Ile Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp Gln Thr Trp
290 295 300
Asp Cys Pro Lys Thr Gln Glu His Ile Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp
305 310 315 320
Ala Gly Gly Phe Phe Val Ser Thr Pro Val Phe Ser Tyr Asp Ala Ile
325 330 335
Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His
340 345 350
Tyr Ile Lys Asp Thr Val Glu Asn Ala Ile Gln Ile Thr Ser Gly Lys
355 360 365
Trp Glu Ala Ile Asn Ile Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr
370 375 380
Ser Ser Asn Glu Phe Glu Asp Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg
385 390 395 400
Ile Ser Ile Gly Ser Tyr Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His

405 410 415
Leu Arg Lys Glu Arg Cys Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Asp Tyr
420 425 430
Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu Val Cys Tyr Gly Pro Gly Ile Pro Ile Ser
435 440 445
Thr Leu His Asp Gly Arg Thr Asp Gln Glu Ile Lys Ile Leu Glu Glu
450 455 460
Asn Lys Glu Leu Glu Asn Ala Leu Lys Asn Ile Gln Leu Pro Lys Glu
465 470 475 480
Glu Ile Lys Lys Leu Glu Val Asp Glu Ile Thr Leu Trp Tyr Lys Met
485 490 495
Ile Leu Pro Pro Gln Phe Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile
500 505 510
Gln Val Tyr Gly Gly Pro Cys Ser Gln Ser Val Arg Ser Val Phe Ala
515 520 525
Val Asn Trp Ile Ser Tyr Leu Ala Ser Lys Glu Gly Met Val Ile Ala
530 535 540
Leu Val Asp Gly Arg Gly Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Leu Leu Tyr
545 550 555 560
Ala Val Tyr Arg Lys Leu Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Ile Thr
565 570 575
Ala Val Arg Lys Phe Ile Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Lys Arg Ile
580 585 590
Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu
595 600 605
Ala Ser Gly Thr Gly Leu Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val
610 615 620
Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr Ala Ser Val Tyr Thr Glu Arg Phe Met Gly
625 630 635 640
Leu Pro Thr Lys Asp Asp Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val
645 650 655
Met Ala Arg Ala Glu Tyr Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His
660 665 670
Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala
675 680 685
Lys Ala Leu Val Asn Ala Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser
690 695 700
Asp Gln Asn His Gly Leu Ser Gly Leu Ser Thr Asn His Leu Tyr Thr
705 710 715 720

His Met Thr His Phe Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp Gly Lys
725 730 735
Lys Lys Lys Lys Lys Gly His His His His His His
740 745

<210> 91
<211> 2244
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 食蟹猴FAP外域+聚lys标签+his6标签
<400> 91

cgccctccaa gagttcataa ctctgaagaa aatacaatga gagcactcac actgaaggat 60
attttaaatg ggacattttc ttataaaaca ttttttccaa actggatttc aggacaagaa 120
tatcttcatc aatctgcaga taacaatata gtactttata atattgaaac aggacaatca 180
tataccattt tgagtaacag aaccatgaaa agtgtgaatg cttcaaatta tggcttatca 240
cctgatcggc aatttgtata tctagaaagt gattattcaa agctttggag atactcttac 300
acagcaacat attacatcta tgaccttagc aatggagaat ttgtaagagg aaatgagctt 360
cctcgtccaa ttcagtattt atgctggtcg cctgttggga gtaaattagc atatgtctat 420
caaaacaata tctatttgaa acaaagacca ggagatccac cttttcaaat aacatttaat 480
ggaagagaaa ataaaatatt taatggaatc ccagactggg tttatgaaga ggaaatgctt 540
gctacaaaat atgctctctg gtggtctcct aatggaaaat ttttggcata tgcggaattt 600
aatgatacag atataccagt tattgcctat tcctattatg gcgatgaaca atatcccaga 660
acaataaata ttccataccc aaaggccgga gctaagaatc cttttgttcg gatatttatt 720
atcgatacca cttaccctgc gtatgtaggt ccccaggaag tgcctgttcc agcaatgata 780
gcctcaagtg attattattt cagttggctc acgtgggtta ctgatgaacg agtatgtttg 840
cagtggctaa aaagagtcca gaatgtttcg gtcttgtcta tatgtgattt cagggaagac 900
tggcagacat gggattgtcc aaagacccag gagcatatag aagaaagcag aactggatgg 960
gctggtggat tctttgtttc aacaccagtt ttcagctatg atgccatttc atactacaaa 1020
atatttagtg acaaggatgg ctacaaacat attcactata tcaaagacac tgtggaaaat 1080
gctattcaaa ttacaagtgg caagtgggag gccataaata tattcagagt aacacaggat 1140
tcactgtttt attctagcaa tgaatttgaa gattaccctg gaagaagaaa catctacaga 1200
attagcattg gaagctatcc tccaagcaag aagtgtgtta cttgccatct aaggaaagaa 1260
aggtgccaat attacacagc aagtttcagc gactacgcca agtactatgc acttgtctgc 1320
tatggcccag gcatccccat ttccaccctt catgacggac gcactgatca agaaattaaa 1380
atcctggaag aaaacaagga attggaaaat gctttgaaaa atatccagct gcctaaagag 1440
gaaattaaga aacttgaagt agatgaaatt actttatggt acaagatgat tcttcctcct 1500
caatttgaca gatcaaagaa gtatcccttg ctaattcaag tgtatggtgg tccctgcagt 1560
cagagtgtaa ggtctgtatt tgctgttaat tggatatctt atcttgcaag taaggaaggg 1620
atggtcattg ccttggtgga tggtcgggga acagctttcc aaggtgacaa actcctgtat 1680

gcagtgtatc gaaagctggg tgtttatgaa gttgaagacc agattacagc tgtcagaaaa 1740
ttcatagaaa tgggtttcat tgatgaaaaa agaatagcca tatggggctg gtcctatgga 1800
ggatatgttt catcactggc ccttgcatct ggaactggtc ttttcaaatg tgggatagca 1860
gtggctccag tctccagctg ggaatattac gcgtctgtct acacagagag attcatgggt 1920
ctcccaacaa aggatgataa tcttgagcac tataagaatt caactgtgat ggcaagagca 1980
gaatatttca gaaatgtaga ctatcttctc atccacggaa cagcagatga taatgtgcac 2040
tttcaaaact cagcacagat tgctaaagct ctggttaatg cacaagtgga tttccaggca 2100
atgtggtact ctgaccagaa ccacggctta tccggcctgt ccacgaacca cttatacacc 2160
cacatgaccc acttcctaaa gcagtgtttc tctttgtcag acggcaaaaa gaaaaagaaa 2220
aagggccacc accatcacca tcac 2244

<210> 92
<211> 702
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)
<400> 92

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

Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr Arg Asn
195 200 205
Asp Thr Ala Ser Tyr Lys Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Ala Arg
210 215 220
Arg Ser Asp Ser Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro
225 230 235 240
Thr Ile Ser Pro Leu Asn Thr Ser Tyr Arg Ser Gly Glu Asn Leu Asn
245 250 255
Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Phe
260 265 270
Val Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn
275 280 285
Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys Gln Ala His Asn Ser
290 295 300
Asp Thr Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Thr Ile Thr Val Tyr Ala
305 310 315 320
Glu Pro Pro Lys Pro Phe Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu
325 330 335
Asp Glu Asp Ala Val Ala Leu Thr Cys Glu Pro Glu Ile Gln Asn Thr
340 345 350
Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg
355 360 365
Leu Gln Leu Ser Asn Asp Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr
370 375 380
Arg Asn Asp Val Gly Pro Tyr Glu Cys Gly Ile Gln Asn Lys Leu Ser
385 390 395 400
Val Asp His Ser Asp Pro Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp
405 410 415
Asp Pro Thr Ile Ser Pro Ser Tyr Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Val Asn
420 425 430
Leu Ser Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser
435 440 445
Trp Leu Ile Asp Gly Asn Ile Gln Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Ile
450 455 460
Ser Asn Ile Thr Glu Lys Asn Ser Gly Leu Tyr Thr Cys Gln Ala Asn
465 470 475 480
Asn Ser Ala Ser Gly His Ser Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Thr Val
485 490 495
Ser Ala Glu Leu Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro

500 505 510
Val Glu Asp Lys Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Ala Gln
515 520 525
Asn Thr Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser
530 535 540
Pro Arg Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn
545 550 555 560
Val Thr Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Cys Gly Ile Gln Asn Ser
565 570 575
Val Ser Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asp Val Leu Tyr Gly
580 585 590
Pro Asp Thr Pro Ile Ile Ser Pro Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly
595 600 605
Ala Asn Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Ala Ser Asn Pro Ser Pro Gln
610 615 620
Tyr Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu
625 630 635 640
Phe Ile Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe
645 650 655
Val Ser Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile
660 665 670
Thr Val Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Ala Gly Ala Thr
675 680 685
Val Gly Ile Met Ile Gly Val Leu Val Gly Val Ala Leu Ile
690 695 700

<210> 93
<211> 2322
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)
<400> 93

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

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

Glu Glu Tyr Glu Asp Asp Ala Tyr Gly His Tyr Glu Ala Phe Ser Thr
385 390 395 400
Leu Ala Pro Glu Ala Trp Pro Ala Met Glu Leu Pro Glu Pro Cys Val
405 410 415
Pro Glu Pro Gly Leu Pro Pro Val Phe Ala Asn Phe Thr Gln Leu Leu
420 425 430
Thr Ile Ser Pro Leu Val Val Ala Glu Gly Gly Thr Ala Trp Leu Glu
435 440 445
Trp Arg His Val Gln Pro Thr Leu Asp Leu Met Glu Ala Glu Leu Arg
450 455 460
Lys Ser Gln Val Leu Phe Ser Val Thr Arg Gly Ala Arg His Gly Glu
465 470 475 480
Leu Glu Leu Asp Ile Pro Gly Ala Gln Ala Arg Lys Met Phe Thr Leu
485 490 495
Leu Asp Val Val Asn Arg Lys Ala Arg Phe Ile His Asp Gly Ser Glu
500 505 510
Asp Thr Ser Asp Gln Leu Val Leu Glu Val Ser Val Thr Ala Arg Val
515 520 525
Pro Met Pro Ser Cys Leu Arg Arg Gly Gln Thr Tyr Leu Leu Pro Ile
530 535 540
Gln Val Asn Pro Val Asn Asp Pro Pro His Ile Ile Phe Pro His Gly
545 550 555 560
Ser Leu Met Val Ile Leu Glu His Thr Gln Lys Pro Leu Gly Pro Glu
565 570 575
Val Phe Gln Ala Tyr Asp Pro Asp Ser Ala Cys Glu Gly Leu Thr Phe
580 585 590
Gln Val Leu Gly Thr Ser Ser Gly Leu Pro Val Glu Arg Arg Asp Gln
595 600 605
Pro Gly Glu Pro Ala Thr Glu Phe Ser Cys Arg Glu Leu Glu Ala Gly
610 615 620
Ser Leu Val Tyr Val His Arg Gly Gly Pro Ala Gln Asp Leu Thr Phe
625 630 635 640
Arg Val Ser Asp Gly Leu Gln Ala Ser Pro Pro Ala Thr Leu Lys Val
645 650 655
Val Ala Ile Arg Pro Ala Ile Gln Ile His Arg Ser Thr Gly Leu Arg
660 665 670
Leu Ala Gln Gly Ser Ala Met Pro Ile Leu Pro Ala Asn Leu Ser Val
675 680 685
Glu Thr Asn Ala Val Gly Gln Asp Val Ser Val Leu Phe Arg Val Thr

690 695 700

Gly Ala Leu Gln Phe Gly Glu Leu Gln Lys Gln Gly Ala Gly Gly Val
705 710 715 720
Glu Gly Ala Glu Trp Trp Ala Thr Gln Ala Phe His Gln Arg Asp Val
725 730 735
Glu Gln Gly Arg Val Arg Tyr Leu Ser Thr Asp Pro Gln His His Ala
740 745 750
Tyr Asp Thr Val Glu Asn Leu Ala Leu Glu Val Gln Val Gly Gln Glu
755 760 765
Ile Leu Ser Asn Leu Ser Phe Pro Val Thr Ile Gln Arg Ala Thr Val
770 775 780
Trp Met Leu Arg Leu Glu Pro Leu His Thr Gln Asn Thr Gln Gln Glu
785 790 795 800
Thr Leu Thr Thr Ala His Leu Glu Ala Thr Leu Glu Glu Ala Gly Pro
805 810 815
Ser Pro Pro Thr Phe His Tyr Glu Val Val Gln Ala Pro Arg Lys Gly
820 825 830
Asn Leu Gln Leu Gln Gly Thr Arg Leu Ser Asp Gly Gln Gly Phe Thr
835 840 845
Gln Asp Asp Ile Gln Ala Gly Arg Val Thr Tyr Gly Ala Thr Ala Arg
850 855 860
Ala Ser Glu Ala Val Glu Asp Thr Phe Arg Phe Arg Val Thr Ala Pro
865 870 875 880
Pro Tyr Phe Ser Pro Leu Tyr Thr Phe Pro Ile His Ile Gly Gly Asp
885 890 895
Pro Asp Ala Pro Val Leu Thr Asn Val Leu Leu Val Val Pro Glu Gly
900 905 910
Gly Glu Gly Val Leu Ser Ala Asp His Leu Phe Val Lys Ser Leu Asn
915 920 925
Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Glu Val Met Glu Arg Pro Arg His Gly Arg
930 935 940
Leu Ala Trp Arg Gly Thr Gln Asp Lys Thr Thr Met Val Thr Ser Phe
945 950 955 960
Thr Asn Glu Asp Leu Leu Arg Gly Arg Leu Val Tyr Gln His Asp Asp
965 970 975
Ser Glu Thr Thr Glu Asp Asp Ile Pro Phe Val Ala Thr Arg Gln Gly
980 985 990
Glu Ser Ser Gly Asp Met Ala Trp Glu Glu Val Arg Gly Val Phe Arg
995 1000 1005

Val Ala Ile Gln Pro Val Asn Asp His Ala Pro Val Gln Thr Ile
1010 1015 1020
Ser Arg Ile Phe His Val Ala Arg Gly Gly Arg Arg Leu Leu Thr
1025 1030 1035
Thr Asp Asp Val Ala Phe Ser Asp Ala Asp Ser Gly Phe Ala Asp
1040 1045 1050
Ala Gln Leu Val Leu Thr Arg Lys Asp Leu Leu Phe Gly Ser Ile
1055 1060 1065
Val Ala Val Asp Glu Pro Thr Arg Pro Ile Tyr Arg Phe Thr Gln
1070 1075 1080
Glu Asp Leu Arg Lys Arg Arg Val Leu Phe Val His Ser Gly Ala
1085 1090 1095
Asp Arg Gly Trp Ile Gln Leu Gln Val Ser Asp Gly Gln His Gln
1100 1105 1110
Ala Thr Ala Leu Leu Glu Val Gln Ala Ser Glu Pro Tyr Leu Arg
1115 1120 1125
Val Ala Asn Gly Ser Ser Leu Val Val Pro Gln Gly Gly Gln Gly
1130 1135 1140
Thr Ile Asp Thr Ala Val Leu His Leu Asp Thr Asn Leu Asp Ile
1145 1150 1155
Arg Ser Gly Asp Glu Val His Tyr His Val Thr Ala Gly Pro Arg
1160 1165 1170
Trp Gly Gln Leu Val Arg Ala Gly Gln Pro Ala Thr Ala Phe Ser
1175 1180 1185
Gln Gln Asp Leu Leu Asp Gly Ala Val Leu Tyr Ser His Asn Gly
1190 1195 1200
Ser Leu Ser Pro Arg Asp Thr Met Ala Phe Ser Val Glu Ala Gly
1205 1210 1215
Pro Val His Thr Asp Ala Thr Leu Gln Val Thr Ile Ala Leu Glu
1220 1225 1230
Gly Pro Leu Ala Pro Leu Lys Leu Val Arg His Lys Lys Ile Tyr
1235 1240 1245
Val Phe Gln Gly Glu Ala Ala Glu Ile Arg Arg Asp Gln Leu Glu
1250 1255 1260
Ala Ala Gln Glu Ala Val Pro Pro Ala Asp Ile Val Phe Ser Val
1265 1270 1275
Lys Ser Pro Pro Ser Ala Gly Tyr Leu Val Met Val Ser Arg Gly
1280 1285 1290
Ala Leu Ala Asp Glu Pro Pro Ser Leu Asp Pro Val Gln Ser Phe

1295 1300 1305

Ser Gln Glu Ala Val Asp Thr Gly Arg Val Leu Tyr Leu His Ser

1310 1315 1320

Arg Pro Glu Ala Trp Ser Asp Ala Phe Ser Leu Asp Val Ala Ser

1325 1330 1335

Gly Leu Gly Ala Pro Leu Glu Gly Val Leu Val Glu Leu Glu Val

1340 1345 1350

Leu Pro Ala Ala Ile Pro Leu Glu Ala Gln Asn Phe Ser Val Pro

1355 1360 1365

Glu Gly Gly Ser Leu Thr Leu Ala Pro Pro Leu Leu Arg Val Ser

1370 1375 1380

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

1385 1390 1395

Glu Pro Pro Gln His Gly Ala Leu Gln Lys Glu Asp Gly Pro Gln

1400 1405 1410

Ala Arg Thr Leu Ser Ala Phe Ser Trp Arg Met Val Glu Glu Gln

1415 1420 1425

Leu Ile Arg Tyr Val His Asp Gly Ser Glu Thr Leu Thr Asp Ser

1430 1435 1440

Phe Val Leu Met Ala Asn Ala Ser Glu Met Asp Arg Gln Ser His

1445 1450 1455

Pro Val Ala Phe Thr Val Thr Val Leu Pro Val Asn Asp Gln Pro

1460 1465 1470

Pro Ile Leu Thr Thr Asn Thr Gly Leu Gln Met Trp Glu Gly Ala

1475 1480 1485

Thr Ala Pro Ile Pro Ala Glu Ala Leu Arg Ser Thr Asp Gly Asp

1490 1495 1500

Ser Gly Ser Glu Asp Leu Val Tyr Thr Ile Glu Gln Pro Ser Asn

1505 1510 1515

Gly Arg Val Val Leu Arg Gly Ala Pro Gly Thr Glu Val Arg Ser

1520 1525 1530

Phe Thr Gln Ala Gln Leu Asp Gly Gly Leu Val Leu Phe Ser His

1535 1540 1545

Arg Gly Thr Leu Asp Gly Gly Phe Arg Phe Arg Leu Ser Asp Gly

1550 1555 1560

Glu His Thr Ser Pro Gly His Phe Phe Arg Val Thr Ala Gln Lys

1565 1570 1575

Gln Val Leu Leu Ser Leu Lys Gly Ser Gln Thr Leu Thr Val Cys

1580 1585 1590

Pro Gly Ser Val Gln Pro Leu Ser Ser Gln Thr Leu Arg Ala Ser
1595 1600 1605
Ser Ser Ala Gly Thr Asp Pro Gln Leu Leu Leu Tyr Arg Val Val
1610 1615 1620
Arg Gly Pro Gln Leu Gly Arg Leu Phe His Ala Gln Gln Asp Ser
1625 1630 1635
Thr Gly Glu Ala Leu Val Asn Phe Thr Gln Ala Glu Val Tyr Ala
1640 1645 1650
Gly Asn Ile Leu Tyr Glu His Glu Met Pro Pro Glu Pro Phe Trp
1655 1660 1665
Glu Ala His Asp Thr Leu Glu Leu Gln Leu Ser Ser Pro Pro Ala
1670 1675 1680
Arg Asp Val Ala Ala Thr Leu Ala Val Ala Val Ser Phe Glu Ala
1685 1690 1695
Ala Cys Pro Gln Arg Pro Ser His Leu Trp Lys Asn Lys Gly Leu
1700 1705 1710
Trp Val Pro Glu Gly Gln Arg Ala Arg Ile Thr Val Ala Ala Leu
1715 1720 1725
Asp Ala Ser Asn Leu Leu Ala Ser Val Pro Ser Pro Gln Arg Ser
1730 1735 1740
Glu His Asp Val Leu Phe Gln Val Thr Gln Phe Pro Ser Arg Gly
1745 1750 1755
Gln Leu Leu Val Ser Glu Glu Pro Leu His Ala Gly Gln Pro His
1760 1765 1770
Phe Leu Gln Ser Gln Leu Ala Ala Gly Gln Leu Val Tyr Ala His
1775 1780 1785
Gly Gly Gly Gly Thr Gln Gln Asp Gly Phe His Phe Arg Ala His
1790 1795 1800
Leu Gln Gly Pro Ala Gly Ala Ser Val Ala Gly Pro Gln Thr Ser
1805 1810 1815
Glu Ala Phe Ala Ile Thr Val Arg Asp Val Asn Glu Arg Pro Pro
1820 1825 1830
Gln Pro Gln Ala Ser Val Pro Leu Arg Leu Thr Arg Gly Ser Arg
1835 1840 1845
Ala Pro Ile Ser Arg Ala Gln Leu Ser Val Val Asp Pro Asp Ser
1850 1855 1860
Ala Pro Gly Glu Ile Glu Tyr Glu Val Gln Arg Ala Pro His Asn
1865 1870 1875
Gly Phe Leu Ser Leu Val Gly Gly Gly Leu Gly Pro Val Thr Arg

1880 1885 1890
Phe Thr Gln Ala Asp Val Asp Ser Gly Arg Leu Ala Phe Val Ala
1895 1900 1905
Asn Gly Ser Ser Val Ala Gly Ile Phe Gln Leu Ser Met Ser Asp
1910 1915 1920
Gly Ala Ser Pro Pro Leu Pro Met Ser Leu Ala Val Asp Ile Leu
1925 1930 1935
Pro Ser Ala Ile Glu Val Gln Leu Arg Ala Pro Leu Glu Val Pro
1940 1945 1950
Gln Ala Leu Gly Arg Ser Ser Leu Ser Gln Gln Gln Leu Arg Val
1955 1960 1965
Val Ser Asp Arg Glu Glu Pro Glu Ala Ala Tyr Arg Leu Ile Gln
1970 1975 1980
Gly Pro Gln Tyr Gly His Leu Leu Val Gly Gly Arg Pro Thr Ser
1985 1990 1995
Ala Phe Ser Gln Phe Gln Ile Asp Gln Gly Glu Val Val Phe Ala
2000 2005 2010
Phe Thr Asn Phe Ser Ser Ser His Asp His Phe Arg Val Leu Ala
2015 2020 2025
Leu Ala Arg Gly Val Asn Ala Ser Ala Val Val Asn Val Thr Val
2030 2035 2040
Arg Ala Leu Leu His Val Trp Ala Gly Gly Pro Trp Pro Gln Gly
2045 2050 2055
Ala Thr Leu Arg Leu Asp Pro Thr Val Leu Asp Ala Gly Glu Leu
2060 2065 2070
Ala Asn Arg Thr Gly Ser Val Pro Arg Phe Arg Leu Leu Glu Gly
2075 2080 2085
Pro Arg His Gly Arg Val Val Arg Val Pro Arg Ala Arg Thr Glu
2090 2095 2100
Pro Gly Gly Ser Gln Leu Val Glu Gln Phe Thr Gln Gln Asp Leu
2105 2110 2115
Glu Asp Gly Arg Leu Gly Leu Glu Val Gly Arg Pro Glu Gly Arg
2120 2125 2130
Ala Pro Gly Pro Ala Gly Asp Ser Leu Thr Leu Glu Leu Trp Ala
2135 2140 2145
Gln Gly Val Pro Pro Ala Val Ala Ser Leu Asp Phe Ala Thr Glu
2150 2155 2160
Pro Tyr Asn Ala Ala Arg Pro Tyr Ser Val Ala Leu Leu Ser Val
2165 2170 2175

Pro Glu Ala Ala Arg Thr Glu Ala Gly Lys Pro Glu Ser Ser Thr
2180 2185 2190
Pro Thr Gly Glu Pro Gly Pro Met Ala Ser Ser Pro Glu Pro Ala
2195 2200 2205
Val Ala Lys Gly Gly Phe Leu Ser Phe Leu Glu Ala Asn Met Phe
2210 2215 2220
Ser Val Ile Ile Pro Met Cys Leu Val Leu Leu Leu Leu Ala Leu
2225 2230 2235
Ile Leu Pro Leu Leu Phe Tyr Leu Arg Lys Arg Asn Lys Thr Gly
2240 2245 2250
Lys His Asp Val Gln Val Leu Thr Ala Lys Pro Arg Asn Gly Leu
2255 2260 2265
Ala Gly Asp Thr Glu Thr Phe Arg Lys Val Glu Pro Gly Gln Ala
2270 2275 2280
Ile Pro Leu Thr Ala Val Pro Gly Gln Gly Pro Pro Pro Gly Gly
2285 2290 2295
Gln Pro Asp Pro Glu Leu Leu Gln Phe Cys Arg Thr Pro Asn Pro
2300 2305 2310
Ala Leu Lys Asn Gly Gln Tyr Trp Val
2315 2320

<210> 94
<211> 1210
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)
<400> 94

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

Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn
115 120 125
Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu
130 135 140
His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu
145 150 155 160
Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met
165 170 175
Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro
180 185 190
Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln
195 200 205
Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg
210 215 220
Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys
225 230 235 240
Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp
245 250 255
Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro
260 265 270
Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly
275 280 285
Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His
290 295 300
Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu
305 310 315 320
Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val
325 330 335
Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn
340 345 350
Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp
355 360 365
Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr
370 375 380
Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu
385 390 395 400
Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp
405 410 415
Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln

420 425 430

His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu

435 440 445

Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser

450 455 460

Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu

465 470 475 480

Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu

485 490 495

Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro

500 505 510

Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn

515 520 525

Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly

530 535 540

Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro

545 550 555 560

Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro

565 570 575

Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val

580 585 590

Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp

595 600 605

Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys

610 615 620

Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly

625 630 635 640

Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu

645 650 655

Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met Arg Arg Arg His

660 665 670

Ile Val Arg Lys Arg Thr Leu Arg Arg Leu Leu Gln Glu Arg Glu Leu

675 680 685

Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Glu Ala Pro Asn Gln Ala Leu Leu

690 695 700

Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe Lys Lys Ile Lys Val Leu Gly Ser

705 710 715 720

Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Leu Trp Ile Pro Glu Gly Glu

725 730 735

Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Glu Leu Arg Glu Ala Thr Ser
740 745 750
Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Ser
755 760 765
Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser
770 775 780
Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe Gly Cys Leu Leu Asp
785 790 795 800
Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser Gln Tyr Leu Leu Asn
805 810 815
Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr Leu Glu Asp Arg Arg
820 825 830
Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Thr Pro
835 840 845
Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Lys Leu Leu Gly Ala
850 855 860
Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp
865 870 875 880
Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp
885 890 895
Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser
900 905 910
Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu Glu
915 920 925
Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr
930 935 940
Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala Asp Ser Arg Pro Lys
945 950 955 960
Phe Arg Glu Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met Ala Arg Asp Pro Gln
965 970 975
Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Glu Arg Met His Leu Pro Ser Pro
980 985 990
Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala Leu Met Asp Glu Glu Asp Met Asp
995 1000 1005
Asp Val Val Asp Ala Asp Glu Tyr Leu Ile Pro Gln Gln Gly Phe
1010 1015 1020
Phe Ser Ser Pro Ser Thr Ser Arg Thr Pro Leu Leu Ser Ser Leu
1025 1030 1035
Ser Ala Thr Ser Asn Asn Ser Thr Val Ala Cys Ile Asp Arg Asn

1040 1045 1050
Gly Leu Gln Ser Cys Pro Ile Lys Glu Asp Ser Phe Leu Gln Arg
1055 1060 1065
Tyr Ser Ser Asp Pro Thr Gly Ala Leu Thr Glu Asp Ser Ile Asp
1070 1075 1080
Asp Thr Phe Leu Pro Val Pro Glu Tyr Ile Asn Gln Ser Val Pro
1085 1090 1095
Lys Arg Pro Ala Gly Ser Val Gln Asn Pro Val Tyr His Asn Gln
1100 1105 1110
Pro Leu Asn Pro Ala Pro Ser Arg Asp Pro His Tyr Gln Asp Pro
1115 1120 1125
His Ser Thr Ala Val Gly Asn Pro Glu Tyr Leu Asn Thr Val Gln
1130 1135 1140
Pro Thr Cys Val Asn Ser Thr Phe Asp Ser Pro Ala His Trp Ala
1145 1150 1155
Gln Lys Gly Ser His Gln Ile Ser Leu Asp Asn Pro Asp Tyr Gln
1160 1165 1170
Gln Asp Phe Phe Pro Lys Glu Ala Lys Pro Asn Gly Ile Phe Lys
1175 1180 1185
Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala Glu Tyr Leu Arg Val Ala Pro Gln
1190 1195 1200
Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala
1205 1210

<210> 95
<211> 556
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)
<400> 95
Met Pro Pro Pro Arg Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Leu Thr Pro Met
1 5 10 15
Glu Val Arg Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp
20 25 30
Asn Ala Val Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln
35 40 45
Gln Leu Thr Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu
50 55 60
Ser Leu Gly Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile
65 70 75 80
Trp Leu Phe Ile Phe Asn Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu

85 90 95
Cys Gln Pro Gly Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr
100 105 110
Val Asn Val Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp
115 120 125
Leu Gly Gly Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro
130 135 140
Ser Ser Pro Ser Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala
145 150 155 160
Lys Asp Arg Pro Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu Pro Pro
165 170 175
Arg Asp Ser Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro
180 185 190
Gly Ser Thr Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser
195 200 205
Arg Gly Pro Leu Ser Trp Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser
210 215 220
Leu Leu Ser Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp
225 230 235 240
Val Met Glu Thr Gly Leu Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala
245 250 255
Gly Lys Tyr Tyr Cys His Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu
260 265 270
Glu Ile Thr Ala Arg Pro Val Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Thr Gly
275 280 285
Gly Trp Lys Val Ser Ala Val Thr Leu Ala Tyr Leu Ile Phe Cys Leu
290 295 300
Cys Ser Leu Val Gly Ile Leu His Leu Gln Arg Ala Leu Val Leu Arg
305 310 315 320
Arg Lys Arg Lys Arg Met Thr Asp Pro Thr Arg Arg Phe Phe Lys Val
325 330 335
Thr Pro Pro Pro Gly Ser Gly Pro Gln Asn Gln Tyr Gly Asn Val Leu
340 345 350
Ser Leu Pro Thr Pro Thr Ser Gly Leu Gly Arg Ala Gln Arg Trp Ala
355 360 365
Ala Gly Leu Gly Gly Thr Ala Pro Ser Tyr Gly Asn Pro Ser Ser Asp
370 375 380
Val Gln Ala Asp Gly Ala Leu Gly Ser Arg Ser Pro Pro Gly Val Gly
385 390 395 400

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Glu Gly Tyr Glu Glu Pro Asp Ser Glu Glu
405 410 415
Asp Ser Glu Phe Tyr Glu Asn Asp Ser Asn Leu Gly Gln Asp Gln Leu
420 425 430
Ser Gln Asp Gly Ser Gly Tyr Glu Asn Pro Glu Asp Glu Pro Leu Gly
435 440 445
Pro Glu Asp Glu Asp Ser Phe Ser Asn Ala Glu Ser Tyr Glu Asn Glu
450 455 460
Asp Glu Glu Leu Thr Gln Pro Val Ala Arg Thr Met Asp Phe Leu Ser
465 470 475 480
Pro His Gly Ser Ala Trp Asp Pro Ser Arg Glu Ala Thr Ser Leu Gly
485 490 495
Ser Gln Ser Tyr Glu Asp Met Arg Gly Ile Leu Tyr Ala Ala Pro Gln
500 505 510
Leu Arg Ser Ile Arg Gly Gln Pro Gly Pro Asn His Glu Glu Asp Ala
515 520 525
Asp Ser Tyr Glu Asn Met Asp Asn Pro Asp Gly Pro Asp Pro Ala Trp
530 535 540
Gly Gly Gly Gly Arg Met Gly Thr Trp Ser Thr Arg
545 550 555

<210> 96
<211> 297
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)
<400> 96

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

Val Lys Gly Lys Met Ile Met Asn Ser Leu Ser Leu Phe Ala Ala Ile
115 120 125
Ser Gly Met Ile Leu Ser Ile Met Asp Ile Leu Asn Ile Lys Ile Ser
130 135 140
His Phe Leu Lys Met Glu Ser Leu Asn Phe Ile Arg Ala His Thr Pro
145 150 155 160
Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn Cys Glu Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys Asn
165 170 175
Ser Pro Ser Thr Gln Tyr Cys Tyr Ser Ile Gln Ser Leu Phe Leu Gly
180 185 190
Ile Leu Ser Val Met Leu Ile Phe Ala Phe Phe Gln Glu Leu Val Ile
195 200 205
Ala Gly Ile Val Glu Asn Glu Trp Lys Arg Thr Cys Ser Arg Pro Lys
210 215 220
Ser Asn Ile Val Leu Leu Ser Ala Glu Glu Lys Lys Glu Gln Thr Ile
225 230 235 240
Glu Ile Lys Glu Glu Val Val Gly Leu Thr Glu Thr Ser Ser Gln Pro
245 250 255
Lys Asn Glu Glu Asp Ile Glu Ile Ile Pro Ile Gln Glu Glu Glu Glu
260 265 270
Glu Glu Thr Glu Thr Asn Phe Pro Glu Pro Pro Gln Asp Gln Glu Ser
275 280 285
Ser Pro Ile Glu Asn Asp Ser Ser Pro
290 295

<210> 97
<211> 364
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)
<400> 97

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

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

<210> 98
<211> 277
<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 98

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

<210> 99

<211> 255
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)
<400> 99

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

<210> 100
<211> 260
<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 100

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

<210> 101

<211> 283

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 101

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

<210> 102

<211> 595
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)
<400> 102

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

275 280 285
Cys Ala Thr Ser Ala Thr Asn Ser Cys Ala Arg Cys Val Pro Tyr Pro
290 295 300
Ile Cys Ala Ala Glu Thr Val Thr Lys Pro Gln Asp Met Ala Glu Lys
305 310 315 320
Asp Thr Thr Phe Glu Ala Pro Pro Leu Gly Thr Gln Pro Asp Cys Asn
325 330 335
Pro Thr Pro Glu Asn Gly Glu Ala Pro Ala Ser Thr Ser Pro Thr Gln
340 345 350
Ser Leu Leu Val Asp Ser Gln Ala Ser Lys Thr Leu Pro Ile Pro Thr
355 360 365
Ser Ala Pro Val Ala Leu Ser Ser Thr Gly Lys Pro Val Leu Asp Ala
370 375 380
Gly Pro Val Leu Phe Trp Val Ile Leu Val Leu Val Val Val Val Gly
385 390 395 400
Ser Ser Ala Phe Leu Leu Cys His Arg Arg Ala Cys Arg Lys Arg Ile
405 410 415
Arg Gln Lys Leu His Leu Cys Tyr Pro Val Gln Thr Ser Gln Pro Lys
420 425 430
Leu Glu Leu Val Asp Ser Arg Pro Arg Arg Ser Ser Thr Gln Leu Arg
435 440 445
Ser Gly Ala Ser Val Thr Glu Pro Val Ala Glu Glu Arg Gly Leu Met
450 455 460
Ser Gln Pro Leu Met Glu Thr Cys His Ser Val Gly Ala Ala Tyr Leu
465 470 475 480
Glu Ser Leu Pro Leu Gln Asp Ala Ser Pro Ala Gly Gly Pro Ser Ser
485 490 495
Pro Arg Asp Leu Pro Glu Pro Arg Val Ser Thr Glu His Thr Asn Asn
500 505 510
Lys Ile Glu Lys Ile Tyr Ile Met Lys Ala Asp Thr Val Ile Val Gly
515 520 525
Thr Val Lys Ala Glu Leu Pro Glu Gly Arg Gly Leu Ala Gly Pro Ala
530 535 540
Glu Pro Glu Leu Glu Glu Glu Leu Glu Ala Asp His Thr Pro His Tyr
545 550 555 560
Pro Glu Gln Glu Thr Glu Pro Pro Leu Gly Ser Cys Ser Asp Val Met
565 570 575
Leu Ser Val Glu Glu Glu Gly Lys Glu Asp Pro Leu Pro Thr Ala Ala
580 585 590

Ser Gly Lys
595

<210> 103
<211> 241
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)
<400> 103

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

<210> 104

<211> 272
<212> PRT
<213> 小鼠(Mus musculus)
<400> 104

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

<210> 105

<211> 256
<212> PRT
<213> 小鼠(Mus musculus)
<400> 105

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

<210> 106
<211> 254
<212> PRT

<213> 食蟹猴(cynomolgus)

<400> 106

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

<210> 107

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽接头
<400> 107
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5
<210> 108
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽接头
<400> 108
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10
<210> 109
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽接头
<400> 109
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10
<210> 110
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽接头
<400> 110
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10
<210> 111
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽接头
<400> 111
Gly Ser Pro Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser

1 5 10

<210> 112
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽接头
<400> 112
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 113
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽接头
<400> 113
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser
20

<210> 114
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽接头
<400> 114
Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5

<210> 115
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽接头
<400> 115
Gly Ser Gly Ser Gly Asn Gly Ser
1 5

<210> 116
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽接头
<400> 116
Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5
<210> 117
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽接头
<400> 117
Gly Gly Ser Gly Ser Gly
1 5
<210> 118
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽接头
<400> 118
Gly Gly Ser Gly
1
<210> 119
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽接头
<400> 119
Gly Gly Ser Gly Asn Gly Ser Gly
1 5
<210> 120
<211> 8
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 肽接头
<400> 120
Gly Gly Asn Gly Ser Gly Ser Gly
1 5
<210> 121
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽接头
<400> 121
Gly Gly Asn Gly Ser Gly
1 5
<210> 122
<211> 186
<212> PRT
<213> 食蟹猴(cynomolgus)
<400> 122
Leu His Cys Val Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys Gln
1 5 10 15
Glu Cys Arg Pro Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Asn Arg Ser Gln
20 25 30
Asn Thr Val Cys Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val
35 40 45
Ser Ala Lys Pro Cys Lys Ala Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly
50 55 60
Ser Glu Arg Lys Gln Pro Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg
65 70 75 80
Cys Arg Ala Gly Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp
85 90 95
Cys Ala Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala
100 105 110
Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln
115 120 125
Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro
130 135 140
Pro Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Thr Thr

145 150 155 160
Val Gln Pro Thr Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Arg Pro Ser Thr
165 170 175
Arg Pro Val Glu Val Pro Arg Gly Pro Ala
180 185
<210> 123
<211> 192
<212> PRT
<213> 小鼠(Mus musculus)
<400> 123
Val Thr Ala Arg Arg Leu Asn Cys Val Lys His Thr Tyr Pro Ser Gly
1 5 10 15
His Lys Cys Cys Arg Glu Cys Gln Pro Gly His Gly Met Val Ser Arg
20 25 30
Cys Asp His Thr Arg Asp Thr Leu Cys His Pro Cys Glu Thr Gly Phe
35 40 45
Tyr Asn Glu Ala Val Asn Tyr Asp Thr Cys Lys Gln Cys Thr Gln Cys
50 55 60
Asn His Arg Ser Gly Ser Glu Leu Lys Gln Asn Cys Thr Pro Thr Gln
65 70 75 80
Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Pro Gly Thr Gln Pro Arg Gln Asp Ser
85 90 95
Gly Tyr Lys Leu Gly Val Asp Cys Val Pro Cys Pro Pro Gly His Phe
100 105 110
Ser Pro Gly Asn Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu
115 120 125
Ser Gly Lys Gln Thr Arg His Pro Ala Ser Asp Ser Leu Asp Ala Val
130 135 140
Cys Glu Asp Arg Ser Leu Leu Ala Thr Leu Leu Trp Glu Thr Gln Arg
145 150 155 160
Pro Thr Phe Arg Pro Thr Thr Val Gln Ser Thr Thr Val Trp Pro Arg
165 170 175
Thr Ser Glu Leu Pro Ser Pro Pro Thr Leu Val Thr Pro Glu Gly Pro
180 185 190
<210> 124
<211> 681
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> Fc穴链的核苷酸序列

<400> 124

gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 60
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 240
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtgcacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag 420
aaccaggtca gcctctcgtg cgcagtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 540
gacggctcct tcttcctcgt gagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660
ctctccctgt ctccgggtaa a 681

<210> 125

<211> 1335

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人OX40抗原Fc节链的核苷酸序列

<400> 125

ctgcactgcg tgggcgacac ctaccccagc aacgaccggt gctgccacga gtgcagaccc 60
ggcaacggca tggtgtcccg gtgcagccgg tcccagaaca ccgtgtgcag accttgcggc 120
cctggcttct acaacgacgt ggtgtccagc aagccctgca agccttgtac ctggtgcaac 180
ctgcggagcg gcagcgagcg gaagcagctg tgtaccgcca cccaggatac cgtgtgccgg 240
tgtagagccg gcacccagcc cctggacagc tacaaacccg gcgtggactg cgccccttgc 300
cctcctggcc acttcagccc tggcgacaac caggcctgca agccttggac caactgcacc 360
ctggccggca agcacaccct gcagcccgcc agcaatagca gcgacgccat ctgcgaggac 420
cgggatcctc ctgccaccca gcctcaggaa acccagggcc ctcccgccag acccatcacc 480
gtgcagccta cagaggcctg gcccagaacc agccaggggc ctagcaccag acccgtggaa 540
gtgcctggcg gcagagccgt cgacgaacag ttatattttc agggcggctc acccaaatct 600
gcagacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 660
gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 720
acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 780
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 840
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 900
aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 960
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catgccggga tgagctgacc 1020
aagaaccagg tcagcctgtg gtgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1080

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1140
tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1200
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1260
agcctctccc tgtctccggg taaatccgga ggcctgaacg acatcttcga ggcccagaag 1320
attgaatggc acgag 1335

<210> 126
<211> 1335
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 食蟹猴OX40抗原Fc节链的核苷酸序列
<400> 126

ctccactgtg tcggggacac ctaccccagc aacgaccggt gctgtcagga gtgcaggcca 60
ggcaacggga tggtgagccg ctgcaaccgc tcccagaaca cggtgtgccg tccgtgcggg 120
cccggcttct acaacgacgt ggtcagcgcc aagccctgca aggcctgcac atggtgcaac 180
ctcagaagtg ggagtgagcg gaaacagccg tgcacggcca cacaggacac agtctgccgc 240
tgccgggcgg gcacccagcc cctggacagc tacaagcctg gagttgactg tgccccctgc 300
cctccagggc acttctcccc gggcgacaac caggcctgca agccctggac caactgcacc 360
ttggccggga agcacaccct gcagccagcc agcaatagct cggacgccat ctgtgaggac 420
agggaccccc cacccacaca gccccaggag acccagggcc ccccggccag gcccaccact 480
gtccagccca ctgaagcctg gcccagaacc tcacagagac cctccacccg gcccgtggag 540
gtccccaggg gccctgcggt cgacgaacag ttatattttc agggcggctc acccaaatct 600
gcagacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 660
gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 720
acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 780
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 840
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 900
aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 960
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catgccggga tgagctgacc 1020
aagaaccagg tcagcctgtg gtgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1080
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1140
tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1200
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1260
agcctctccc tgtctccggg taaatccgga ggcctgaacg acatcttcga ggcccagaag 1320
attgaatggc acgag 1335

<210> 127
<211> 1353
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 鼠OX40抗原Fc节链的核苷酸序列

<400> 127

gtgaccgcca gacggctgaa ctgcgtgaag cacacctacc ccagcggcca caagtgctgc 60
agagagtgcc agcccggcca cggcatggtg tccagatgcg accacacacg ggacaccctg 120
tgccaccctt gcgagacagg cttctacaac gaggccgtga actacgatac ctgcaagcag 180
tgcacccagt gcaaccacag aagcggcagc gagctgaagc agaactgcac ccccacccag 240
gataccgtgt gcagatgcag acccggcacc cagcccagac aggacagcgg ctacaagctg 300
ggcgtggact gcgtgccctg ccctcctggc cacttcagcc ccggcaacaa ccaggcctgc 360
aagccctgga ccaactgcac cctgagcggc aagcagacca gacaccccgc cagcgacagc 420
ctggatgccg tgtgcgagga cagaagcctg ctggccaccc tgctgtggga gacacagcgg 480
cccaccttca gacccaccac cgtgcagagc accaccgtgt ggcccagaac cagcgagctg 540
cccagtcctc ctaccctcgt gacacctgag ggccccgtcg acgaacagtt atattttcag 600
ggcggctcac ccaaatctgc agacaaaact cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa 660
ctcctggggg gaccgtcagt cttcctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc 720
tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc 780
aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 840
gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 900
ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag 960
aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca 1020
tgccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgtggt gcctggtcaa aggcttctat 1080
cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1140
acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct acagcaagct caccgtggac 1200
aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 1260
aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aatccggagg cctgaacgac 1320
atcttcgagg cccagaagat tgaatggcac gag 1353

<210> 128

<211> 227

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Fc穴链

<400> 128

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

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

<210> 129
<211> 445
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人OX40抗原Fc节链
<400> 129

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

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

370 375 380

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
385 390 395 400

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
405 410 415

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu
420 425 430

Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
435 440 445

<210> 130

<211> 445

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 食蟹猴OX40抗原
Fc节链

<400> 130

Leu His Cys Val Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys Gln
1 5 10 15

Glu Cys Arg Pro Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Asn Arg Ser Gln
20 25 30

Asn Thr Val Cys Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val
35 40 45

Ser Ala Lys Pro Cys Lys Ala Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly
50 55 60

Ser Glu Arg Lys Gln Pro Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg
65 70 75 80

Cys Arg Ala Gly Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp
85 90 95

Cys Ala Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala
100 105 110

Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln
115 120 125

Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro
130 135 140

Pro Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Thr Thr
145 150 155 160

Val Gln Pro Thr Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Arg Pro Ser Thr
165 170 175

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

<210> 131
<211> 451
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 鼠OX40抗原Fc节链

<400> 131

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

290 295 300
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
305 310 315 320
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
325 330 335
Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
340 345 350
Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
355 360 365
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
370 375 380
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
385 390 395 400
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
405 410 415
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
420 425 430
Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu
435 440 445
Trp His Glu
450

<210> 132
<211> 1613
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 文库DP88-4的核苷酸序列
<400> 132
tgaaatacct attgcctacg gcagccgctg gattgttatt actcgcggcc cagccggcca 60
tggccgacat ccagatgacc cagtctcctt ccaccctgtc tgcatctgta ggagaccgtg 120
tcaccatcac ttgccgtgcc agtcagagta ttagtagctg gttggcctgg tatcagcaga 180
aaccagggaa agcccctaag ctcctgatct atgatgcctc cagtttggaa agtggggtcc 240
catcacgttt cagcggcagt ggatccggga cagaattcac tctcaccatc agcagcttgc 300
agcctgatga ttttgcaact tattactgcc aacagtataa tagttattct acgtttggcc 360
agggcaccaa agtcgagatc aagcgtacgg tggctgcacc atctgtcttc atcttcccgc 420
catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg aataacttct 480
atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg ggtaactccc 540
aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc agcaccctga 600
cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc acccatcagg 660

gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgtggagcc gcagaacaaa 720
aactcatctc agaagaggat ctgaatggag ccgcagacta caaggacgac gacgacaagg 780
gtgccgcata ataaggcgcg ccaattctat ttcaaggaga cagtcatatg aaatacctgc 840
tgccgaccgc tgctgctggt ctgctgctcc tcgctgccca gccggcgatg gcccaggtgc 900
aattggtgca gtctggggct gaggtgaaga agcctgggtc ctcggtgaag gtctcctgca 960
aggcctccgg aggcacattc agcagctacg ctataagctg ggtgcgacag gcccctggac 1020
aagggctcga gtggatggga gggatcatcc ctatctttgg tacagcaaac tacgcacaga 1080
agttccaggg cagggtcacc attactgcag acaaatccac gagcacagcc tacatggagc 1140
tgagcagcct gagatctgag gacaccgccg tgtattactg tgcgagacta tccccaggcg 1200
gttactatgt tatggatgcc tggggccaag ggaccaccgt gaccgtctcc tcagctagca 1260
ccaaaggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct gggggcacag 1320
cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg tcgtggaact 1380
caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc tcaggactct 1440
actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag acctacatct 1500
gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aagtggacaa gaaagttgag cccaaatctt 1560
gtgacgcggc cgcaagcact agtgcccatc accatcacca tcacgccgcg gca 1613

<210> 133
<211> 723
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Fab轻链Vk1_5的核苷酸序列
<400> 133
gacatccaga tgacccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gtgccagtca gagtattagt agctggttgg cctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagcg gcagtggatc cgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cttgcagcct 240
gatgattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt attctacgtt tggccagggc 300
accaaagtcg agatcaagcg tacggtggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct 360
gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 420
agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 480
agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 540
agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg 600
agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtg gagccgcaga acaaaaactc 660
atctcagaag aggatctgaa tggagccgca gactacaagg acgacgacga caagggtgcc 720
gca 723

<210> 134
<211> 241
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Fab轻链Vk1_5

<400> 134

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

<210> 135

<211> 720

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> Fab重链VH1_69的核苷酸序列
<400> 135
caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagactatcc 300
ccaggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360
gctagcacca aaggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 420
ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 480
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 540
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 600
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaaag tggacaagaa agttgagccc 660
aaatcttgtg acgcggccgc aagcactagt gcccatcacc atcaccatca cgccgcggca 720
<210> 136
<211> 240
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> Fab重链VH1_69
<400> 136
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Ala Ala Ala Ser Thr Ser Ala His His His His His His Ala Ala Ala
225 230 235 240

<210> 137
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> LMB3引物
<400> 137
caggaaacag ctatgaccat gattac 26

<210> 138
<211> 71
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Vk1_5_L3r_S引物
<400> 138
ctcgactttg gtgccctggc caaacgtsba atacgaatta tactgttggc agtaataagt 60
tgcaaaatca t 71

<210> 139
<211> 74
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Vk1_5_L3r_SY引物
<400> 139
ctcgactttg gtgccctggc caaacgtmhr sgratacgaa ttatactgtt ggcagtaata 60
agttgcaaaa tcat 74

<210> 140
<211> 77
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Vk1_5_L3r_SPY
<400> 140
ctcgactttg gtgccctggc caaacgtmhh mssssgratac gaattatact gttggcagta 60
ataagttgca aaatcat 77
<210> 141
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> RJH31引物
<400> 141
acgtttggcc agggcaccaa agtcgag 27
<210> 142
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> RJH32引物
<400> 142
tctcgcacag taatacacgg cggtgtcc 28
<210> 143
<211> 64
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DP88-v4-4
<400> 143
ggacaccgcc gtgtattact gtgcgagaga ctactggggc caagggacca ccgtgaccgt 60
ctcc 64
<210> 144
<211> 64
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> DP88-v4-6
<400> 144
ggacaccgcc gtgtattact gtgcgagaga ctactggggc caagggacca ccgtgaccgt 60
ctcc 64
<210> 145
<211> 64
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DP88-v4-8
<400> 145
ggacaccgcc gtgtattact gtgcgagaga ctactggggc caagggacca ccgtgaccgt 60
ctcc 64
<210> 146
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> fdseqlong引物
<400> 146
gacgttagta aatgaatttt ctgtatgagg 30
<210> 147
<211> 1596
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> (Vk3_20/VH3_23)模板
<400> 147
atgaaatacc tattgcctac ggcagccgct ggattgttat tactcgcggc ccagccggcc 60
atggccgaaa tcgtgttaac gcagtctcca ggcaccctgt ctttgtctcc aggggaaaga 120
gccaccctct cttgcagggc cagtcagagt gttagcagca gctacttagc ctggtaccag 180
cagaaacctg gccaggctcc caggctcctc atctatggag catccagcag ggccactggc 240
atcccagaca ggttcagtgg cagtggatcc gggacagact tcactctcac catcagcaga 300
ctggagcctg aagattttgc agtgtattac tgtcagcagt atggtagctc accgctgacg 360
ttcggccagg ggaccaaagt ggaaatcaaa cgtacggtgg ctgcaccatc tgtcttcatc 420
ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat 480
aacttctatc ccagagaggc caaagtacag tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt 540
aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc 600
accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc 660

catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag agcttcaaca ggggagagtg tggagccgca 720
catcaccatc accatcacgg agccgcagac tacaaggacg acgacgacaa gggtgccgca 780
taataaggcg cgccaattct atttcaagga gacagtcata tgaaatacct gctgccgacc 840
gctgctgctg gtctgctgct cctcgctgcc cagccggcga tggccgaggt gcaattgctg 900
gagtctgggg gaggcttggt acagcctggg gggtccctga gactctcctg tgcagcctcc 960
ggattcacct ttagcagtta tgccatgagc tgggtccgcc aggctccagg gaaggggctg 1020
gagtgggtct cagctattag tggtagtggt ggtagcacat actacgcaga ctccgtgaag 1080
ggccggttca ccatctccag agacaattcc aagaacacgc tgtatctgca gatgaacagc 1140
ctgagagccg aggacacggc cgtatattac tgtgcgaaac cgtttccgta ttttgactac 1200
tggggccaag gaaccctggt caccgtctcg agtgctagca ccaaaggccc atcggtcttc 1260
cccctggcac cctcctccaa gagcacctct gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc 1320
aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc 1380
gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc tcaggactct actccctcag cagcgtggtg 1440
accgtgccct ccagcagctt gggcacccag acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc 1500
agcaacacca aagtggacaa gaaagttgag cccaaatctt gtgacgcggc cgcagaacaa 1560
aaactcatct cagaagagga tctgaatgcc gcggca 1596

<210> 148
<211> 714
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Fab轻链Vk3_20
<400> 148

gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccgct gacgttcggc 300
caggggacca aagtggaaat caaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgtggagc cgcacatcac 660
catcaccatc acggagccgc agactacaag gacgacgacg acaagggtgc cgca 714

<210> 149
<211> 238
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fab轻链Vk3_20
<400> 149

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

<210> 150
<211> 711
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Fab重链VH3_23

<400> 150

gaggtgcaat tgctggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaccgttt 300
ccgtattttg actactgggg ccaaggaacc ctggtcaccg tctcgagtgc tagcaccaaa 360
ggcccatcgg tcttcccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 420
ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc 480
gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 540
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac 600
gtgaatcaca agcccagcaa caccaaagtg gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac 660
gcggccgcag aacaaaaact catctcagaa gaggatctga atgccgcggc a 711

<210> 151

<211> 237

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Fab重链VH3_23 (DP47)

<400> 151

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

145 150 155 160
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Ala Ala Ala Glu
210 215 220
Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ala Ala Ala
225 230 235

<210> 152
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> MS64引物
<400> 152
acgttcggcc aggggaccaa agtgg 25

<210> 153
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DP47CDR3_ba引物
<400> 153
cgcacagtaa tatacggccg tgtcc 25

<210> 154
<211> 64
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DP47-v4-4
<400> 154
cgaggacacg gccgtatatt actgtgcgga ctactggggc caaggaaccc tggtcaccgt 60
ctcg 64

<210> 155
<211> 64
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> DP47-v4-6
<400> 155
cgaggacacg gccgtatatt actgtgcgga ctactggggc caaggaaccc tggtcaccgt 60
ctcg 64
<210> 156
<211> 64
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DP47-v4-8
<400> 156
cgaggacacg gccgtatatt actgtgcgga ctactggggc caaggaaccc tggtcaccgt 60
ctcg 64
<210> 157
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> fdseqlong
<400> 157
gacgttagta aatgaatttt ctgtatgagg 30
<210> 158
<211> 1605
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> V13_19/VH3_23文库模板
<400> 158
atgaaatacc tattgcctac ggcagccgct ggattgttat tactcgcggc ccagccggcc 60
atggcctcgt ctgagctgac tcaggaccct gctgtgtctg tggccttggg acagacagtc 120
aggatcacat gccaaggaga cagcctcaga agttattatg caagctggta ccagcagaag 180
ccaggacagg cccctgtact tgtcatctat ggtaaaaaca accggccctc agggatccca 240
gaccgattct ctggctccag ctcaggaaac acagcttcct tgaccatcac tggggctcag 300
gcggaagatg aggctgacta ttactgtaac tcccgtgata gtagcggtaa tcatgtggta 360
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggacaaccca aggctgcccc cagcgtgacc 420
ctgttccccc ccagcagcga ggaattgcag gccaacaagg ccaccctggt ctgcctgatc 480
agcgacttct acccaggcgc cgtgaccgtg gcctggaagg ccgacagcag ccccgtgaag 540

gccggcgtgg agaccaccac ccccagcaag cagagcaaca acaagtacgc cgccagcagc 600
tacctgagcc tgacccccga gcagtggaag agccacaggt cctacagctg ccaggtgacc 660
cacgagggca gcaccgtgga gaaaaccgtg gcccccaccg agtgcagcgg agccgcagaa 720
caaaaactca tctcagaaga ggatctgaat ggagccgcag actacaagga cgacgacgac 780
aagggtgccg cataataagg cgcgccaatt ctatttcaag gagacagtca tatgaaatac 840
ctgctgccga ccgctgctgc tggtctgctg ctcctcgctg cccagccggc gatggccgag 900
gtgcaattgc tggagtctgg gggaggcttg gtacagcctg gggggtccct gagactctcc 960
tgtgcagcct ccggattcac ctttagcagt tatgccatga gctgggtccg ccaggctcca 1020
gggaaggggc tggagtgggt ctcagctatt agtggtagtg gtggtagcac atactacgca 1080
gactccgtga agggccggtt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 1140
cagatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gccgtatatt actgtgcgaa accgtttccg 1200
tattttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaaaggc 1260
ccatcggtct tcccccctggc accctcctcc aagagcacct ctgggggcac agcggccctg 1320
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc 1380
ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 1440
agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 1500
aatcacaagc ccagcaacac caaagtggac aagaaagttg agcccaaatc ttgtgacgcg 1560
gccgcaagca ctagtgccca tcaccatcac catcacgccg cggca 1605

<210> 159
<211> 726
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Fab轻链Vl3_19
<400> 159
tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60
acatgccaag gagacagcct cagaagttat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120
caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180
ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240
gatgaggctg actattactg taactcccgt gatagtagcg gtaatcatgt ggtattcggc 300
ggagggacca agctgaccgt cctaggacaa cccaaggctg cccccagcgt gaccctgttc 360
ccccccagca gcgaggaatt gcaggccaac aaggccaccc tggtctgcct gatcagcgac 420
ttctacccag gcgccgtgac cgtggcctgg aaggccgaca gcagccccgt gaaggccggc 480
gtggagacca ccacccccag caagcagagc aacaacaagt acgccgccag cagctacctg 540
agcctgaccc ccgagcagtg gaagagccac aggtcctaca gctgccaggt gacccacgag 600
ggcagcaccg tggagaaaac cgtggccccc accgagtgca gcggagccgc agaacaaaaa 660
ctcatctcag aagaggatct gaatggagcc gcagactaca aggacgacga cgacaagggt 720
gccgca 726

<210> 160

<211> 242
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> Fab轻链V13_19
<400> 160

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

<210> 161
<211> 26

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> LMB3 λ-DP47文库
<400> 161
caggaaacag ctatgaccat gattac 26
<210> 162
<211> 85
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Vl_3_19_L3r_V λ-DP47文库
<400> 162
ggacggtcag cttggtccct ccgccgaata cvhvattacc gctactatca cgggagttac 60
agtaatagtc agcctcatct tccgc 85
<210> 163
<211> 88
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Vl_3_19_L3r_HV λ-DP47
<400> 163
ggacggtcag cttggtccct ccgccgaata ccmmatgatt accgctacta tcacgggagt 60
tacagtaata gtcagcctca tcttccgc 88
<210> 164
<211> 91
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Vl_3_19_L3r_HLV λ-DP47
<400> 164
ggacggtcag cttggtccct ccgccgaata crhmvwgatg attaccgcta ctatcacggg 60
agttacagta atagtcagcc tcatcttccg c 91
<210> 165
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> RJH80 λ-DP47

<400> 165
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtcc 28
<210> 166
<211> 318
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA (8H9) VL
<400> 166
tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60
acatgccaag gagacagcct cagaagttat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120
caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180
ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240
gatgaggctg actattactg taactcccgt gttatgcctc ataatcgcgt attcggcgga 300
gggaccaagc tgaccgtc 318
<210> 167
<211> 360
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA (8H9) VH
<400> 167
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggGtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gcgtgttttc 300
taccgtggtg gtgtttctat ggactactgg ggccaaggaa ccctggtcac cgtctcgagt 360
<210> 168
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA (49B4) VL
<400> 168
gacatccaga tgacccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gtgccagtca gagtattagt agctggttgg cctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagcg gcagtggatc cgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cttgcagcct 240

gatgattttg caacttatta ctgccaacag tatagttcgc agccgtatac gtttggccag 300
ggcaccaaag tcgagatcaa g 321
<210> 169
<211> 354
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA (49B4) VH
<400> 169
caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagagaatac 300
taccgtggtc cgtacgacta ctggggccaa gggaccaccg tgaccgtctc ctca 354
<210> 170
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA (1G4) VL
<400> 170
gacatccaga tgacccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gtgccagtca gagtattagt agctggttgg cctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagcg gcagtggatc cgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cttgcagcct 240
gatgattttg caacttatta ctgccaacag tatatttcgt attccatgtt gacgtttggc 300
cagggcacca aagtcgagat caag 324
<210> 171
<211> 348
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA (1G4) VH
<400> 171
caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagagaatac 300
ggttctatgg actactgggg ccaagggacc accgtgaccg tctcctca 348
<210> 172
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA (20B7) VL
<400> 172
gacatccaga tgacccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gtgccagtca gagtattagt agctggttgg cctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagcg gcagtggatc cgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cttgcagcct 240
gatgattttg caacttatta ctgccaacag tatcaggctt tttcgcttac gtttggccag 300
ggcaccaaag tcgagatcaa g 321
<210> 173
<211> 366
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA (20B7) VH
<400> 173
caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagagttaac 300
tacccgtact cttactgggg tgacttcgac tactggggcc aagggaccac cgtgaccgtc 360
tcctca 366
<210> 174
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA (CLC-563) VL
<400> 174
gagatcgtgc tgacccagag ccccggcaca ctctccctgt ctcctgggga aagggccacc 60
ctttcatgca gagccagcca gtccgtctct agtagctacc tggcatggta tcagcagaag 120
ccaggacaag ccccccgcct cctgatttac ggcgcttcct ctcgggcaac tggtatccct 180

gacaggttct cagggagcgg aagcggaaca gattttacct tgactatttc tagactggag 240
ccagaggact tcgccgtgta ttactgtcag cagtacggta gtagcccct caccttggc 300
caggggacaa aagtcgaaat caag 324
<210> 175
<211> 348
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA (CLC-563) VH
<400> 175
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gcttgacgtt 300
ggtgctttcg actactgggg ccaaggagcc ctggtcaccg tctcgagt 348
<210> 176
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA (CLC-564) VL
<400> 176
gagatcgtgc tgacccagag ccccggcaca ctctccctgt ctcctgggga aagggccacc 60
ctttcatgca gagccagcca gtccgtctct agtagctacc tggcatggta tcagcagaag 120
ccaggacaag ccccccgcct cctgatttac ggcgcttcct ctcgggcaac tggtatccct 180
gacaggttct cagggagcgg aagcggaaca gattttacct tgactatttc tagactggag 240
ccagaggact tcgccgtgta ttactgtcag cagtacggta gtagcccct caccttggc 300
caggggacaa aagtcgaaat caag 324
<210> 177
<211> 348
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA (CLC-564) VH
<400> 177
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gttcgacgtt 300
ggtccgttcg actactgggg ccaaggaacc ctggtcaccg tctcgagt 348
<210> 178
<211> 318
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA (17A9) VL
<400> 178
tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60
acatgccaag gagacagcct cagaagttat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120
caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180
ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240
gatgaggctg actattactg taactcccgt gttatgcctc ataatcgcgt attcggcgga 300
gggaccaagc tgaccgtc 318
<210> 179
<211> 360
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA (17A9) VH
<400> 179
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggGtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gcgtgttttc 300
taccgtggtg gtgtttctat ggactactgg ggccaaggaa ccctggtcac cgtctcgagt 360
<210> 180
<211> 645
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA 8H9 P329GLALA IgG1轻链
<400> 180
gacatccaga tgacccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gtgccagtca gagtattagt agctggttgg cctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180

cgtttcagcg gcagtggatc cgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cttgcagcct 240
gatgattttg caacttatta ctgccaacag tatttgacgt attcgcggtt tacgtttggc 300
cagggcacca aagtcgagat caagcgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

<210> 181
<211> 1338
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA 8H9 P329GLALA IgG1重链
<400> 181

caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagagaatac 300
ggttggatgg actactgggg ccaagggacc accgtgaccg tctcctcagc tagcaccaag 360
ggcccatcgg tcttcccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 420
ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc 480
gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 540
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac 600
gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac 660
aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaagctg caggggggacc gtcagtcttc 720
ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc 780
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 840
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 900
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 960
aaggtctcca acaaagccct cggcgccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1020
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggatgagct gaccaagaac 1080
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1140
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1200
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1260
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1320
tccctgtctc cgggtaaa 1338

<210> 182

<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 8H9 P329GLALA IgG1轻链
<400> 182

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

<210> 183
<211> 446
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 8H9 P329GLALA IgG1重链

<400> 183

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

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

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

<210> 184
<211> 642
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA 49B4 P329GLALA IgG1轻链
<400> 184
gacatccaga tgacccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gtgccagtca gagtattagt agctggttgg cctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagcg gcagtggatc cgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cttgcagcct 240
gatgattttg caacttatta ctgccaacag tatagttcgc agccgtatac gtttggccag 300
ggcaccaaag tcgagatcaa gcgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642
<210> 185
<211> 1344

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA 49B4 P329GLALA IgG1重链
<400> 185
caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagagaatac 300
taccgtggtc cgtacgacta ctggggccaa gggaccaccg tgaccgtctc ctcagctagc 360
accaagggcc catcggtctt ccccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 420
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 540
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 600
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagttga gcccaaatct 660
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aagctgcagg gggaccgtca 720
gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 780
acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 840
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 900
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 960
aagtgcaagg tctccaacaa agccctcggc gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1020
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc 1080
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1140
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1200
tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1260
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1320
agcctctccc tgtctccggg taaa 1344
<210> 186
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 49B4 P329GLALA IgG1轻链
<400> 186
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
20 25 30

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

<210> 187
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 49B4重链
<400> 187
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

370 375 380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 188
<211> 645
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA 1G4 P329GLALA IgG1轻链
<400> 188
gacatccaga tgacccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gtgccagtca gagtattagt agctggttgg cctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagcg gcagtggatc cgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cttgcagcct 240
gatgattttg caacttatta ctgccaacag tatatttcgt attccatgtt gacgtttggc 300
cagggcacca aagtcgagat caagcgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

<210> 189
<211> 1338
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA 1G4 P329GLALA IgG1重链
<400> 189
caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagagaatac 300

ggttctatgg actactgggg ccaagggacc accgtgaccg tctcctcagc tagcaccaag 360
ggcccatcgg tcttcccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 420
ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc 480
gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 540
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac 600
gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac 660
aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaagctg cagggggacc gtcagtcttc 720
ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 780
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 840
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 900
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 960
aaggtctcca acaaagccct cggcgccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1020
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggatgagct gaccaagaac 1080
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1140
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1200
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1260
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1320
tccctgtctc cgggtaaa 1338

<210> 190
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 1G4 P329GLALA IgG1轻链
<400> 190

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

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 191
<211> 446
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 1G4 P329GLALA IgG1重链
<400> 191
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Tyr Gly Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 192

<211> 642
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA 20B7 P329GLALA IgG1轻链
<400> 192
gacatccaga tgacccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gtgccagtca gagtattagt agctggttgg cctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagcg gcagtggatc cgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cttgcagcct 240
gatgattttg caacttatta ctgccaacag tatcaggctt tttcgcttac gtttggccag 300
ggcaccaaag tcgagatcaa gcgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642
<210> 193
<211> 1356
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA 20B7 P329GLALA IgG1重链
<400> 193
caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagagttaac 300
tacccgtact cttactgggg tgacttcgac tactggggcc aagggaccac cgtgaccgtc 360
tcctcagcta gcaccaaggg cccatcggtc ttcccctgg caccctcctc caagagcacc 420
tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 480
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag 540
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc 600
cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt 660
gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaagctgca 720
gggggaccgt cagtcttcct cttcccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg 780
acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 840
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 900

tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 960
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcg gcgcccccat cgagaaaacc 1020
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg 1080
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1140
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1200
cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 1260
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1320
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa 1356

<210> 194
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工的
<220>
<223> 20B7 P329GLALA IgG1轻链
<400> 194

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

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 195
<211> 452
<212> PRT
<213> 人工的
<220>
<223> 20B7 P329GLALA IgG1重链
<400> 195

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

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
225 230 235 240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro
325 330 335
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445
Ser Pro Gly Lys
450

<210> 196
<211> 645
<212> DNA
<213> 人工的
<220>
<223> DNA CLC-563 P329GLALA IgG1轻链
<400> 196
gagatcgtgc tgacccagag ccccggcaca ctctccctgt ctcctgggga aagggccacc 60
ctttcatgca gagccagcca gtccgtctct agtagctacc tggcatggta tcagcagaag 120

ccaggacaag ccccccgcct cctgatttac ggcgcttcct ctcgggcaac tggtatccct 180
gacaggttct cagggagcgg aagcggaaca gattttacct tgactatttc tagactggag 240
ccagaggact tcgccgtgta ttactgtcag cagtacggta gtagcccctc cacctttggc 300
caggggacaa aagtcgaaat caagcgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

<210> 197
<211> 1338
<212> DNA
<213> 人工的
<220>
<223> DNA CLC-563 P329GLALA IgG1重链
<400> 197

gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggGtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gcttgacgtt 300
ggtgctttcg actactgggg ccaaggagcc ctggtcaccg tctcgagtgc tagcaccaag 360
ggcccatcgg tcttcccccc ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 420
ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc 480
gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 540
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac 600
gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac 660
aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaagctg caggggGacc gtcagtcttc 720
ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc 780
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 840
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 900
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 960
aaggtctcca acaaagccct cggcgccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1020
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggatgagct gaccaagaac 1080
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1140
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1200
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1260
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1320
tccctgtctc cgggtaaa 1338

<210> 198
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工的
<220>
<223> CLC-563 P329GLALA IgG1轻链
<400> 198

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

<210> 199
<211> 446
<212> PRT
<213> 人工的

<220>

<223> CLC-563 P329GLALA IgG1重链

<400> 199

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

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

<210> 200
<211> 645
<212> DNA
<213> 人工的
<220>
<223> DNA CLC-564 P329GLALA IgG1轻链
<400> 200

gagatcgtgc tgacccagag ccccggcaca ctctccctgt ctcctgggga aagggccacc 60
ctttcatgca gagccagcca gtccgtctct agtagctacc tggcatggta tcagcagaag 120
ccaggacaag ccccccgcct cctgatttac ggcgcttcct ctcgggcaac tggtatccct 180
gacaggttct cagggagcgg aagcggaaca gattttacct tgactatttc tagactggag 240
ccagaggact tcgccgtgta ttactgtcag cagtacggta gtagcccccc caccttttggc 300
caggggacaa aagtcgaaat caagcgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

<210> 201

<211> 1338
<212> DNA
<213> 人工的
<220>
<223> DNA CLC-564 P329GLALA IgG1重链
<400> 201
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggGtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gttcgacgtt 300
ggtccgttcg actactgggg ccaaggaacc ctggtcaccg tctcgagtgc tagcaccaag 360
ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 420
ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc 480
gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 540
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac 600
gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac 660
aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaagctg caggggGacc gtcagtcttc 720
ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc 780
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 840
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 900
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 960
aaggtctcca acaaagccct cggcgccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1020
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggatgagct gaccaagaac 1080
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1140
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1200
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1260
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1320
tccctgtctc cgggtaaa 1338
<210> 202
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工的
<220>
<223> CLC-564 P329GLALA IgG1轻链
<400> 202
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

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

<210> 203
<211> 446
<212> PRT
<213> 人工的
<220>
<223> CLC-564 P329GLALA IgG1重链
<400> 203
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 204
<211> 639
<212> DNA
<213> 人工的
<220>
<223> DNA 17A9 P329GLALA IgG1轻链
<400> 204
tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60
acatgccaag gagacagcct cagaagttat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120
caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180
ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240
gatgaggctg actattactg taactcccgt gttatgcctc ataatcgcgt attcggcgga 300
gggaccaagc tgaccgtcct aggtcaaccc aaggctgccc ccagcgtgac cctgttcccc 360
cccagcagcg aggaactgca ggccaacaag gccaccctgg tctgcctgat cagcgacttc 420
tacccaggcg ccgtgaccgt ggcctggaag gccgacagca gccccgtgaa ggccggcgtg 480
gagaccacca cccccagcaa gcagagcaac aacaagtacg ccgccagcag ctacctgagc 540
ctgacccccg agcagtggaa gagccacagg tcctacagct gccaggtgac ccacgagggc 600
agcaccgtgg agaaaaccgt ggcccccacc gagtgcagc 639
<210> 205
<211> 1350
<212> DNA
<213> 人工的
<220>
<223> DNA 17A9 P329GLALA IgG1重链
<400> 205
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggGtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gcgtgttttc 300
taccgtggtg gtgtttctat ggactactgg ggccaaggaa ccctggtcac cgtctcgagt 360
gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 420
ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 480
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 540
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 600
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 660
aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaagc tgcaggggga 720
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 780
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag 1080
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1350

<210> 206
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工的
<220>
<223> 17A9 P329GLALA IgG1轻链
<400> 206

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

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

<210> 207
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工的
<220>
<223> 17A9 P329GLALA IgG1重链
<400> 207
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Val Phe Tyr Arg Gly Gly Val Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 208
<211> 663
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人OX40 His核苷酸序列
<400> 208

ctgcactgcg tgggcgacac ctaccccagc aacgaccggt gctgccacga gtgcagaccc 60
ggcaacggca tggtgtcccg gtgcagccgg tcccagaaca ccgtgtgcag accttgcggc 120
cctggcttct acaacgacgt ggtgtccagc aagccctgca agccttgtac ctggtgcaac 180
ctgcggagcg gcagcgagcg gaagcagctg tgtaccgcca cccaggatac cgtgtgccgg 240
tgtagagccg gcacccagcc cctggacagc tacaaacccg gcgtggactg cgccccttgc 300
cctcctggcc acttcagccc tggcgacaac caggcctgca agccttggac caactgcacc 360
ctggccggca agcacaccct gcagcccgcc agcaatagca gcgacgccat ctgcgaggac 420
cgggatcctc ctgccaccca gcctcaggaa acccagggcc ctcccgccag acccatcacc 480
gtgcagccta cagaggcctg gcccagaacc agccaggggc ctagcaccag acccgtggaa 540
gtgcctggcg gcagagccgt cgacgaacag ttatattttc agggcggctc aggcctgaac 600
gacatcttcg aggcccagaa gatcgagtgg cacgaggctc gagctcacca ccatcaccat 660
cac 663

<210> 209
<211> 221
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人OX40 His
<400> 209

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

85 90 95
Cys Ala Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala
100 105 110
Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln
115 120 125
Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro
130 135 140
Ala Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr
145 150 155 160
Val Gln Pro Thr Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr
165 170 175
Arg Pro Val Glu Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Asp Glu Gln Leu Tyr
180 185 190
Phe Gln Gly Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile
195 200 205
Glu Trp His Glu Ala Arg Ala His His His His His His
210 215 220

<210> 210
<211> 681
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA 鼠OX40 His
<400> 210
gtgaccgcca gacggctgaa ctgcgtgaag cacacctacc ccagcggcca caagtgctgc 60
agagagtgcc agcccggcca cggcatggtg tccagatgcg accacacacg ggacaccctg 120
tgccaccctt gcgagacagg cttctacaac gaggccgtga actacgatac ctgcaagcag 180
tgcacccagt gcaaccacag aagcggcagc gagctgaagc agaactgcac ccccacccag 240
gataccgtgt gcagatgcag acccggcacc cagcccagac aggacagcgg ctacaagctg 300
ggcgtggact gcgtgccctg ccctcctggc cacttcagcc ccggcaacaa ccaggcctgc 360
aagccctgga ccaactgcac cctgagcggc aagcagacca gacaccccgc cagcgacagc 420
ctggatgccg tgtgcgagga cagaagcctg ctggccaccc tgctgtggga gacacagcgg 480
cccaccttca gacccaccac cgtgcagagc accaccgtgt ggcccagaac cagcgagctg 540
cccagtcctc ctaccctcgt gacacctgag ggccccgtcg acgaacagtt atattttcag 600
ggcggctcag gcctgaacga catcttcgag gcccagaaga tcgagtggca cgaggctcga 660
gctcaccacc atcaccatca c 681

<210> 211
<211> 226
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 鼠OX40 His
<400> 211

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

<210> 212
<211> 1317
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 二聚体人OX40抗原Fc的核苷酸序列

<400> 212

ctgcactgcg tgggcgacac ctaccccagc aacgaccggt gctgccacga gtgcagaccc 60
ggcaacggca tggtgtcccg gtgcagccgg tcccagaaca ccgtgtgcag accttgcggc 120
cctggcttct acaacgacgt ggtgtccagc aagccctgca agccttgtac ctggtgcaac 180
ctgcggagcg gcagcgagcg gaagcagctg tgtaccgcca cccaggatac cgtgtgccgg 240
tgtagagccg gcacccagcc cctggacagc tacaaacccg gcgtggactg cgcccttgc 300
cctcctggcc acttcagccc tggcgacaac caggcctgca agccttggac caactgcacc 360
ctggccggca agcacaccct gcagcccgcc agcaatagca gcgacgccat ctgcgaggac 420
cgggatcctc ctgccaccca gcctcaggaa acccagggcc ctcccgccag acccatcacc 480
gtgcagccta cagaggcctg gcccagaacc agccaggggc ctagcaccag acccgtggaa 540
gtgcctggcg gcagagccgt cgacgaacag ttatattttc agggcggctc acccaaatct 600
gcagacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 660
gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 720
acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 780
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 840
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 900
aagtgcaagg tctccaacaa agccctcggc gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 960
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc 1020
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1080
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1140
tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1200
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1260
agcctctccc tgtctccggg taaatccggc tacccatacg atgttccaga ttacgct 1317

<210> 213

<211> 439

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 二聚体人OX40抗原Fc

<400> 213

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

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

370 375 380
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
385 390 395 400
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
405 410 415
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Tyr Pro
420 425 430
Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
435

<210> 214
<211> 2064
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> (8B9) VHCH1-重链-(28H1) VHCL
<400> 214

caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagagaatac 300
ggttggatgg actactgggg ccaagggacc accgtgaccg tctcctcagc tagcaccaag 360
ggcccatccg tgttccctct ggcccccttcc agcaagtcta cctctggcgg cacagccgct 420
ctgggctgcc tcgtgaagga ctacttcccc gagcctgtga cagtgtcctg gaactctggc 480
gccctgacat ccggcgtgca cacctttcca gctgtgctgc agtcctccgg cctgtactcc 540
ctgtcctccg tcgtgacagt gccctccagc tctctgggca cccagaccta catctgcaac 600
gtgaaccaca agccctccaa caccaaggtg gacaagaagg tggaacccaa gtcctgcgac 660
aagacccaca cctgtccccc ttgtcctgcc cctgaagctg ctggcggccc tagcgtgttc 720
ctgttccccc caaagcccaa ggacaccctg atgatctccc ggacccccga agtgacctgc 780
gtggtggtgg atgtgtccca cgaggaccct gaagtgaagt tcaattggta cgtggacggc 840
gtggaagtgc acaatgccaa gaccaagcct agagaggaac agtacaactc cacctaccgg 900
gtggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag gattggctga acggcaaaga gtacaagtgc 960
aaggtgtcca acaaggccct gggagccccc atcgaaaaga ccatctccaa ggccaagggc 1020
cagcctcgcg agcctcaggt gtacaccctg ccccctagca gagatgagct gaccaagaac 1080
caggtgtccc tgacctgtct cgtgaaaggc ttctaccccct ccgatatcgc cgtggaatgg 1140
gagagcaacg gccagcccga gaacaactac aagaccaccc cccctgtgct ggactccgac 1200
ggctcattct tcctgtactc taagctgaca gtggacaagt cccggtggca gcagggcaac 1260
gtgttctcct gctccgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacaccca gaagtccctg 1320
tccctgtctc ccgggggagg cggaggatct ggcggaggcg gatccggtgg tggcggatct 1380

ggggcggtg gatctgaggt gcagctgctg gaatctgggg gaggactggt gcagccaggc 1440
ggatctctga ggctgtcctg cgctgcttcc ggctttacct tctccagcca cgccatgagt 1500
tgggtgcgcc aggcacccgg aaaaggactg gaatgggtgt cagccatctg ggcctccggc 1560
gagcagtact acgccgatag cgtgaagggc cggttcacca tctctcggga taacagcaag 1620
aatactctgt acctgcagat gaactccctg cgcgctgaag ataccgctgt gtattactgc 1680
gccaagggct ggctgggcaa cttcgattac tggggccagg gaaccctcgt gactgtctcg 1740
agcgcttctg tggccgctcc ctccgtgttc atcttcccac cttccgacga gcagctgaag 1800
tccggcactg cctctgtcgt gtgcctgctg aacaacttct accctcggga agccaaggtg 1860
cagtggaaag tggataacgc cctgcagtcc ggcaactccc aggaatccgt gaccgagcag 1920
gactccaagg acagcaccta ctccctgagc agcaccctga ccctgtccaa ggccgactac 1980
gagaagcaca aggtgtacgc ctgtgaagtg acccaccagg gcctgtccag ccccgtgacc 2040
aagtccttca accggggcga gtgc 2064

<210> 215
<211> 642
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA VLCH1-轻链2 (28H1)
<400> 215

gagatcgtgc tgacccagtc tcccggcacc ctgagcctga gccctggcga gagagccacc 60
ctgagctgca gagccagcca gagcgtgagc cggagctacc tggcctggta tcagcagaag 120
cccggccagg cccccagact gctgatcatc ggcgccagca cccgggccac cggcatcccc 180
gatagattca gcggcagcgg ctccggcacc gacttcaccc tgaccatcag ccggctggaa 240
cccgaggact tcgccgtgta ctactgccag cagggccagg tgatcccccc caccttcggc 300
cagggcacca aggtggaaat caagagctcc gctagcacca agggcccctc cgtgtttcct 360
ctggccccca gcagcaagag cacctctggc ggaacagccg ccctgggctg cctggtgaaa 420
gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc tggaactctg gcgccctgac cagcggcgtg 480
cacacctttc cagccgtgct gcagagcagc ggcctgtact ccctgagcag cgtggtgaca 540
gtgccctcca gcagcctggg cacccagacc tacatctgca acgtgaacca caagcccagc 600
aacaccaaag tggacaagaa ggtggaaccc aagagctgcg ac 642

<210> 216
<211> 688
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (8B9) VHCH1-重链-(28H1) VHCL
<400> 216

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

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

325 330 335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly
435 440 445
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
450 455 460
Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
465 470 475 480
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser
485 490 495
His Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
500 505 510
Val Ser Ala Ile Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
515 520 525
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
530 535 540
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
545 550 555 560
Ala Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
565 570 575
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
580 585 590
Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
595 600 605
Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
610 615 620
Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
625 630 635 640

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
645 650 655
Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
660 665 670
Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
675 680 685

<210> 217
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> VLCH1-轻链2 (28H1)
<400> 217

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

Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210

<210> 218
<211> 2070
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA (49B4) VHCH1-重链-(28H1) VHCL
<400> 218

caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagagaatac 300
taccgtggtc cgtacgacta ctggggccaa gggaccaccg tgaccgtctc ctcagctagc 360
accaagggcc catccgtgtt ccctctggcc ccttccagca agtctacctc tggcggcaca 420
gccgctctgg gctgcctcgt gaaggactac ttccccgagc ctgtgacagt gtcctggaac 480
tctggcgccc tgacatccgg cgtgcacacc tttccagctg tgctgcagtc ctccggcctg 540
tactccctgt cctccgtcgt gacagtgccc tccagctctc tgggcaccca gacctacatc 600
tgcaacgtga accacaagcc ctccaacacc aaggtggaca agaaggtgga acccaagtcc 660
tgcgacaaga cccacacctg tccccccttgt cctgcccctg aagctgctgg cggccctagc 720
gtgttcctgt tccccccaaa gcccaaggac accctgatga tctcccggac ccccgaagtg 780
acctgcgtgg tggtggatgt gtcccacgag gaccctgaag tgaagttcaa ttggtacgtg 840
gacggcgtgg aagtgcacaa tgccaagacc aagcctagag aggaacagta caactccacc 900
taccgggtgg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggatt ggctgaacgg caaagagtac 960
aagtgcaagg tgtccaacaa ggccctggga gcccccatcg aaaagaccat ctccaaggcc 1020
aagggccagc ctcgcgagcc tcaggtgtac accctgcccc ctagcagaga tgagctgacc 1080
aagaaccagg tgtccctgac ctgtctcgtg aaaggcttct acccctccga tatcgccgtg 1140
gaatgggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccacccccc tgtgctggac 1200
tccgacggct cattcttcct gtactctaag ctgacagtgg acaagtcccg gtggcagcag 1260
ggcaacgtgt tctcctgctc cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta cacccagaag 1320
tccctgtccc tgtctcccgg gggaggcgga ggatctggcg gaggcggatc cggtggtggc 1380
ggatctgggg gcggtggatc tgaggtgcag ctgctggaat ctgggggagg actggtgcag 1440
ccaggcggat ctctgaggct gtcctgcgct gcttccggct ttaccttctc cagccacgcc 1500
atgagttggg tgcgccaggc acccggaaaa ggactggaat gggtgtcagc catctgggcc 1560
tccggcgagc agtactacgc cgatagcgtg aagggccggt tcaccatctc tcgggataac 1620
agcaagaata ctctgtacct gcagatgaac tccctgcgcg ctgaagatac cgctgtgtat 1680
tactgcgcca agggctggct gggcaacttc gattactggg gccagggaac cctcgtgact 1740
gtctcgagcg cttctgtggc cgctccctcc gtgttcatct tcccaccttc cgacgagcag 1800

ctgaagtccg gcactgcctc tgtcgtgtgc ctgctgaaca acttctaccc tcgggaagcc 1860
aaggtgcagt ggaaagtgga taacgccctg cagtccggca actcccagga atccgtgacc 1920
gagcaggact ccaaggacag cacctactcc ctgagcagca ccctgaccct gtccaaggcc 1980
gactacgaga agcacaaggt gtacgcctgt gaagtgaccc accagggcct gtccagcccc 2040
gtgaccaagt ccttcaaccg gggcgagtgc 2070

<210> 219
<211> 690
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (49B4) VHCH1-重链-(28H1) VHCL
<400> 219

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

210 215 220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly
435 440 445
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
450 455 460
Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
465 470 475 480
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
485 490 495
Ser Ser His Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
500 505 510
Glu Trp Val Ser Ala Ile Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp
515 520 525

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
530 535 540
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
545 550 555 560
Tyr Cys Ala Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
565 570 575
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
580 585 590
Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
595 600 605
Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp
610 615 620
Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr
625 630 635 640
Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
645 650 655
Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
660 665 670
Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly
675 680 685
Glu Cys
690

<210> 220
<211> 2064
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA (1G4) VHCH1-重链-(28H1) VHCL
<400> 220

caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagagaatac 300
ggttctatgg actactgggg ccaagggacc accgtgaccg tctcctcagc tagcaccaag 360
ggcccatccg tgttccctct ggcccttcc agcaagtcta cctctggcgg cacagccgct 420
ctgggctgcc tcgtgaagga ctacttcccc gagcctgtga cagtgtcctg gaactctggc 480
gccctgacat ccggcgtgca cacctttcca gctgtgctgc agtcctccgg cctgtactcc 540
ctgtcctccg tcgtgacagt gccctccagc tctctgggca cccagaccta catctgcaac 600

gtgaaccaca agccctccaa caccaaggtg gacaagaagg tggaacccaa gtcctgcgac 660
aagacccaca cctgtccccc ttgtcctgcc cctgaagctg ctggcggccc tagcgtgttc 720
ctgttccccc caaagcccaa ggacaccctg atgatctccc ggacccccga agtgacctgc 780
gtggtggtgg atgtgtccca cgaggaccct gaagtgaagt tcaattggta cgtggacggc 840
gtggaagtgc acaatgccaa gaccaagcct agagaggaac agtacaactc cacctaccgg 900
gtggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag gattggctga acggcaaaga gtacaagtgc 960
aaggtgtcca acaaggccct gggagccccc atcgaaaaga ccatctccaa ggccaagggc 1020
cagcctcgcg agcctcaggt gtacaccctg ccccctagca gagatgagct gaccaagaac 1080
caggtgtccc tgacctgtct cgtgaaaggc ttctacccct ccgatatcgc cgtggaatgg 1140
gagagcaacg gccagcccga gaacaactac aagaccaccc cccctgtgct ggactccgac 1200
ggctcattct tcctgtactc taagctgaca gtggacaagt cccggtggca gcagggcaac 1260
gtgttctcct gctccgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacaccca gaagtccctg 1320
tccctgtctc ccgggggagg cggaggatct ggcggaggcg gatccggtgg tggcggatct 1380
gggggcggtg gatctgaggt gcagctgctg gaatctgggg gaggactggt gcagccaggc 1440
ggatctctga ggctgtcctg cgctgcttcc ggctttacct tctccagcca cgccatgagt 1500
tgggtgcgcc aggcacccgg aaaaggactg gaatgggtgt cagccatctg ggcctccggc 1560
gagcagtact acgccgatag cgtgaagggc cggttcacca tctctcggga taacagcaag 1620
aatactctgt acctgcagat gaactccctg cgcgctgaag ataccgctgt gtattactgc 1680
gccaagggct ggctgggcaa cttcgattac tggggccagg gaaccctcgt gactgtctcg 1740
agcgcttctg tggccgctcc ctccgtgttc atcttcccac cttccgacga gcagctgaag 1800
tccggcactg cctctgtcgt gtgcctgctg aacaacttct accctcggga agccaaggtg 1860
cagtggaaag tggataacgc cctgcagtcc ggcaactccc aggaatccgt gaccgagcag 1920
gactccaagg acagcaccta ctccctgagc agcaccctga ccctgtccaa ggccgactac 1980
gagaagcaca aggtgtacgc ctgtgaagtg acccaccagg gcctgtccag ccccgtgacc 2040
aagtccttca accggggcga gtgc 2064

<210> 221
<211> 688
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (1G4) VHCH1-重链-(28H1) VHCL
<400> 221

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

50 55 60

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

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly
435 440 445
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
450 455 460
Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
465 470 475 480
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser
485 490 495
His Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
500 505 510
Val Ser Ala Ile Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
515 520 525
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
530 535 540
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
545 550 555 560
Ala Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
565 570 575
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
580 585 590
Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
595 600 605
Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
610 615 620
Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
625 630 635 640
Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
645 650 655
Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
660 665 670
Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

675 680 685

<210> 222

<211> 2082

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> DNA (20B7) VHCH1-重链-(28H1) VHCL

<400> 222

caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagagttaac 300
tacccgtact cttactgggg tgacttcgac tactggggcc aagggaccac cgtgaccgtc 360
tcctcagcta gcaccaaggg cccatccgtg ttccctctgg ccccttccag caagtctacc 420
tctggcggca cagccgctct gggctgcctc gtgaaggact acttccccga gcctgtgaca 480
gtgtcctgga actctggcgc cctgacatcc ggcgtgcaca cctttccagc tgtgctgcag 540
tcctccggcc tgtactccct gtcctccgtc gtgacagtgc cctccagctc tctgggcacc 600
cagacctaca tctgcaacgt gaaccacaag ccctccaaca ccaaggtgga caagaaggtg 660
gaacccaagt cctgcgacaa gacccacacc tgtccccctt gtcctgcccc tgaagctgct 720
ggcggcccta gcgtgttcct gttcccccca aagcccaagg acaccctgat gatctcccgg 780
acccccgaag tgacctgcgt ggtggtggat gtgtcccacg aggaccctga agtgaagttc 840
aattggtacg tggacggcgt ggaagtgcac aatgccaaga ccaagcctag agaggaacag 900
tacaactcca cctaccgggt ggtgtccgtg ctgaccgtgc tgcaccagga ttggctgaac 960
ggcaaagagt acaagtgcaa ggtgtccaac aaggccctgg gagcccccat cgaaaagacc 1020
atctccaagg ccaagggcca gcctcgcgag cctcaggtgt acaccctgcc ccctagcaga 1080
gatgagctga ccaagaacca ggtgtccctg acctgtctcg tgaaaggctt ctacccctcc 1140
gatatcgccg tggaatggga gagcaacggc cagcccgaga acaactacaa gaccaccccc 1200
cctgtgctgg actccgacgg ctcattcttc ctgtactcta agctgacagt ggacaagtcc 1260
cggtggcagc agggcaacgt gttctcctgc tccgtgatgc acgaggccct gcacaaccac 1320
tacacccaga agtccctgtc cctgtctccc gggggaggcg gaggatctgg cggaggcgga 1380
tccggtggtg gcggatctgg gggcggtgga tctgaggtgc agctgctgga atctgggggа 1440
ggactggtgc agccaggcgg atctctgagg ctgtcctgcg ctgcttccgg ctttaccttc 1500
tccagccacg ccatgagttg ggtgcgccag gcacccggaa aaggactgga atgggtgtca 1560
gccatctggg cctccggcga gcagtactac gccgatagcg tgaagggccg gttcaccatc 1620
tctcgggata acagcaagaa tactctgtac ctgcagatga actccctgcg cgctgaagat 1680
accgctgtgt attactgcgc caagggctgg ctgggcaact tcgattactg gggccaggga 1740
accctcgtga ctgtctcgag cgcttctgtg gccgctccct ccgtgttcat cttcccacct 1800
tccgacgagc agctgaagtc cggcactgcc tctgtcgtgt gcctgctgaa caacttctac 1860

cctcgggaag ccaaggtgca gtggaaagtg gataacgccc tgcagtccgg caactcccag 1920
gaatccgtga ccgagcagga ctccaaggac agcacctact ccctgagcag caccctgacc 1980
ctgtccaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gtgaagtgac ccaccagggc 2040
ctgtccagcc ccgtgaccaa gtccttcaac cggggcgagt gc 2082

<210> 223
<211> 694
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (20B7) VHCH1-重链-(28H1) VHCL
<400> 223

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

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
225 230 235 240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro
325 330 335
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445
Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
450 455 460
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly
465 470 475 480
Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
485 490 495
Gly Phe Thr Phe Ser Ser His Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro
500 505 510
Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Trp Ala Ser Gly Glu Gln
515 520 525
Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn

530 535 540
Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
545 550 555 560
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr
565 570 575
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala
580 585 590
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
595 600 605
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
610 615 620
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
625 630 635 640
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
645 650 655
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
660 665 670
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
675 680 685
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
690

<210> 224
<211> 2064
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA (CLC-563) VHCH1-重链-(28H1) VHCL
<400> 224
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggGTC cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gcttgacgtt 300
ggtgctttcg actactgggg ccaaggagcc ctggtcaccg tctcgagtgc tagcaccaag 360
ggcccatccg tgttccctct ggcccCttcc agcaagtcta cctctggcgg cacagccgct 420
ctgggctgcc tcgtgaagga ctacttcccc gagcctgtga cagtgtcctg gaactctggc 480
gccctgacat ccggcgtgca cacctttcca gctgtgctgc agtcctccgg cctgtactcc 540
ctgtcctccg tcgtgacagt gccctccagc tctctgggca cccagaccta catctgcaac 600
gtgaaccaca agccctccaa caccaaggtg gacaagaagg tggaacccaa gtcctgcgac 660

aagacccaca cctgtccccc ttgtcctgcc cctgaagctg ctggcggccc tagcgtgttc 720
ctgttccccc caaagcccaa ggacaccctg atgatctccc ggacccccga agtgacctgc 780
gtggtggtgg atgtgtccca cgaggaccct gaagtgaagt tcaattggta cgtggacggc 840
gtggaagtgc acaatgccaa gaccaagcct agagaggaac agtacaactc cacctaccgg 900
gtggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag gattggctga acggcaaaga gtacaagtgc 960
aaggtgtcca acaaggccct gggagccccc atcgaaaaga ccatctccaa ggccaagggc 1020
cagcctcgcg agcctcaggt gtacaccctg ccccctagca gagatgagct gaccaagaac 1080
caggtgtccc tgacctgtct cgtgaaaggc ttctaccct ccgatatcgc cgtggaatgg 1140
gagagcaacg gccagcccga gaacaactac aagaccaccc cccctgtgct ggactccgac 1200
ggctcattct tcctgtactc taagctgaca gtggacaagt cccggtggca gcagggcaac 1260
gtgttctcct gctccgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacaccca gaagtccctg 1320
tccctgtctc ccgggggagg cggaggatct ggcggaggcg gatccggtgg tggcggatct 1380
gggggcggtg gatctgaggt gcagctgctg gaatctgggg gaggactggt gcagccaggc 1440
ggatctctga ggctgtcctg cgctgcttcc ggctttacct tctccagcca cgccatgagt 1500
tgggtgcgcc aggcacccgg aaaaggactg gaatgggtgt cagccatctg ggcctccggc 1560
gagcagtact acgccgatag cgtgaagggc cggttcacca tctctcggga taacagcaag 1620
aatactctgt acctgcagat gaactccctg cgcgctgaag ataccgctgt gtattactgc 1680
gccaagggct ggctgggcaa cttcgattac tggggccagg gaaccctcgt gactgtctcg 1740
agcgcttctg tggccgctcc ctccgtgttc atcttcccac cttccgacga gcagctgaag 1800
tccggcactg cctctgtcgt gtgcctgctg aacaacttct accctcggga agccaaggtg 1860
cagtggaaag tggataacgc cctgcagtcc ggcaactccc aggaatccgt gaccgagcag 1920
gactccaagg acagcaccta ctccctgagc agcaccctga ccctgtccaa ggccgactac 1980
gagaagcaca aggtgtacgc ctgtgaagtg acccaccagg gcctgtccag ccccgtgacc 2040
aagtccttca accggggcga gtgc 2064

<210> 225
<211> 688
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (CLC-563) VHCH1-重链-(28H1) VHCL
<400> 225

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

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

370 375 380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly
435 440 445
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
450 455 460
Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
465 470 475 480
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser
485 490 495
His Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
500 505 510
Val Ser Ala Ile Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
515 520 525
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
530 535 540
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
545 550 555 560
Ala Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
565 570 575
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
580 585 590
Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
595 600 605
Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
610 615 620
Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
625 630 635 640
Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
645 650 655
Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
660 665 670
Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
675 680 685

<210> 226
<211> 2064
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA (CLC-564) VHCH1-重链-(28H1) VHCL
<400> 226

gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gttcgacgtt 300
ggtccgttcg actactgggg ccaaggaacc ctggtcaccg tctcgagtgc tagcaccaag 360
ggcccatccg tgttccctct ggccccttcc agcaagtcta cctctggcgg cacagccgct 420
ctgggctgcc tcgtgaagga ctacttcccc gagcctgtga cagtgtcctg gaactctggc 480
gccctgacat ccggcgtgca cacctttcca gctgtgctgc agtcctccgg cctgtactcc 540
ctgtcctccg tcgtgacagt gccctccagc tctctgggca cccagaccta catctgcaac 600
gtgaaccaca agccctccaa caccaaggtg gacaagaagg tggaacccaa gtcctgcgac 660
aagacccaca cctgtccccc ttgtcctgcc cctgaagctg ctggcggccc tagcgtgttc 720
ctgttccccc caaagcccaa ggacaccctg atgatctccc ggacccccga agtgacctgc 780
gtggtggtgg atgtgtccca cgaggaccct gaagtgaagt tcaattggta cgtggacggc 840
gtggaagtgc acaatgccaa gaccaagcct agagaggaac agtacaactc cacctaccgg 900
gtggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag gattggctga acggcaaaga gtacaagtgc 960
aaggtgtcca acaaggccct gggagccccc atcgaaaaga ccatctccaa ggccaagggc 1020
cagcctcgcg agcctcaggt gtacaccctg ccccctagca gagatgagct gaccaagaac 1080
caggtgtccc tgacctgtct cgtgaaaggc ttctaccct ccgatatcgc cgtggaatgg 1140
gagagcaacg gccagcccga gaacaactac aagaccaccc cccctgtgct ggactccgac 1200
ggctcattct tcctgtactc taagctgaca gtggacaagt cccggtggca gcagggcaac 1260
gtgttctcct gctccgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacaccca gaagtccctg 1320
tccctgtctc ccgggggagg cggaggatct ggcggaggcg gatccggtgg tggcggatct 1380
gggggcggtg gatctgaggt gcagctgctg gaatctgggg gaggactggt gcagccaggc 1440
ggatctctga ggctgtcctg cgctgcttcc ggctttacct tctccagcca cgccatgagt 1500
tgggtgcgcc aggcacccgg aaaaggactg gaatgggtgt cagccatctg ggcctccggc 1560
gagcagtact acgccgatag cgtgaagggc cggttcacca tctctcggga taacagcaag 1620
aatactctgt acctgcagat gaactccctg cgcgctgaag ataccgctgt gtattactgc 1680
gccaagggct ggctgggcaa cttcgattac tggggccagg gaaccctcgt gactgtctcg 1740
agcgcttctg tggccgctcc ctccgtgttc atcttcccac cttccgacga gcagctgaag 1800
tccggcactg cctctgtcgt gtgcctgctg aacaacttct accctcggga agccaaggtg 1860
cagtggaaag tggataacgc cctgcagtcc ggcaactccc aggaatccgt gaccgagcag 1920

gactccaagg acagcaccta ctccctgagc agcaccctga ccctgtccaa ggccgactac 1980
gagaagcaca aggtgtacgc ctgtgaagtg acccaccagg gcctgtccag ccccgtgacc 2040
aagtccttca accggggcga gtgc 2064

<210> 227
<211> 688
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (CLC-564) VHCH1-重链-(28H1) VHCL
<400> 227

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

225 230 235 240
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly
435 440 445
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
450 455 460
Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
465 470 475 480
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser
485 490 495
His Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
500 505 510
Val Ser Ala Ile Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
515 520 525
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
530 535 540

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
545 550 555 560
Ala Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
565 570 575
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
580 585 590
Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
595 600 605
Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
610 615 620
Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
625 630 635 640
Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
645 650 655
Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
660 665 670
Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
675 680 685

<210> 228
<211> 1350
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA (28H1) VHCL-重链穴
<400> 228

gaagtgcagc tgctggaatc cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60
tcctgcgccg cctccggctt caccttctcc tcccacgcca tgtcctgggt ccgacaggct 120
cctggcaaag gcctggaatg ggtgtccgcc atctgggcct ccggcgagca gtactacgcc 180
gactctgtga agggccggtt caccatctcc cgggacaact ccaagaacac cctgtacctg 240
cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgtgccaa gggctggctg 300
ggcaacttcg actactgggg acagggcacc ctggtcaccg tgtccagcgc tagcgtggcc 360
gctcccagcg tgttcatctt cccacccagc gacgagcagc tgaagtccgg cacagccagc 420
gtggtgtgcc tgctgaacaa cttctacccc cgcgaggcca aggtgcagtg gaaggtggac 480
aacgccctgc agagcggcaa cagccaggaa tccgtgaccg agcaggacag caaggactcc 540
acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg agcaaggccg actacgagaa gcacaaggtg 600
tacgcctgcg aagtgaccca ccagggcctg tccagccccg tgaccaagag cttcaaccgg 660
ggcgagtgcg acaagaccca cacctgtccc ccttgccctg cccctgaagc tgctggtggc 720
ccttccgtgt tcctgttccc cccaaagccc aaggacaccc tgatgatcag ccggaccccc 780
gaagtgacct gcgtggtggt cgatgtgtcc cacgaggacc ctgaagtgaa gttcaattgg 840

tacgtggacg gcgtggaagt gcacaatgcc aagaccaagc cgcgggagga gcagtacaac 900
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtgcaccc tgcccccatc ccgggatgag 1080
ctgaccaaga accaggtcag cctctcgtgc gcagtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200
ctggactccg acggctcctt cttcctcgtg agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1350

<210> 229
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (28H1) VHCL-重链穴
<400> 229

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

180 185 190
Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
195 200 205
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly Lys
450

<210> 230
<211> 1343
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> DNA (49B4) VHCH1-重链节
<400> 230
aggtgcaatt ggtgcagtct ggggctgagg tgaagaagcc tgggtcctcg gtgaaggtct 60
cctgcaaggc ctccggaggc acattcagca gctacgctat aagctgggtg cgacaggccc 120
ctggacaagg gctcgagtgg atgggaggga tcatccctat ctttggtaca gcaaactacg 180
cacagaagtt ccagggcagg gtcaccatta ctgcagacaa atccacgagc acagcctaca 240
tggagctgag cagcctgaga tctgaggaca ccgccgtgta ttactgtgcg agagaatact 300
accgtggtcc gtacgactac tggggccaag ggaccaccgt gaccgtctcc tcagctagca 360
ccaagggccc tagcgtgttc cctctggccc ctagcagcaa gagcacaagt ggaggaacag 420
ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg tcctggaatt 480
ctggcgccct gacaagcggc gtgcacacat ttccagccgt gctgcagagc agcggcctgt 540
actctctgag cagcgtcgtg accgtgccct ctagctctct gggcacccag acctacatct 600
gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aagtggacaa gaaggtggaa cccaagagct 660
gcgacaagac ccacacctgt ccccccttgcc ctgcccctga agctgctggt ggcccttccg 720
tgttcctgtt cccccccaaag cccaaggaca ccctgatgat cagccggacc cccgaagtga 780
cctgcgtggt ggtcgatgtg tcccacgagg accctgaagt gaagttcaat tggtacgtgg 840
acggcgtgga agtgcacaat gccaagacca agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt 900
accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca 960
agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca 1020
aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atgccgggat gagctgacca 1080
agaaccaggt cagcctgtgg tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg 1140
agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc gtgctggact 1200
ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg 1260
ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga 1320
gcctctccct gtctccgggt aaa 1343
<210> 231
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (49B4) VHCH1-重链节
<400> 231
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Tyr Tyr Arg Gly Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350
Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys

355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

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

<210> 232

<211> 1338

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> DNA (1G4) VHCH1-重链节

<400> 232

caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagagaatac 300
ggttctatgg actactgggg ccaagggacc accgtgaccg tctcctcagc tagcaccaag 360
ggccctagcg tgttccctct ggcccctagc agcaagagca caagtggagg aacagccgcc 420
ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc gagcccgtga ccgtgtcctg gaattctggc 480
gccctgacaa gcggcgtgca cacatttcca gccgtgctgc agagcagcgg cctgtactct 540
ctgagcagcg tcgtgaccgt gccctctagc tctctgggca cccagaccta catctgcaac 600
gtgaaccaca agcccagcaa caccaaagtg gacaagaagg tggaacccaa gagctgcgac 660
aagacccaca cctgtccccc ttgccctgcc cctgaagctg ctggtggccc ttccgtgttc 720
ctgttccccc caaagcccaa ggacaccctg atgatcagcc ggacccccga agtgacctgc 780
gtggtggtcg atgtgtccca cgaggaccct gaagtgaagt tcaattggta cgtggacggc 840
gtggaagtgc acaatgccaa gaccaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 900
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 960
aaggtctcca acaaagccct cggcgccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1020
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatgcc gggatgagct gaccaagaac 1080
caggtcagcc tgtggtgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1140
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1200
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1260

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1320
tccctgtctc cgggtaaa 1338

<210> 233
<211> 446
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (1G4) VHCH1-重链节
<400> 233

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

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

<210> 234
<211> 1356
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA (20B7) VHCH1-重链节
<400> 234

caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagagttaac 300
tacccgtact cttactgggg tgacttcgac tactggggcc aagggaccac cgtgaccgtc 360

tcctcagcta gcaccaaggg ccctagcgtg ttccctctgg cccctagcag caagagcaca 420
agtggaggaa cagccgccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga gcccgtgacc 480
gtgtcctgga attctggcgc cctgacaagc ggcgtgcaca catttccagc cgtgctgcag 540
agcagcggcc tgtactctct gagcagcgtc gtgaccgtgc cctctagctc tctgggcacc 600
cagacctaca tctgcaacgt gaaccacaag cccagcaaca ccaaagtgga caagaaggtg 660
gaacccaaga gctgcgacaa gacccacacc tgtccccctt gccctgcccc tgaagctgct 720
ggtggccctt ccgtgttcct gttcccccca aagcccaagg acaccctgat gatcagccgg 780
acccccgaag tgacctgcgt ggtggtcgat gtgtcccacg aggaccctga agtgaagttc 840
aattggtacg tggacggcgt ggaagtgcac aatgccaaga ccaagccgcg ggaggagcag 900
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 960
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcg gcgcccccat cgagaaaacc 1020
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatgccgg 1080
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg tggtgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1140
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1200
cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 1260
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1320
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa 1356

<210> 235
<211> 452
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (20B7) VHCH1-重链节
<400> 235

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

115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 236
<211> 1338
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA (CLC-563) VHCH1-重链节
<400> 236

gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gcttgacgtt 300
ggtgctttcg actactgggg ccaaggagcc ctggtcaccg tctcgagtgc tagcaccaag 360
ggccctagcg tgttccctct ggcccctagc agcaagagca caagtggagg aacagccgcc 420
ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc gagcccgtga ccgtgtcctg gaattctggc 480
gccctgacaa gcggcgtgca cacatttcca gccgtgctgc agagcagcgg cctgtactct 540
ctgagcagcg tcgtgaccgt gccctctagc tctctgggca cccagaccta catctgcaac 600
gtgaaccaca agcccagcaa caccaaagtg gacaagaagg tggaacccaa gagctgcgac 660
aagacccaca cctgtccccc ttgccctgcc cctgaagctg ctggtggccc ttccgtgttc 720
ctgttccccc caaagcccaa ggacaccctg atgatcagcc ggaccccga agtgacctgc 780
gtggtggtcg atgtgtccca cgaggaccct gaagtgaagt tcaattggta cgtggacggc 840
gtggaagtgc acaatgccaa gaccaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 900
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 960
aaggtctcca acaaagccct cggcgccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1020
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatgcc gggatgagct gaccaagaac 1080
caggtcagcc tgtggtgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1140
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1200
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1260
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1320
tccctgtctc cgggtaaa 1338

<210> 237
<211> 446
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> (CLC-563) VHCH1-重链节

<400> 237

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

290 295 300

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

<210> 238
<211> 1338
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA (CLC-564) VHCH1-重链节
<400> 238

gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gttcgacgtt 300
ggtccgttcg actactgggg ccaaggaacc ctggtcaccg tctcgagtgc tagcaccaag 360
ggccctagcg tgttccctct ggcccctagc agcaagagca caagtggagg aacagccgcc 420
ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc gagcccgtga ccgtgtcctg gaattctggc 480
gccctgacaa gcggcgtgca cacatttcca gccgtgctgc agagcagcgg cctgtactct 540
ctgagcagcg tcgtgaccgt gccctctagc tctctgggca cccagaccta catctgcaac 600
gtgaaccaca agcccagcaa caccaaagtg gacaagaagg tggaacccaa gagctgcgac 660
aagacccaca cctgtccccc ttgccctgcc cctgaagctg ctggtggccc ttccgtgttc 720
ctgttccccc caaagcccaa ggacaccctg atgatcagcc ggacccccga agtgacctgc 780

gtggtggtcg atgtgtccca cgaggaccct gaagtgaagt tcaattggta cgtggacggc 840
gtggaagtgc acaatgccaa gaccaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 900
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 960
aaggtctcca acaaagccct cggcgccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1020
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatgcc gggatgagct gaccaagaac 1080
caggtcagcc tgtggtgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1140
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1200
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1260
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1320
tccctgtctc cgggtaaa 1338

<210> 239
<211> 446
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (CLC-564) VHCH1-重链节
<400> 239

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

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

<210> 240
<211> 163
<212> PRT
<213> 食蟹猴(cynomolgus)
<400> 240

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

<210> 241
<211> 164
<212> PRT
<213> 小鼠(Mus musculus)
<400> 241

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

100 105 110
Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Arg Ser Val Leu Lys Thr Gly Thr
115 120 125
Thr Glu Lys Asp Val Val Cys Gly Pro Pro Val Val Ser Phe Ser Pro
130 135 140
Ser Thr Thr Ile Ser Val Thr Pro Glu Gly Gly Pro Gly Gly His Ser
145 150 155 160
Leu Gln Val Leu

<210> 242
<211> 1266
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA 人4-1BB抗原Fc节链
<400> 242
ctgcaggacc cctgcagcaa ctgccctgcc ggcaccttct gcgacaacaa ccggaaccag 60
atctgcagcc cctgcccccc caacagcttc agctctgccg gcggacagcg gacctgcgac 120
atctgcagac agtgcaaggg cgtgttcaga acccggaaag agtgcagcag caccagcaac 180
gccgagtgcg actgcacccc cggcttccat tgtctgggag ccggctgcag catgtgcgag 240
caggactgca agcagggcca ggaactgacc aagaagggct gcaaggactg ctgcttcggc 300
accttcaacg accagaagcg gggcatctgc cggccctgga ccaactgtag cctggacggc 360
aagagcgtgc tggtcaacgg caccaaagaa cgggacgtcg tgtgcggccc cagccctgct 420
gatctgtctc ctggggccag cagcgtgacc cctcctgccc ctgccagaga gcctggccac 480
tctcctcagg tcgacgaaca gttatatttt cagggcggct cacccaaatc tgcagacaaa 540
actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc 600
ttcccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 660
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 720
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 780
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 840
gtctccaaca aagccctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 900
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatgccggg atgagctgac caagaaccag 960
gtcagcctgt ggtgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1020
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1080
tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1140
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1200
ctgtctccgg gtaaatccgg aggcctgaac gacatcttcg aggcccagaa gattgaatgg 1260
cacgag 1266
<210> 243
<211> 1266

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA 食蟹猴4-1BB抗原Fc节链
<400> 243
ttgcaggatc tgtgtagtaa ctgcccagct ggtacattct gtgataataa caggagtcag 60
atttgcagtc cctgtcctcc aaatagtttc tccagcgcag gtggacaaag gacctgtgac 120
atatgcaggc agtgtaaagg tgttttcaag accaggaagg agtgttcctc caccagcaat 180
gcagagtgtg actgcatttc agggtatcac tgcctggggg cagagtgcag catgtgtgaa 240
caggattgta aacaaggtca agaattgaca aaaaaaggtt gtaaagactg ttgctttggg 300
acatttaatg accagaaacg tggcatctgt cgcccctgga caaactgttc tttggatgga 360
aagtctgtgc ttgtgaatgg gacgaaggag agggacgtgg tctgcggacc atctccagcc 420
gacctctctc caggagcatc ctctgcgacc ccgcctgccc ctgcgagaga gccaggacac 480
tctccgcagg tcgacgaaca gttatatttt cagggcggct cacccaaatc tgcagacaaa 540
actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc 600
ttcccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 660
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 720
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 780
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 840
gtctccaaca aagccctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 900
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatgccggg atgagctgac caagaaccag 960
gtcagcctgt ggtgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1020
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1080
tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1140
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1200
ctgtctccgg gtaaatccgg aggcctgaac gacatcttcg aggcccagaa gattgaatgg 1260
cacgag 1266
<210> 244
<211> 1269
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA 鼠4-1BB抗原Fc节链
<400> 244
gtgcagaaca gctgcgacaa ctgccagccc ggcaccttct gccggaagta caaccccgtg 60
tgcaagagct gccccccccag caccttcagc agcatcggcg gccagcccaa ctgcaacatc 120
tgcagagtgt gcgccggcta cttccggttc aagaagttct gcagcagcac ccacaacgcc 180
gagtgcgagt gcatcgaggg cttccactgc ctgggccccc agtgcaccag atgcgagaag 240
gactgcagac ccggccagga actgaccaag cagggctgta agacctgcag cctgggcacc 300

ttcaacgacc agaacgggac cggcgtgtgc cggccttgga ccaattgcag cctggacggg 360
agaagcgtgc tgaaaaccgg caccaccgag aaggacgtcg tgtgcggccc tcccgtggtg 420
tccttcagcc ctagcaccac catcagcgtg acccctgaag gcggccctgg cggacactct 480
ctgcaggtcc tggtcgacga acagttatat tttcagggcg gctcacccaa atctgcagac 540
aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc 600
ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc 660
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 720
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 780
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 840
aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 900
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatgcc gggatgagct gaccaagaac 960
caggtcagcc tgtggtgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1020
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1080
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1140
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1200
tccctgtctc cgggtaaatc cggaggcctg aacgacatct tcgaggccca gaagattgaa 1260
tggcacgag 1269

<210> 245
<211> 422
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人4-1BB抗原Fc节链
<400> 245

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

115 120 125
Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
130 135 140
Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
145 150 155 160
Ser Pro Gln Val Asp Glu Gln Leu Tyr Phe Gln Gly Gly Ser Pro Lys
165 170 175
Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
180 185 190
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
195 200 205
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
210 215 220
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
225 230 235 240
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
245 250 255
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
260 265 270
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
275 280 285
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
290 295 300
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
305 310 315 320
Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
325 330 335
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
340 345 350
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
355 360 365
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
370 375 380
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
385 390 395 400
Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln
405 410 415
Lys Ile Glu Trp His Glu
420

<210> 246
<211> 422
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 食蟹猴4-1BB抗原Fc节链
<400> 246

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

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
260 265 270
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
275 280 285
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
290 295 300
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
305 310 315 320
Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
325 330 335
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
340 345 350
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
355 360 365
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
370 375 380
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
385 390 395 400
Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln
405 410 415
Lys Ile Glu Trp His Glu
420

<210> 247
<211> 423
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 鼠4-1BB抗原Fc节链
<400> 247

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

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

385 390 395 400
Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala
405 410 415
Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
420

<210> 248
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物 MS63
<400> 248
tttcgcacag taatatacgg ccgtgtcc 28

<210> 249
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA 4-1BB(12B3) VL
<400> 249
gacatccaga tgacccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gtgccagtca gagtattagt agctggttgg cctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagcg gcagtggatc cgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cttgcagcct 240
gatgattttg caacttatta ctgccaacag tatcattcgt atccgcagac gtttggccag 300
ggcaccaaag tcgagatcaa g 321

<210> 250
<211> 360
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA 4-1BB(12B3) VH
<400> 250
caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagatctgaa 300
ttccgtttct acgctgactt cgactactgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

<210> 251
<211> 318
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA 4-1BB(25G7) VL
<400> 251
tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60
acatgccaag gagacagcct cagaagttat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120
caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180
ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240
gatgaggctg actattactg taactccctt gataggcgcg gtatgtgggt attcggcgga 300
gggaccaagc tgaccgtc 318
<210> 252
<211> 354
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA 4-1BB(25G7) VH
<400> 252
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggGtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gcgtgacgac 300
ccgtggccgc cgttcgacta ctggggccaa ggaaccctgg tcaccgtctc gagt 354
<210> 253
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA 4-1BB(11D5) VL
<400> 253
gacatccaga tgacccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gtgccagtca gagtattagt agctggttgg cctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagcg gcagtggatc cgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cttgcagcct 240
gatgattttg caacttatta ctgccaacag cttaattcgt atcctcagac gtttggccag 300
ggcaccaaag tcgagatcaa g 321

<210> 254
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA 4-1BB(11D5) VH
<400> 254
caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagatctact 300
ctgatctacg gttacttcga ctactggggc caagggacca ccgtgaccgt ctcctca 357
<210> 255
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA 4-1BB(9B11) VL
<400> 255
gacatccaga tgacccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gtgccagtca gagtattagt agctggttgg cctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagcg gcagtggatc cgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cttgcagcct 240
gatgattttg caacttatta ctgccaacag gttaattctt atccgcagac gtttggccag 300
ggcaccaaag tcgagatcaa g 321
<210> 256
<211> 360
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA 4-1BB(9B11) VH
<400> 256
caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagatcttct 300
ggtgcttacc cgggttactt cgactactgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

<210> 257
<211> 318
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA 4-1BB(20G2) VL
<400> 257
gacatccaga tgacccagtc tccatccacc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gtgccagtca gagtattagt agctggttgg cctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagcg gcagtggatc cgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cttgcagcct 240
gatgattttg caacttatta ctgccaacag cagcactcgt attatacgtt tggccagggc 300
accaaagtcg agatcaag 318
<210> 258
<211> 360
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA 4-1BB(20G2) VH
<400> 258
caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagatcttac 300
tactgggaat cttacccgtt cgactactgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctccagc 360
<210> 259
<211> 642
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA 12B3 P329GLALA IgG1轻链
<400> 259
gacatccaga tgacccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gtgccagtca gagtattagt agctggttgg cctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagcg gcagtggatc cgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cttgcagcct 240
gatgattttg caacttatta ctgccaacag tatcattcgt atccgcagac gtttggccag 300
ggcaccaaag tcgagatcaa gcgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca 360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

<210> 260
<211> 1350
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA 12B3 P329GLALA IgG1重链
<400> 260

caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagatctgaa 300
ttccgtttct acgctgactt cgactactgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360
gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 420
ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 480
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 540
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 600
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 660
aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaagc tgcaggggga 720
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 780
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag 1080
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1350

<210> 261
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 12B3 P329GLALA IgG1轻链
<400> 261

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

<210> 262
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 12B3 P329GLALA IgG1重链
<400> 262

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
```

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

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly Lys
450

<210> 263
<211> 639
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA 25G7 P329GLALA IgG1轻链
<400> 263
tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60
acatgccaag gagacagcct cagaagttat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120
caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180
ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240
gatgaggctg actattactg taactccctt gataggcgcg gtatgtgggt attcggcgga 300
gggaccaagc tgaccgtcct aggtcaaccc aaggctgccc ccagcgtgac cctgttcccc 360
cccagcagcg aggaactgca ggccaacaag gccaccctgg tctgcctgat cagcgacttc 420
tacccaggcg ccgtgaccgt ggcctggaag gccgacagca gccccgtgaa ggccggcgtg 480
gagaccacca cccccagcaa gcagagcaac aacaagtacg ccgccagcag ctacctgagc 540
ctgacccccg agcagtggaa gagccacagg tcctacagct gccaggtgac ccacgagggc 600
agcaccgtgg agaaaaccgt ggcccccacc gagtgcagc 639
<210> 264
<211> 1344
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> DNA 25G7 P329GLALA IgG1重链
<400> 264
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggGTC cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gcgtgacgac 300
ccgtggccgc cgttcgacta ctggggccaa ggaaccctgg tcaccgtctc gagtgctagc 360
accaagggcc catcggtctt cccCctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 420
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 540
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 600
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagttga gcccaaatct 660
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aagctgcagg gggaccgtca 720
gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 780
acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 840
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 900
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 960
aagtgcaagg tctccaacaa agccctcggc gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1020
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc 1080
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1140
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1200
tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1260
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1320
agcctctccc tgtctccggg taaa 1344
<210> 265
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 25G7 P329GLALA IgG1轻链
<400> 265
Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15
Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
20 25 30
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr

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

<210> 266
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 25G7 P329GLALA IgG1重链
<400> 266
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

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

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 267
<211> 642
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA 11D5 P329GLALA IgG1轻链
<400> 267
gacatccaga tgacccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gtgccagtca gagtattagt agctggttgg cctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagcg gcagtggatc cgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cttgcagcct 240
gatgattttg caacttatta ctgccaacag cttaattcgt atcctcagac gtttggccag 300
ggcaccaaag tcgagatcaa gcgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

<210> 268
<211> 1347
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA 11D5 P329GLALA IgG1重链
<400> 268
caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagatctact 300
ctgatctacg gttacttcga ctactggggc caagggacca ccgtgaccgt ctcctcagct 360

agcaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 420
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga 540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 600
atctgcaacg tgaatcacaa gcccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 660
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaagctgc agggggaccg 720
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 780
gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ggcgccccca tcgagaaaac catctccaaa 1020
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 1347

<210> 269
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 11D5 P329GLALA IgG1轻链
<400> 269

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

115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 270
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 11D5 P329GLALA IgG1重链
<400> 270
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Thr Leu Ile Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
225 230 235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445
Lys

<210> 271

<211> 642
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA 9B11 P329GLALA IgG1轻链
<400> 271
gacatccaga tgacccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gtgccagtca gagtattagt agctggttgg cctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagcg gcagtggatc cgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cttgcagcct 240
gatgattttg caacttatta ctgccaacag gttaattctt atccgcagac gtttggccag 300
ggcaccaaag tcgagatcaa gcgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642
<210> 272
<211> 1350
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA 9B11 P329GLALA IgG1重链
<400> 272
caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagatcttct 300
ggtgcttacc cgggttactt cgactactgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360
gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 420
ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 480
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 540
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 600
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 660
aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaagc tgcaggggga 720
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 780
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag 1080
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1350

<210> 273
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 9B11 P329GLALA IgG1轻链
<400> 273

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

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 274
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 9B11 P329GLALA IgG1重链
<400> 274

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

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly Lys
450

<210> 275
<211> 639
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA 20G2 P329GLALA IgG1轻链
<400> 275
gacatccaga tgacccagtc tccatccacc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gtgccagtca gagtattagt agctggttgg cctggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagcg gcagtggatc cgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cttgcagcct 240
gatgattttg caacttatta ctgccaacag cagcactcgt attatacgtt tggccagggc 300
accaaagtcg agatcaagcg tacggtggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct 360
gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 420
agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 480
agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 540
agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg 600
agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgt 639

<210> 276
<211> 1350
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA 20G2 P329GLALA IgG1重链
<400> 276

caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagatcttac 300
tactgggaat cttacccgtt cgactactgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctccagc 360
gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 420
ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 480
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 540
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 600
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 660
aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaagc tgcaggggga 720
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 780
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag 1080
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1350

<210> 277
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 20G2 P329GLALA IgG1轻链
<400> 277

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

<210> 278
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 20G2 P329GLALA IgG1重链

<400> 278

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

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly Lys
450

<210> 279
<211> 421
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> mu4-1BB D1 / hu4-1BB D2 Fc节
<400> 279
Val Gln Asn Ser Cys Asp Asn Cys Gln Pro Gly Thr Phe Cys Arg Lys
1 5 10 15
Tyr Asn Pro Val Cys Lys Ser Cys Pro Pro Ser Thr Phe Ser Ser Ile
20 25 30
Gly Gly Gln Pro Asn Cys Asn Ile Cys Arg Val Cys Ala Gly Tyr Phe
35 40 45
Arg Phe Lys Lys Phe Cys Ser Ser Thr His Asn Ala Glu Cys Glu Cys
50 55 60
Ile Glu Gly Phe His Cys Leu Gly Pro Gln Cys Thr Arg Cys Glu Lys
65 70 75 80

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

385 390 395 400
Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys
405 410 415
Ile Glu Trp His Glu
420

<210> 280
<211> 424
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hu4-1BB D1 / mu4-1BB D2 Fc节
<400> 280
Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
1 5 10 15
Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
20 25 30
Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
35 40 45
Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
50 55 60
Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
65 70 75 80
Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Thr
85 90 95
Cys Ser Leu Gly Thr Phe Asn Asp Gln Asn Gly Thr Gly Val Cys Arg
100 105 110
Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Arg Ser Val Leu Lys Thr Gly
115 120 125
Thr Thr Glu Lys Asp Val Val Cys Gly Pro Pro Val Val Ser Phe Ser
130 135 140
Pro Ser Thr Thr Ile Ser Val Thr Pro Glu Gly Gly Pro Gly Gly His
145 150 155 160
Ser Leu Gln Val Leu Val Asp Glu Gln Leu Tyr Phe Gln Gly Gly Ser
165 170 175
Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
180 185 190
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
195 200 205
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

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

<210> 281
<211> 354
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> hu 4-1BB D1 Fc节
<400> 281
Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
1 5 10 15
Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
20 25 30
Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val

35 40 45

Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
50 55 60

Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
65 70 75 80

Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Val
85 90 95

Asp Glu Gln Leu Tyr Phe Gln Gly Gly Ser Pro Lys Ser Ala Asp Lys
100 105 110

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
130 135 140

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
145 150 155 160

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
165 170 175

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
180 185 190

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

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
210 215 220

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
225 230 235 240

Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp
245 250 255

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
260 265 270

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
275 280 285

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
290 295 300

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
305 310 315 320

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325 330 335

Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp
340 345 350

His Glu
<210> 282
<211> 94
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 鼠4-1BB域D1 (N端)
<400> 282
Val Gln Asn Ser Cys Asp Asn Cys Gln Pro Gly Thr Phe Cys Arg Lys
1 5 10 15
Tyr Asn Pro Val Cys Lys Ser Cys Pro Pro Ser Thr Phe Ser Ser Ile
20 25 30
Gly Gly Gln Pro Asn Cys Asn Ile Cys Arg Val Cys Ala Gly Tyr Phe
35 40 45
Arg Phe Lys Lys Phe Cys Ser Ser Thr His Asn Ala Glu Cys Glu Cys
50 55 60
Ile Glu Gly Phe His Cys Leu Gly Pro Gln Cys Thr Arg Cys Glu Lys
65 70 75 80
Asp Cys Arg Pro Gly Gln Glu Leu Thr Lys Gln Gly Cys Lys
85 90
<210> 283
<211> 68
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人4-1BB域D2 (C端)
<400> 283
Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg
1 5 10 15
Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly
20 25 30
Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser
35 40 45
Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly
50 55 60
His Ser Pro Gln
65
<210> 284
<211> 95

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人4-1BB域D1 (N端)
<400> 284

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

<210> 285
<211> 70
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 鼠4-1BB域D2 (C端)
<400> 285

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

<210> 286
<211> 2076
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> DNA (12B3) VHCH1-重链-(28H1) VHCL

<400> 286

caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagatctgaa 300
ttccgtttct acgctgactt cgactactgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360
gctagcacca agggcccatc cgtgttccct ctggcccctt ccagcaagtc tacctctggc 420
ggcacagccg ctctgggctg cctcgtgaag gactacttcc ccgagcctgt gacagtgtcc 480
tggaactctg gcgccctgac atccggcgtg cacacctttc cagctgtgct gcagtcctcc 540
ggcctgtact ccctgtcctc cgtcgtgaca gtgccctcca gctctctggg cacccagacc 600
tacatctgca acgtgaacca caagccctcc aacaccaagg tggacaagaa ggtggaaccc 660
aagtcctgcg acaagaccca cacctgtccc ccttgtcctg cccctgaagc tgctggcggc 720
cctagcgtgt tcctgttccc cccaaagccc aaggacaccc tgatgatctc ccggaccccc 780
gaagtgacct gcgtggtggt ggatgtgtcc cacgaggacc ctgaagtgaa gttcaattgg 840
tacgtggacg gcgtggaagt gcacaatgcc aagaccaagc ctagagagga acagtacaac 900
tccacctacc gggtggtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggattggct gaacggcaaa 960
gagtacaagt gcaaggtgtc caacaaggcc ctgggagccc ccatcgaaaa gaccatctcc 1020
aaggccaagg gccagcctcg cgagcctcag gtgtacaccc tgcccccctag cagagatgag 1080
ctgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctcgtgaaag gcttctaccc ctccgatatc 1140
gccgtggaat gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac ccccccctgtg 1200
ctggactccg acggctcatt cttcctgtac tctaagctga cagtggacaa gtcccggtgg 1260
cagcagggca acgtgttctc ctgctccgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 1320
cagaagtccc tgtccctgtc tcccgggggga ggcggaggat ctggcggagg cggatccggt 1380
ggtggcggat ctgggggcgg tggatctgag gtgcagctgc tggaatctgg gggaggactg 1440
gtgcagccag gcggatctct gaggctgtcc tgcgctgctt ccggctttac cttctccagc 1500
cacgccatga gttgggtgcg ccaggcaccc ggaaaaggac tggaatgggt gtcagccatc 1560
tgggcctccg gcgagcagta ctacgccgat agcgtgaagg gccggttcac catctctcgg 1620
gataacagca agaatactct gtacctgcag atgaactccc tgcgcgctga agataccgct 1680
gtgtattact gcgccaaggg ctggctgggc aacttcgatt actggggcca gggaaccctc 1740
gtgactgtct cgagcgcttc tgtggccgct ccctccgtgt tcatcttccc accttccgac 1800
gagcagctga agtccggcac tgcctctgtc gtgtgcctgc tgaacaactt ctaccctcgg 1860
gaagccaagg tgcagtggaa agtggataac gccctgcagt ccggcaactc ccaggaatcc 1920
gtgaccgagc aggactccaa ggacagcacc tactccctga gcagcaccct gaccctgtcc 1980
aaggccgact acgagaagca caaggtgtac gcctgtgaag tgacccacca gggcctgtcc 2040
agccccgtga ccaagtcctt caaccggggc gagtgc 2076

<210> 287

<211> 692

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (12B3) VHCH1-重链-(28H1) VHCL
<400> 287

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

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
450 455 460
Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu
465 470 475 480
Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
485 490 495
Thr Phe Ser Ser His Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
500 505 510
Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr
515 520 525
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
530 535 540
Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
545 550 555 560
Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly
565 570 575
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser

580 585 590
Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
595 600 605
Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
610 615 620
Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
625 630 635 640
Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
645 650 655
Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
660 665 670
Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
675 680 685
Arg Gly Glu Cys
690

<210> 288
<211> 2070
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA (25G7) VHCH1-重链-(28H1) VHCL
<400> 288

gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gcgtgacgac 300
ccgtggccgc cgttcgacta ctggggccaa ggaaccctgg tcaccgtctc gagtgctagc 360
accaagggcc catccgtgtt ccctctggcc ccttccagca agtctacctc tggcggcaca 420
gccgctctgg gctgcctcgt gaaggactac ttccccgagc ctgtgacagt gtcctggaac 480
tctggcgccc tgacatccgg cgtgcacacc tttccagctg tgctgcagtc ctccggcctg 540
tactccctgt cctccgtcgt gacagtgccc tccagctctc tgggcaccca gacctacatc 600
tgcaacgtga accacaagcc ctccaacacc aaggtggaca agaaggtgga acccaagtcc 660
tgcgacaaga cccacacctg tccccttgt cctgcccctg aagctgctgg cggccctagc 720
gtgttcctgt tccccccaaa gcccaaggac accctgatga tctcccggac ccccgaagtg 780
acctgcgtgg tggtggatgt gtcccacgag gaccctgaag tgaagttcaa ttggtacgtg 840
gacggcgtgg aagtgcacaa tgccaagacc aagcctagag aggaacagta caactccacc 900
taccgggtgg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggatt ggctgaacgg caaagagtac 960
aagtgcaagg tgtccaacaa ggccctggga gcccccatcg aaaagaccat ctccaaggcc 1020

aagggccagc ctcgcgagcc tcaggtgtac accctgcccc ctagcagaga tgagctgacc 1080
aagaaccagg tgtccctgac ctgtctcgtg aaaggcttct acccctccga tatcgccgtg 1140
gaatgggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccacccccc tgtgctggac 1200
tccgacggct cattcttcct gtactctaag ctgacagtgg acaagtcccg gtggcagcag 1260
ggcaacgtgt tctcctgctc cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta cacccagaag 1320
tccctgtccc tgtctcccgg gggaggcgga ggatctggcg gaggcggatc cggtggtggc 1380
ggatctgggg gcggtggatc tgaggtgcag ctgctggaat ctgggggagg actggtgcag 1440
ccaggcggat ctctgaggct gtcctgcgct gcttccggct ttaccttctc cagccacgcc 1500
atgagttggg tgcgccaggc acccggaaaa ggactggaat gggtgtcagc catctgggcc 1560
tccggcgagc agtactacgc cgatagcgtg aagggccggt tcaccatctc tcgggataac 1620
agcaagaata ctctgtacct gcagatgaac tccctgcgcg ctgaagatac cgctgtgtat 1680
tactgcgcca agggctggct gggcaacttc gattactggg gccagggaac cctcgtgact 1740
gtctcgagcg cttctgtggc cgctccctcc gtgttcatct tcccaccttc cgacgagcag 1800
ctgaagtccg gcactgcctc tgtcgtgtgc ctgctgaaca acttctaccc tcgggaagcc 1860
aaggtgcagt ggaaagtgga taacgccctg cagtccggca actcccagga atccgtgacc 1920
gagcaggact ccaaggacag cacctactcc ctgagcagca ccctgaccct gtccaaggcc 1980
gactacgaga agcacaaggt gtacgcctgt gaagtgaccc accagggcct gtccagcccc 2040
gtgaccaagt ccttcaaccg gggcgagtgc 2070

<210> 289
<211> 690
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (25G7) VHCH1-重链-(28H1) VHCL
<400> 289

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

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly

435 440 445

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

450 455 460

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

465 470 475 480

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

485 490 495

Ser Ser His Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

500 505 510

Glu Trp Val Ser Ala Ile Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp

515 520 525

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr

530 535 540

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr

545 550 555 560

Tyr Cys Ala Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

565 570 575

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe

580 585 590

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val

595 600 605

Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp

610 615 620

Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr

625 630 635 640

Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr

645 650 655

Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val

660 665 670

Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly

675 680 685

Glu Cys

690

<210> 290

<211> 2073

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> DNA (11D5) VHCH1-重链-(28H1) VHCL

<400> 290

caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagatctact 300
ctgatctacg gttacttcga ctactggggc caagggacca ccgtgaccgt ctcctcagct 360
agcaccaagg gcccatccgt gttccctctg gccccttcca gcaagtctac ctctggcggc 420
acagccgctc tgggctgcct cgtgaaggac tacttccccg agcctgtgac agtgtcctgg 480
aactctggcg ccctgacatc cggcgtgcac acctttccag ctgtgctgca gtcctccggc 540
ctgtactccc tgtcctccgt cgtgacagtg ccctccagct ctctgggcac ccagacctac 600
atctgcaacg tgaaccacaa gccctccaac accaaggtgg acaagaaggt ggaacccaag 660
tcctgcgaca agacccacac ctgtccccct tgtcctgccc ctgaagctgc tggcggccct 720
agcgtgttcc tgttcccccc aaagcccaag gacaccctga tgatctcccg gacccccgaa 780
gtgacctgcg tggtggtgga tgtgtcccac gaggaccctg aagtgaagtt caattggtac 840
gtggacggcg tggaagtgca caatgccaag accaagccta gagaggaaca gtacaactcc 900
acctaccggg tggtgtccgt gctgaccgtg ctgcaccagg attggctgaa cggcaaagag 960
tacaagtgca aggtgtccaa caaggccctg ggagccccca tcgaaaagac catctccaag 1020
gccaagggcc agcctcgcga gcctcaggtg tacaccctgc cccctagcag agatgagctg 1080
accaagaacc aggtgtccct gacctgtctc gtgaaaggct tctacccctc cgatatcgcc 1140
gtggaatggg agagcaacgg ccagcccgag aacaactaca agaccacccc ccctgtgctg 1200
gactccgacg gctcattctt cctgtactct aagctgacag tggacaagtc ccggtggcag 1260
cagggcaacg tgttctcctg ctccgtgatg cacgaggccc tgcacaacca ctacacccag 1320
aagtccctgt ccctgtctcc cgggggaggc ggaggatctg gcggaggcgg atccggtggt 1380
ggcggatctg ggggcggtgg atctgaggtg cagctgctgg aatctggggg aggactggtg 1440
cagccaggcg gatctctgag gctgtcctgc gctgcttccg gctttacctt ctccagccac 1500
gccatgagtt gggtgcgcca ggcacccgga aaaggactgg aatgggtgtc agccatctgg 1560
gcctccggcg agcagtacta cgccgatagc gtgaagggcc ggttcaccat ctctcgggat 1620
aacagcaaga atactctgta cctgcagatg aactccctgc gcgctgaaga taccgctgtg 1680
tattactgcg ccaagggctg gctgggcaac ttcgattact ggggccaggg aaccctcgtg 1740
actgtctcga gcgcttctgt ggccgctccc tccgtgttca tcttcccacc ttccgacgag 1800
cagctgaagt ccggcactgc ctctgtcgtg tgcctgctga acaacttcta ccctcgggaa 1860
gccaaggtgc agtggaaagt ggataacgcc ctgcagtccg gcaactccca ggaatccgtg 1920
accgagcagg actccaagga cagcacctac tccctgagca gcaccctgac cctgtccaag 1980
gccgactacg agaagcacaa ggtgtacgcc tgtgaagtga cccaccaggg cctgtccagc 2040
cccgtgacca agtccttcaa ccggggcgag tgc 2073

<210> 291

<211> 691
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (11D5) VHCH1-重链-(28H1) VHCL
<400> 291

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

260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

275 280 285

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

290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys

325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

355 360 365

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

370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys

405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

435 440 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

450 455 460

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val

465 470 475 480

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr

485 490 495

Phe Ser Ser His Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly

500 505 510

Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala

515 520 525

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn

530 535 540

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val

545 550 555 560

Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

565 570 575

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val
580 585 590
Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
595 600 605
Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
610 615 620
Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
625 630 635 640
Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
645 650 655
Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
660 665 670
Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
675 680 685
Gly Glu Cys
690

<210> 292
<211> 2076
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA (9B11) VHCH1-重链-(28H1) VHCL
<400> 292

caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagatcttct 300
ggtgcttacc cgggttactt cgactactgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360
gctagcacca agggcccatc cgtgttccct ctggcccctt ccagcaagtc tacctctggc 420
ggcacagccg ctctgggctg cctcgtgaag gactacttcc ccgagcctgt gacagtgtcc 480
tggaactctg gcgccctgac atccggcgtg cacacctttc cagctgtgct gcagtcctcc 540
ggcctgtact ccctgtcctc cgtcgtgaca gtgccctcca gctctctggg cacccagacc 600
tacatctgca acgtgaacca caagccctcc aacaccaagg tggacaagaa ggtggaaccc 660
aagtcctgcg acaagaccca cacctgtccc ccttgtcctg cccctgaagc tgctggcggc 720
cctagcgtgt tcctgttccc cccaaagccc aaggacaccc tgatgatctc ccggacccct 780
gaagtgacct gcgtggtggt ggatgtgtcc cacgaggacc ctgaagtgaa gttcaattgg 840
tacgtggacg gcgtggaagt gcacaatgcc aagaccaagc ctagagagga acagtacaac 900
tccacctacc gggtggtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggattggct gaacggcaaa 960

gagtacaagt gcaaggtgtc caacaaggcc ctgggagccc ccatcgaaaa gaccatctcc 1020
aaggccaagg gccagcctcg cgagcctcag gtgtacaccc tgcccctag cagagatgag 1080
ctgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctcgtgaaag gcttctaccc ctccgatatc 1140
gccgtggaat gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac ccccctgtg 1200
ctggactccg acggctcatt cttcctgtac tctaagctga cagtggacaa gtcccggtgg 1260
cagcagggca acgtgttctc ctgctccgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 1320
cagaagtccc tgtccctgtc tcccgggga ggcggaggat ctggcggagg cggatccggt 1380
ggtggcggat ctgggggcgg tggatctgag gtgcagctgc tggaatctgg gggaggactg 1440
gtgcagccag gcggatctct gaggctgtcc tgcgctgctt ccggctttac cttctccagc 1500
cacgccatga gttgggtgcg ccaggcaccc ggaaaaggac tggaatgggt gtcagccatc 1560
tgggcctccg gcgagcagta ctacgccgat agcgtgaagg gccggttcac catctctcgg 1620
gataacagca agaatactct gtacctgcag atgaactccc tgcgcgctga agataccgct 1680
gtgtattact gcgccaaggg ctggctgggc aacttcgatt actggggcca gggaaccctc 1740
gtgactgtct cgagcgcttc tgtggccgct ccctccgtgt tcatcttccc accttccgac 1800
gagcagctga agtccggcac tgcctctgtc gtgtgcctgc tgaacaactt ctaccctcgg 1860
gaagccaagg tgcagtggaa agtggataac gccctgcagt ccggcaactc ccaggaatcc 1920
gtgaccgagc aggactccaa ggacagcacc tactccctga gcagcaccct gaccctgtcc 1980
aaggccgact acgagaagca caaggtgtac gcctgtgaag tgacccacca gggcctgtcc 2040
agccccgtga ccaagtcctt caaccggggc gagtgc 2076

<210> 293
<211> 692
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (9B11) VHCH1-重链-(28H1) VHCL
<400> 293

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

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly

225 230 235 240

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

245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu

325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365

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

370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
450 455 460
Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu
465 470 475 480
Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
485 490 495
Thr Phe Ser Ser His Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
500 505 510
Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr
515 520 525
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
530 535 540
Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
545 550 555 560
Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly
565 570 575
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser
580 585 590
Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
595 600 605
Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
610 615 620
Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
625 630 635 640
Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
645 650 655
Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
660 665 670
Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
675 680 685
Arg Gly Glu Cys
690

<210> 294
<211> 1350
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> DNA (12B3) VHCH1-重链节
<400> 294
caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagatctgaa 300
ttccgtttct acgctgactt cgactactgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360
gctagcacca agggccctag cgtgttccct ctggccccta gcagcaagag cacaagtgga 420
ggaacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480
tggaattctg gcgccctgac aagcggcgtg cacacatttc cagccgtgct gcagagcagc 540
ggcctgtact ctctgagcag cgtcgtgacc gtgccctcta gctctctggg cacccagacc 600
tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaaag tggacaagaa ggtggaaccc 660
aagagctgcg acaagaccca cacctgtccc ccttgccctg cccctgaagc tgctggtggc 720
ccttccgtgt tcctgttccc cccaaagccc aaggacaccc tgatgatcag ccggaccccc 780
gaagtgacct gcgtggtggt cgatgtgtcc cacgaggacc ctgaagtgaa gttcaattgg 840
tacgtggacg gcgtggaagt gcacaatgcc aagaccaagc cgcgggagga gcagtacaac 900
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatg ccgggatgag 1080
ctgaccaaga accaggtcag cctgtggtgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1350
<210> 295
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (12B3) VHCH1-重链节
<400> 295
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Glu Phe Arg Phe Tyr Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly Lys
450

<210> 296
<211> 1344
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA (25G7) VHCH1-重链节
<400> 296

gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gcgtgacgac 300
ccgtggccgc cgttcgacta ctggggccaa ggaaccctgg tcaccgtctc gagtgctagc 360
accaagggcc ctagcgtgtt ccctctggcc cctagcagca agagcacaag tggaggaaca 420
gccgccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcctggaat 480
tctggcgccc tgacaagcgg cgtgcacaca tttccagccg tgctgcagag cagcggcctg 540
tactctctga gcagcgtcgt gaccgtgccc tctagctctc tgggcaccca gacctacatc 600
tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaagtggaca agaaggtgga acccaagagc 660
tgcgacaaga cccacacctg tccccttgc cctgcccctg aagctgctgg tggcccttcc 720
gtgttcctgt tccccccaaa gcccaaggac accctgatga tcagccggac ccccgaagtg 780
acctgcgtgg tggtcgatgt gtcccacgag gaccctgaag tgaagttcaa ttggtacgtg 840
gacggcgtgg aagtgcacaa tgccaagacc aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 900
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 960
aagtgcaagg tctccaacaa agccctcggc gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1020
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catgccggga tgagctgacc 1080

aagaaccagg tcagcctgtg gtgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1140
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1200
tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1260
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1320
agcctctccc tgtctccggg taaa 1344

<210> 297
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (25G7) VHCH1-重链节
<400> 297

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

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

<210> 298
<211> 1347
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA (11D5) VHCH1-重链节
<400> 298
caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180

gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagatctact 300
ctgatctacg gttacttcga ctactggggc caagggacca ccgtgaccgt ctcctcagct 360
agcaccaagg gccctagcgt gttccctctg gcccctagca gcaagagcac aagtggagga 420
acagccgccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg agcccgtgac cgtgtcctgg 480
aattctggcg ccctgacaag cggcgtgcac acatttccag ccgtgctgca gagcagcggc 540
ctgtactctc tgagcagcgt cgtgaccgtg ccctctagct ctctgggcac ccagacctac 600
atctgcaacg tgaaccacaa gcccagcaac accaaagtgg acaagaaggt ggaacccaag 660
agctgcgaca agacccacac ctgtccccct tgccctgccc ctgaagctgc tggtggccct 720
tccgtgttcc tgttcccccc aaagcccaag gacaccctga tgatcagccg gacccccgaa 780
gtgacctgcg tggtggtcga tgtgtcccac gaggaccctg aagtgaagtt caattggtac 840
gtggacggcg tggaagtgca caatgccaag accaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ggcgccccca tcgagaaaac catctccaaa 1020
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatgccg ggatgagctg 1080
accaagaacc aggtcagcct gtggtgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 1347

<210> 299
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (11D5) VHCH1-重链节
<400> 299

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

Ala Arg Ser Thr Leu Ile Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
225 230 235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350
Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp
355 360 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys

405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

435 440 445

Lys

<210> 300

<211> 1350

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> DNA (9B11) VHCH1-重链节

<400> 300

caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60

tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180

gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagatcttct 300

ggtgcttacc cgggttactt cgactactgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

gctagcacca agggccctag cgtgttccct ctggccccta gcagcaagag cacaagtgga 420

ggaacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480

tggaattctg gcgccctgac aagcggcgtg cacacatttc cagccgtgct gcagagcagc 540

ggcctgtact ctctgagcag cgtcgtgacc gtgccctcta gctctctggg cacccagacc 600

tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaaag tggacaagaa ggtggaaccc 660

aagagctgcg acaagaccca cacctgtccc ccttgccctg cccctgaagc tgctggtggc 720

ccttccgtgt tcctgttccc cccaaagccc aaggacaccc tgatgatcag ccggaccccc 780

gaagtgacct gcgtggtggt cgatgtgtcc cacgaggacc ctgaagtgaa gttcaattgg 840

tacgtggacg gcgtggaagt gcacaatgcc aagaccaagc cgcgggagga gcagtacaac 900

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatg ccgggatgag 1080

ctgaccaaga accaggtcag cctgtggtgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200

ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1350

<210> 301

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> (9B11) VHCH1-重链节

<400> 301

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

275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

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

Gly Lys
450

<210> 302
<211> 1338
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA (8H9) VHCH1-重链节
<400> 302

caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagagaatac 300
ggttggatgg actactgggg ccaagggacc accgtgaccg tctcctcagc tagcaccaag 360
ggccctagcg tgttccctct ggccccctagc agcaagagca caagtggagg aacagccgcc 420
ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc gagcccgtga ccgtgtcctg gaattctggc 480
gccctgacaa gcggcgtgca cacatttcca gccgtgctgc agagcagcgg cctgtactct 540

ctgagcagcg tcgtgaccgt gccctctagc tctctgggca cccagaccta catctgcaac 600
gtgaaccaca agcccagcaa caccaaagtg gacaagaagg tggaacccaa gagctgcgac 660
aagacccaca cctgtccccc ttgccctgcc cctgaagctg ctggtggccc ttccgtgttc 720
ctgttccccc caaagcccaa ggacaccctg atgatcagcc ggacccccga agtgacctgc 780
gtggtggtcg atgtgtccca cgaggaccct gaagtgaagt tcaattggta cgtggacggc 840
gtggaagtgc acaatgccaa gaccaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 900
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 960
aaggtctcca acaaagccct cggcgccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1020
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatgcc gggatgagct gaccaagaac 1080
caggtcagcc tgtggtgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1140
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1200
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1260
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1320
tccctgtctc cgggtaaa 1338

<210> 303
<211> 446
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (8H9) VHCH1-重链节
<400> 303

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

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350
Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
355 360 365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 304

<211> 1752
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> (49B4) VHCH1 Fc节 VH (4B9)的核苷酸序列
<400> 304
caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagagaatac 300
taccgtggtc cgtacgacta ctggggccaa gggaccaccg tgaccgtctc ctcagctagc 360
accaagggcc catcggtctt ccccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 420
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 540
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 600
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagttga gcccaaatct 660
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aagctgcagg gggaccgtca 720
gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 780
acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 840
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 900
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 960
aagtgcaagg tctccaacaa agccctcggc gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1020
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc cctgcagaga tgagctgacc 1080
aagaaccagg tgtccctgtg gtgtctggtc aagggcttct accccagcga tatcgccgtg 1140
gagtgggaga gcaacggcca gcctgagaac aactacaaga ccacccccc tgtgctggac 1200
agcgacggca gcttcttcct gtactccaaa ctgaccgtgg acaagagccg gtggcagcag 1260
ggcaacgtgt tcagctgcag cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta cacccagaag 1320
tccctgagcc tgagccccgg cggaggcggc ggaagcggag gaggaggatc tgggggcgga 1380
ggttccggag gcggaggatc cgaggtgcag ctgctcgaaa gcggcggagg actggtgcag 1440
cctggcggca gcctgagact gtcttgcgcc gccagcggct tcaccttcag cagctacgcc 1500
atgagctggg tccgccaggc ccctggcaag ggactggaat gggtgtccgc catcatcggc 1560
tctggcgcca gcacctacta cgccgacagc gtgaagggcc ggttcaccat cagccgggac 1620
aacagcaaga acaccctgta cctgcagatg aacagcctgc gggccgagga caccgccgtg 1680
tactactgcg ccaagggatg gttcggcggc ttcaactact ggggacaggg caccctggtc 1740
accgtgtcca gc 1752
<210> 305
<211> 1725
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> (49B4) VHCH1 Fc穴 VL (4B9)的核苷酸序列

<400> 305

caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagagaatac 300
taccgtggtc cgtacgacta ctggggccaa gggaccaccg tgaccgtctc ctcagctagc 360
accaagggcc catcggtctt ccccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 420
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 540
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 600
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagttga gcccaaatct 660
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aagctgcagg gggaccgtca 720
gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 780
acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 840
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 900
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 960
aagtgcaagg tctccaacaa agccctcggc gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1020
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtgc accctgcccc catcccggga tgagctgacc 1080
aagaaccagg tcagcctctc gtgcgcagtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1140
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1200
tccgacggct ccttcttcct cgtgagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1260
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1320
agcctctccc tgtctccggg tggaggcggc ggaagcggag gaggaggatc cggcggcgga 1380
ggttccggag gcggtggatc tgagatcgtg ctgacccagt ctcccggcac cctgtctctg 1440
agccctggcg agagagccac cctgtcctgc agagcctccc agtccgtgac ctcctcctac 1500
ctcgcctggt atcagcagaa gcccggccag gcccctcggc tgctgatcaa cgtgggcagt 1560
cggagagcca ccggcatccc tgaccggttc tccggctctg gctccggcac cgacttcacc 1620
ctgaccatct cccggctgga acccgaggac ttcgccgtgt actactgcca gcagggcatc 1680
atgctgcccc ccacctttgg ccagggcacc aaggtggaaa tcaag 1725

<210> 306

<211> 584

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> (49B4) VHCH1 Fc节 VH (4B9)

<400> 306

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

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350
Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
355 360 365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly
435 440 445
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
450 455 460
Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
465 470 475 480
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
485 490 495
Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
500 505 510
Glu Trp Val Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala
515 520 525
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
530 535 540
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
545 550 555 560
Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln
565 570 575
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
580

<210> 307
<211> 575
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> (49B4) VHCH1 Fc穴 VL (4B9)

<400> 307

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

275 280 285

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

290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr

325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu

340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys

355 360 365

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser

405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly

435 440 445

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

450 455 460

Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu

465 470 475 480

Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val

485 490 495

Thr Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

500 505 510

Arg Leu Leu Ile Asn Val Gly Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp

515 520 525

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

530 535 540

Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile

545 550 555 560

Met Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

565 570 575

<210> 308

<211> 1749

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> (49B4) VHCH1 Fc节 VH (28H1)的核苷酸序列
<400> 308
caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagagaatac 300
taccgtggtc cgtacgacta ctggggccaa gggaccaccg tgaccgtctc ctcagctagc 360
accaagggcc catcggtctt ccccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 420
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 540
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 600
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagttga gcccaaatct 660
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aagctgcagg gggaccgtca 720
gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 780
acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 840
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 900
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 960
aagtgcaagg tctccaacaa agccctcggc gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1020
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc cctgcagaga tgagctgacc 1080
aagaaccagg tgtccctgtg gtgtctggtc aagggcttct accccagcga tatcgccgtg 1140
gagtgggaga gcaacggcca gcctgagaac aactacaaga ccacccccc tgtgctggac 1200
agcgacggca gcttcttcct gtactccaaa ctgaccgtgg acaagagccg gtggcagcag 1260
ggcaacgtgt tcagctgcag cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta cacccagaag 1320
tccctgagcc tgagccccgg cggaggcggc ggaagcggag gaggaggatc cggaggaggg 1380
ggaagtggcg gcggaggatc tgaggtgcag ctgctggaat ccggcggagg cctggtgcag 1440
cctggcggat ctctgagact gtcctgcgcc gcctccggct tcaccttctc ctcccacgcc 1500
atgtcctggg tccgacaggc tcctggcaaa ggcctggaat gggtgtccgc catctgggcc 1560
tccggcgagc agtactacgc cgactctgtg aagggccggt tcaccatctc ccgggacaac 1620
tccaagaaca ccctgtacct gcagatgaac tccctgcggg ccgaggacac cgccgtgtac 1680
tactgtgcca agggctggct gggcaacttc gactactggg gccagggcac cctggtcacc 1740
gtgtccagc 1749
<210> 309
<211> 1725
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> (49B4) VHCH1 Fc穴 VL (28H1)的核苷酸序列
<400> 309
caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagagaatac 300
taccgtggtc cgtacgacta ctggggccaa gggaccaccg tgaccgtctc ctcagctagc 360
accaagggcc catcggtctt ccccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 420
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 540
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 600
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagttga gcccaaatct 660
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aagctgcagg gggaccgtca 720
gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 780
acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 840
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 900
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 960
aagtgcaagg tctccaacaa agccctcggc gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1020
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtgc accctgcccc catcccggga tgagctgacc 1080
aagaaccagg tcagcctctc gtgcgcagtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1140
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1200
tccgacggct ccttcttcct cgtgagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1260
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1320
agcctctccc tgtctccggg tggaggcggc ggaagcggag gaggaggatc cggtggtggc 1380
ggatctgggg gcggtggatc tgagatcgtg ctgacccagt ctcccggcac cctgagcctg 1440
agccctggcg agagagccac cctgagctgc agagccagcc agagcgtgag ccggagctac 1500
ctggcctggt atcagcagaa gcccggccag gcccccagac tgctgatcat cggcgccagc 1560
acccgggcca ccggcatccc cgatagattc agcggcagcg gctccggcac cgacttcacc 1620
ctgaccatca gccggctgga acccgaggac ttcgccgtgt actactgcca gcagggccag 1680
gtgatccccc ccaccttcgg ccagggcacc aaggtggaaa tcaag 1725
<210> 310
<211> 583
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (49B4) VHCH1 Fc节 VH (28H1)
<400> 310

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

305 310 315 320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350
Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
355 360 365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly
435 440 445
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
450 455 460
Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
465 470 475 480
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
485 490 495
Ser Ser His Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
500 505 510
Glu Trp Val Ser Ala Ile Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp
515 520 525
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
530 535 540
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
545 550 555 560
Tyr Cys Ala Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
565 570 575
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
580

<210> 311
<211> 575
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> (49B4) VHCH1 Fc穴 VL (28H1)

<400> 311

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

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
340 345 350
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
355 360 365
Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly
435 440 445
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
450 455 460
Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu
465 470 475 480
Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val
485 490 495
Ser Arg Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
500 505 510
Arg Leu Leu Ile Ile Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp
515 520 525
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
530 535 540
Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln
545 550 555 560
Val Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
565 570 575

<210> 312
<211> 1746
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> (49B4) VHCH1 Fc节 VH (DP47)的核苷酸序列
<400> 312
caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagagaatac 300
taccgtggtc cgtacgacta ctggggccaa gggaccaccg tgaccgtctc ctcagctagc 360
accaagggcc catcggtctt ccccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 420
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 540
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 600
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagttga gcccaaatct 660
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aagctgcagg gggaccgtca 720
gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 780
acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 840
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 900
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 960
aagtgcaagg tctccaacaa agccctcggc gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1020
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc cctgcagaga tgagctgacc 1080
aagaaccagg tgtccctgtg gtgtctggtc aagggcttct accccagcga tatcgccgtg 1140
gagtgggaga gcaacggcca gcctgagaac aactacaaga ccacccccc tgtgctggac 1200
agcgacggca gcttcttcct gtactccaaa ctgaccgtgg acaagagccg gtggcagcag 1260
ggcaacgtgt tcagctgcag cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta cacccagaag 1320
tccctgagcc tgagccccgg cggaggcggc ggaagcggag gaggaggatc cggaggaggg 1380
ggaagtggcg gcggaggatc tgaggtgcaa ttgttggagt ctgggggagg cttggtacag 1440
cctgggggt ccctgagact ctcctgtgca gccagcggat tcacctttag cagttatgcc 1500
atgagctggg tccgccaggc tccagggaag gggctggagt gggtctcagc tattagtggt 1560
agtggtggta gcacatacta cgcagactcc gtgaagggcc ggttcaccat ctccagagac 1620
aattccaaga acacgctgta tctgcagatg aacagcctga gagccgagga cacggccgta 1680
tattactgtg cgaaaggcag cggatttgac tactggggcc aaggaaccct ggtcaccgtc 1740
tcgagc 1746
<210> 313
<211> 1725
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> (49B4) VHCH1 Fc穴 VL (DP47)的核苷酸序列

<400> 313

caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagagaatac 300
taccgtggtc cgtacgacta ctggggccaa gggaccaccg tgaccgtctc ctcagctagc 360
accaagggcc catcggtctt ccccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 420
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 540
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 600
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagttga gcccaaatct 660
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aagctgcagg gggaccgtca 720
gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 780
acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 840
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 900
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 960
aagtgcaagg tctccaacaa agccctcggc gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1020
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtgc accctgcccc catcccggga tgagctgacc 1080
aagaaccagg tcagcctctc gtgcgcagtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1140
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1200
tccgacggct ccttcttcct cgtgagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1260
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1320
agcctctccc tgtctccggg tggaggcggc ggaagcggag gaggaggatc cggaggcggc 1380
ggaagcggag ggggaggctc tgaaattgtg ctgacccaga gccccggcac cctgtcactg 1440
tctccaggcg aaagagccac cctgagctgc agagccagcc agagcgtgtc cagctcttac 1500
ctggcctggt atcagcagaa gcccggacag gcccccagac tgctgatcta cggcgcctct 1560
tctagagcca ccggcatccc cgatagattc agcggcagcg gctccggcac cgacttcacc 1620
ctgacaatca gcagactgga acccgaggac tttgccgtgt attactgcca gcagtacggc 1680
agcagccccc tgacctttgg ccagggcacc aaggtggaaa tcaaa 1725

<210> 314

<211> 582

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> (49B4) VHCH1 Fc节 VH (DP47)

<400> 314

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

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

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350
Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
355 360 365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly
435 440 445
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
450 455 460
Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
465 470 475 480
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
485 490 495
Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
500 505 510
Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala
515 520 525
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
530 535 540
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
545 550 555 560
Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
565 570 575
Leu Val Thr Val Ser Ser
580

<210> 315
<211> 575
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> (49B4) VHCH1 Fc穴 VL (DP47)

<400> 315

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

290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
355 360 365

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
450 455 460

Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu
465 470 475 480

Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val
485 490 495

Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
500 505 510

Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp
515 520 525

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
530 535 540

Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly
545 550 555 560

Ser Ser Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
565 570 575

<210> 316

<211> 1758

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> DNA (12B3) VHCH1 Fc节 VH (4B9) (HC1)
<400> 316
caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctggagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagatctgaa 300
ttccgtttct acgctgactt cgactactgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcgagt 360
gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 420
ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 480
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 540
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 600
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 660
aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaagc tgcaggggga 720
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 780
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccctg cagagatgag 1080
ctgaccaaga accaggtgtc cctgtggtgt ctggtcaagg gcttctaccc cagcgatatc 1140
gccgtggagt gggagagcaa cggccagcct gagaacaact acaagaccac ccccccctgtg 1200
ctggacagcg acggcagctt cttcctgtac tccaaactga ccgtggacaa gagccggtgg 1260
cagcagggca acgtgttcag ctgcagcgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 1320
cagaagtccc tgagcctgag ccccggcgga ggcggcggaa gcggaggagg aggatctggg 1380
ggcggaggtt ccggaggcgg tggatctgag gtgcagctgc tcgaaagcgg cggaggactg 1440
gtgcagcctg gcggcagcct gagactgtct tgcgccgcca gcggcttcac cttcagcagc 1500
tacgccatga gctgggtccg ccaggcccct ggcaagggac tggaatgggt gtccgccatc 1560
atcggctctg gcgccagcac ctactacgcc gacagcgtga agggccggtt caccatcagc 1620
cgggacaaca gcaagaacac cctgtacctg cagatgaaca gcctgcgggc cgaggacacc 1680
gccgtgtact actgcgccaa gggatggttc ggcggcttca actactgggg acagggcacc 1740
ctggtcaccg tgtccagc 1758
<210> 317
<211> 1731
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA (12B3) VHCH1 Fc穴 VL (4B9)

<400> 317

caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctggagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagatctgaa 300
ttccgtttct acgctgactt cgactactgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcgagt 360
gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 420
ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 480
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 540
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 600
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 660
aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaagc tgcaggggga 720
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 780
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtgcaccc tgcccccatc ccgggatgag 1080
ctgaccaaga accaggtcag cctctcgtgc gcagtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200
ctggactccg acggctcctt cttcctcgtg agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtgga ggcggcggaa gcggaggagg aggatccggc 1380
ggcggaggtt ccggaggcgg aggatccgag atcgtgctga cccagtctcc cggcaccctg 1440
tctctgagcc ctggcgagag agccaccctg tcctgcagag cctcccagtc cgtgacctcc 1500
tcctacctcg cctggtatca gcagaagccc ggccaggccc ctcggctgct gatcaacgtg 1560
ggcagtcgga gagccaccgg catccctgac cggttctccg gctctggctc cggcaccgac 1620
ttcaccctga ccatctcccg gctggaaccc gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag 1680
ggcatcatgc tgccccccac ctttggccag ggcaccaagg tggaaatcaa g 1731

<210> 318

<211> 586

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> (12B3) VHCH1 Fc节 VH (4B9)

<400> 318

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

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

325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
450 455 460
Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu
465 470 475 480
Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
485 490 495
Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
500 505 510
Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr
515 520 525
Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
530 535 540
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
545 550 555 560
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp
565 570 575
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
580 585

<210> 319
<211> 577
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (12B3) VHCH1 Fc穴 VL (4B9)

<400> 319

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

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
450 455 460
Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu
465 470 475 480
Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
485 490 495
Ser Val Thr Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
500 505 510
Ala Pro Arg Leu Leu Ile Asn Val Gly Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile
515 520 525
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
530 535 540
Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
545 550 555 560
Gly Ile Met Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
565 570 575
Lys

<210> 320
<211> 1752
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> DNA (25G7) VHCH1 Fc节 VH (4B9)
<400> 320
gaggtgcagc tgctggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60
agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc agctacgcca tgagctgggt gcgccaggcc 120
cctggaaaag gcctggaatg ggtgtccgcc atctctggca gcggcggcag cacctactac 180
gccgattctg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actattgcgc cagggacgac 300
ccctggcccc cctttgatta ttggggacag ggcaccctcg tgaccgtgtc cagcgctagc 360
accaagggcc catcggtctt ccccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 420
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 540
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 600
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagttga gcccaaatct 660
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aagctgcagg gggaccgtca 720
gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 780
acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 840
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 900
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 960
aagtgcaagg tctccaacaa agccctcggc gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1020
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc cctgcagaga tgagctgacc 1080
aagaaccagg tgtccctgtg gtgtctggtc aagggcttct accccagcga tatcgccgtg 1140
gagtgggaga gcaacggcca gcctgagaac aactacaaga ccacccccc tgtgctggac 1200
agcgacggca gcttcttcct gtactccaaa ctgaccgtgg acaagagccg gtggcagcag 1260
ggcaacgtgt tcagctgcag cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta cacccagaag 1320
tccctgagcc tgagccccgg cggaggcggc ggaagcggag gaggaggatc tgggggcgga 1380
ggttccggag gcggtggatc tgaggtgcag ctgctcgaaa gcggcggagg actggtgcag 1440
cctggcggca gcctgagact gtcttgcgcc gccagcggct tcaccttcag cagctacgcc 1500
atgagctggg tccgccaggc ccctggcaag ggactggaat gggtgtccgc catcatcggc 1560
tctggcgcca gcacctacta cgccgacagc gtgaagggcc ggttcaccat cagccgggac 1620
aacagcaaga acaccctgta cctgcagatg aacagcctgc gggccgagga caccgccgtg 1680
tactactgcg ccaagggatg gttcggcggc ttcaactact ggggacaggg caccctggtc 1740
accgtgtcca gc 1752
<210> 321
<211> 1725
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA (25G7) VHCH1 Fc穴 VL (4B9)

<400> 321

gaggtgcagc tgctggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60
agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc agctacgcca tgagctgggt gcgccaggcc 120
cctggaaaag gcctggaatg ggtgtccgcc atctctggca gcggcggcag cacctactac 180
gccgattctg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actattgcgc cagggacgac 300
ccctggcccc cctttgatta ttggggacag ggcaccctcg tgaccgtgtc cagcgctagc 360
accaagggcc catcggtctt ccccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 420
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 540
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 600
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagttga gcccaaatct 660
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aagctgcagg gggaccgtca 720
gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 780
acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 840
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 900
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 960
aagtgcaagg tctccaacaa agccctcggc gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1020
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtgc accctgcccc catcccggga tgagctgacc 1080
aagaaccagg tcagcctctc gtgcgcagtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1140
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1200
tccgacggct ccttcttcct cgtgagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1260
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1320
agcctctccc tgtctccggg tggaggcggc ggaagcggag gaggaggatc cggcggcgga 1380
ggttccggag gcggaggatc cgagatcgtg ctgacccagt ctcccggcac cctgtctctg 1440
agccctggcg agagagccac cctgtcctgc agagcctccc agtccgtgac ctcctcctac 1500
ctcgcctggt atcagcagaa gcccggccag gcccctcggc tgctgatcaa cgtgggcagt 1560
cggagagcca ccggcatccc tgaccggttc tccggctctg gctccggcac cgacttcacc 1620
ctgaccatct cccggctgga acccgaggac ttcgccgtgt actactgcca gcagggcatc 1680
atgctgcccc ccacctttgg ccagggcacc aaggtggaaa tcaag 1725

<210> 322
<211> 584
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (25G7) VHCH1 Fc节 VH
<400> 322

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

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

325 330 335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350
Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
355 360 365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly
435 440 445
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
450 455 460
Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
465 470 475 480
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
485 490 495
Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
500 505 510
Glu Trp Val Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala
515 520 525
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
530 535 540
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
545 550 555 560
Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln
565 570 575
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
580

<210> 323
<211> 575
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (25G7) VHCH1 Fc穴 VL (4B9)

<400> 323

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

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
340 345 350
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
355 360 365
Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly
435 440 445
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
450 455 460
Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu
465 470 475 480
Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val
485 490 495
Thr Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
500 505 510
Arg Leu Leu Ile Asn Val Gly Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp
515 520 525
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
530 535 540
Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile
545 550 555 560
Met Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
565 570 575

<210> 324
<211> 1755
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> DNA (11D5) VHCH1 Fc节 VH (4B9)

<400> 324

caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ccggcagcag cgtgaaggtg 60
tcctgcaagg cttccggcgg caccttcagc agctacgcca tttcttgggt gcgccaggcc 120
cctggacagg gcctggaatg gatgggcggc atcatcccca tcttcggcac cgccaactac 180
gcccagaaat tccagggcag agtgaccatc accgccgaca agagcaccag caccgcctac 240
atggaactga gcagcctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaagcacc 300
ctgatctacg gctacttcga ctactggggc cagggcacca ccgtgaccgt gtctagcgct 360
agcaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 420
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga 540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 600
atctgcaacg tgaatcacaa gcccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 660
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaagctgc agggggaccg 720
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 780
gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ggcgccccca tcgagaaaac catctccaaa 1020
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc cccctgcag agatgagctg 1080
accaagaacc aggtgtccct gtggtgtctg gtcaagggct tctaccccag cgatatcgcc 1140
gtggagtggg agagcaacgg ccagcctgag aacaactaca agaccacccc ccctgtgctg 1200
gacagcgacg gcagcttctt cctgtactcc aaactgaccg tggacaagag ccggtggcag 1260
cagggcaacg tgttcagctg cagcgtgatg cacgaggccc tgcacaacca ctacacccag 1320
aagtccctga gcctgagccc cggcggaggc ggcggaagcg gaggaggagg atctgggggc 1380
ggaggttccg gaggcggtgg atctgaggtg cagctgctcg aaagcggcgg aggactggtg 1440
cagcctggcg gcagcctgag actgtcttgc gccgccagcg gcttcacctt cagcagctac 1500
gccatgagct gggtccgcca ggcccctggc aagggactgg aatgggtgtc cgccatcatc 1560
ggctctggcg ccagcaccta ctacgccgac agcgtgaagg gccggttcac catcagccgg 1620
gacaacagca agaacaccct gtacctgcag atgaacagcc tgcgggccga ggacaccgcc 1680
gtgtactact gcgccaaggg atggttcggc ggcttcaact actggggaca gggcaccctg 1740
gtcaccgtgt ccagc 1755

<210> 325

<211> 1728

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> DNA (11D5) VHCH1 Fc穴 VL (4B9)

<400> 325

caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ccggcagcag cgtgaaggtg 60
tcctgcaagg cttccggcgg caccttcagc agctacgcca tttcttgggt gcgccaggcc 120
cctggacagg gcctggaatg gatgggcggc atcatcccca tcttcggcac cgccaactac 180
gcccagaaat tccagggcag agtgaccatc accgccgaca agagcaccag caccgcctac 240
atggaactga gcagcctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaagcacc 300
ctgatctacg gctacttcga ctactggggc cagggcacca ccgtgaccgt gtctagcgct 360
agcaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 420
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga 540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 600
atctgcaacg tgaatcacaa gcccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 660
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaagctgc agggggaccg 720
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 780
gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ggcgccccca tcgagaaaac catctccaaa 1020
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tgcaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 1080
accaagaacc aggtcagcct ctcgtgcgca gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200
gactccgacg gctccttctt cctcgtgagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320
aagagcctct ccctgtctcc gggtggaggc ggcggaagcg gaggaggagg atccggcggc 1380
ggaggttccg gaggcggagg atccgagatc gtgctgaccc agtctcccgg caccctgtct 1440
ctgagccctg gcgagagagc caccctgtcc tgcagagcct cccagtccgt gacctcctcc 1500
tacctcgcct ggtatcagca gaagcccggc caggcccctc ggctgctgat caacgtgggc 1560
agtcggagag ccaccggcat ccctgaccgg ttctccggct ctggctccgg caccgacttc 1620
accctgacca tctcccggct ggaacccgag gacttcgccg tgtactactg ccagcagggc 1680
atcatgctgc cccccacctt tggccagggc accaaggtgg aaatcaag 1728

<210> 326
<211> 585
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (11D5) VHCH1 Fc节 VH (4B9)
<400> 326

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Thr Leu Ile Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

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

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro

225 230 235 240

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

245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp

260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

275 280 285

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

290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys

325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350
Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp
355 360 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
450 455 460
Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
465 470 475 480
Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
485 490 495
Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
500 505 510
Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr
515 520 525
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
530 535 540
Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
545 550 555 560
Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly
565 570 575
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
580 585

<210> 327
<211> 576
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (11D5) VHCH1 Fc穴 VL (4B9)
<400> 327

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

305 310 315 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr
340 345 350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser
355 360 365
Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
450 455 460
Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
465 470 475 480
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
485 490 495
Val Thr Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
500 505 510
Pro Arg Leu Leu Ile Asn Val Gly Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro
515 520 525
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
530 535 540
Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly
545 550 555 560
Ile Met Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
565 570 575

<210> 328
<211> 1758
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA (9B11) VHCH1 Fc节 VH (4B9)

<400> 328

caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagatcttct 300
ggtgcttacc cgggttactt cgactactgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360
gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 420
ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 480
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 540
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 600
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 660
aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaagc tgcaggggga 720
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 780
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccctg cagagatgag 1080
ctgaccaaga accaggtgtc cctgtggtgt ctggtcaagg gcttctaccc cagcgatatc 1140
gccgtggagt gggagagcaa cggccagcct gagaacaact acaagaccac ccccccctgtg 1200
ctggacagcg acggcagctt cttcctgtac tccaaactga ccgtggacaa gagccggtgg 1260
cagcagggca acgtgttcag ctgcagcgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 1320
cagaagtccc tgagcctgag ccccggcgga ggcggcggaa gcggaggagg aggatctggg 1380
ggcggaggtt ccggaggcgg tggatctgag gtgcagctgc tcgaaagcgg cggaggactg 1440
gtgcagcctg gcggcagcct gagactgtct tgcgccgcca gcggcttcac cttcagcagc 1500
tacgccatga gctgggtccg ccaggcccct ggcaagggac tggaatgggt gtccgccatc 1560
atcggctctg gcgccagcac ctactacgcc gacagcgtga agggccggtt caccatcagc 1620
cgggacaaca gcaagaacac cctgtacctg cagatgaaca gcctgcgggc cgaggacacc 1680
gccgtgtact actgcgccaa gggatggttc ggcggcttca actactgggg acagggcacc 1740
ctggtcaccg tgtccagc 1758

<210> 329

<211> 1731

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> DNA (9B11) VHCH1 Fc穴 VL (4B9)

<400> 329

caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60

tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagatcttct 300
ggtgcttacc cgggttactt cgactactgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360
gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 420
ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 480
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 540
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 600
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 660
aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaagc tgcaggggga 720
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 780
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtgcaccc tgcccccatc ccgggatgag 1080
ctgaccaaga accaggtcag cctctcgtgc gcagtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200
ctggactccg acggctcctt cttcctcgtg agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtgga ggcggcggaa gcggaggagg aggatccggc 1380
ggcggaggtt ccggaggcgg aggatccgag atcgtgctga cccagtctcc cggcaccctg 1440
tctctgagcc ctggcgagag agccaccctg tcctgcagag cctcccagtc cgtgacctcc 1500
tcctacctcg cctggtatca gcagaagccc ggccaggccc ctcggctgct gatcaacgtg 1560
ggcagtcgga gagccaccgg catccctgac cggttctccg gctctggctc cggcaccgac 1620
ttcaccctga ccatctcccg gctggaaccc gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag 1680
ggcatcatgc tgccccccac ctttggccag ggcaccaagg tggaaatcaa g 1731

<210> 330
<211> 586
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (9B11) VHCH1 Fc节 VH (4B9)
<400> 330

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Ser Gly Ala Tyr Pro Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

340 345 350
Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
450 455 460
Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu
465 470 475 480
Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
485 490 495
Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
500 505 510
Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr
515 520 525
Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
530 535 540
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
545 550 555 560
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp
565 570 575
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
580 585

<210> 331
<211> 577
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (9B11) VHCH1 Fc穴 VL (4B9)
<400> 331
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

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

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
450 455 460
Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu
465 470 475 480
Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
485 490 495
Ser Val Thr Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
500 505 510
Ala Pro Arg Leu Leu Ile Asn Val Gly Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile
515 520 525
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
530 535 540
Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
545 550 555 560
Gly Ile Met Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
565 570 575
Lys

<210> 332
<211> 1731
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA (12B3) VHCH1 Fc节 VL (4B9)

<400> 332

caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctggagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagatctgaa 300
ttccgtttct acgctgactt cgactactgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcgagt 360
gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 420
ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 480
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 540
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 600
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 660
aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaagc tgcaggggga 720
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 780
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccctg cagagatgag 1080
ctgaccaaga accaggtgtc cctgtggtgt ctggtcaagg gcttctaccc cagcgatatc 1140
gccgtggagt gggagagcaa cggccagcct gagaacaact acaagaccac cccccctgtg 1200
ctggacagcg acggcagctt cttcctgtac tccaaactga ccgtggacaa gagccggtgg 1260
cagcagggca acgtgttcag ctgcagcgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 1320
cagaagtccc tgagcctgag ccccggcgga ggcggcggaa gcggaggagg aggatctggg 1380
ggcggaggtt ccggaggcgg tggatctgag atcgtgctga cccagtctcc cggcaccctg 1440
tctctgagcc ctggcgagag agccaccctg tcctgcagag cctcccagtc cgtgacctcc 1500
tcctacctcg cctggtatca gcagaagccc ggccaggccc ctcggctgct gatcaacgtg 1560
ggcagtcgga gagccaccgg catccctgac cggttctccg gctctggctc cggcaccgac 1620
ttcaccctga ccatctcccg gctggaaccc gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag 1680
ggcatcatgc tgccccccac ctttggccag ggcaccaagg tggaaatcaa g 1731

<210> 333

<211> 1758

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> DNA (12B3) VHCH1 Fc穴 VH (4B9)

<400> 333

caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggctggagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagatctgaa 300
ttccgtttct acgctgactt cgactactgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcgagt 360
gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 420
ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 480
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 540
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 600
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 660
aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaagc tgcaggggga 720
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 780
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtgcaccc tgcccccatc ccgggatgag 1080
ctgaccaaga accaggtcag cctctcgtgc gcagtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200
ctggactccg acggctcctt cttcctcgtg agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtgga ggcggcggaa gcggaggagg aggatccggc 1380
ggcggaggtt ccggaggcgg aggatccgag gtgcagctgc tcgaaagcgg cggaggactg 1440
gtgcagcctg gcggcagcct gagactgtct tgcgccgcca gcggcttcac cttcagcagc 1500
tacgccatga gctgggtccg ccaggcccct ggcaagggac tggaatgggt gtccgccatc 1560
atcggctctg gcgccagcac ctactacgcc gacagcgtga agggccggtt caccatcagc 1620
cgggacaaca gcaagaacac cctgtacctg cagatgaaca gcctgcgggc cgaggacacc 1680
gccgtgtact actgcgccaa gggatggttc ggcggcttca actactgggg acagggcacc 1740
ctggtcaccg tgtccagc 1758

<210> 334
<211> 577
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (12B3) VHCH1 Fc节 VL (4B9)
<400> 334

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Glu Phe Arg Phe Tyr Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

340 345 350
Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
450 455 460
Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu
465 470 475 480
Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
485 490 495
Ser Val Thr Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
500 505 510
Ala Pro Arg Leu Leu Ile Asn Val Gly Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile
515 520 525
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
530 535 540
Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
545 550 555 560
Gly Ile Met Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
565 570 575
Lys

<210> 335
<211> 586
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (12B3) VHCH1 Fc穴 VH (4B9)
<400> 335
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

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

325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
450 455 460
Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu
465 470 475 480
Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
485 490 495
Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
500 505 510
Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr
515 520 525
Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
530 535 540
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
545 550 555 560
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp
565 570 575
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
580 585

<210> 336
<211> 1725
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA (25G7) VHCH1 Fc节 VL (4B9)

<400> 336

gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggGtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gcgtgacgac 300
ccgtggccgc cgttcgacta ctggggccaa ggaaccctgg tcaccgtctc gagtgctagc 360
accaagggcc catcggtctt cccccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 420
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 540
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 600
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagttga gcccaaatct 660
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aagctgcagg gggaccgtca 720
gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 780
acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 840
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 900
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 960
aagtgcaagg tctccaacaa agccctcggc gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1020
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc cctgcagaga tgagctgacc 1080
aagaaccagg tgtccctgtg gtgtctggtc aagggcttct accccagcga tatcgccgtg 1140
gagtgggaga gcaacggcca gcctgagaac aactacaaga ccacccccCc tgtgctggac 1200
agcgacggca gcttcttcct gtactccaaa ctgaccgtgg acaagagccg gtggcagcag 1260
ggcaacgtgt tcagctgcag cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta cacccagaag 1320
tccctgagcc tgagccccgg cggaggcggc ggaagcggag gaggaggatc tgggggcgga 1380
ggttccggag gcggtggatc tgagatcgtg ctgacccagt ctcccggcac cctgtctctg 1440
agccctggcg agagagccac cctgtcctgc agagcctccc agtccgtgac ctcctcctac 1500
ctcgcctggt atcagcagaa gcccggccag gcccctcggc tgctgatcaa cgtgggcagt 1560
cggagagcca ccggcatccc tgaccggttc tccggctctg gctccggcac cgacttcacc 1620
ctgaccatct cccggctgga acccgaggac ttcgccgtgt actactgcca gcagggcatc 1680
atgctgcccc ccacctttgg ccagggcacc aaggtggaaa tcaag 1725

<210> 337

<211> 1752

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> DNA (25G7) VHCH1 Fc穴 VH (4B9)

<400> 337

gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggGtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gcgtgacgac 300
ccgtggccgc cgttcgacta ctggggccaa ggaaccctgg tcaccgtctc gagtgctagc 360
accaagggcc catcggtctt cccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 420
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 540
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 600
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagttga gcccaaatct 660
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aagctgcagg gggaccgtca 720
gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 780
acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 840
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 900
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 960
aagtgcaagg tctccaacaa agccctcggc gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1020
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtgc accctgcccc catcccggga tgagctgacc 1080
aagaaccagg tcagcctctc gtgcgcagtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1140
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1200
tccgacggct ccttcttcct cgtgagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1260
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1320
agcctctccc tgtctccggg tggaggcggc ggaagcggag gaggaggatc cggcggcgga 1380
ggttccggag gcggaggatc cgaggtgcag ctgctcgaaa gcggcggagg actggtgcag 1440
cctggcggca gcctgagact gtcttgcgcc gccagcggct tcaccttcag cagctacgcc 1500
atgagctggg tccgccaggc ccctggcaag ggactggaat gggtgtccgc catcatcggc 1560
tctggcgcca gcacctacta cgccgacagc gtgaagggcc ggttcaccat cagccgggac 1620
aacagcaaga acaccctgta cctgcagatg aacagcctgc gggccgagga caccgccgtg 1680
tactactgcg ccaagggatg gttcggcggc ttcaactact ggggacaggg caccctggtc 1740
accgtgtcca gc 1752

<210> 338
<211> 575
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (25G7) VHCH1 Fc节 VL (4B9)
<400> 338

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Asp Pro Trp Pro Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

340 345 350
Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
355 360 365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly
435 440 445
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
450 455 460
Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu
465 470 475 480
Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val
485 490 495
Thr Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
500 505 510
Arg Leu Leu Ile Asn Val Gly Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp
515 520 525
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
530 535 540
Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile
545 550 555 560
Met Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
565 570 575

<210> 339
<211> 584
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (25G7) VHCH1 Fc穴 VH (4B9)
<400> 339
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Asp Pro Trp Pro Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

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

115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr

210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser

225 230 235 240

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

245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr

325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
340 345 350
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
355 360 365
Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly
435 440 445
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
450 455 460
Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
465 470 475 480
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
485 490 495
Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
500 505 510
Glu Trp Val Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala
515 520 525
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
530 535 540
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
545 550 555 560
Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln
565 570 575
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
580

<210> 340
<211> 1728
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA (11D5) VHCH1 Fc节 VL (4B9)
<400> 340

caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagatctact 300
ctgatctacg gttacttcga ctactggggc caagggacca ccgtgaccgt ctcctcagct 360
agcaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 420
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga 540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 600
atctgcaacg tgaatcacaa gcccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 660
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaagctgc agggggaccg 720
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 780
gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ggcgccccca tcgagaaaac catctccaaa 1020
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccctgcag agatgagctg 1080
accaagaacc aggtgtccct gtggtgtctg gtcaagggct tctaccccag cgatatcgcc 1140
gtggagtggg agagcaacgg ccagcctgag aacaactaca agaccacccc ccctgtgctg 1200
gacagcgacg gcagcttctt cctgtactcc aaactgaccg tggacaagag ccggtggcag 1260
cagggcaacg tgttcagctg cagcgtgatg cacgaggccc tgcacaacca ctacacccag 1320
aagtccctga gcctgagccc cggcggaggc ggcggaagcg gaggaggagg atctgggggc 1380
ggaggttccg gaggcggtgg atctgagatc gtgctgaccc agtctcccgg caccctgtct 1440
ctgagccctg gcgagagagc caccctgtcc tgcagagcct cccagtccgt gacctcctcc 1500
tacctcgcct ggtatcagca gaagcccggc caggcccctc ggctgctgat caacgtgggc 1560
agtcggagag ccaccggcat ccctgaccgg ttctccggct ctggctccgg caccgacttc 1620
accctgacca tctcccggct ggaacccgag gacttcgccg tgtactactg ccagcagggc 1680
atcatgctgc cccccacctt tggccagggc accaaggtgg aaatcaag 1728

<210> 341
<211> 1755
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA (11D5) VHCH1 Fc穴 VH (4B9)
<400> 341

caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180

gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagatctact 300
ctgatctacg gttacttcga ctactggggc caagggacca ccgtgaccgt ctcctcagct 360
agcaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 420
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga 540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 600
atctgcaacg tgaatcacaa gcccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 660
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaagctgc agggggaccg 720
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 780
gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ggcgccccca tcgagaaaac catctccaaa 1020
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tgcaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 1080
accaagaacc aggtcagcct ctcgtgcgca gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200
gactccgacg gctccttctt cctcgtgagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320
aagagcctct ccctgtctcc gggtggaggc ggcggaagcg gaggaggagg atccggcggc 1380
ggaggttccg gaggcggagg atccgaggtg cagctgctcg aaagcggcgg aggactggtg 1440
cagcctggcg gcagcctgag actgtcttgc gccgccagcg gcttcacctt cagcagctac 1500
gccatgagct gggtccgcca ggcccctggc aagggactgg aatgggtgtc cgccatcatc 1560
ggctctggcg ccagcaccta ctacgccgac agcgtgaagg gccggttcac catcagccgg 1620
gacaacagca agaacaccct gtacctgcag atgaacagcc tgcgggccga ggacaccgcc 1680
gtgtactact gcgccaaggg atggttcggc ggcttcaact actggggaca gggcaccctg 1740
gtcaccgtgt ccagc 1755

<210> 342
<211> 576
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (11D5) VHCH1 Fc节 VL (4B9)
<400> 342

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

35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Thr Leu Ile Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
225 230 235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp
355 360 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
450 455 460
Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
465 470 475 480
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
485 490 495
Val Thr Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
500 505 510
Pro Arg Leu Leu Ile Asn Val Gly Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro
515 520 525
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
530 535 540
Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly
545 550 555 560
Ile Met Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
565 570 575

<210> 343
<211> 585
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (11D5) VHCH1 Fc穴 VH (4B9)
<400> 343

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Thr Leu Ile Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
225 230 235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr

340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser
355 360 365

Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
450 455 460

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
465 470 475 480

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
485 490 495

Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
500 505 510

Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr
515 520 525

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
530 535 540

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
545 550 555 560

Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly
565 570 575

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
580 585

<210> 344

<211> 1731

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> DNA (9B11) VHCH1 Fc节 VL (4B9)

<400> 344

caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60

tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagatcttct 300
ggtgcttacc cgggttactt cgactactgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360
gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 420
ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 480
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 540
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 600
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 660
aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaagc tgcaggggga 720
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 780
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccctg cagagatgag 1080
ctgaccaaga accaggtgtc cctgtggtgt ctggtcaagg gcttctaccc cagcgatatc 1140
gccgtggagt gggagagcaa cggccagcct gagaacaact acaagaccac ccccccctgtg 1200
ctggacagcg acggcagctt cttcctgtac tccaaactga ccgtggacaa gagccggtgg 1260
cagcagggca acgtgttcag ctgcagcgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 1320
cagaagtccc tgagcctgag ccccggcgga ggcggcggaa gcggaggagg aggatctggg 1380
ggcggaggtt ccggaggcgg tggatctgag atcgtgctga cccagtctcc cggcaccctg 1440
tctctgagcc ctggcgagag agccaccctg tcctgcagag cctcccagtc cgtgacctcc 1500
tcctacctcg cctggtatca gcagaagccc ggccaggccc ctcggctgct gatcaacgtg 1560
ggcagtcgga gagccaccgg catccctgac cggttctccg gctctggctc cggcaccgac 1620
ttcaccctga ccatctcccg gctggaaccc gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag 1680
ggcatcatgc tgccccccac ctttggccag ggcaccaagg tggaaatcaa g 1731

<210> 345
<211> 1758
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> DNA (9B11) VHCH1 Fc穴 VH (4B9)
<400> 345

caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagatcttct 300
ggtgcttacc cgggttactt cgactactgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360
gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 420
ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 480
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 540
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 600
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 660
aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaagc tgcaggggga 720
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 780
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtgcaccc tgcccccatc ccgggatgag 1080
ctgaccaaga accaggtcag cctctcgtgc gcagtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200
ctggactccg acggctcctt cttcctcgtg agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtgga ggcggcggaa gcggaggagg aggatccggc 1380
ggcggaggtt ccggaggcgg aggatccgag gtgcagctgc tcgaaagcgg cggaggactg 1440
gtgcagcctg gcggcagcct gagactgtct tgcgccgcca gcggcttcac cttcagcagc 1500
tacgccatga gctgggtccg ccaggcccct ggcaagggac tggaatgggt gtccgccatc 1560
atcggctctg gcgccagcac ctactacgcc gacagcgtga agggccggtt caccatcagc 1620
cgggacaaca gcaagaacac cctgtacctg cagatgaaca gcctgcgggc cgaggacacc 1680
gccgtgtact actgcgccaa gggatggttc ggcggcttca actactgggg acagggcacc 1740
ctggtcaccg tgtccagc 1758

<210> 346
<211> 577
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (9B11) VHCH1 Fc节 VL (4B9)
<400> 346

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Ser Gly Ala Tyr Pro Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365
Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
450 455 460
Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu
465 470 475 480
Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
485 490 495
Ser Val Thr Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
500 505 510
Ala Pro Arg Leu Leu Ile Asn Val Gly Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile
515 520 525
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
530 535 540
Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
545 550 555 560
Gly Ile Met Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
565 570 575
Lys

<210> 347
<211> 586
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> (9B11) VHCH1 Fc穴 VH (4B9)
<400> 347
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Ser Gly Ala Tyr Pro Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys

340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365

Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp

405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

450 455 460

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu

465 470 475 480

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe

485 490 495

Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys

500 505 510

Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr

515 520 525

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser

530 535 540

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr

545 550 555 560

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp

565 570 575

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

580 585

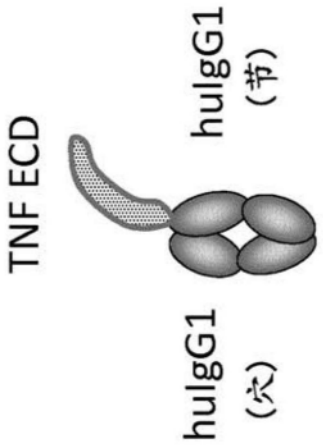


图1A

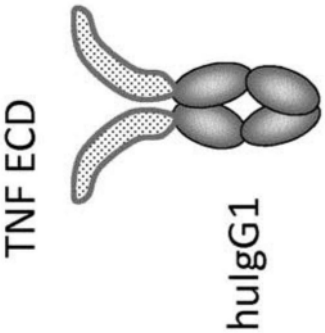


图1B

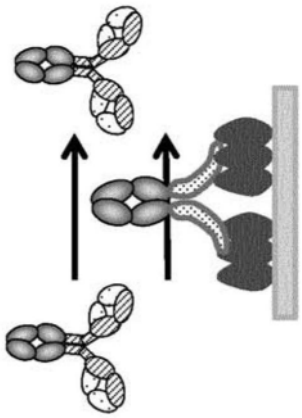


图1C

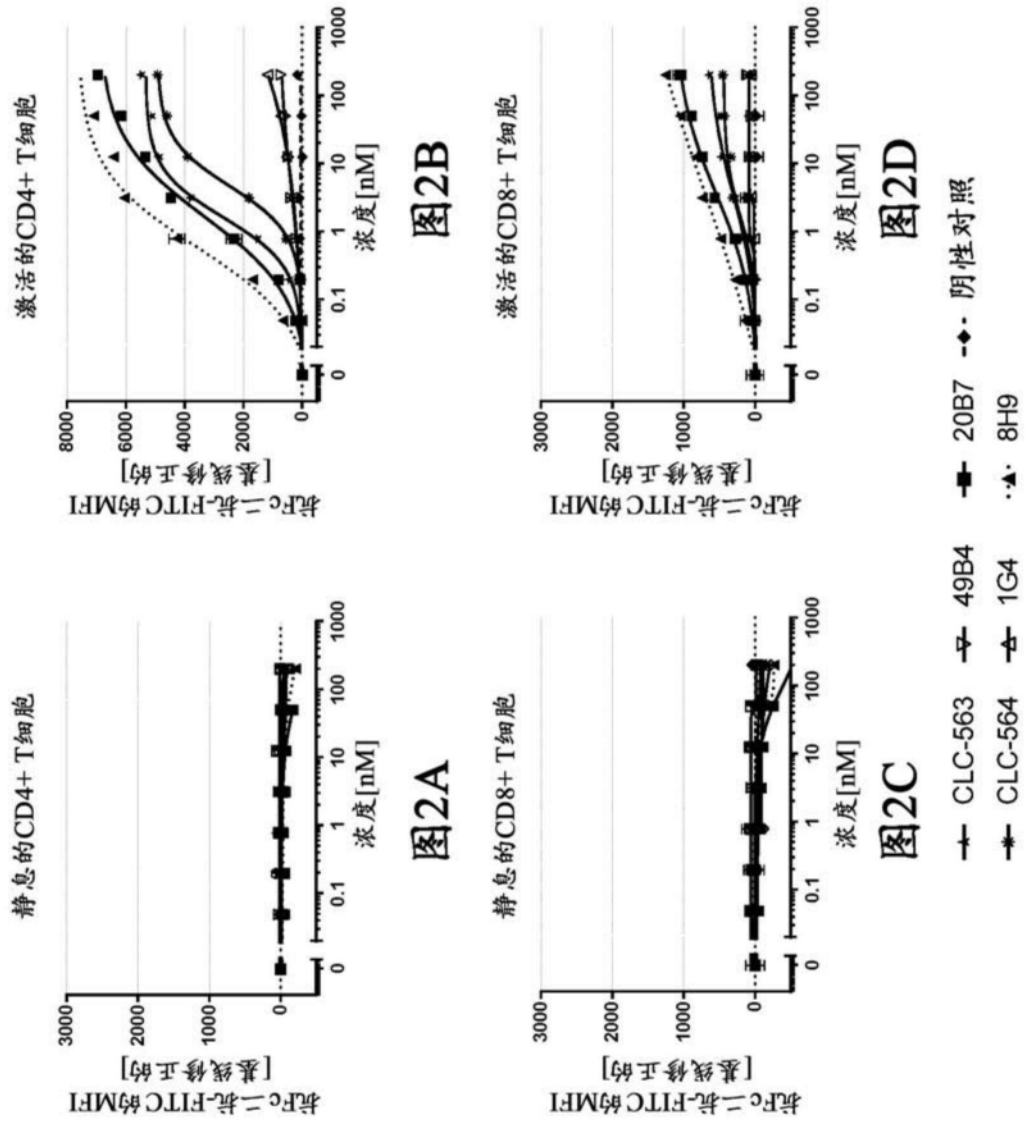

静息的CD4+ T细胞
激活的CD4+ T细胞
静息的CD8+ T细胞
激活的CD8+ T细胞
抗Fc二抗-FITC的MFI
[基线修正的]
浓度[nM]
0
0.1
1
10
100
1000
图2A
图2B
图2C
图2D
CLC-563
49B4
20B7
阴性对照
CLC-564
1G4
8H9

图2

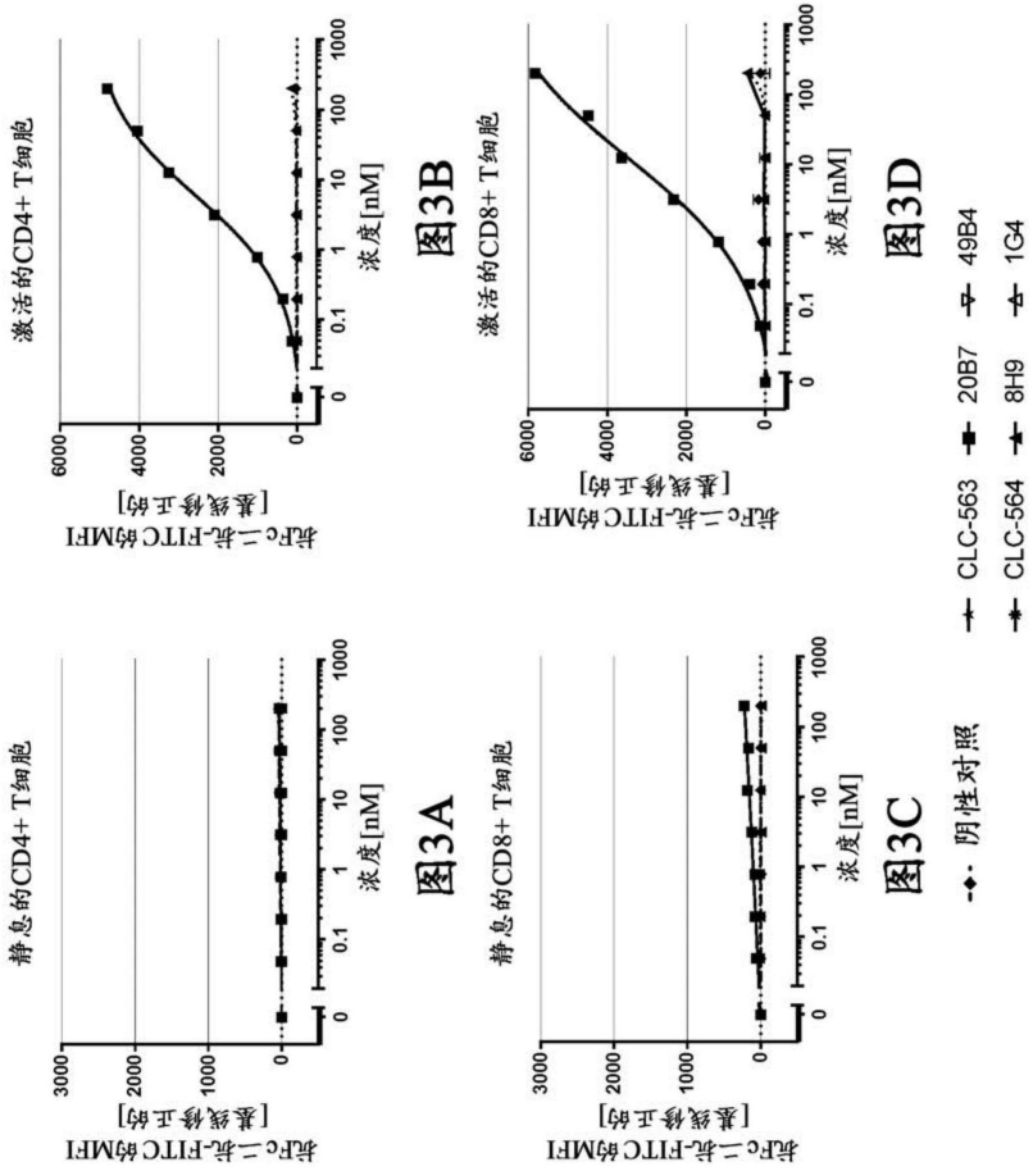

静息的CD4+ T细胞
抗Fc二抗-FITC的MFI
[基线修正的]
浓度[nM]
图3A
激活的CD4+ T细胞
抗Fc二抗-FITC的MFI
[基线修正的]
浓度[nM]
图3B
静息的CD8+ T细胞
抗Fc二抗-FITC的MFI
[基线修正的]
浓度[nM]
图3C
激活的CD8+ T细胞
抗Fc二抗-FITC的MFI
[基线修正的]
浓度[nM]
图3D
阴性对照
CLC-563
20B7
49B4
CLC-564
8H9
1G4

图3

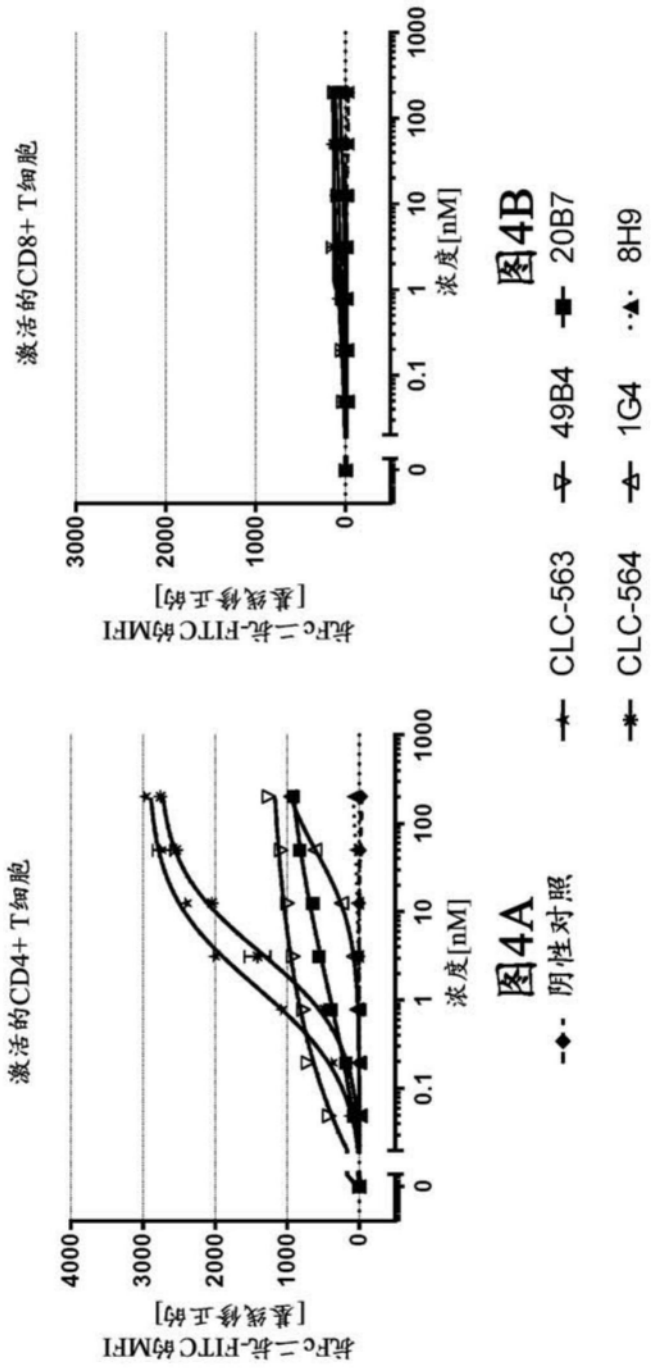

激活的CD4+ T细胞
抗Fc二抗-FITC的MFI
[基线修正的]
浓度[nM]
图4A
激活的CD8+ T细胞
抗Fc二抗-FITC的MFI
[基线修正的]
浓度[nM]
图4B
阴性对照
CLC-563
49B4
20B7
CLC-564
1G4
8H9

图4

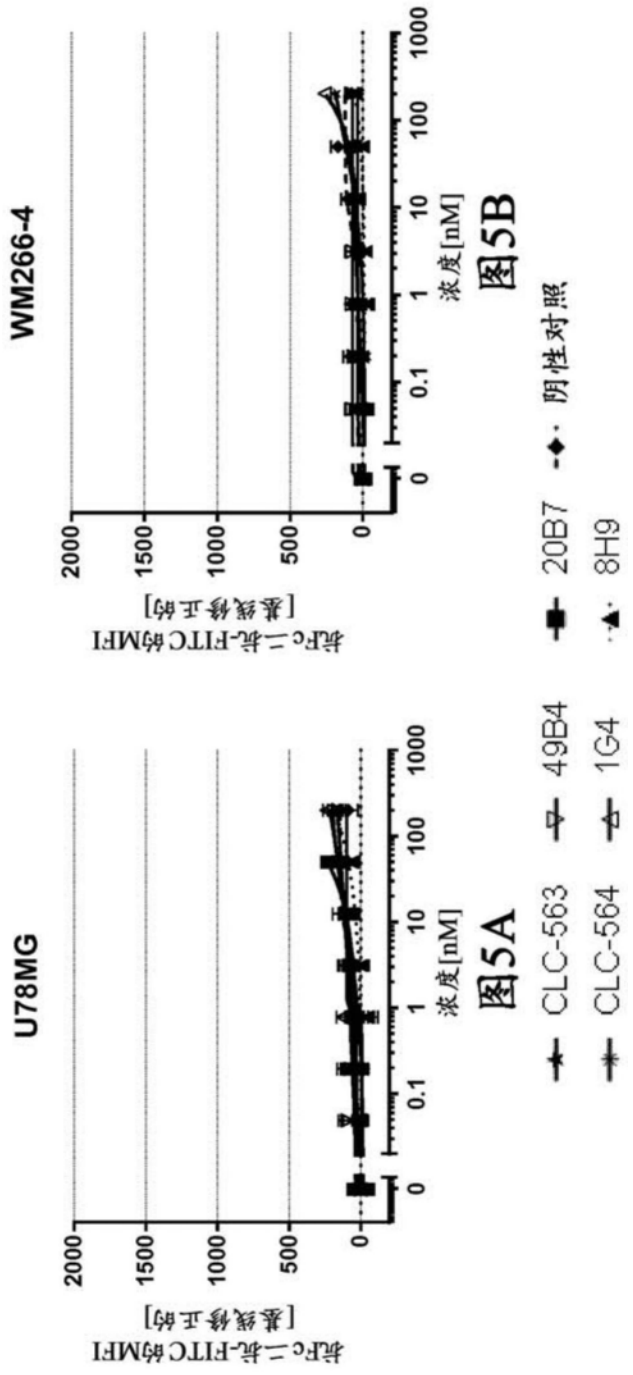

U78MG
WM266-4
抗Fc二抗-FITC的MFI
[基线修正的]
浓度[nM]
0
0.1
1
10
100
1000
500
1000
1500
2000
图5A
图5B
CLC-563
49B4
CLC-564
1G4
20B7
8H9
阴性对照

图5

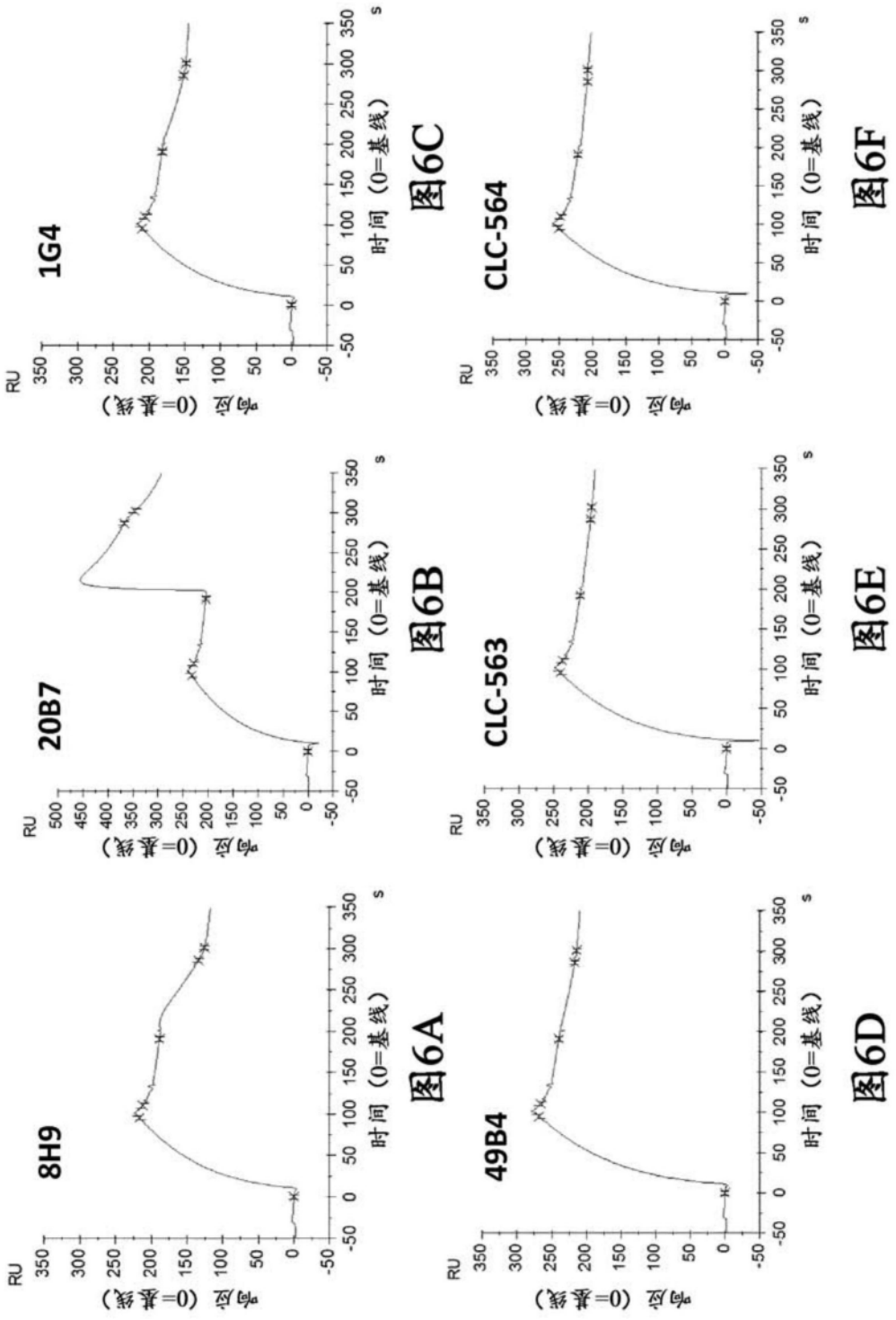


图6A 图6B 图6C 图6D 图6E 图6F

图6

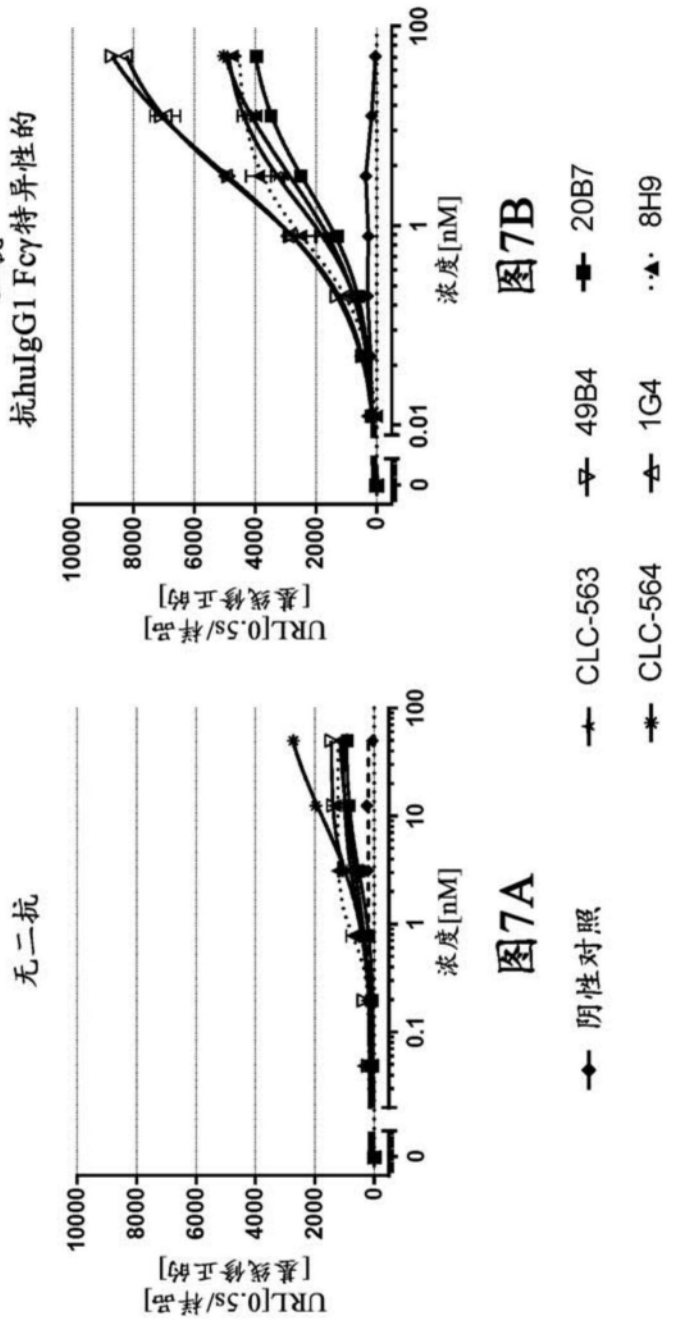

无二抗
二抗
抗huIgG1 Fcγ特异性的
URL[0.5s/样品]
[基线修正的]
浓度[nM]
0
2000
4000
6000
8000
10000
0.1
1
10
100
0.01
图7A
图7B
阴性对照
CLC-563
49B4
20B7
CLC-564
1G4
8H9

图7

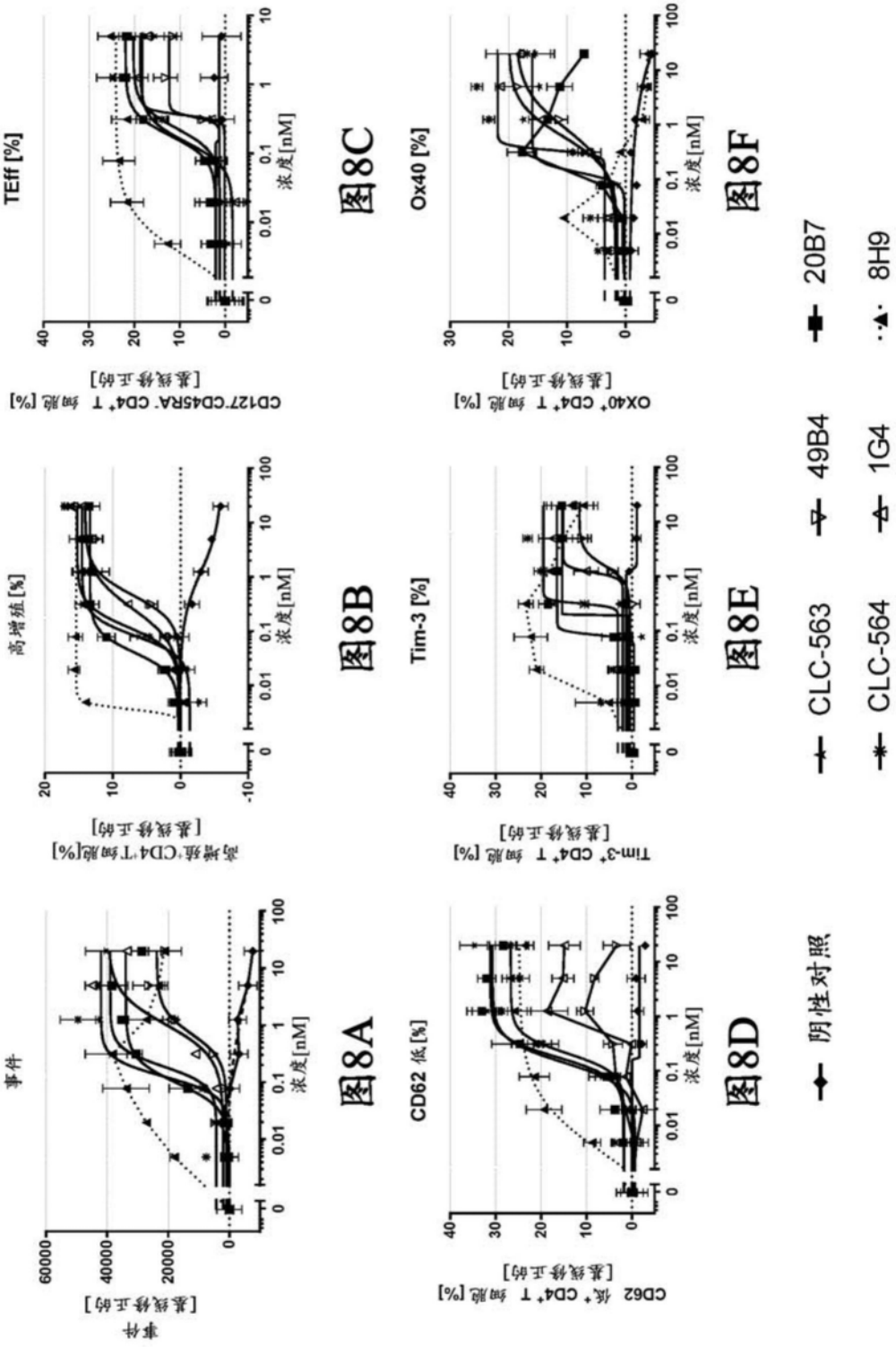

事件
[基线修正的]
浓度[nM]
图8A
高增殖[%]
[基线修正的]
浓度[nM]
图8B
TEff [%]
[基线修正的]
浓度[nM]
图8C
CD62 低[%]
[基线修正的]
浓度[nM]
图8D
Tim-3 [%]
[基线修正的]
浓度[nM]
图8E
Ox40 [%]
[基线修正的]
浓度[nM]
图8F
阴性对照
CLC-563
CLC-564
49B4
1G4
20B7
8H9

图8

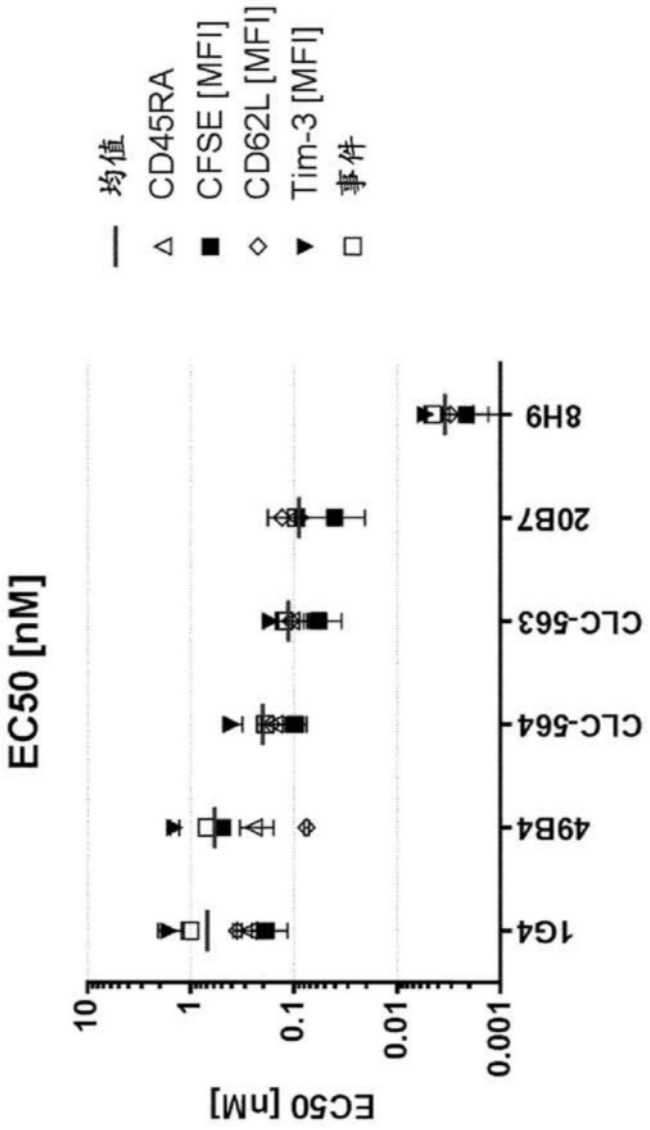

均值
CD45RA
CFSE [MFI]
CD62L [MFI]
Tim-3 [MFI]
事件
EC50 [nM]
10
1
0.1
0.01
0.001
1G4
49B4
CLC-564
CLC-563
20B7
8H9

图9

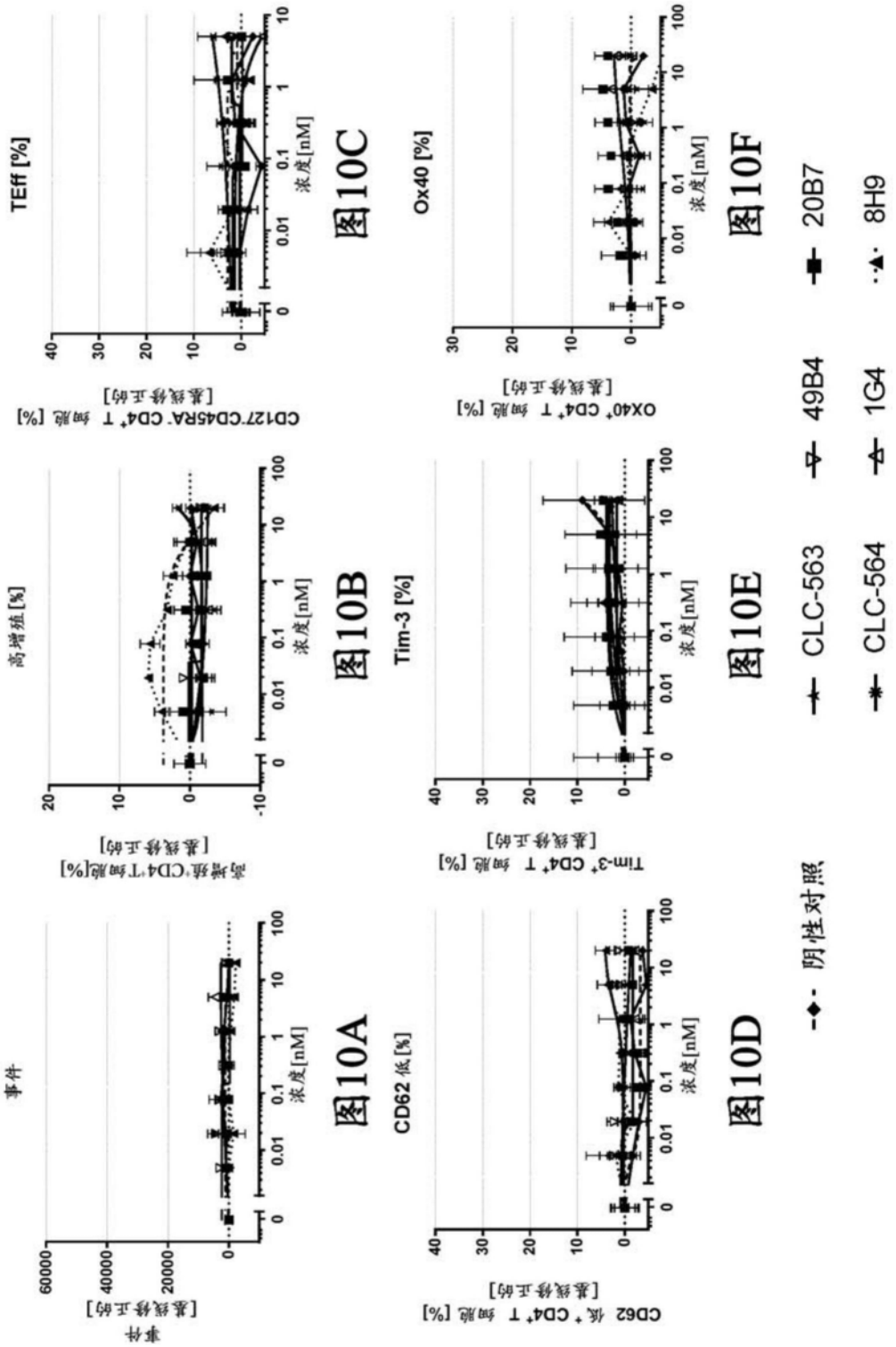

事件
基线修正的
浓度[nM]
图10A
高增殖[%]
高增殖CD4+T细胞[%]
基线修正的
浓度[nM]
图10B
TEff [%]
CD127-CD45RA- CD4+ T 细胞 [%]
基线修正的
浓度[nM]
图10C
CD62 低[%]
CD62 低+ CD4+ T 细胞 [%]
基线修正的
浓度[nM]
图10D
Tim-3 [%]
Tim-3+ CD4+ T 细胞 [%]
基线修正的
浓度[nM]
图10E
Ox40 [%]
OX40+ CD4+ T 细胞 [%]
基线修正的
浓度[nM]
图10F
阴性对照
CLC-563
49B4
20B7
CLC-564
1G4
8H9

图10

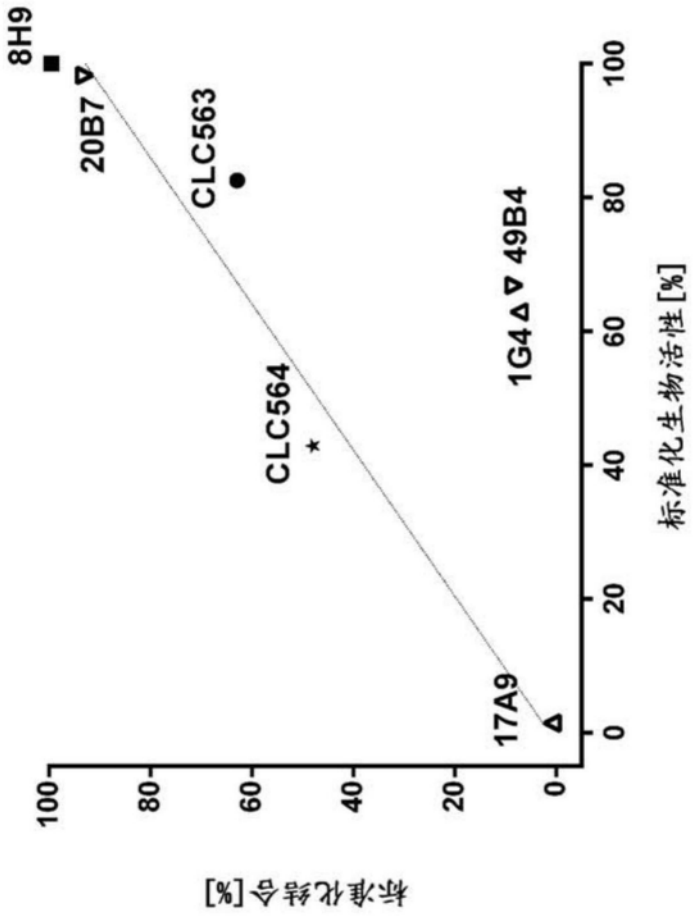

8H9
20B7
CLC563
CLC564
17A9
1G4
49B4
0
20
40
60
80
100
标准化结合[%]
标准化生物活性[%]

图11

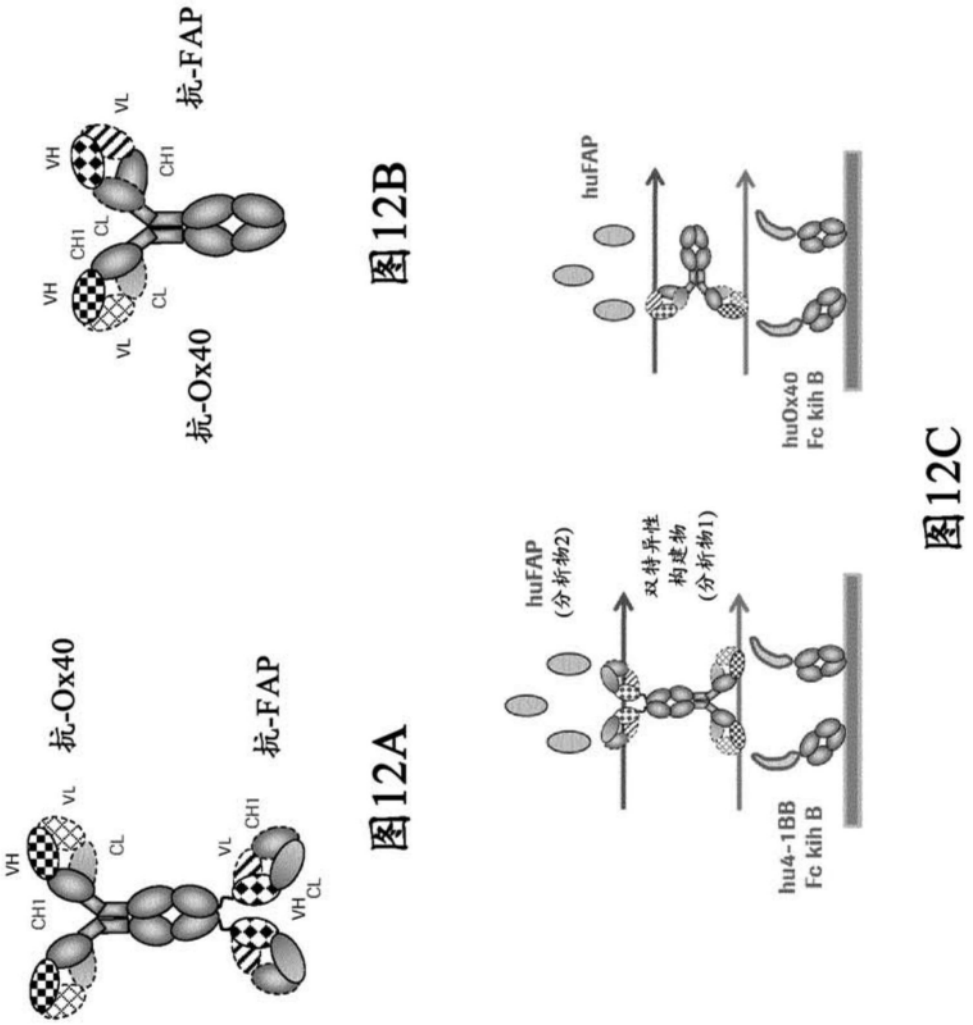

抗-Ox40
抗-FAP
VH
VL
CH1
CL
图12A
抗-FAP
抗-Ox40
图12B
huFAP
huOx40
Fc kih B
huFAP
(分析物2)
双特异性
构建物
(分析物1)
hu4-1BB
Fc kih B
图12C

图12

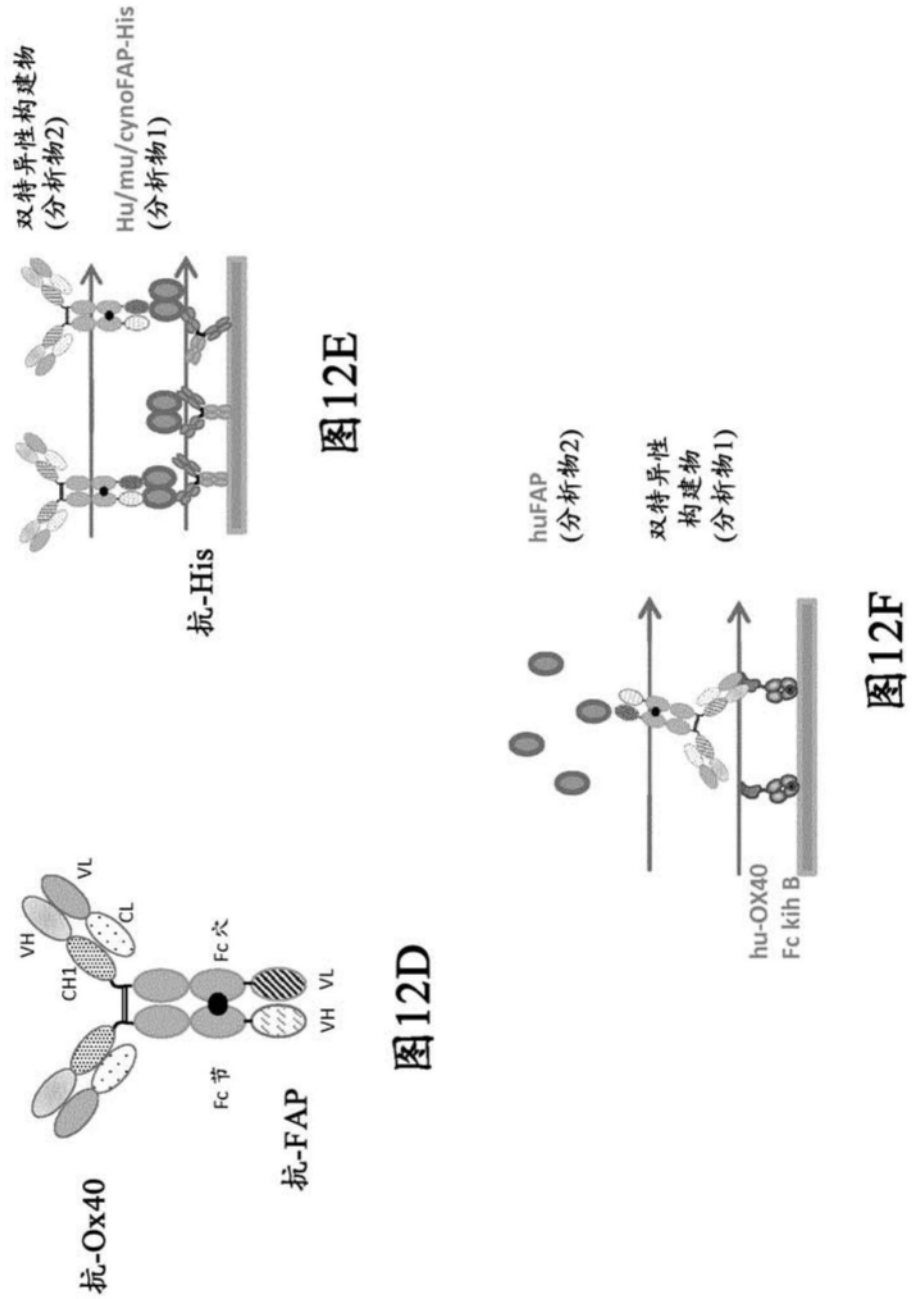

双特异性构建物
(分析物2)
Hu/mu/cynoFAP-His
(分析物1)
抗-His
图12E
huFAP
(分析物2)
双特异性
构建物
(分析物1)
hu-OX40
Fc kih B
图12F
VH
VL
CH1
CL
Fc 穴
Fc 节
VH VL
抗-FAP
抗-Ox40
图12D

图12(续)

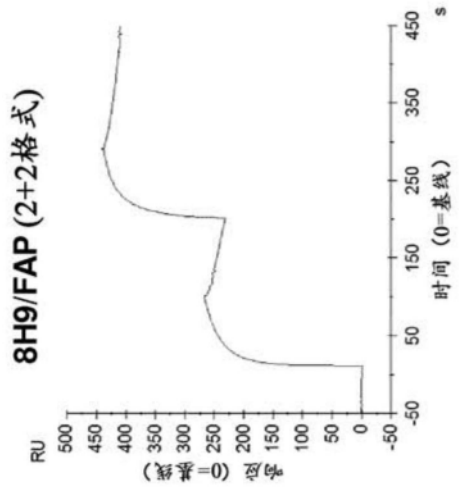

8H9/FAP (2+2格式)
RU
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
-50
响应 (0=基线)
-50
50
150
250
350
450
s
时间 (0=基线)

图13A

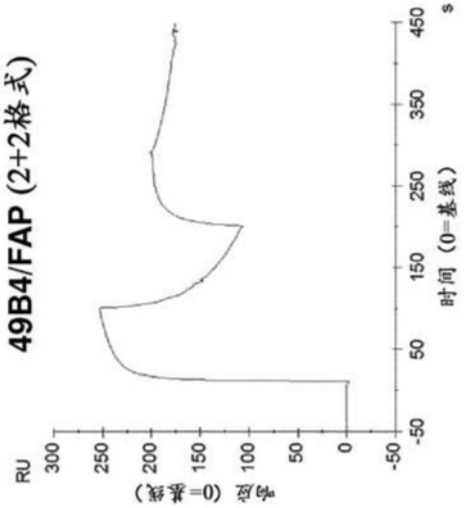

49B4/FAP (2+2格式)
RU
300
250
200
150
100
50
0
-50
响应 (0=基线)
-50
50
150
250
350
450
s
时间 (0=基线)

图13B

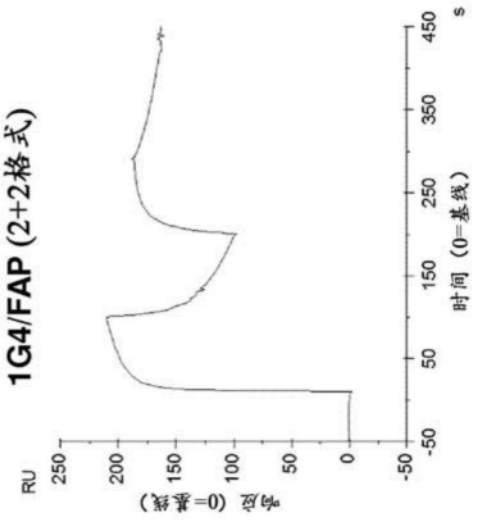

1G4/FAP (2+2格式)
RU
250
200
150
100
50
0
-50
响应 (0=基线)
-50
50
150
250
350
450
s
时间 (0=基线)

图13C

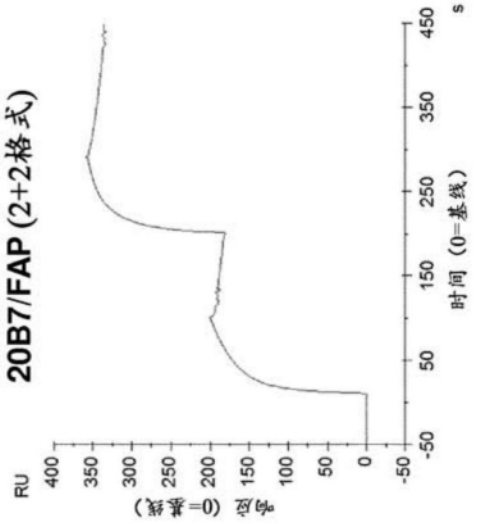

20B7/FAP (2+2格式)
RU
400
350
300
250
200
150
100
50
0
-50
响应 (0=基线)
-50
50
150
250
350
450
s
时间 (0=基线)

图13D

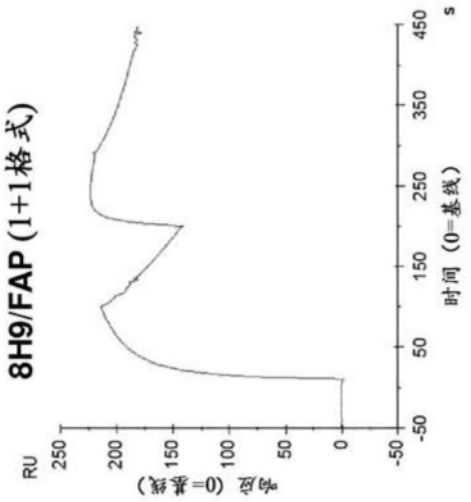

8H9/FAP (1+1格式)
RU
250
200
150
100
50
0
-50
响应 (0=基线)
-50
50
150
250
350
450
s
时间 (0=基线)

图13E

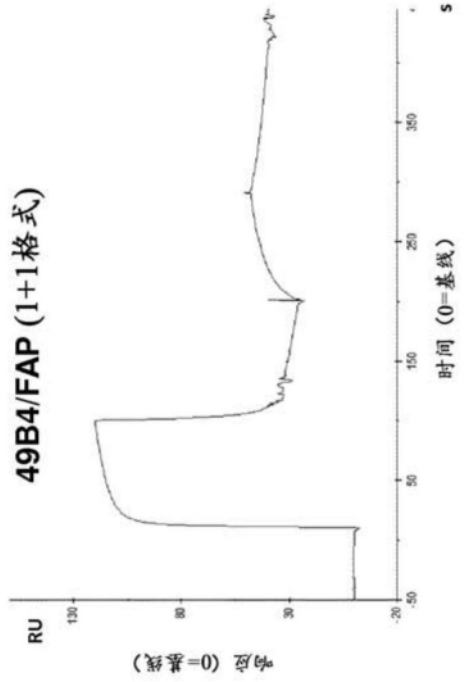

49B4/FAP (1+1格式)
RU
130
80
30
-20
响应 (0=基线)
-50
50
150
250
350
s
时间 (0=基线)

图13F

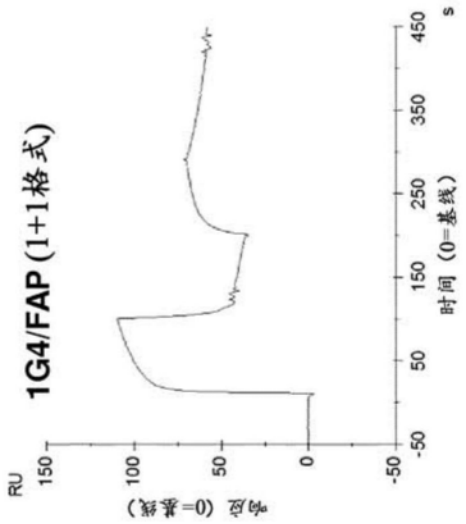

1G4/FAP (1+1格式)
RU
150
100
50
0
-50
响应 (0=基线)
-50
50
150
250
350
450
s
时间 (0=基线)

图13G

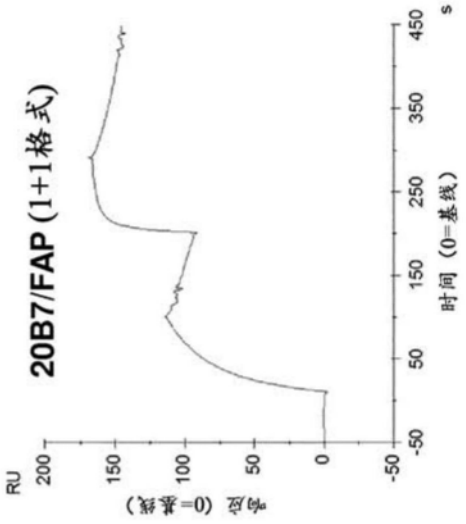

20B7/FAP (1+1格式)
RU
200
150
100
50
0
-50
响应 (0=基线)
-50
50
150
250
350
450
s
时间 (0=基线)

图13H

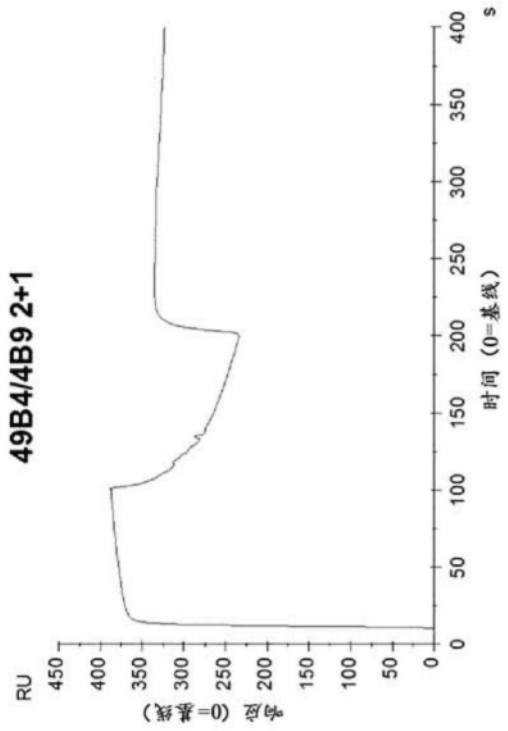

49B4/4B9 2+1
RU
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
响应 (0=基线)
0
50
100
150
200
250
300
350
400
s
时间 (0=基线)

图13J

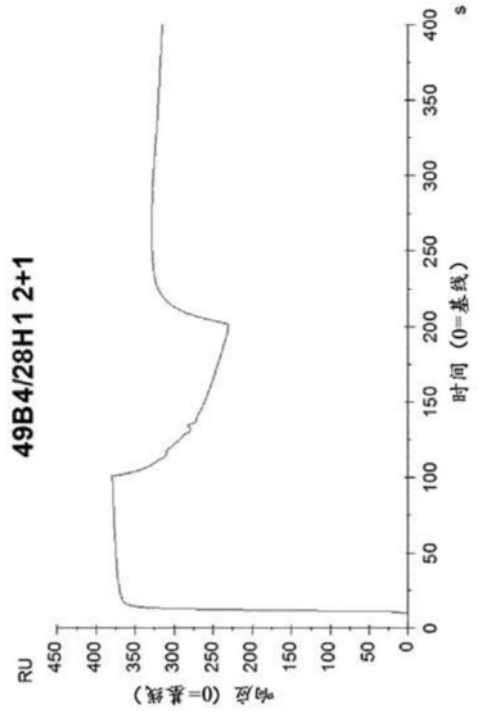

49B4/28H1 2+1
RU
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
响应 (0=基线)
0
50
100
150
200
250
300
350
400
s
时间 (0=基线)

图13K

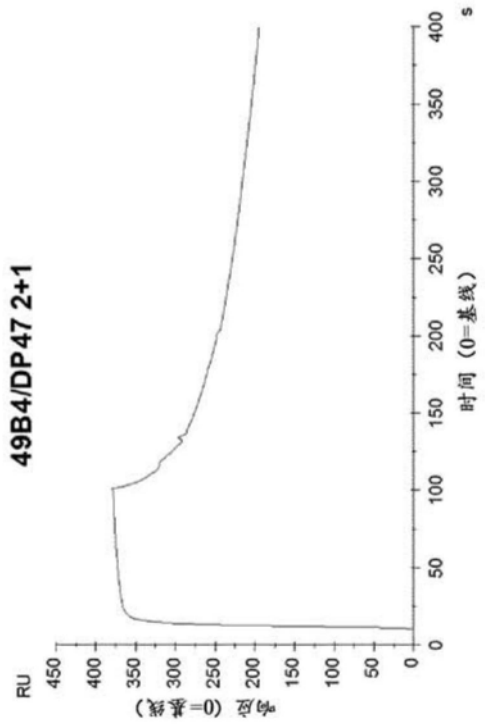

49B4/DP47 2+1
RU
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
响应 (0=基线)
0
50
100
150
200
250
300
350
400
时间 (0=基线)
s

图13L

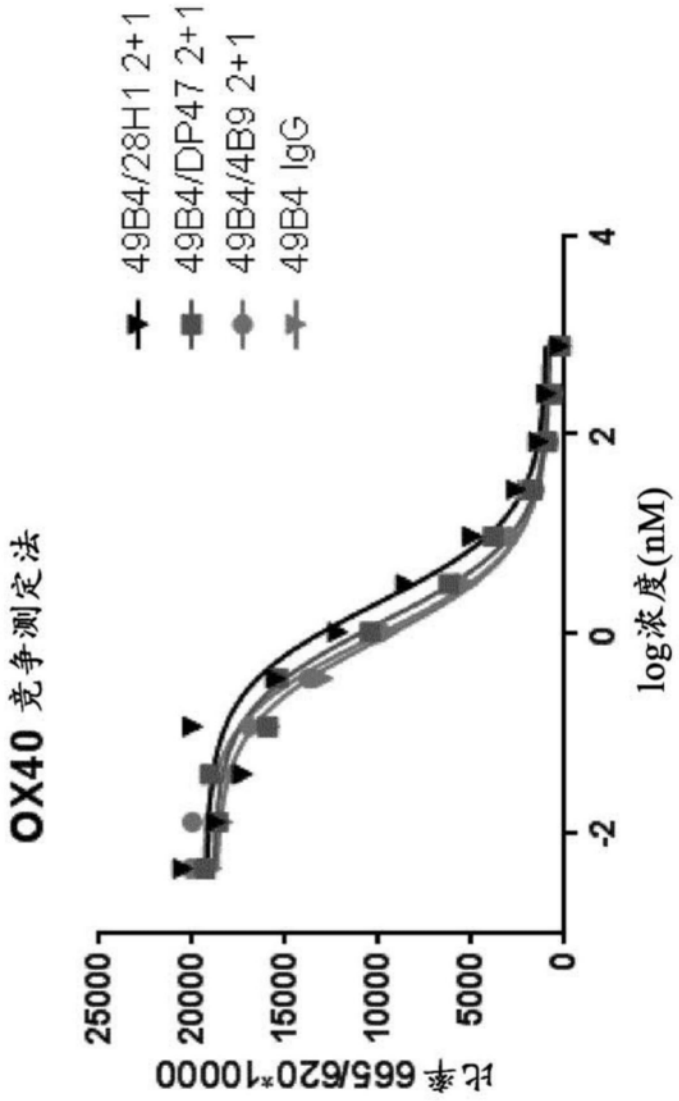

OX40 竞争测定法
49B4/28H1 2+1
49B4/DP47 2+1
49B4/4B9 2+1
49B4 IgG
比率 665/620*10000
25000
20000
15000
10000
5000
0
-2
0
2
4
log浓度(nM)

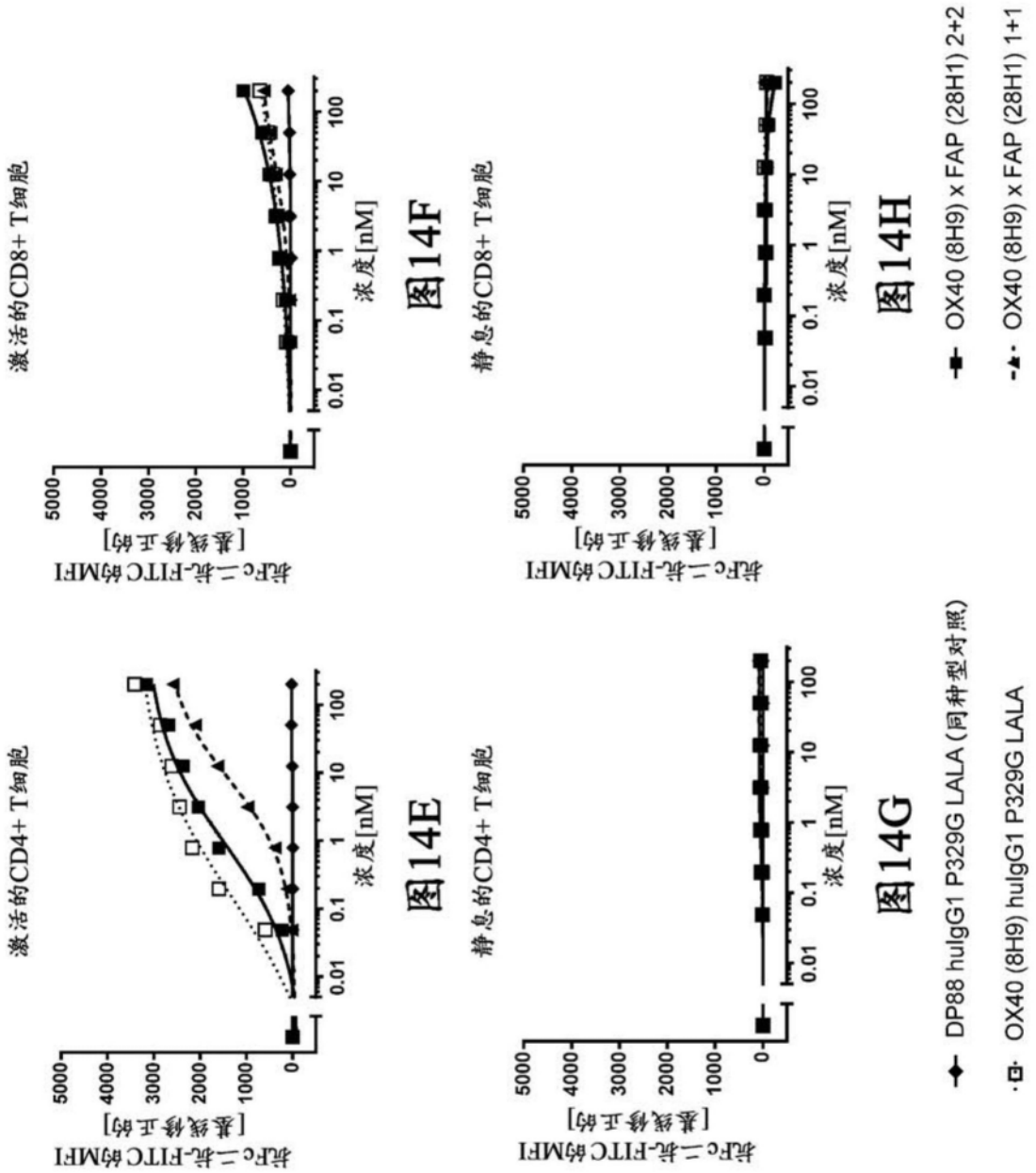
图13M

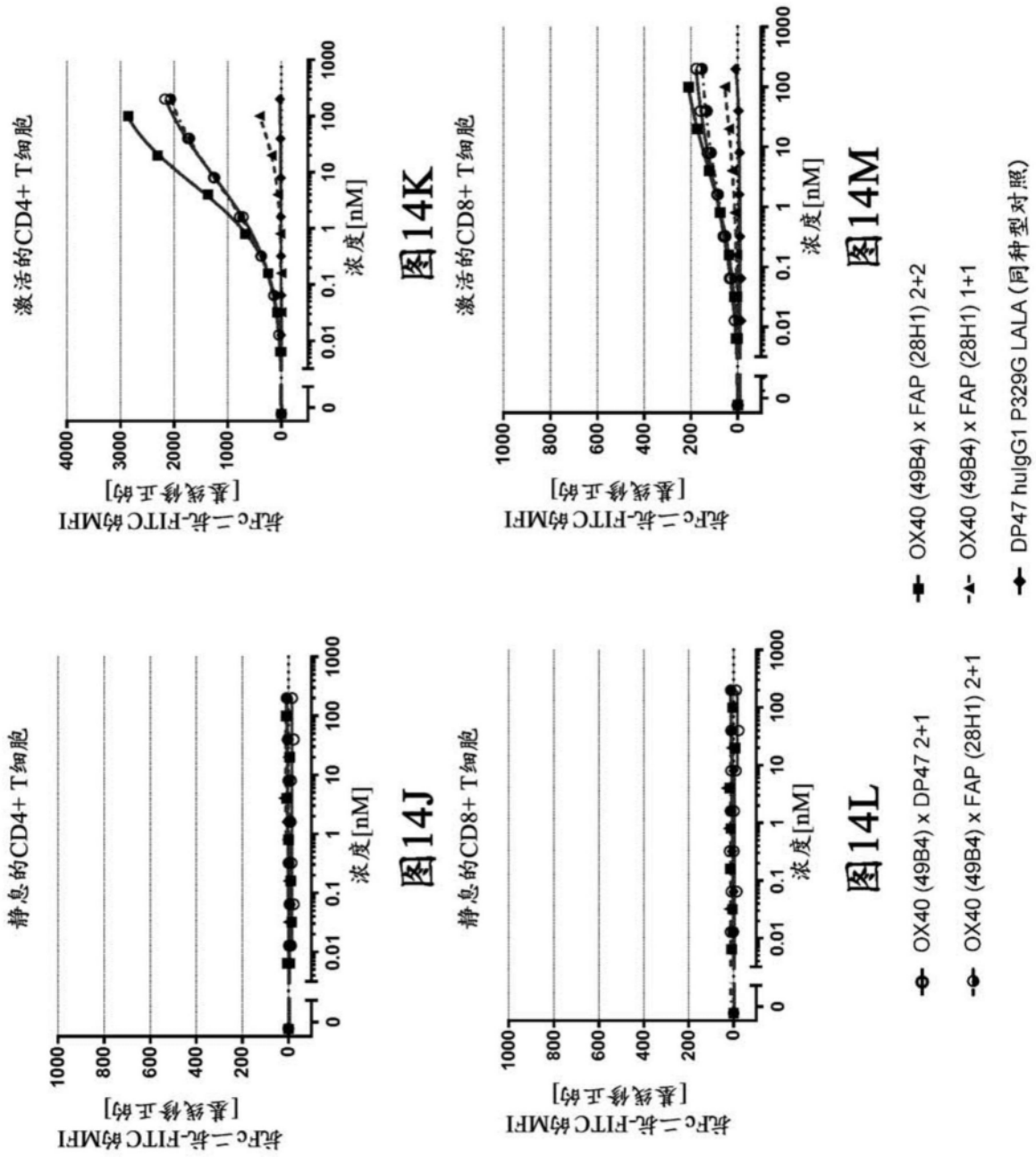
图14A

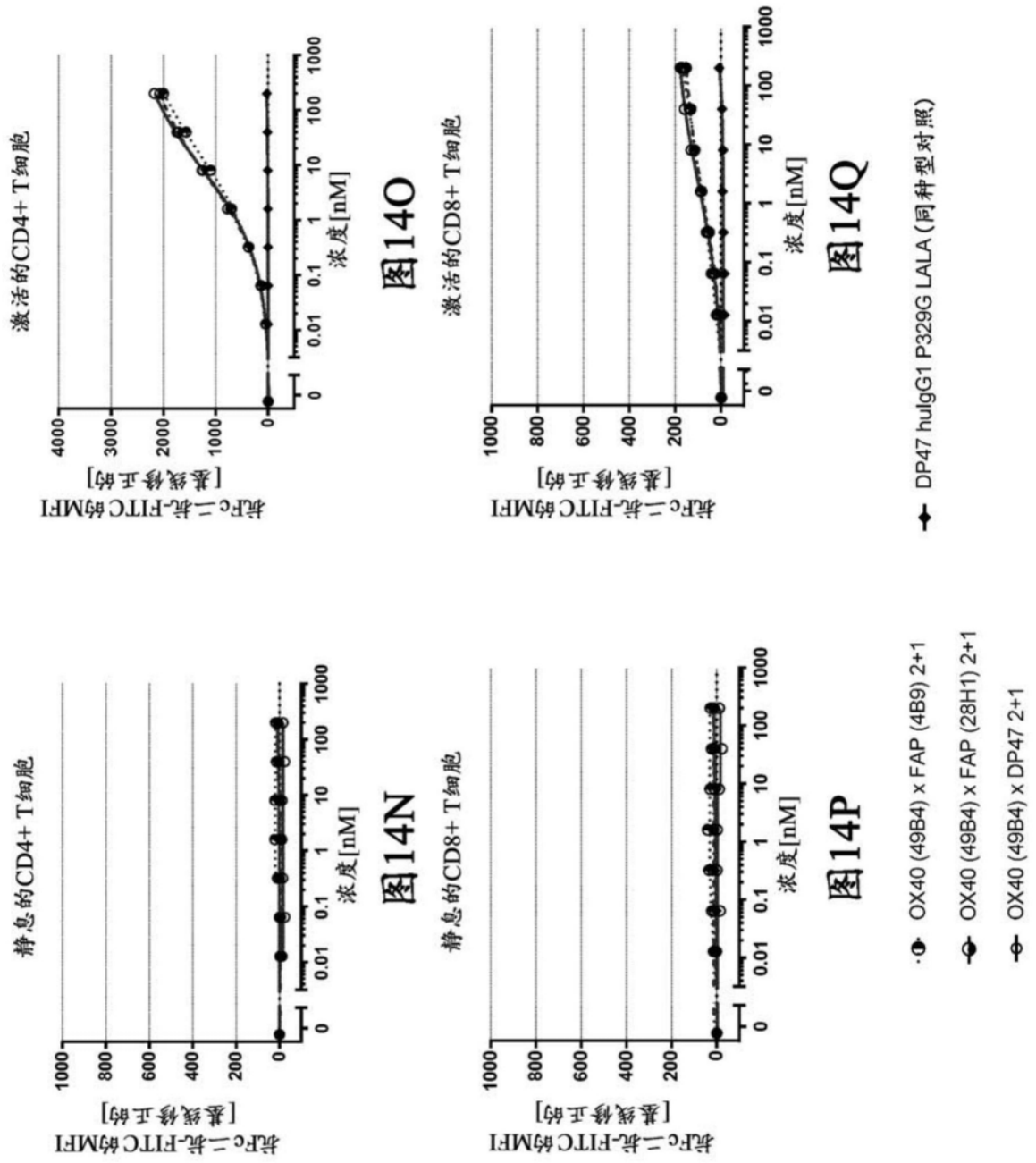
图14B

图14C

图14D


激活的CD4+ T细胞
抗Fc二抗-FITC的MFI
[基线修正的]
浓度[nM]
图14E
静息的CD4+ T细胞
图14G
激活的CD8+ T细胞
图14F
静息的CD8+ T细胞
图14H
DP88 hulgG1 P329G LALA (同种型对照)
OX40 (8H9) hulgG1 P329G LALA
OX40 (8H9) x FAP (28H1) 2+2
OX40 (8H9) x FAP (28H1) 1+1


静息的CD4+ T细胞
抗Fc二抗-FITC的MFI [基线修正的]
浓度[nM]
图14J
静息的CD8+ T细胞
抗Fc二抗-FITC的MFI [基线修正的]
浓度[nM]
图14L
激活的CD4+ T细胞
抗Fc二抗-FITC的MFI [基线修正的]
浓度[nM]
图14K
激活的CD8+ T细胞
抗Fc二抗-FITC的MFI [基线修正的]
浓度[nM]
图14M
OX40 (49B4) x DP47 2+1
OX40 (49B4) x FAP (28H1) 2+1
OX40 (49B4) x FAP (28H1) 2+2
OX40 (49B4) x FAP (28H1) 1+1
DP47 hulgG1 P329G LALA (同种型对照)


激活的CD4+ T细胞
抗Fc二抗-FITC的MFI
[基线修正的]
浓度[nM]
图14O
激活的CD8+ T细胞
抗Fc二抗-FITC的MFI
[基线修正的]
浓度[nM]
图14Q
DP47 hulgG1 P329G LALA (同种型对照)
静息的CD4+ T细胞
抗Fc二抗-FITC的MFI
[基线修正的]
浓度[nM]
图14N
静息的CD8+ T细胞
抗Fc二抗-FITC的MFI
[基线修正的]
浓度[nM]
图14P
OX40 (49B4) x FAP (4B9) 2+1
OX40 (49B4) x FAP (28H1) 2+1
OX40 (49B4) x DP47 2+1

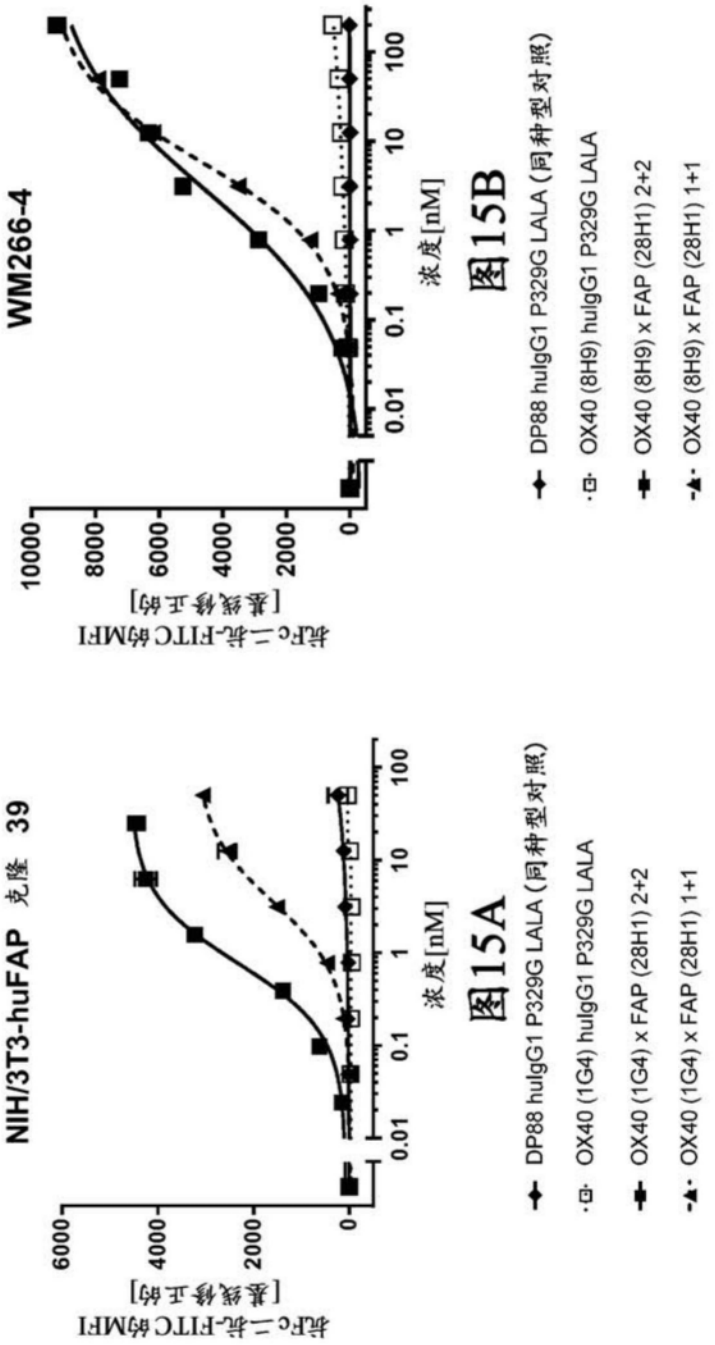

NIH/3T3-huFAP 克隆 39
WM266-4
抗Fc二抗-FITC的MFI
[基线修正的]
浓度[nM]
0.01
0.1
1
10
100
0
2000
4000
6000
8000
10000
DP88 hulgG1 P329G LALA (同种型对照)
OX40 (1G4) hulgG1 P329G LALA
OX40 (1G4) x FAP (28H1) 2+2
OX40 (1G4) x FAP (28H1) 1+1
OX40 (8H9) hulgG1 P329G LALA
OX40 (8H9) x FAP (28H1) 2+2
OX40 (8H9) x FAP (28H1) 1+1

图15A

图15B

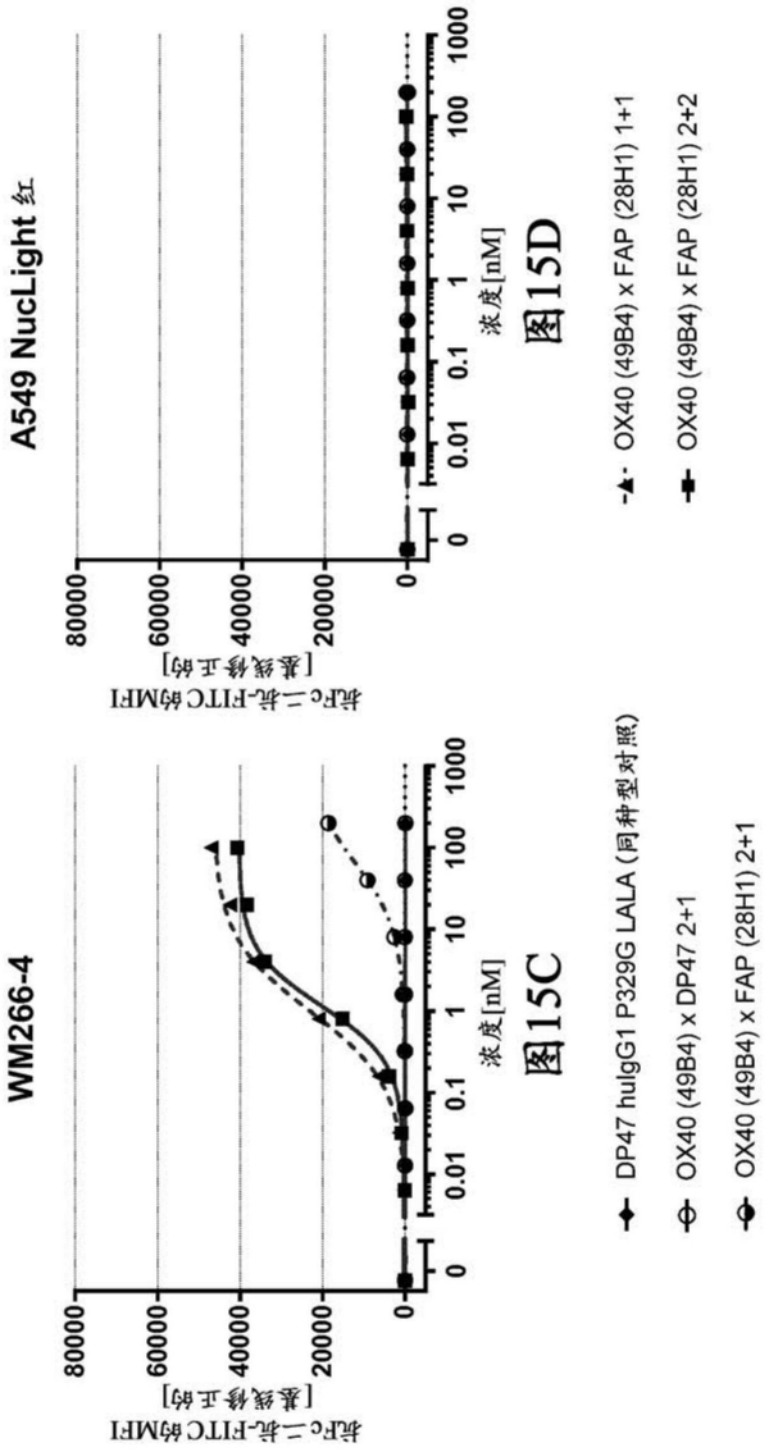

WM266-4
A549 NucLight 红
抗Fc二抗-FITC的MFI
[基线修正的]
浓度[nM]
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
20000
40000
60000
80000
DP47 hulgG1 P329G LALA (同种型对照)
OX40 (49B4) x DP47 2+1
OX40 (49B4) x FAP (28H1) 2+1
OX40 (49B4) x FAP (28H1) 1+1
OX40 (49B4) x FAP (28H1) 2+2

图15C 图15D

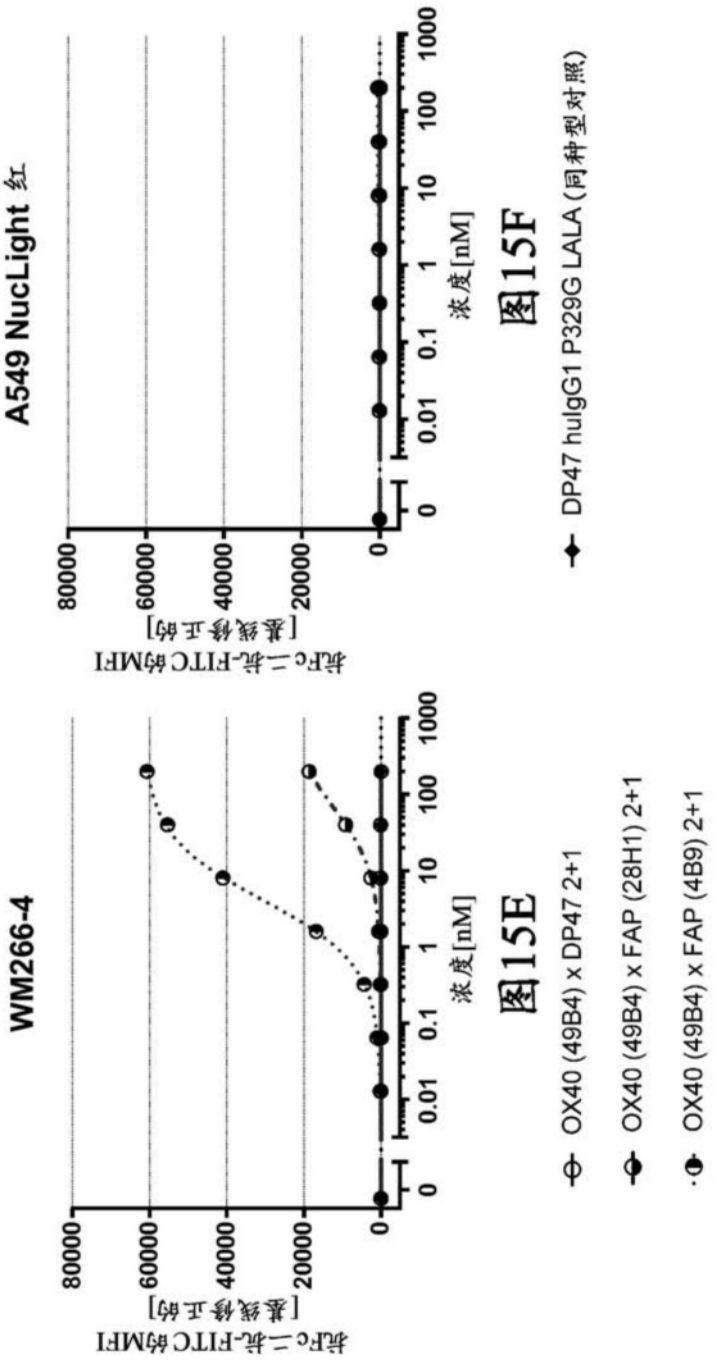
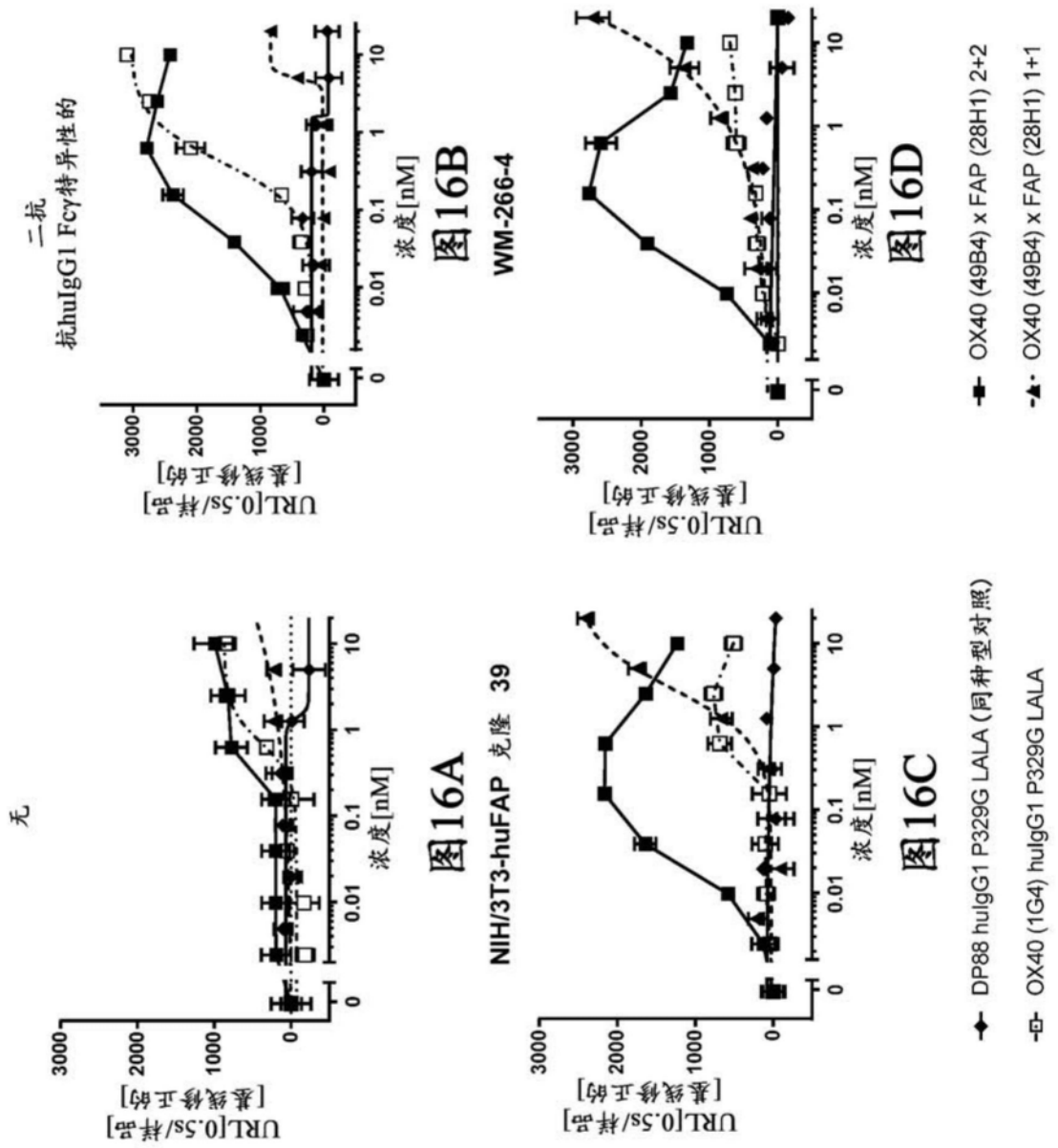

A549 NucLight 红
WM266-4
抗Fc二抗-FITC的MFI
[基线修正的]
浓度[nM]
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
20000
40000
60000
80000
OX40 (49B4) x DP47 2+1
OX40 (49B4) x FAP (28H1) 2+1
OX40 (49B4) x FAP (4B9) 2+1
DP47 hulgG1 P329G LALA (同种型对照)

图15E

图15F


无
URL[0.5s/样品]
[基线修正的]
浓度[nM]
图16A
二抗
抗huIgG1 Fcγ特异性的
图16B
NIH/3T3-huFAP 克隆 39
图16C
WM-266-4
图16D
DP88 huIgG1 P329G LALA (同种型对照)
OX40 (1G4) huIgG1 P329G LALA
OX40 (49B4) x FAP (28H1) 2+2
OX40 (49B4) x FAP (28H1) 1+1

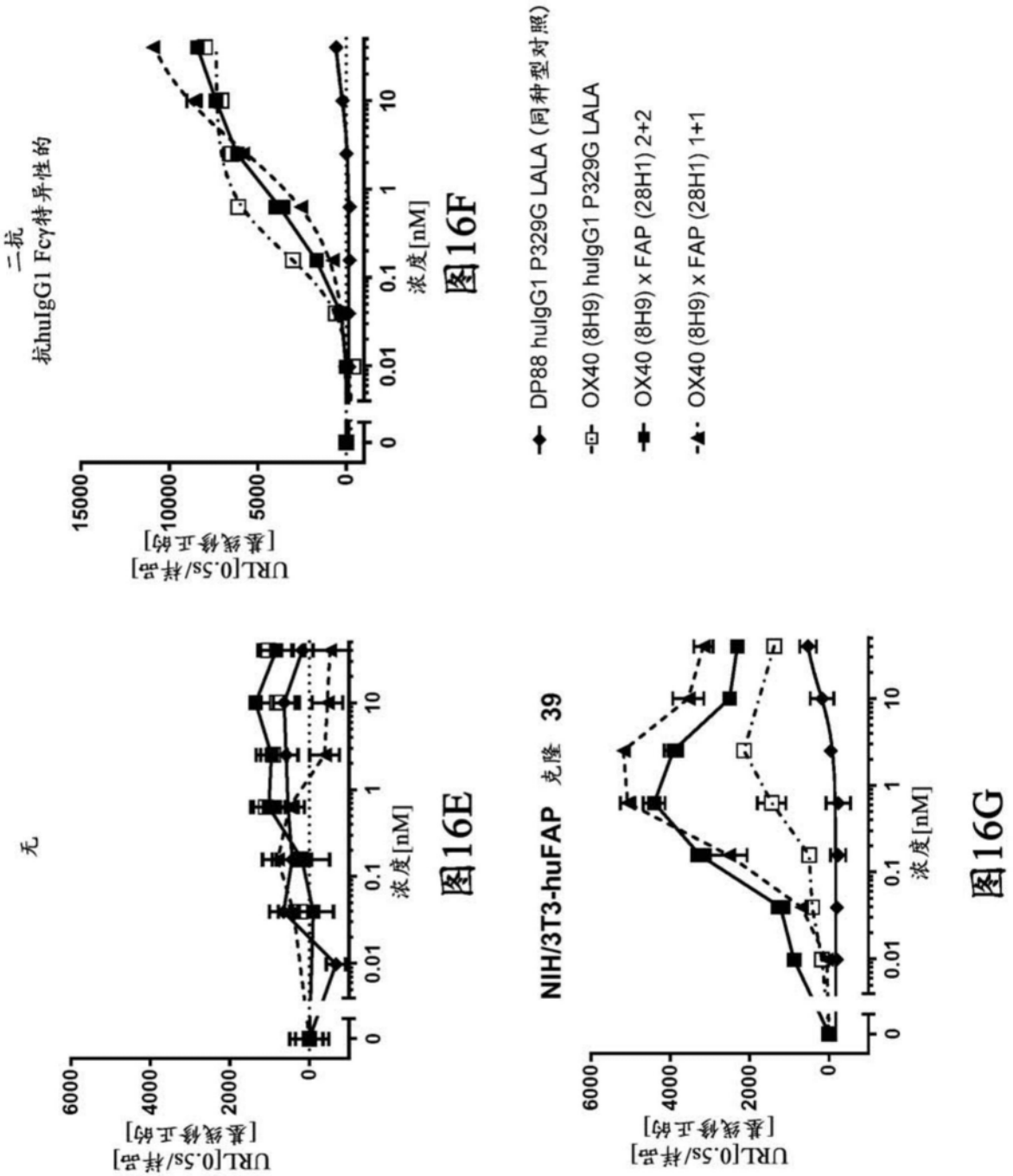


图16F

图16E

图16G

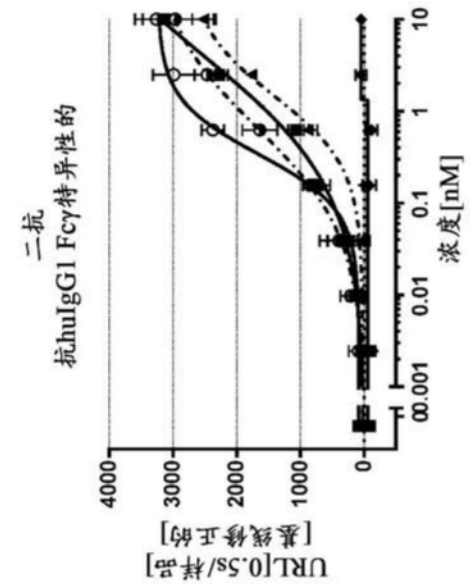
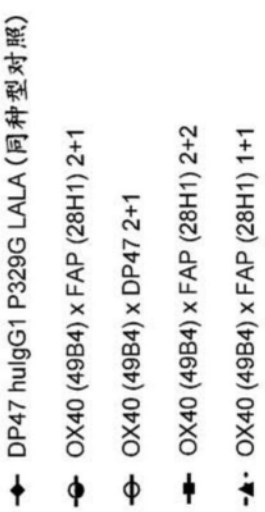


图16J



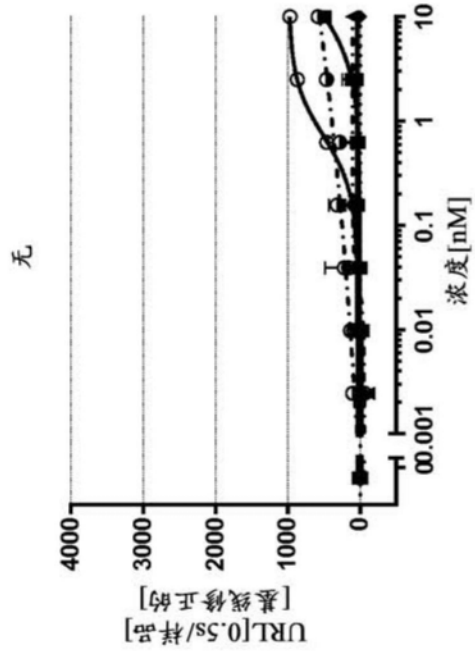


图16H

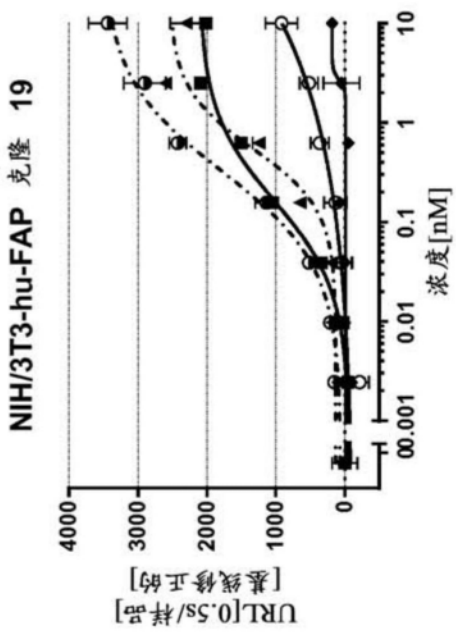


图16K

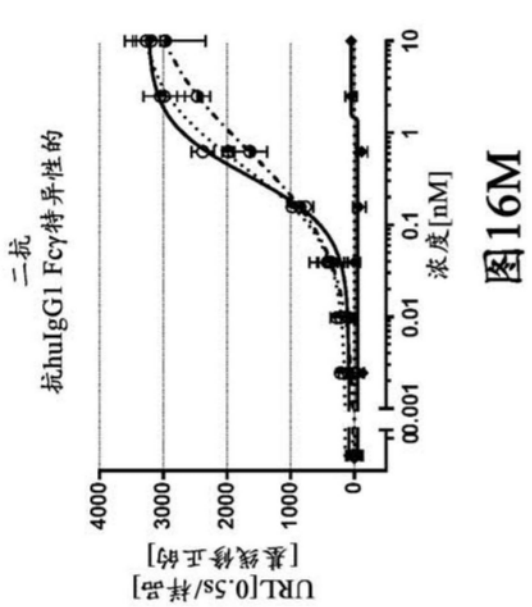


图16M

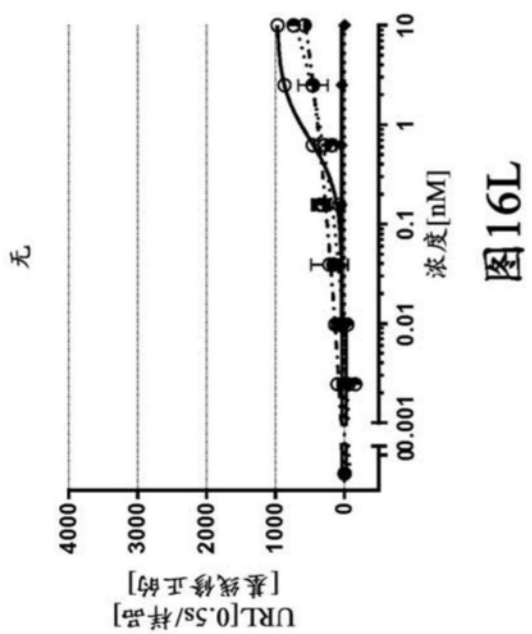
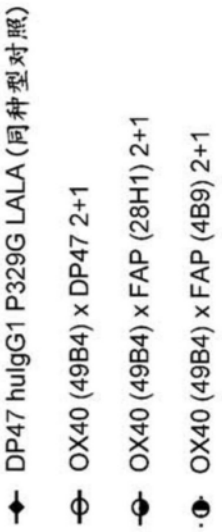


图16L



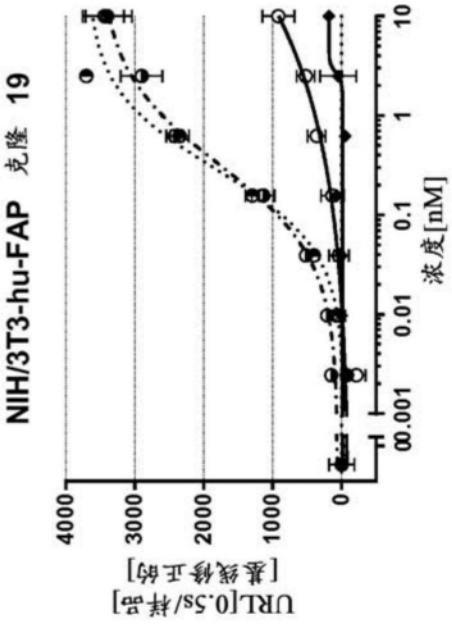
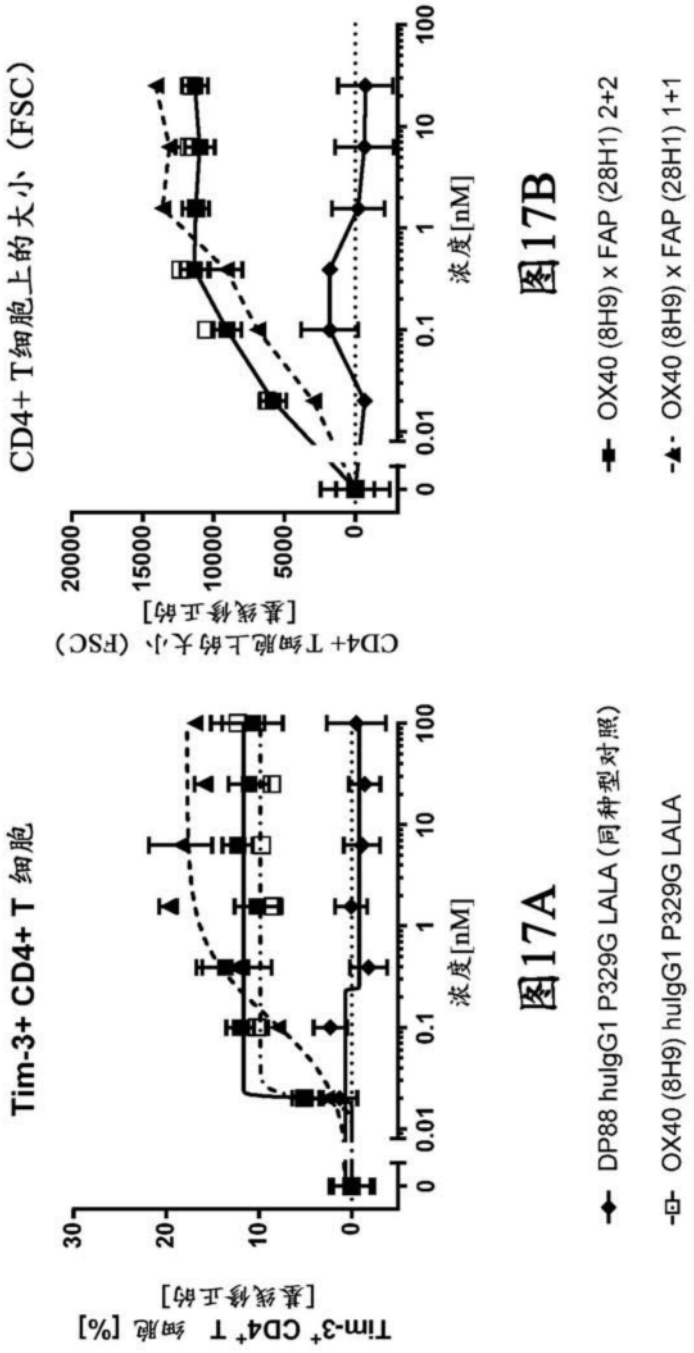


图16N


CD4+ T细胞上的大小（FSC）
[基线修正的]
浓度[nM]
0
0.01
0.1
1
10
100
5000
10000
15000
20000
OX40 (8H9) x FAP (28H1) 2+2
OX40 (8H9) x FAP (28H1) 1+1
图17B
Tim-3+ CD4+ T 细胞
Tim-3+ CD4+ T 细胞 [%]
[基线修正的]
浓度[nM]
0
10
20
30
DP88 hulgG1 P329G LALA (同种型对照)
OX40 (8H9) hulgG1 P329G LALA
图17A

Tim-3+ CD4+ T 细胞 [%]
[基线修正的]
浓度[nM]
图18A
增殖 CD4+ T 细胞 [%]
[基线修正的]
浓度[nM]
图18B
CD127 低 CD4+ T 细胞 [%]
[基线修正的]
浓度[nM]
图18C
CD4+ T细胞上的Ox40 [MFI]
[基线修正的]
浓度[nM]
图18D
DP88 hulgG1 P329G LALA (同种型对照)
OX40 (1G4) hulgG1 P329G LALA
OX40 (1G4) x FAP (28H1) 2+2
OX40 (1G4) x FAP (28H1) 1+1

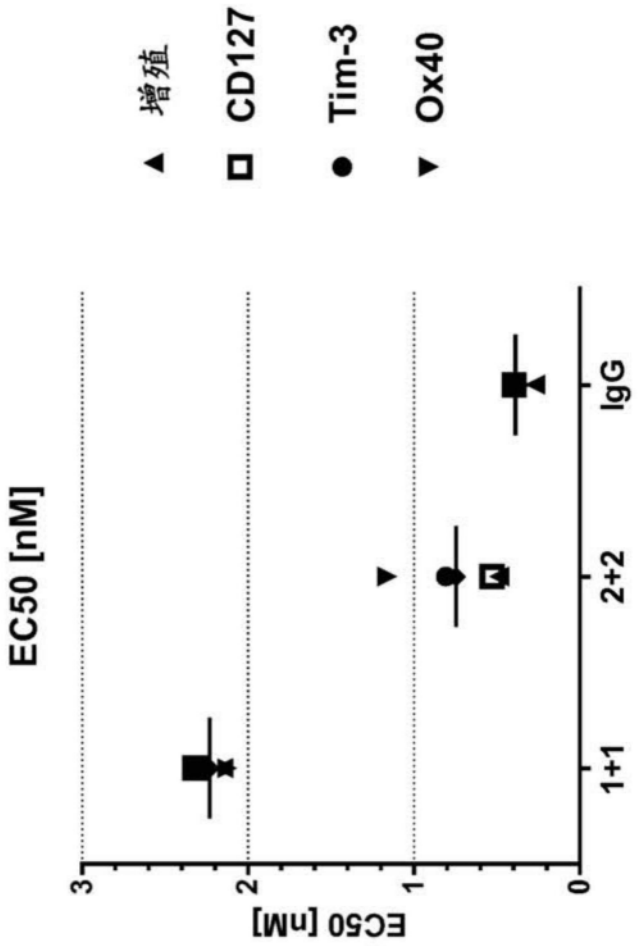
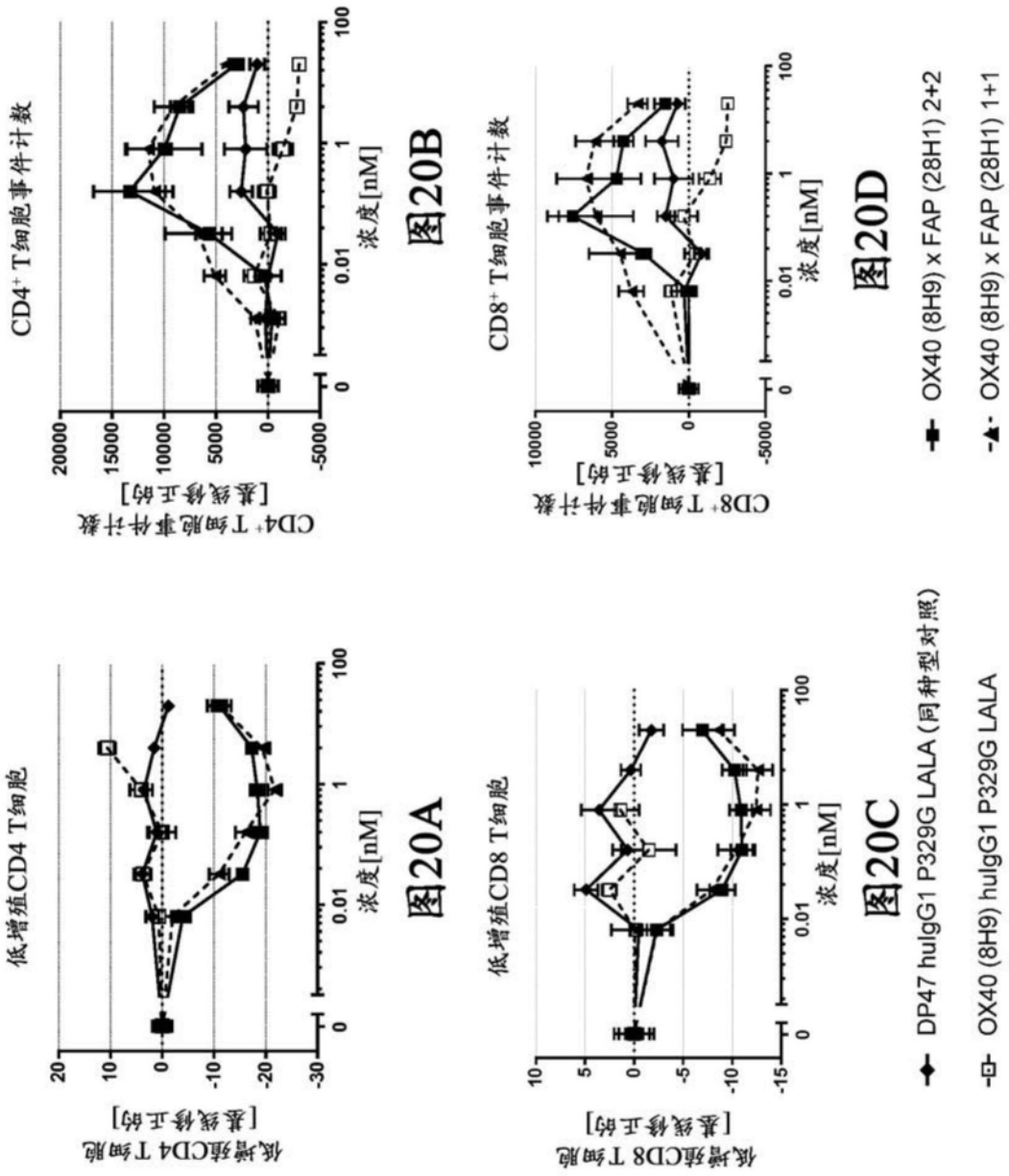


图19


低增殖CD4 T细胞
[基线修正的]
浓度[nM]
图20A
CD4+ T细胞事件计数
[基线修正的]
浓度[nM]
图20B
低增殖CD8 T细胞
[基线修正的]
浓度[nM]
图20C
CD8+ T细胞事件计数
[基线修正的]
浓度[nM]
图20D
DP47 hulgG1 P329G LALA (同种型对照)
OX40 (8H9) hulgG1 P329G LALA
OX40 (8H9) x FAP (28H1) 2+2
OX40 (8H9) x FAP (28H1) 1+1

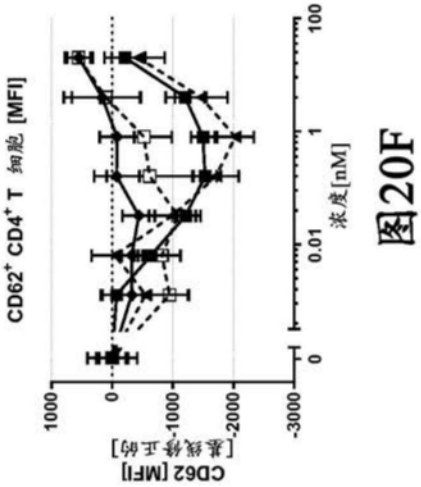


图20F

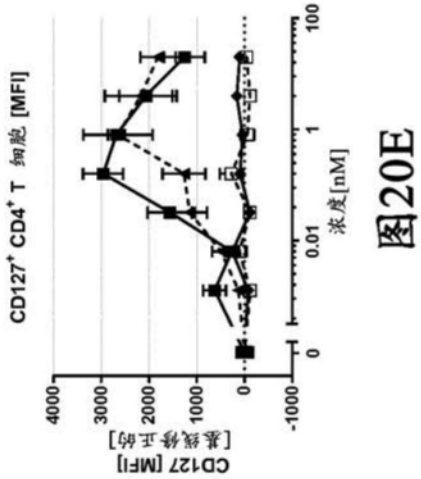


图20E

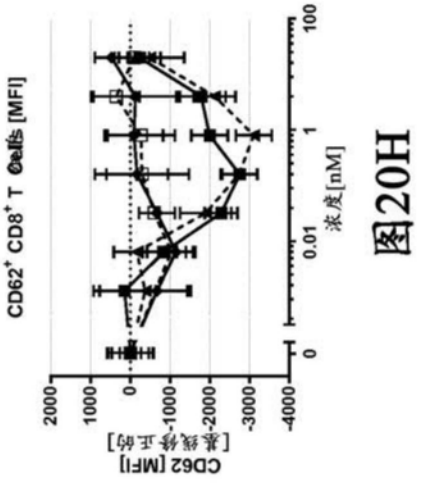


图20H

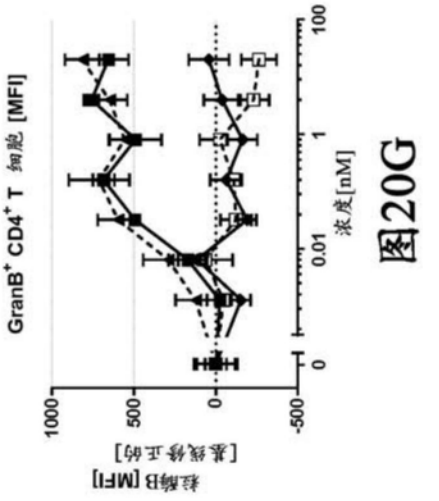


图20G



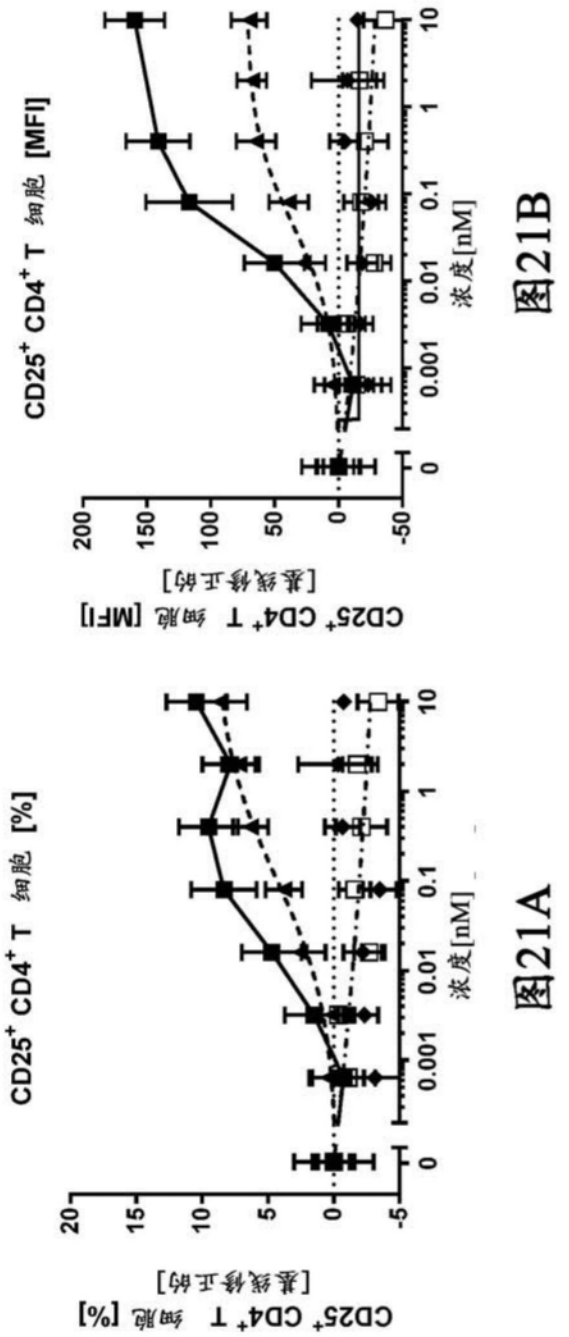


图21A

图21B

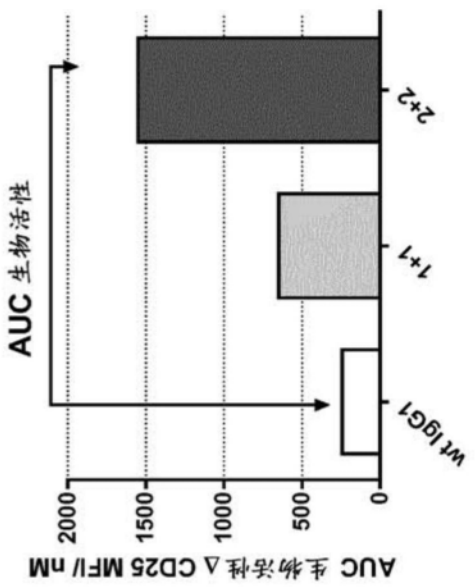
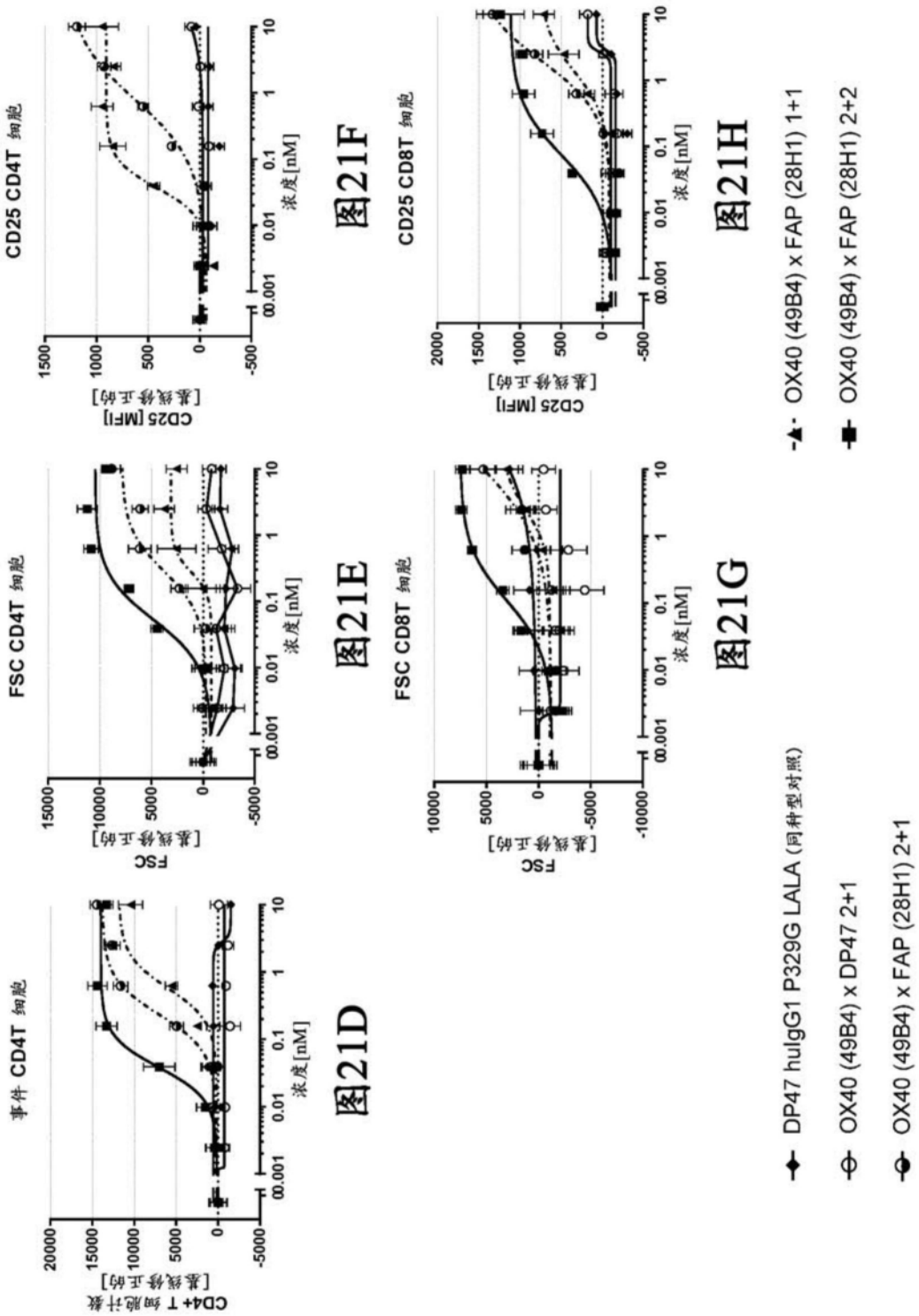
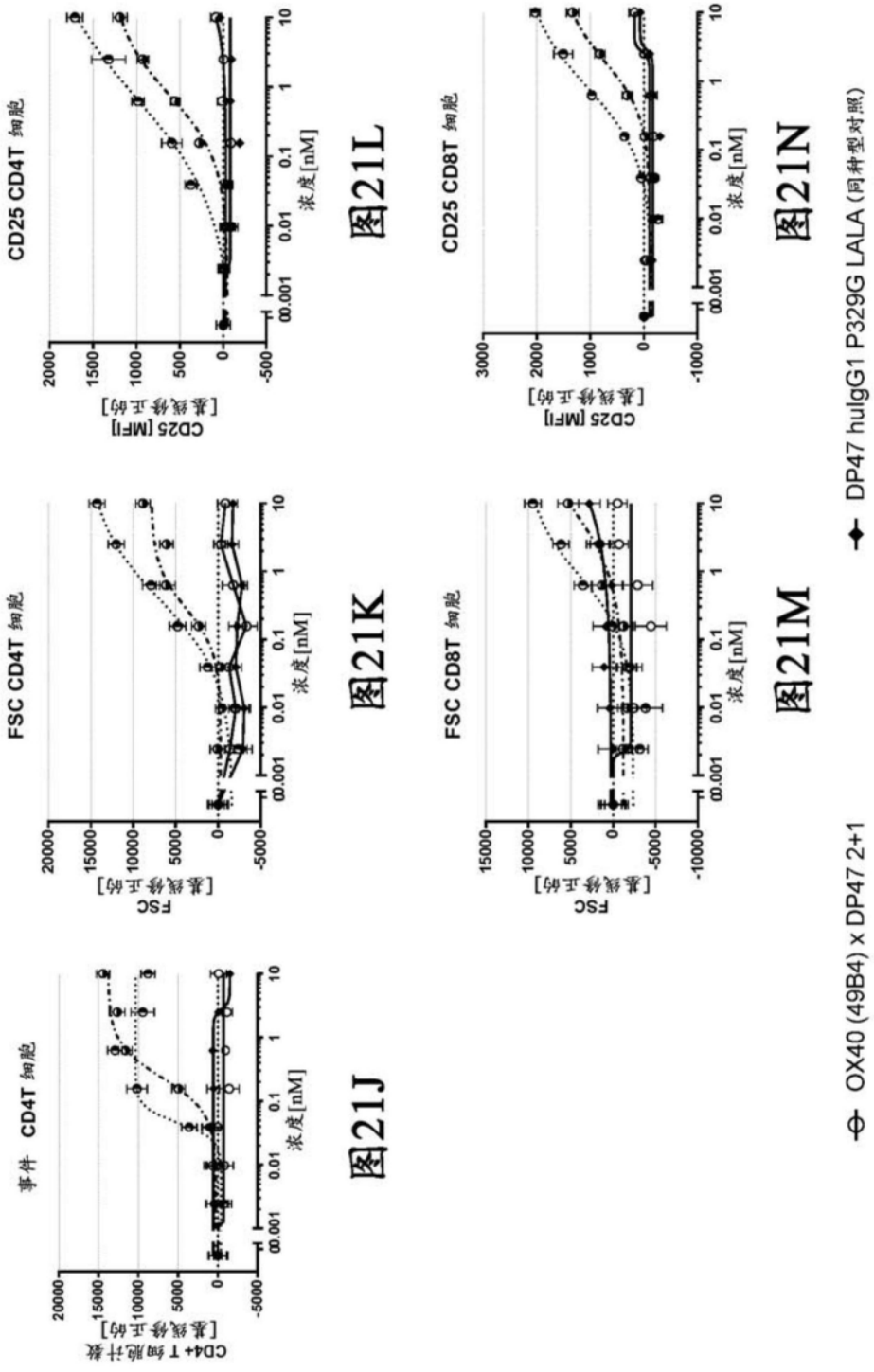


图21C


事件 CD4T 细胞
CD4+ T 细胞计数
[基线修正的]
浓度[nM]
图21D
FSC CD4T 细胞
FSC
[基线修正的]
浓度[nM]
图21E
CD25 CD4T 细胞
CD25 [MFI]
[基线修正的]
浓度[nM]
图21F
FSC CD8T 细胞
FSC
[基线修正的]
浓度[nM]
图21G
CD25 CD8T 细胞
CD25 [MFI]
[基线修正的]
浓度[nM]
图21H
DP47 hulgG1 P329G LALA (同种型对照)
OX40 (49B4) x DP47 2+1
OX40 (49B4) x FAP (28H1) 2+1
OX40 (49B4) x FAP (28H1) 1+1
OX40 (49B4) x FAP (28H1) 2+2


事件 CD4T 细胞
CD4+ T 细胞计数 [基线修正的]
浓度[nM]
图21J
FSC CD4T 细胞
FSC [基线修正的]
浓度[nM]
图21K
FSC CD8T 细胞
FSC [基线修正的]
浓度[nM]
图21M
CD25 CD4T 细胞
CD25 [MFI] [基线修正的]
浓度[nM]
图21L
CD25 CD8T 细胞
CD25 [MFI] [基线修正的]
浓度[nM]
图21N
OX40 (49B4) x DP47 2+1
OX40 (49B4) x FAP (28H1) 2+1
OX40 (49B4) x FAP (4B9) 2+1
DP47 hulgG1 P329G LALA (同种型对照)

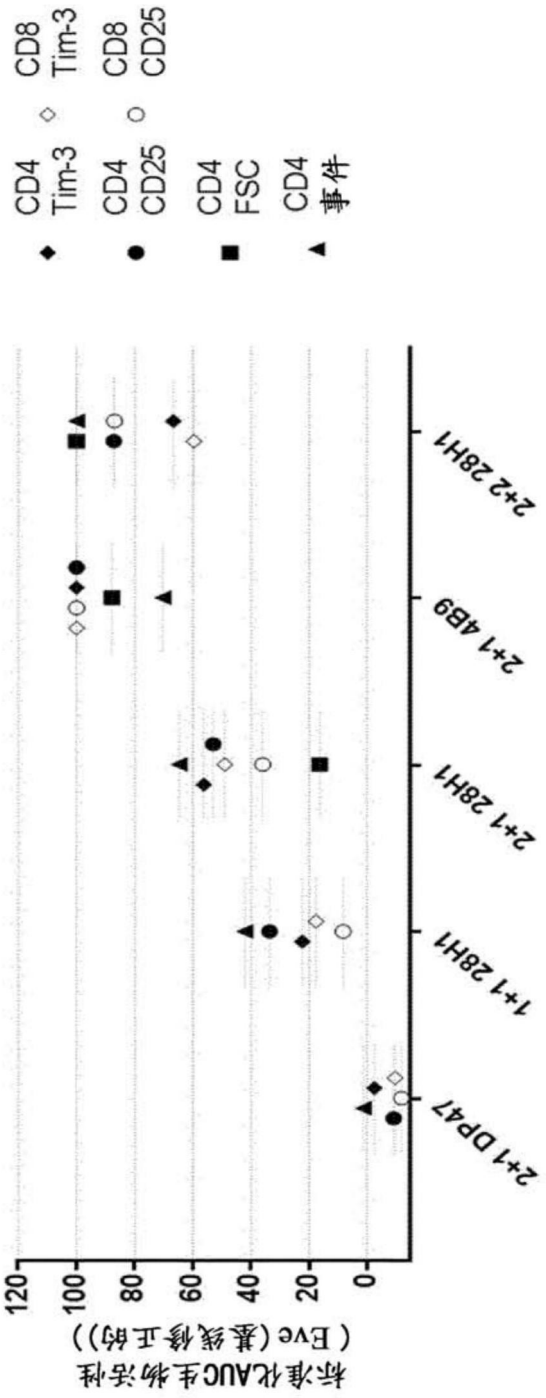
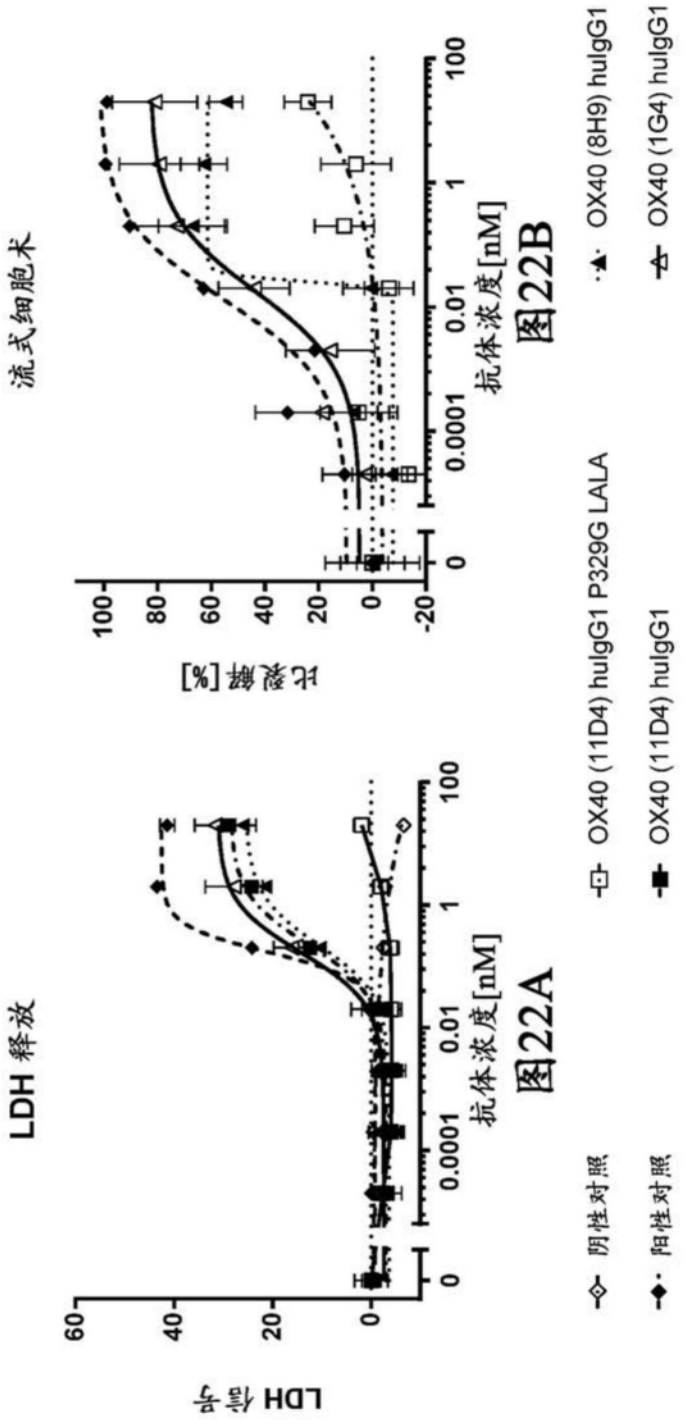

CD8 Tim-3
CD8 CD25
CD4 Tim-3
CD4 CD25
CD4 FSC
CD4 事件
标准化AUC生物活性
(Eve(基线修正的))
120
100
80
60
40
20
0
2+1 DP47
1+1 28H1
2+1 28H1
2+1 4B9
2+2 28H1

图21P


LDH 释放
LDH 信号
60
40
20
0
0
0.0001
0.01
1
100
抗体浓度[nM]
图22A
流式细胞术
比裂解[%]
100
80
60
40
20
0
-20
0
0.0001
0.01
1
100
抗体浓度[nM]
图22B
阴性对照
阳性对照
OX40 (11D4) huIgG1 P329G LALA
OX40 (11D4) huIgG1
OX40 (8H9) huIgG1
OX40 (1G4) huIgG1

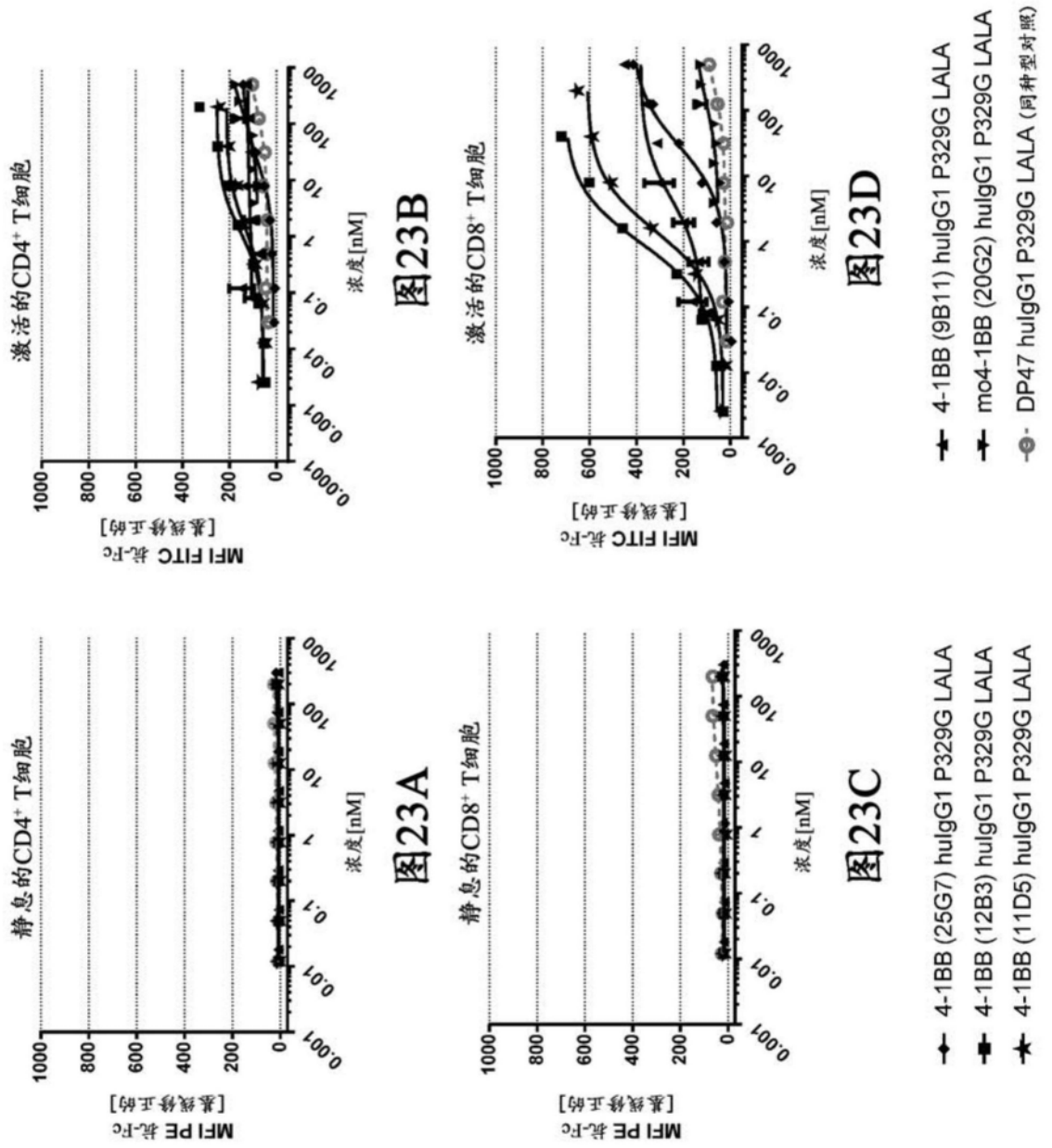

静息的CD4+ T细胞
MFI PE 抗-Fc [基线修正的]
浓度[nM]
图23A
静息的CD8+ T细胞
MFI PE 抗-Fc [基线修正的]
浓度[nM]
图23C
激活的CD4+ T细胞
MFI FITC 抗-Fc [基线修正的]
浓度[nM]
图23B
激活的CD8+ T细胞
MFI FITC 抗-Fc [基线修正的]
浓度[nM]
图23D
4-1BB (25G7) hulgG1 P329G LALA
4-1BB (12B3) hulgG1 P329G LALA
4-1BB (11D5) hulgG1 P329G LALA
4-1BB (9B11) hulgG1 P329G LALA
mo4-1BB (20G2) hulgG1 P329G LALA
DP47 hulgG1 P329G LALA (同种型对照)

图24A

图24B

图24C

图24D

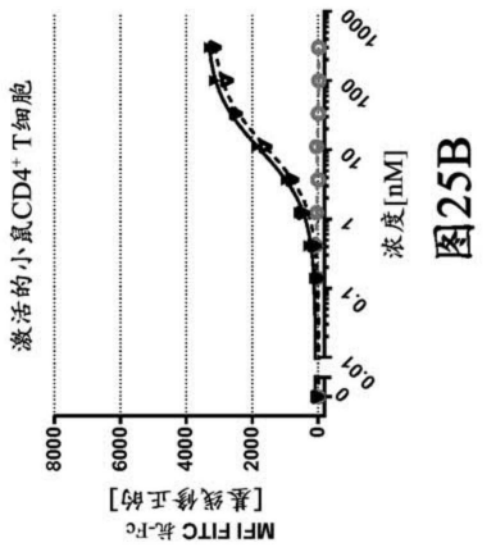


图25A

图25B

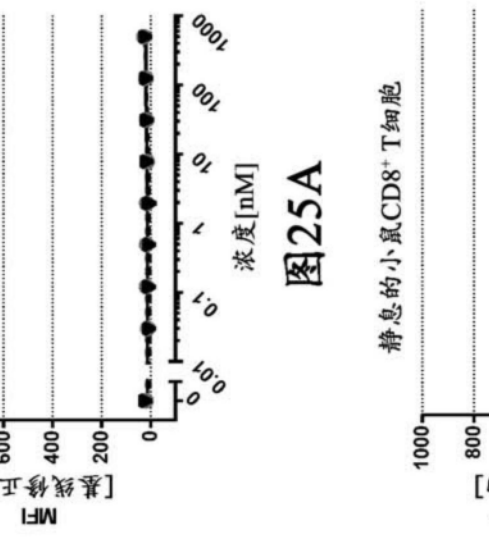


图25C

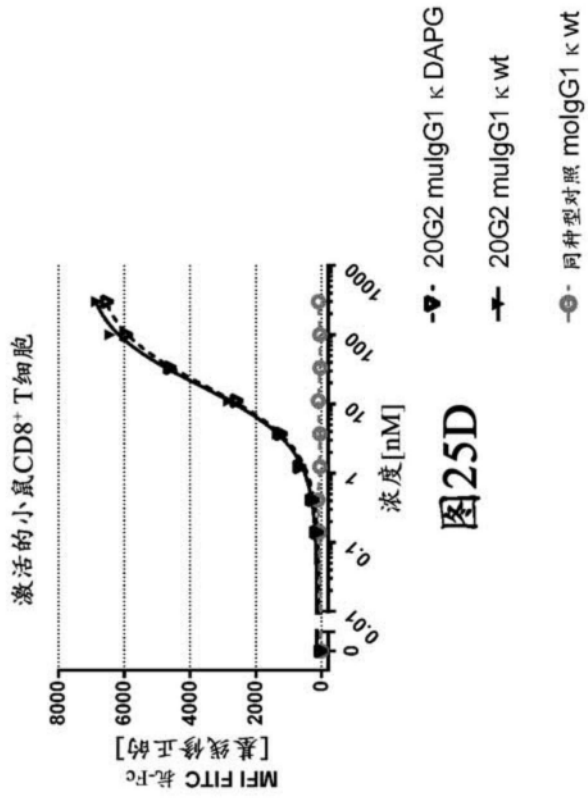
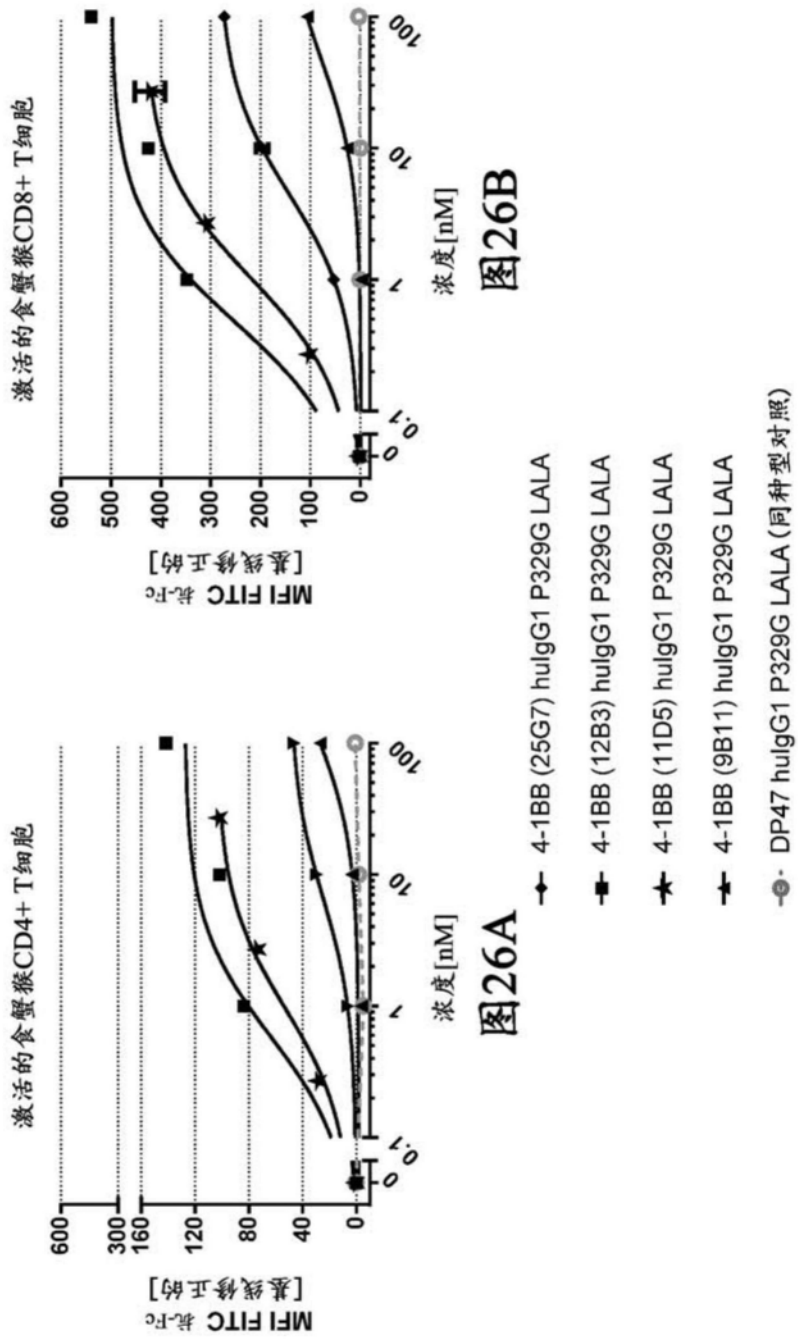


图25D


激活的食蟹猴CD4+ T细胞
MFI FITC 抗-Fc [基线修正的]
600
300
160
120
80
40
0
0
0.1
1
10
100
浓度[nM]
图26A
激活的食蟹猴CD8+ T细胞
MFI FITC 抗-Fc [基线修正的]
600
500
400
300
200
100
0
0
0.1
1
10
100
浓度[nM]
图26B
4-1BB (25G7) hulgG1 P329G LALA
4-1BB (12B3) hulgG1 P329G LALA
4-1BB (11D5) hulgG1 P329G LALA
4-1BB (9B11) hulgG1 P329G LALA
DP47 hulgG1 P329G LALA (同种型对照)

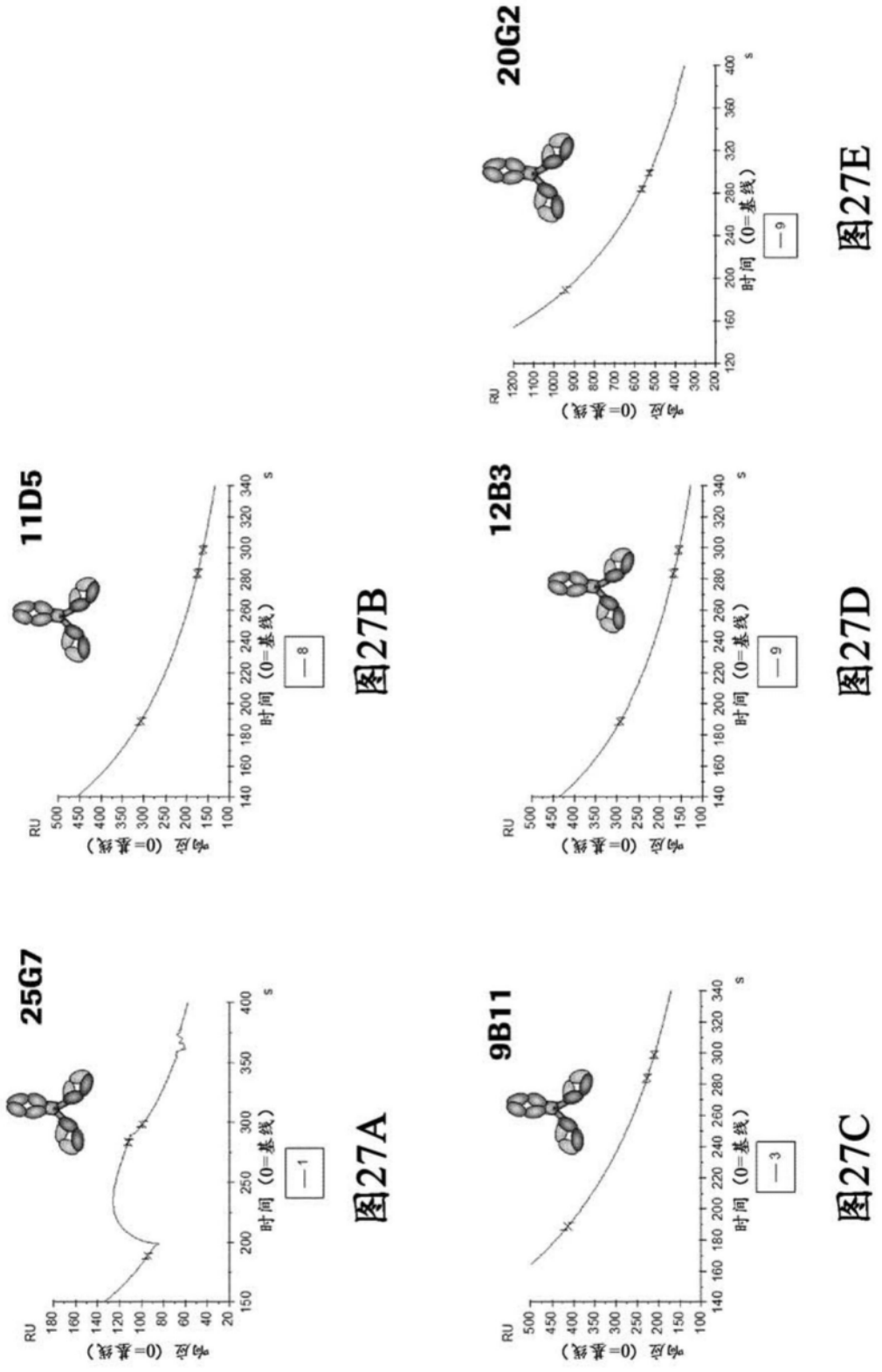


图27A 图27B 图27E

图27C 图27D

图27

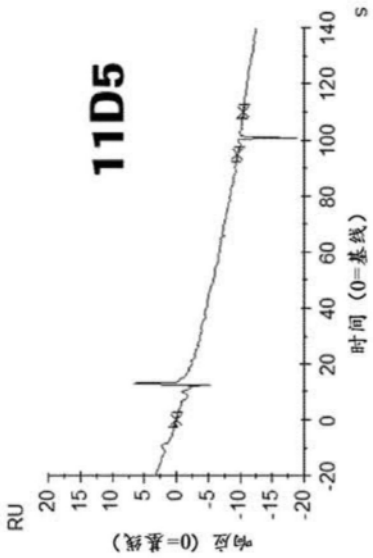


图28B

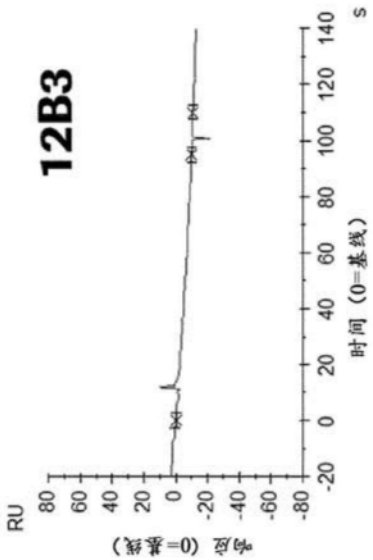


图28A

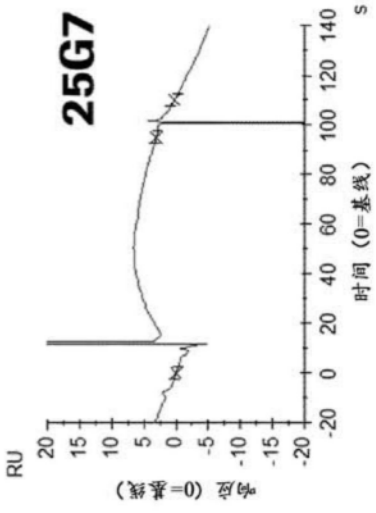


图28C

图28

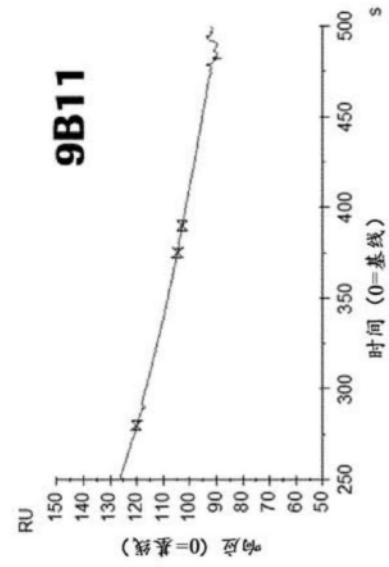


图28E

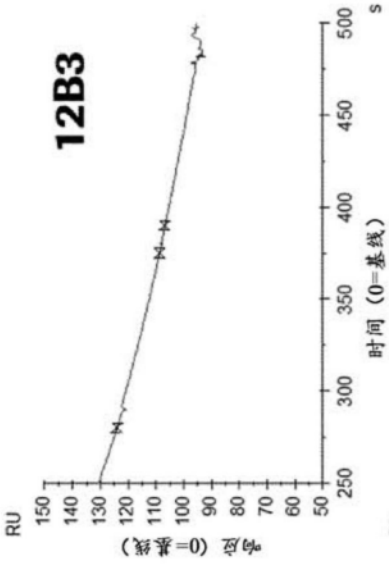


图28D

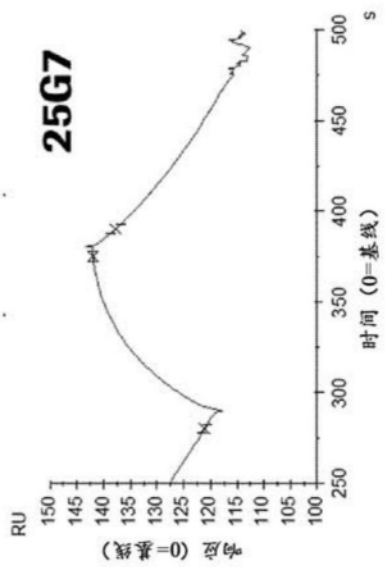


图28F

图28(续)

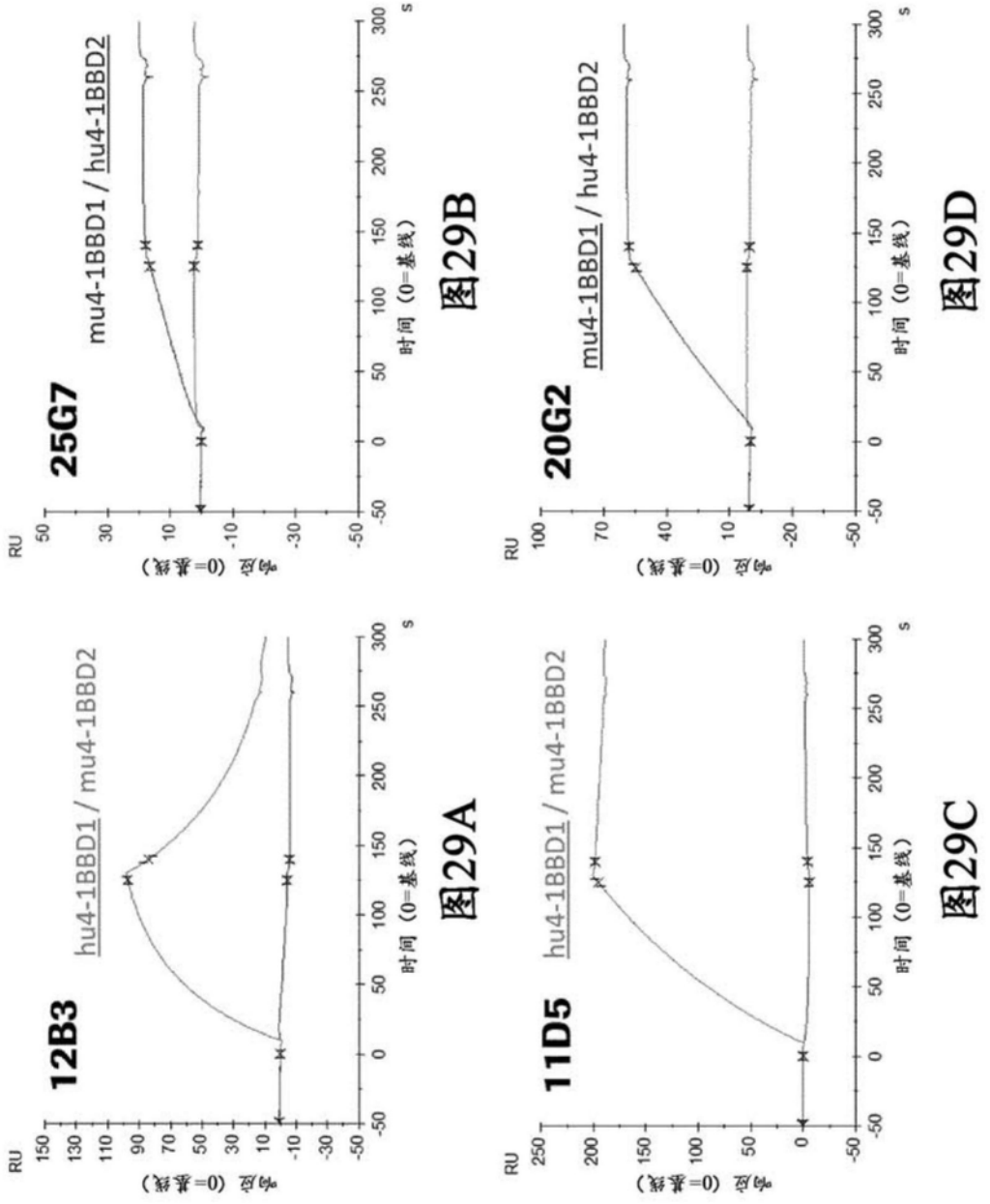

12B3
hu4-1BBD1 / mu4-1BBD2
RU
时间 (0=基线)
s
图29A
25G7
mu4-1BBD1 / hu4-1BBD2
图29B
11D5
hu4-1BBD1 / mu4-1BBD2
图29C
20G2
mu4-1BBD1 / hu4-1BBD2
图29D

图29

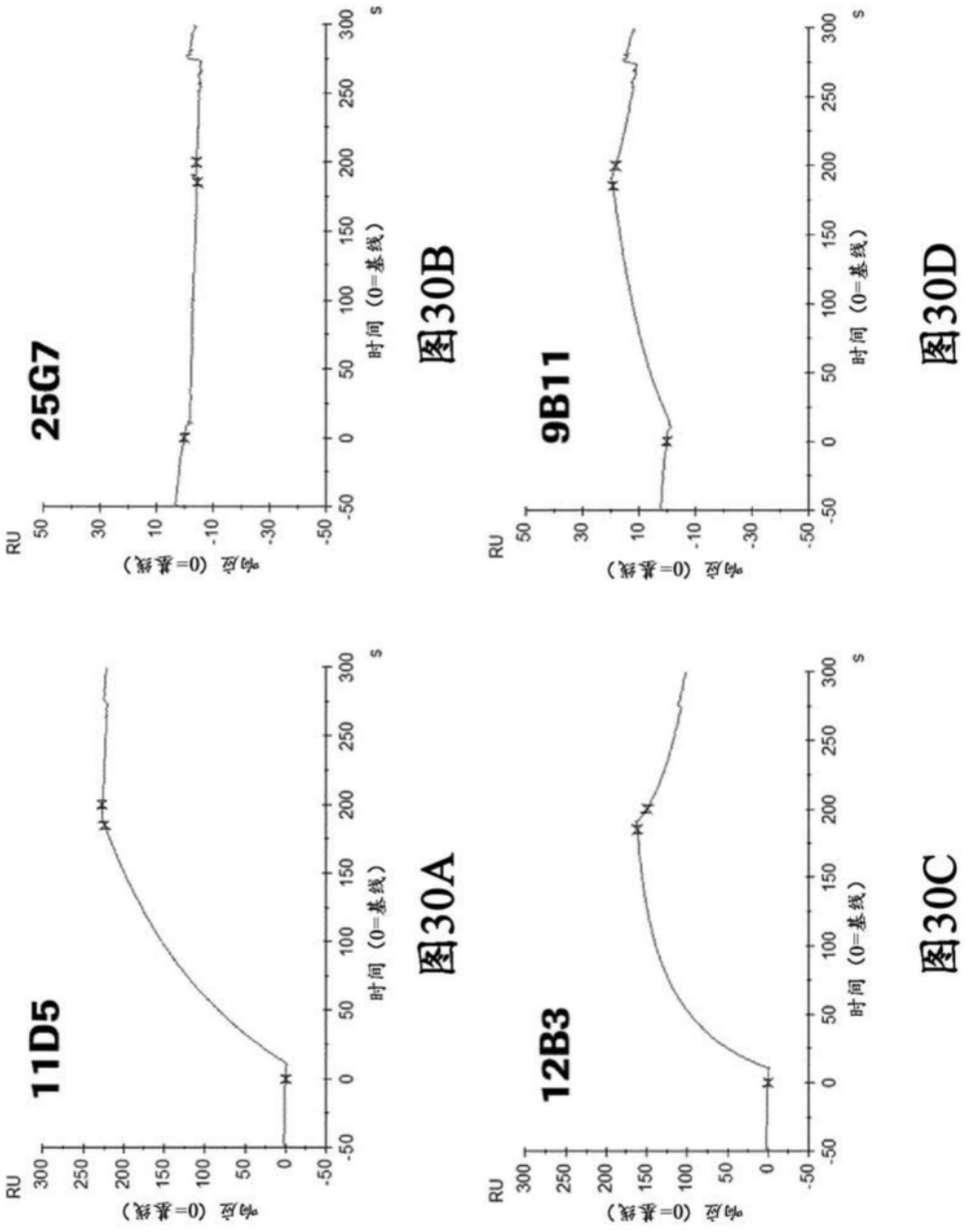


图30

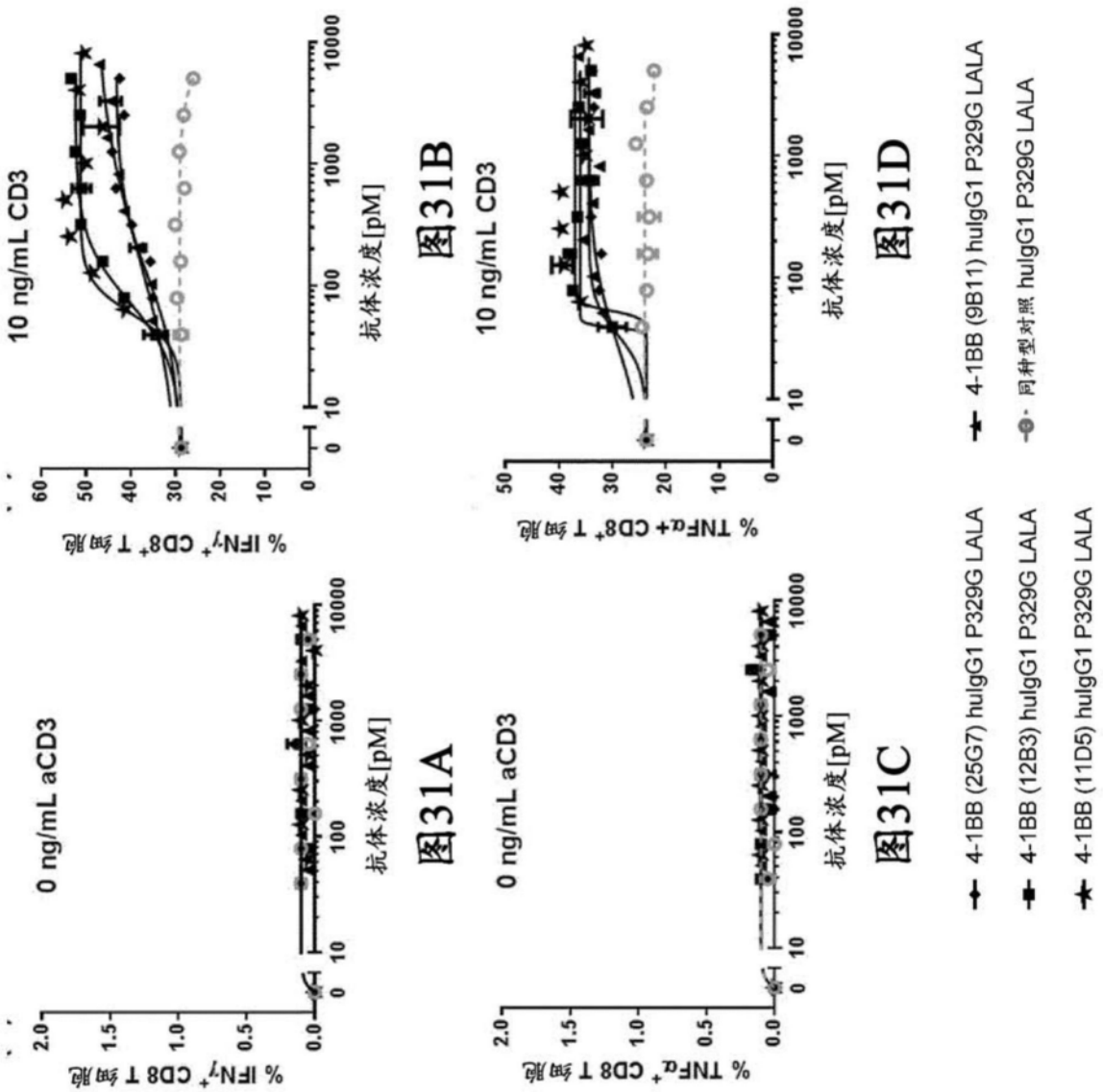

10 ng/mL CD3
% IFNγ+ CD8+ T 细胞
抗体浓度[pM]
图31B
10 ng/mL CD3
% TNFα+ CD8+ T 细胞
抗体浓度[pM]
图31D
0 ng/mL aCD3
% IFNγ+ CD8 T 细胞
抗体浓度[pM]
图31A
0 ng/mL aCD3
% TNFα+ CD8 T 细胞
抗体浓度[pM]
图31C
4-1BB (25G7) hulgG1 P329G LALA
4-1BB (12B3) hulgG1 P329G LALA
4-1BB (11D5) hulgG1 P329G LALA
4-1BB (9B11) hulgG1 P329G LALA
同种型对照 hulgG1 P329G LALA

图31

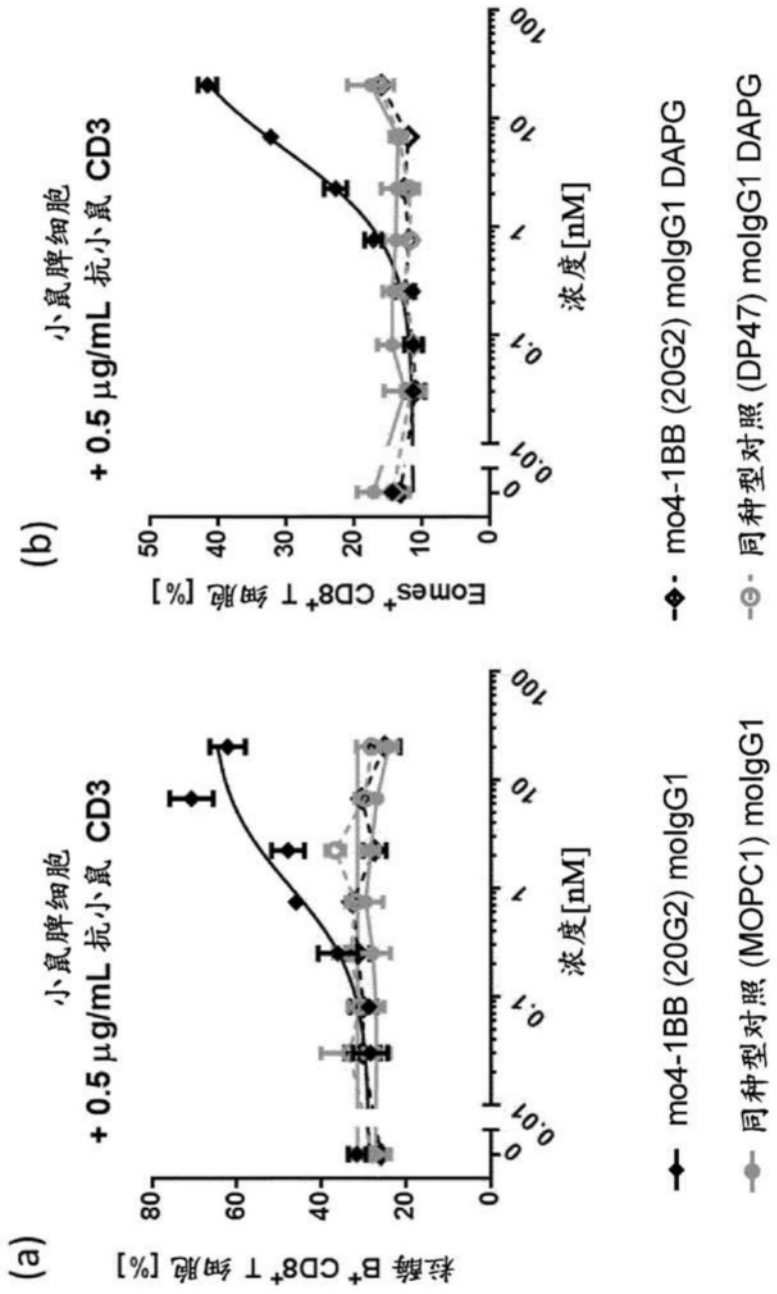

(a)
小鼠脾细胞
+ 0.5 µg/mL 抗小鼠 CD3
粒酶 B+ CD8+ T 细胞 [%]
浓度[nM]
mo4-1BB (20G2) molgG1
同种型对照 (MOPC1) molgG1
(b)
小鼠脾细胞
+ 0.5 µg/mL 抗小鼠 CD3
Eomes+ CD8+ T 细胞 [%]
浓度[nM]
mo4-1BB (20G2) molgG1 DAPG
同种型对照 (DP47) molgG1 DAPG

图32

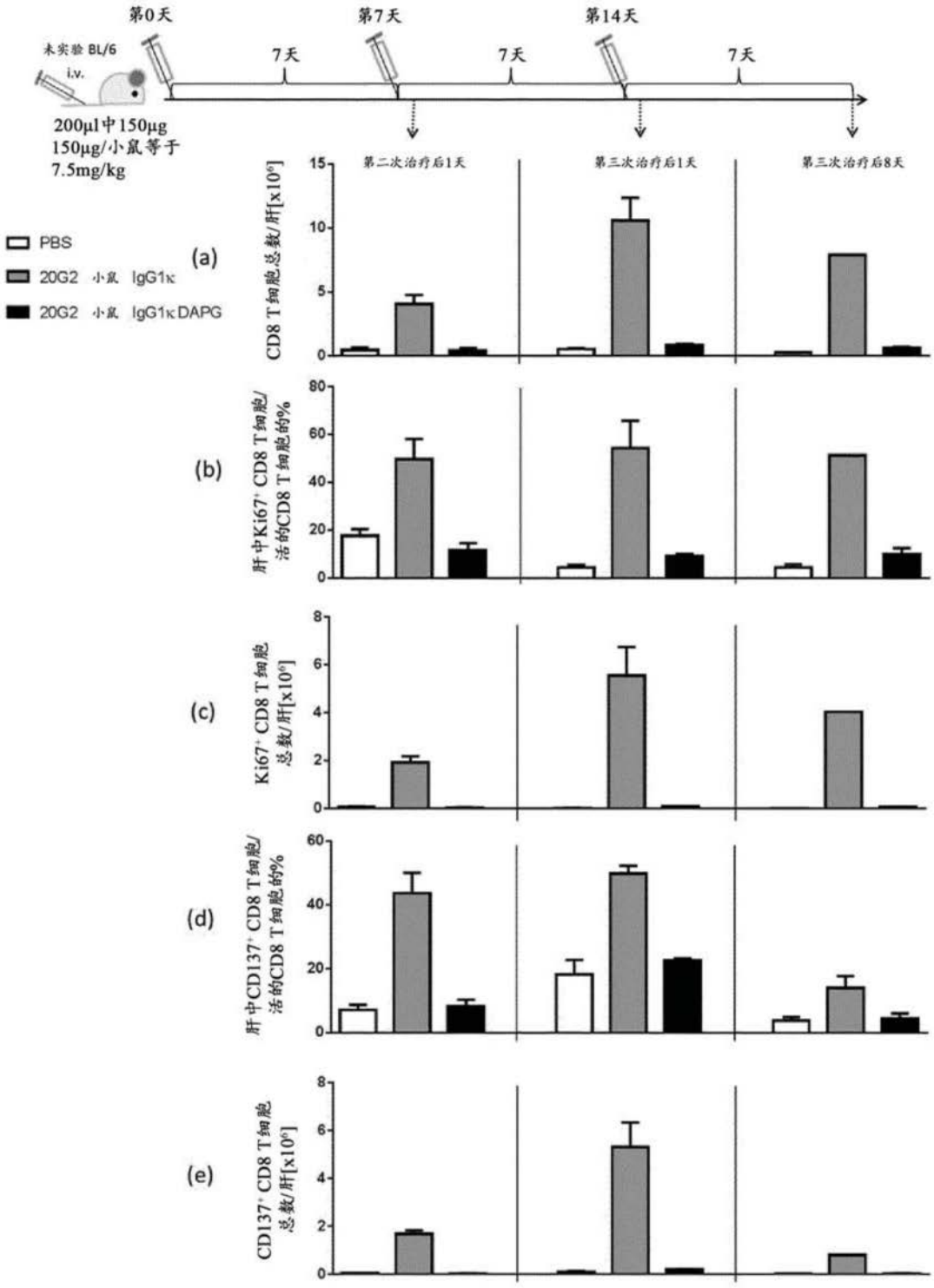

第0天
第7天
第14天
7天
7天
7天
未实验 BL/6
i.v.
200μl中150μg
150μg/小鼠等于
7.5mg/kg
PBS
20G2 小鼠 IgG1κ
20G2 小鼠 IgG1κ DAPG
第二次治疗后1天
第三次治疗后1天
第三次治疗后8天
(a)
CD8 T细胞总数/肝[x10⁶]
(b)
肝中Ki67⁺ CD8 T细胞/活的CD8 T细胞的%
(c)
Ki67⁺ CD8 T细胞总数/肝[x10⁶]
(d)
肝中CD137⁺ CD8 T细胞/活的CD8 T细胞的%
(e)
CD137⁺ CD8 T细胞总数/肝[x10⁶]

图33

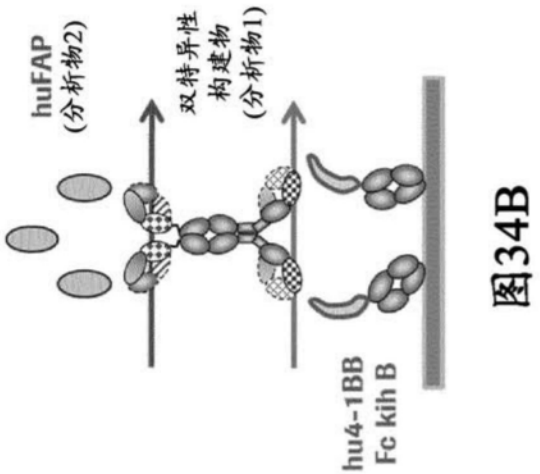


图34B

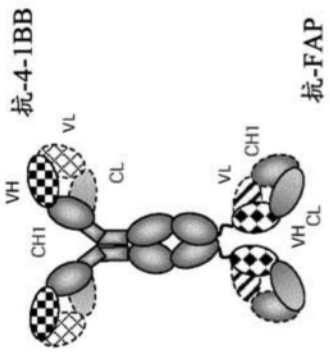


图34A

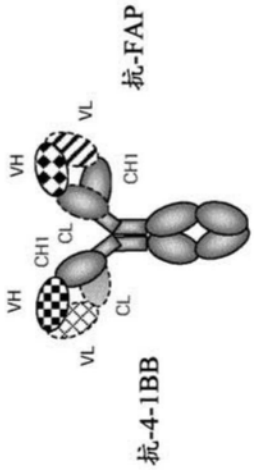


图34C

图34

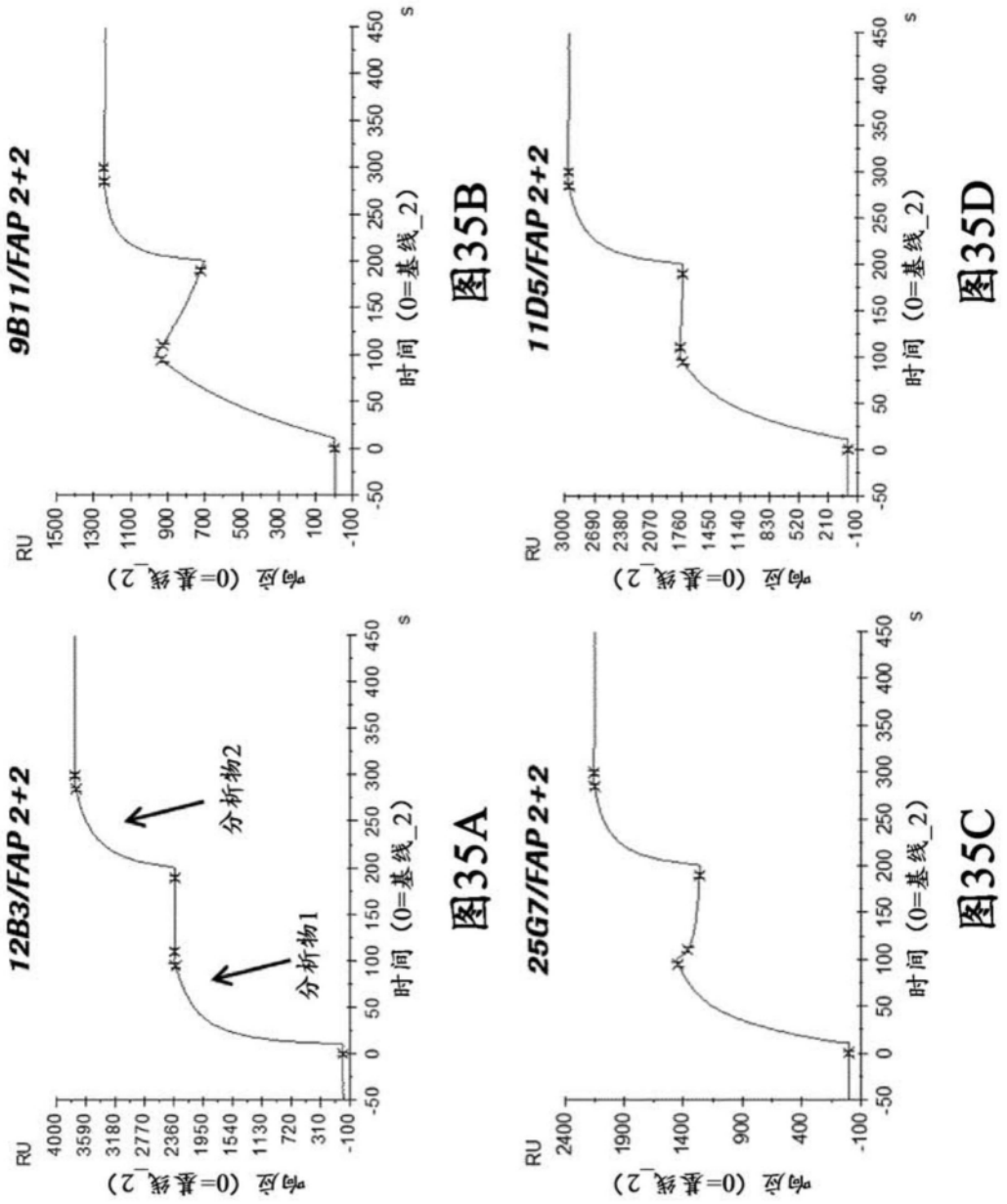

12B3/FAP 2+2
9B11/FAP 2+2
11D5/FAP 2+2
25G7/FAP 2+2
RU
时间 (0=基线_2)
s
分析物1
分析物2
图35A
图35B
图35C
图35D

图35

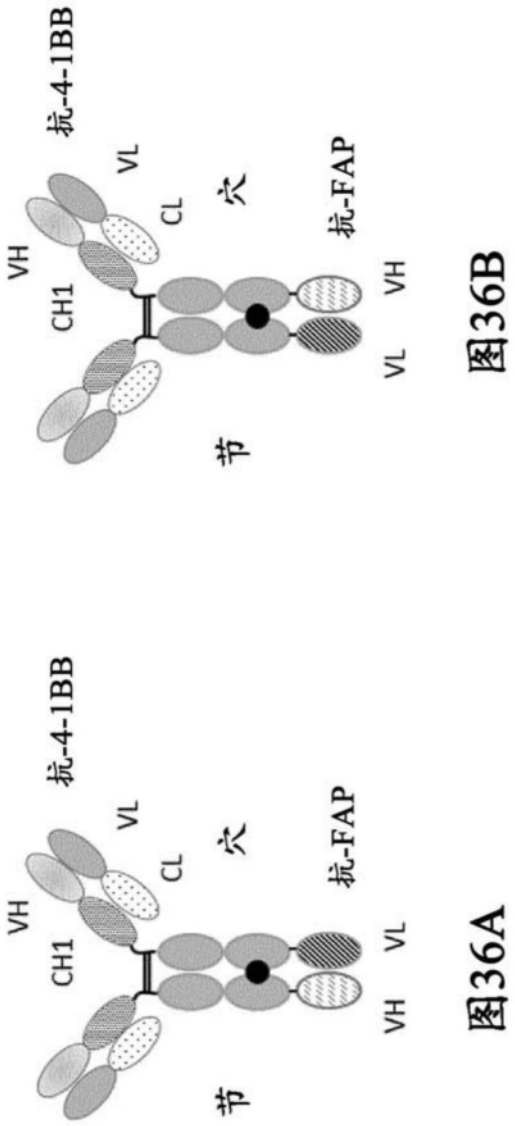
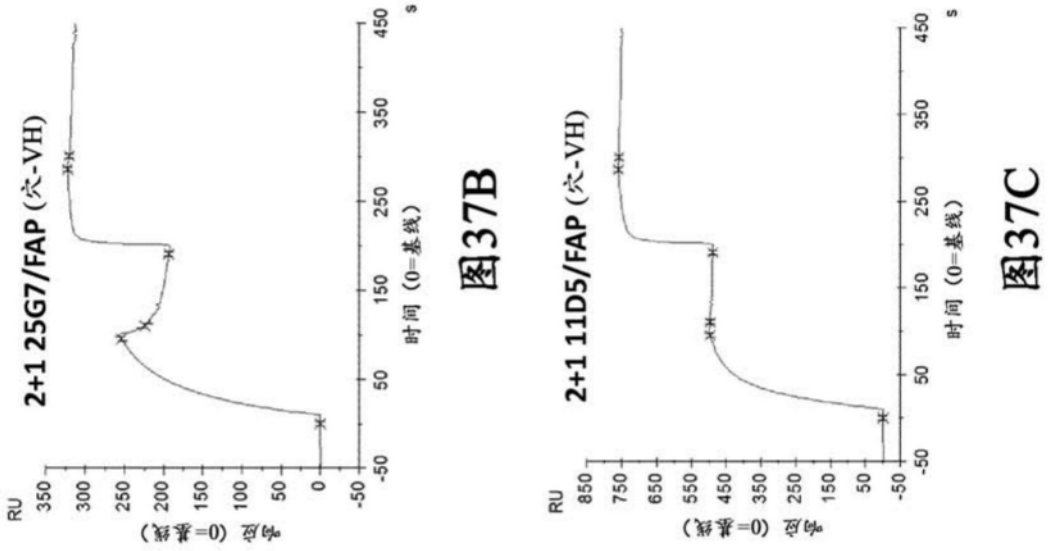

抗-4-1BB
VH
CH1
VL
CL
穴
抗-FAP
VH
VL
节
图36B
抗-4-1BB
VH
CH1
VL
CL
穴
抗-FAP
VH
VL
节
图36A

图36


2+1 25G7/FAP (穴-VH)
RU
350
300
250
200
150
100
50
0
-50
-50
50
150
250
350
450
s
时间 (0=基线)
响应 (0=基线)
图37B
2+1 11D5/FAP (穴-VH)
RU
850
750
650
550
450
350
250
150
50
-50
-50
50
150
250
350
450
s
时间 (0=基线)
响应 (0=基线)
图37C

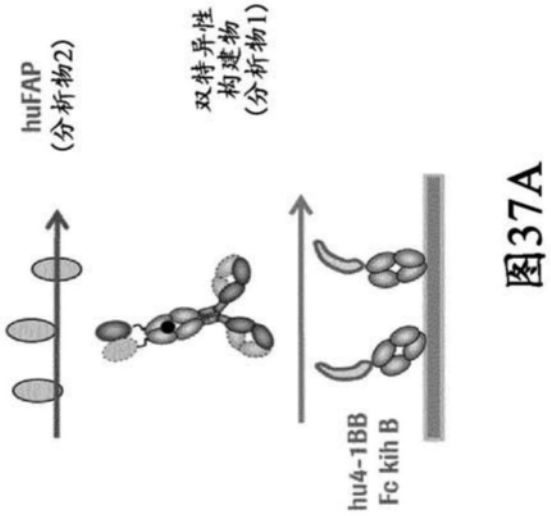

huFAP
(分析物2)
双特异性
构建物
(分析物1)
hu4-1BB
Fc kih B
图37A

图37

图38A

图38C

图38B

图38D

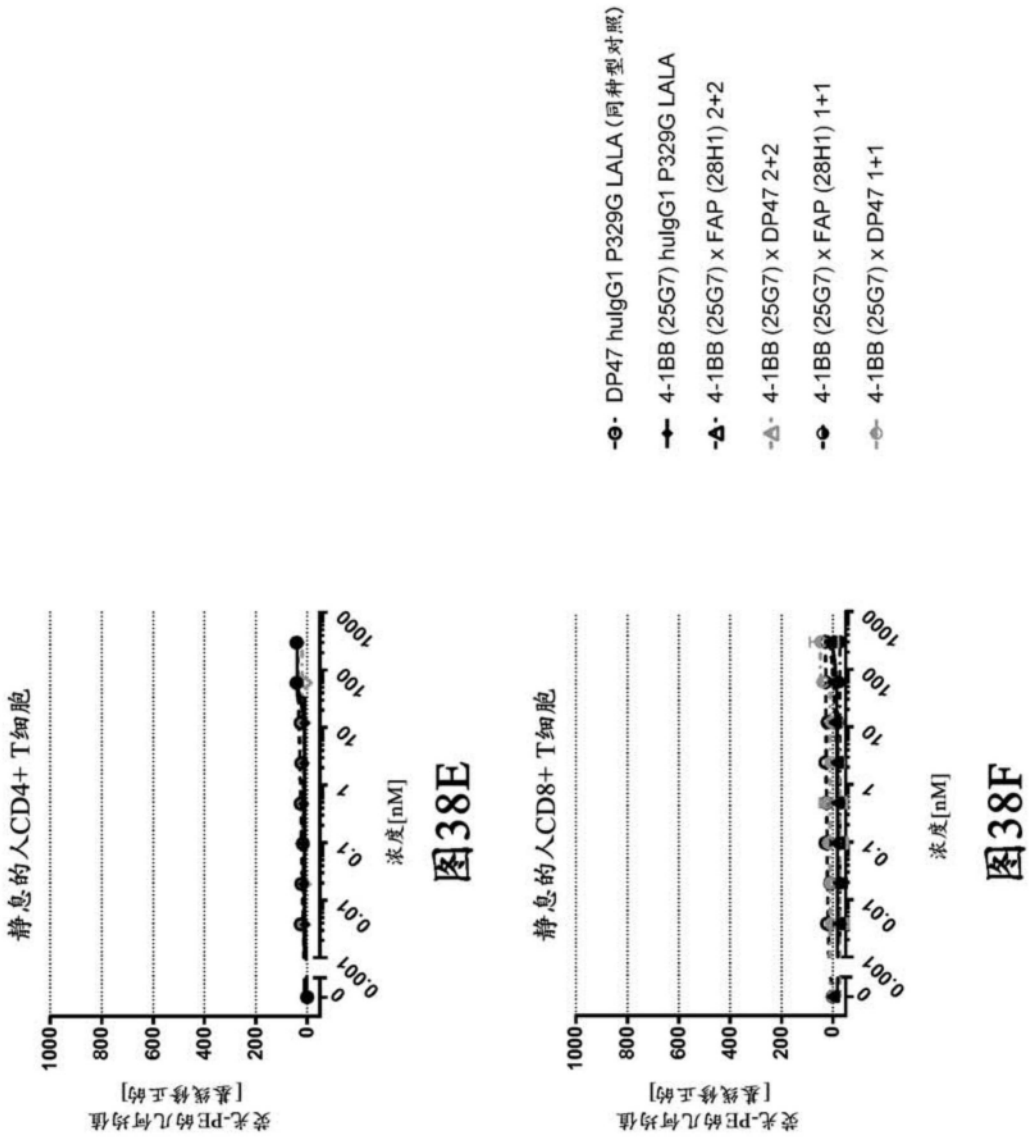

静息的人CD4+ T细胞
荧光-PE的几何均值
[基线修正的]
1000
800
600
400
200
0
浓度[nM]
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
DP47 hulgG1 P329G LALA (同种型对照)
4-1BB (25G7) hulgG1 P329G LALA
4-1BB (25G7) x FAP (28H1) 2+2
4-1BB (25G7) x DP47 2+2
4-1BB (25G7) x FAP (28H1) 1+1
4-1BB (25G7) x DP47 1+1
静息的人CD8+ T细胞
荧光-PE的几何均值
[基线修正的]
浓度[nM]

图38E

图38F

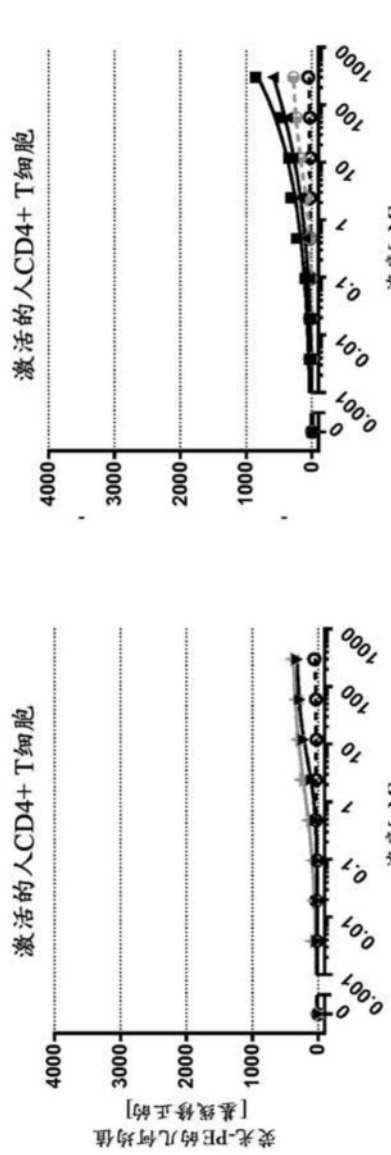


图39A

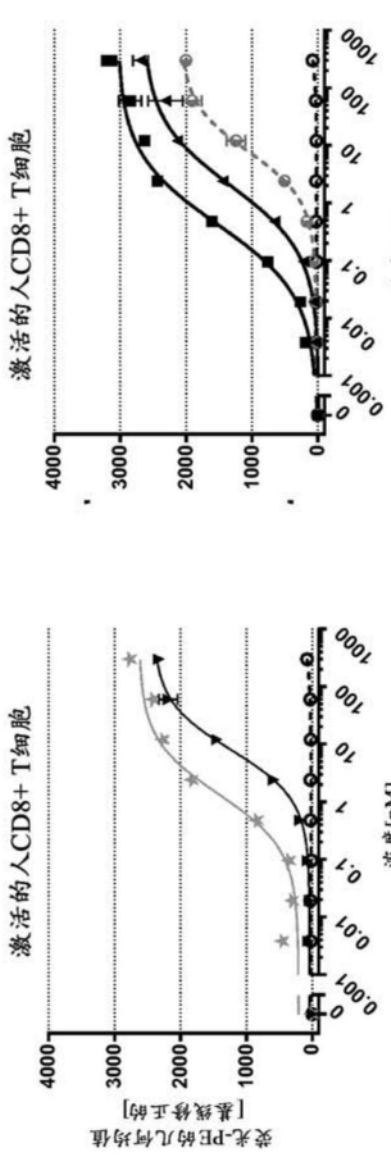


图39B

图39C



图39D

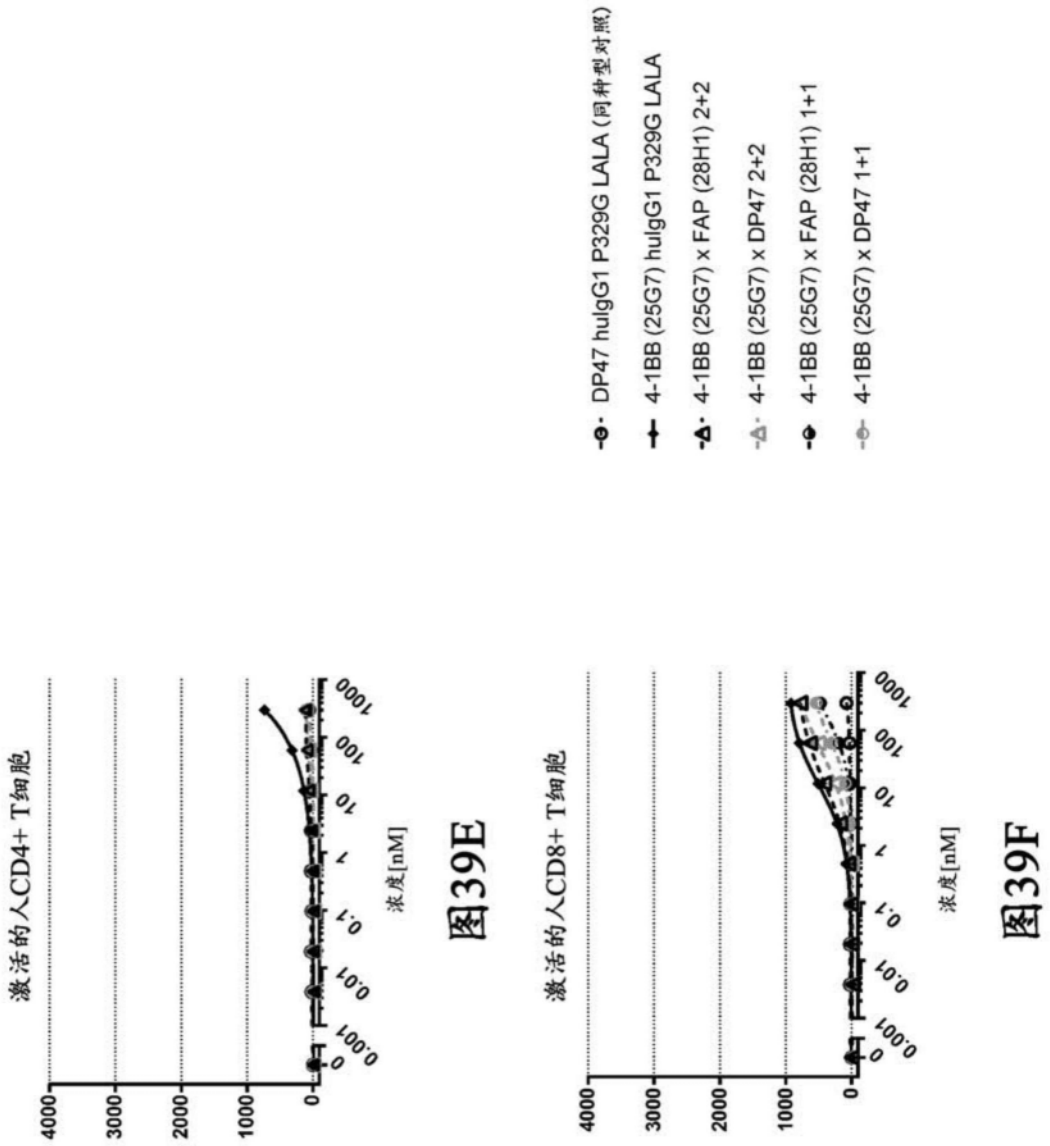

DP47 hulgG1 P329G LALA (同种型对照)
4-1BB (25G7) hulgG1 P329G LALA
4-1BB (25G7) x FAP (28H1) 2+2
4-1BB (25G7) x DP47 2+2
4-1BB (25G7) x FAP (28H1) 1+1
4-1BB (25G7) x DP47 1+1
激活的人CD4+ T细胞
激活的人CD8+ T细胞
浓度[nM]
浓度[nM]

图39E

图39F

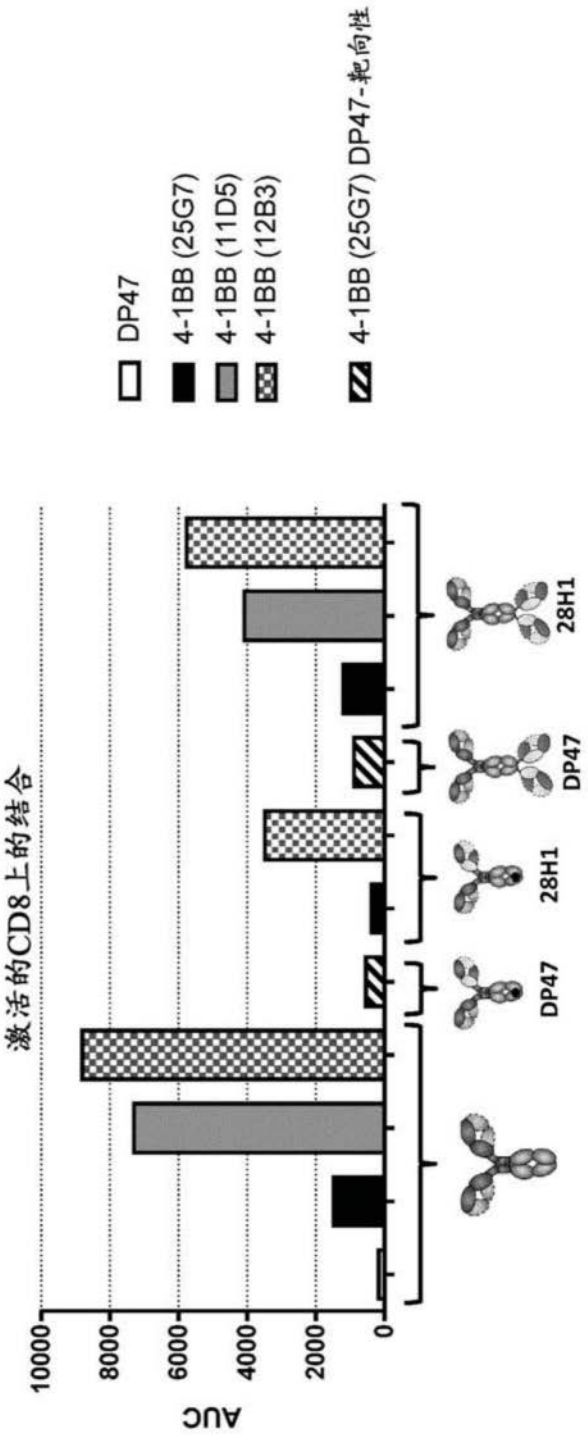

DP47
4-1BB (25G7)
4-1BB (11D5)
4-1BB (12B3)
4-1BB (25G7) DP47-靶向性
激活的CD8上的结合
AUC
0
2000
4000
6000
8000
10000
DP47
28H1
DP47
28H1

图40

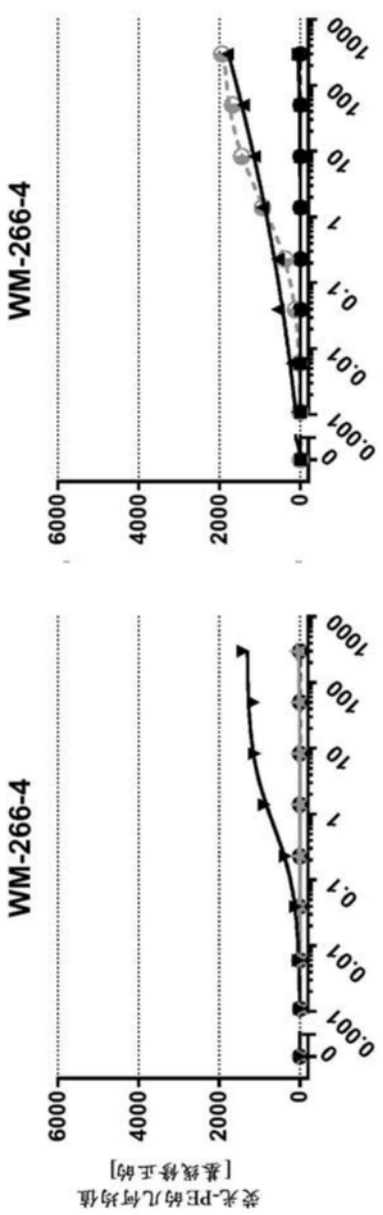


图41A

图41B

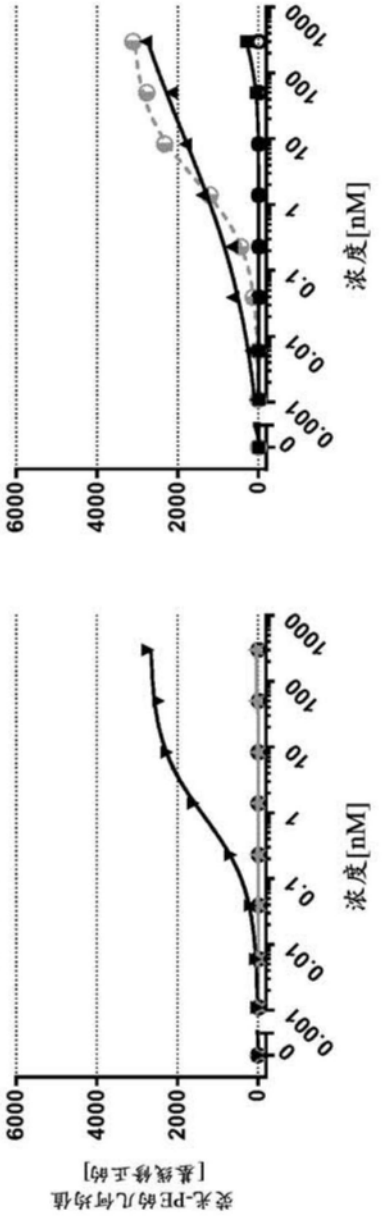


图41C

图41D

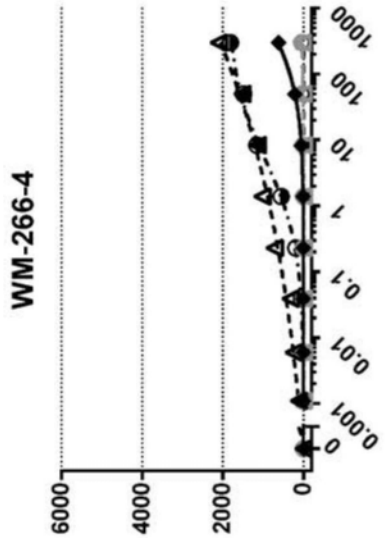

WM-266-4
6000
4000
2000
0
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000

图41E

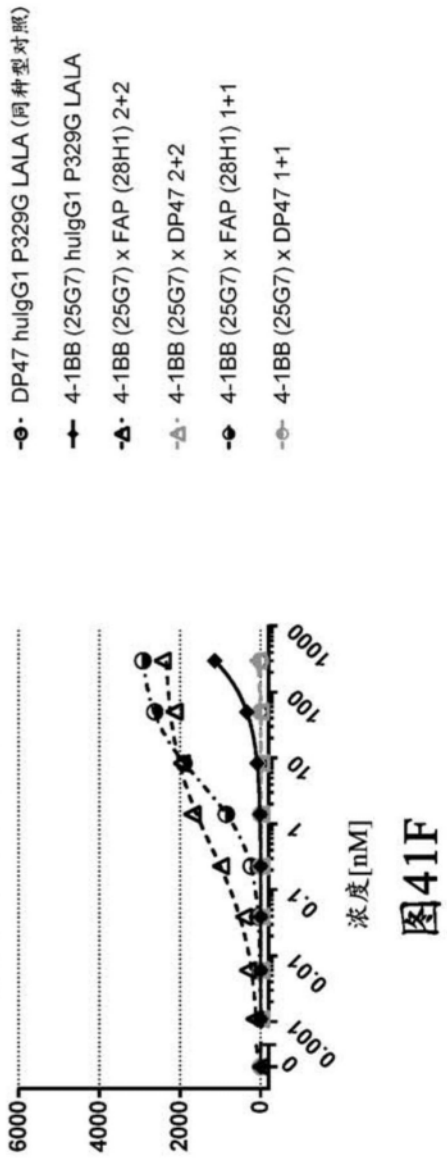

DP47 hulgG1 P329G LALA (同种型对照)
4-1BB (25G7) hulgG1 P329G LALA
4-1BB (25G7) x FAP (28H1) 2+2
4-1BB (25G7) x DP47 2+2
4-1BB (25G7) x FAP (28H1) 1+1
4-1BB (25G7) x DP47 1+1
NIH/3T3-huFAP 克隆 19
6000
4000
2000
0
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
浓度[nM]

图41F

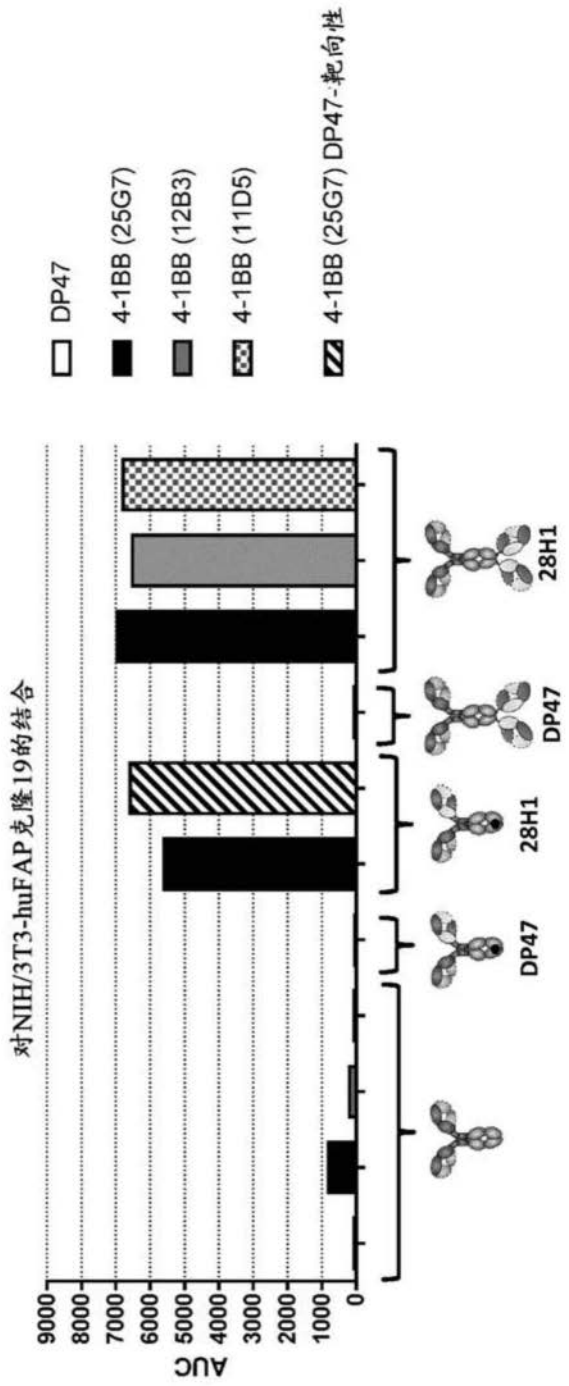

DP47
4-1BB (25G7)
4-1BB (12B3)
4-1BB (11D5)
4-1BB (25G7) DP47-靶向性
对NIH/3T3-huFAP克隆19的结合
AUC
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
DP47
28H1
DP47
28H1

图42

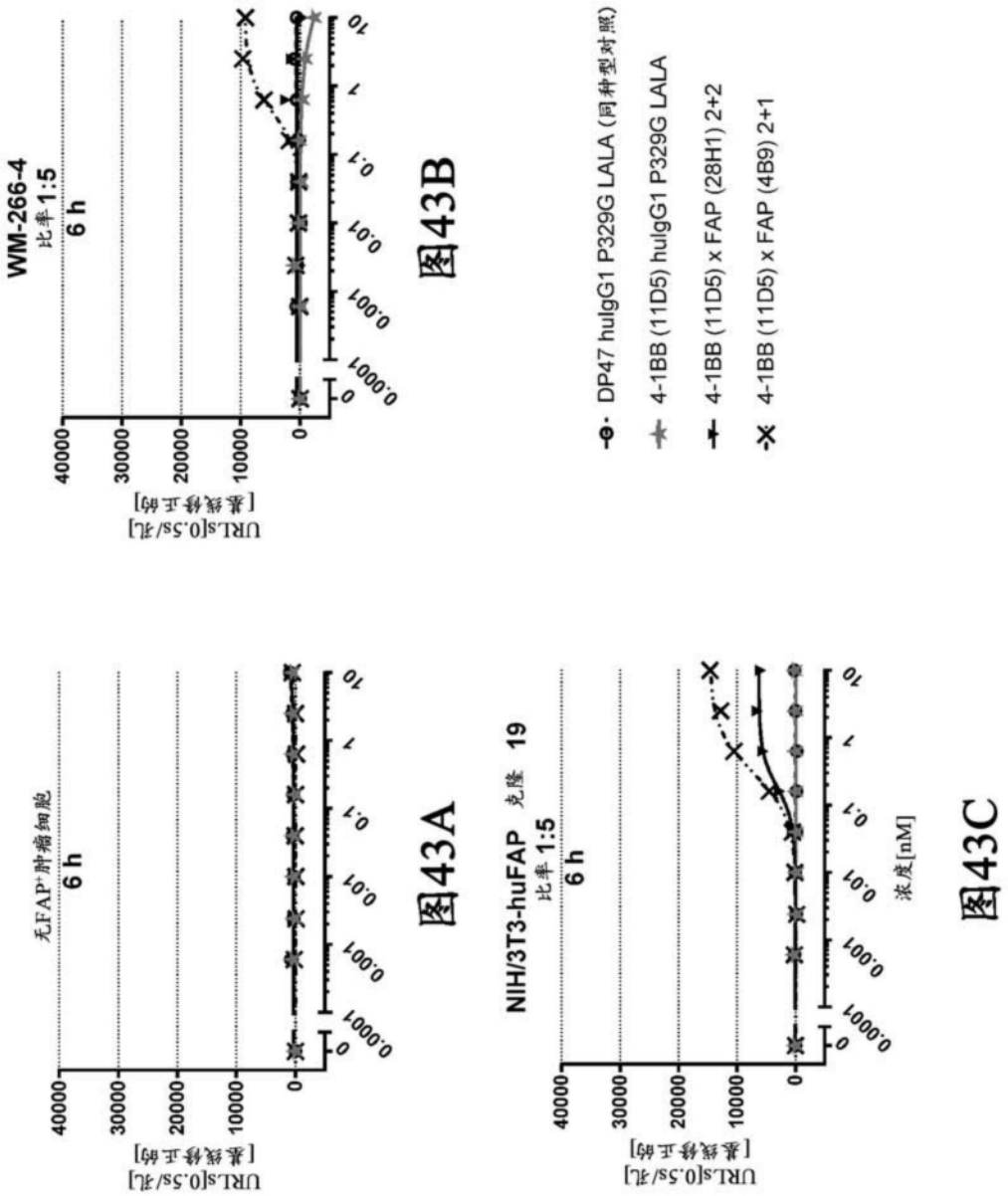

WM-266-4
比率1:5
6 h
URLs[0.5s/孔]
[基线修正的]
40000
30000
20000
10000
0
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
0
浓度[nM]
DP47 huIgG1 P329G LALA (同种型对照)
4-1BB (11D5) huIgG1 P329G LALA
4-1BB (11D5) x FAP (28H1) 2+2
4-1BB (11D5) x FAP (4B9) 2+1
图43B
无FAP+肿瘤细胞
6 h
图43A
NIH/3T3-huFAP 克隆 19
比率1:5
6 h
图43C

图43

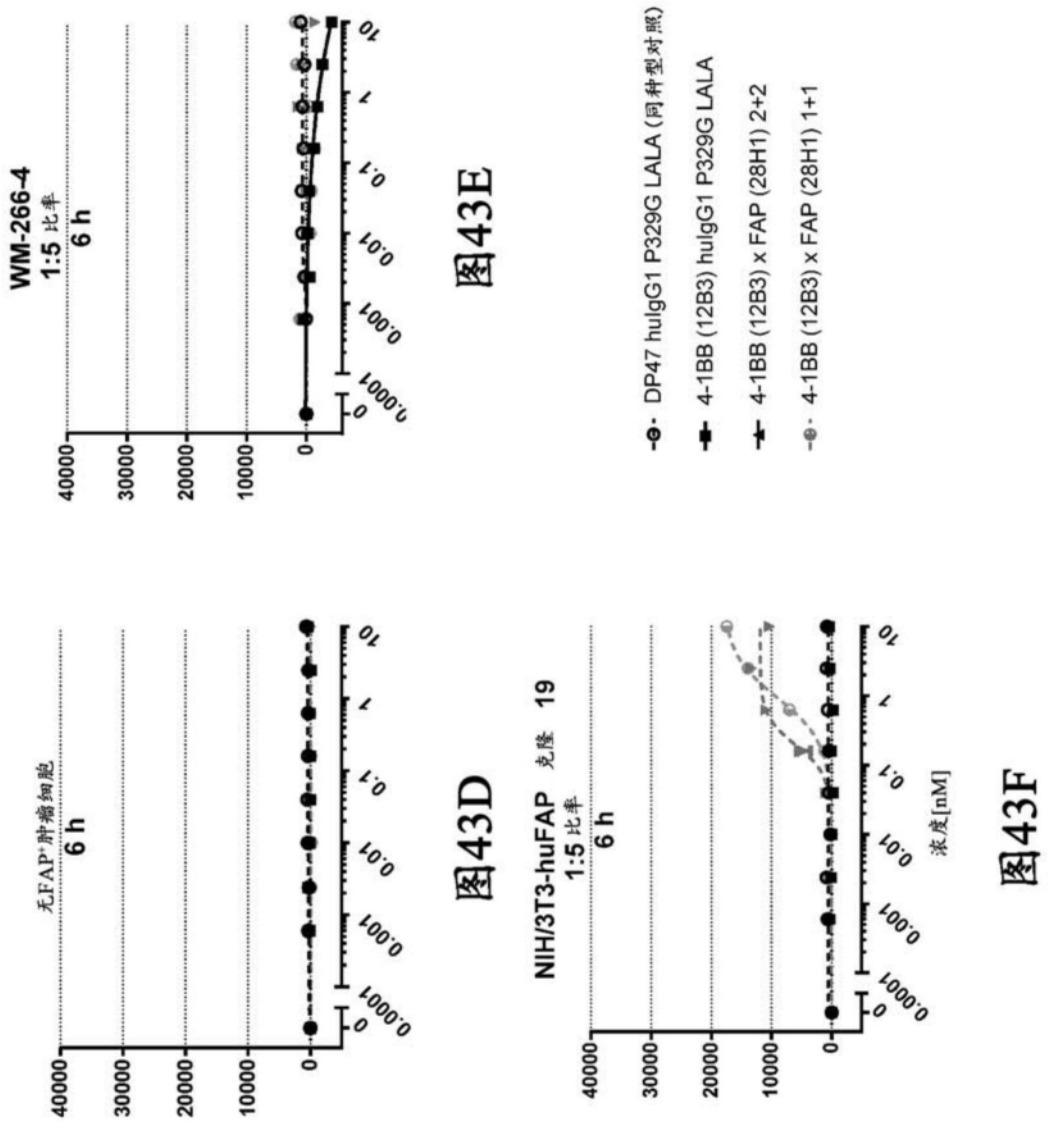

WM-266-4
1:5 比率
6 h
40000
30000
20000
10000
0
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
0
DP47 hulgG1 P329G LALA (同种型对照)
4-1BB (12B3) hulgG1 P329G LALA
4-1BB (12B3) x FAP (28H1) 2+2
4-1BB (12B3) x FAP (28H1) 1+1
图43E
无FAP+肿瘤细胞
6 h
图43D
NIH/3T3-huFAP 克隆 19
1:5 比率
6 h
浓度[nM]
图43F

图43(续)

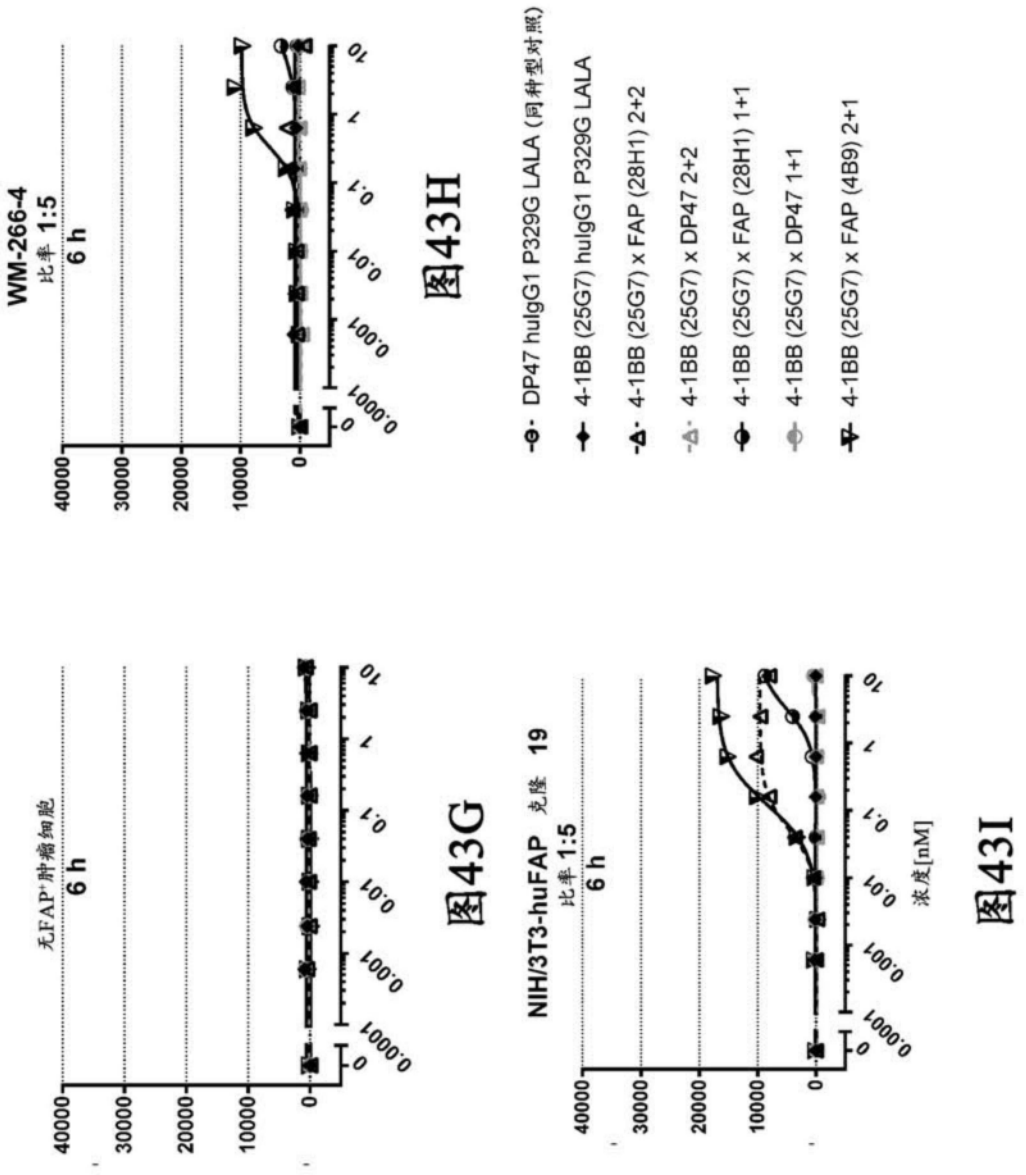

WM-266-4
比率 1:5
6 h
40000
30000
20000
10000
0
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
0
DP47 hulgG1 P329G LALA (同种型对照)
4-1BB (25G7) hulgG1 P329G LALA
4-1BB (25G7) x FAP (28H1) 2+2
4-1BB (25G7) x DP47 2+2
4-1BB (25G7) x FAP (28H1) 1+1
4-1BB (25G7) x DP47 1+1
4-1BB (25G7) x FAP (4B9) 2+1
图43H
无FAP+肿瘤细胞
6 h
图43G
NIH/3T3-huFAP 克隆 19
比率 1:5
6 h
浓度[nM]
图43I

图43(续)

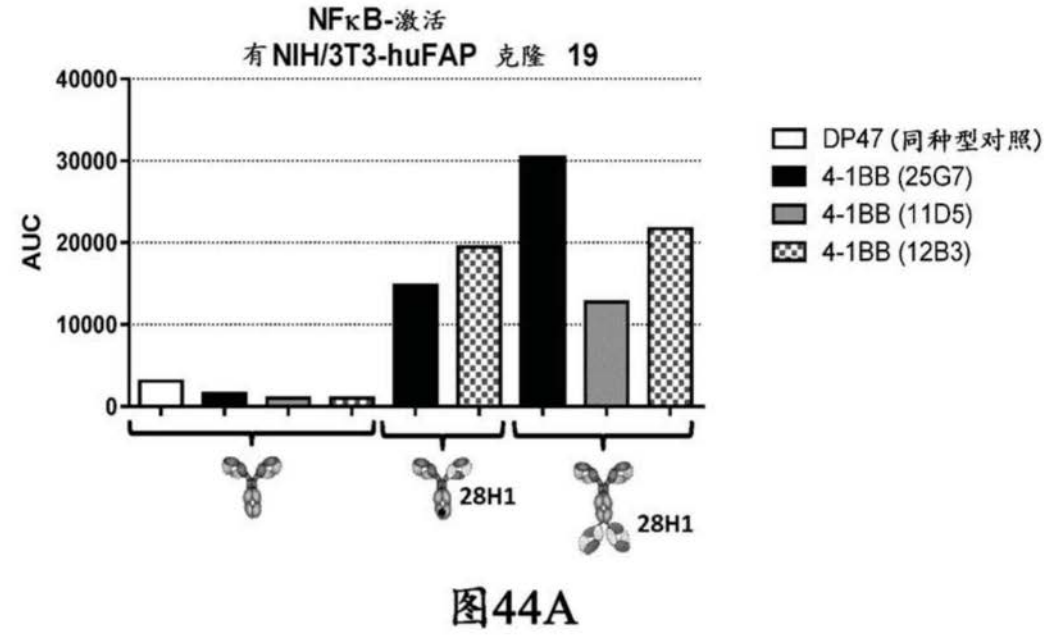


图44A

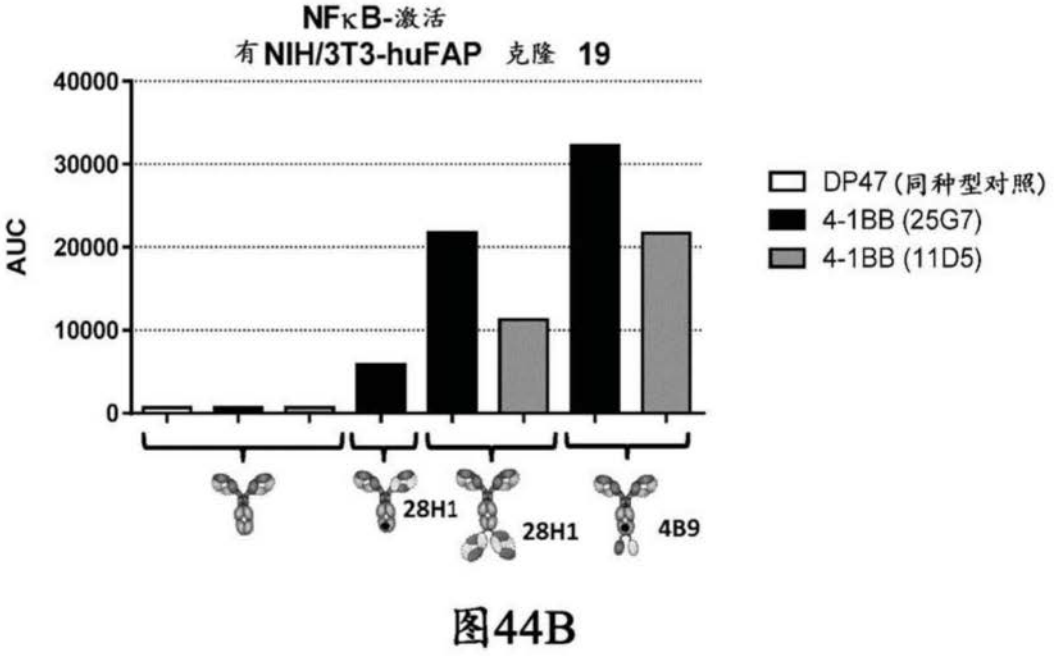


图44B

图44